

日本熱帯医学会雑誌

Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene

第10巻 第3,4号

昭和57年12月15日

内 容

原 著

- トキソプラズマ免疫マウス血清由来加水分解物質 (HS-LKs) の異種細胞内トキソプラズマ殺滅効果 (英文)
 ……桜井 治久, 佐藤 基佳, 広瀬 恒夫, 小俣 吉孝, 斉藤 篤志, 鈴木 直義 183-195
- 京都市内深泥ヶ池におけるアシマダラスマカとキンイロヌマカの生態学的研究
 ……岩城 操 197-205
- 蛇毒の酵素化学的研究 (第11報), タイワンハブ毒よりアルギニンエステル水解酵素 (ME-4) の精製およびその性質
 ……杉原 久義, 鬼頭 玲子, 二改 俊章, 酒井 恵美 207-217
- 常時照明および常時暗黒条件飼育におけるフィラリア *D. viteae* の中間宿主アフリカ産ダニ *Ornithodoros moubata* の生活環について
 ……水野不二男, 野上 貞雄, 圓橋 正秀, 松村 武男 219-227
- 亜熱帯人と温帯人との高温曝露時の生理的反応の比較 (英文)
 ……堀 清記, 飯塚平吉郎, 中村 正 229-237
- グアテマラのオンコセルカ症流行地における4種のブユの牛に対する吸血活動の日周性について (英文)
 ……橋口 義久, 多田 功, Flores C. O., 高岡 宏行 239-244
- ビオチン, アビジン, ペルオキシダーゼ法 (免疫酵素抗体法) による狂犬病ウイルス感染価の迅速測定法とそのウイルス中和抗体測定への応用 (英文)
 ……七條 明久, 三舟求真人, 林 慧君 245-251

学術記録

- 日本熱帯医学会九州支部第5回大会講演要旨 …… 253-260

MICROBICIDAL ACTIVITY OF HYDROLYZED TOXOPLASMA IMMUNE MOUSE SERUM (HS-LK_S) IN HETEROLOGOUS CELL CULTURES

HARUHISA SAKURAI, MOTOYOSHI SATO*, TSUNEO HIROSE*,
YOSHITAKA OMATA**, ATSUSHI SAITO AND NAOYOSHI SUZUKI¹⁾

Received for publication March 23 1982

Lymphokines (Spl-LK_S) capable of inhibiting toxoplasma multiplication in homologous cell monolayers in vitro exist in the supernatant of spleen cells from toxoplasma immune animals incubated either with toxoplasma lysate antigen (TLA), or with non-specific mitogens (4, 10, 12-15). Contained in the Spl-LK_S is a toxoplasma growth inhibitory factor, Toxo-GIF (15), approximately 30,000 to 40,000 m. w., which inhibits toxoplasma multiplication in homologous but not in heterologous cells, thus showing species specificity (10).

Recently, circulating interferon (IFN) has demonstrated antiviral activity not only in homologous but also in heterologous cells (1, 2). In the authors' previous reports (11, 12, 18), the activity of gamma-interferon (IFN-r) in the circulation of toxoplasma immune animals reached its maximum after 6 h while the Toxo-GIF activity peaked 24 to 48 h after TLA injection. The relationship of Toxo-GIF to IFN-r, both of which are found in the same serum, had not yet been clarified. Based on the above observations, an attempt was made to determine whether immune serum, chemically hydrolyzed to its low-molecular components via enzymes and acid-alkaline hydrolysis, would inhibit toxoplasma multiplication not only in homologous but also in heterologous cells. It also aimed at detecting IFN activity from the same hydrolyzed samples.

MATERIALS AND METHODS

Mice and Toxoplasma strain used: Inbred Balb/c nu/+ and nu/nu mice were used in the experiments. They were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 100 tachyzoites of the S-273 (swine origin) strain of *Toxoplasma gondii*. They were challenged i.p. with 1,000 tachyzoites of the same strain 4 wks after the 1st inoculation. They were further challenged with 100 tachyzoites of the RH strain 4 wks postinfection in order to obtain hyperimmune mice which served as donors of immune spleen cells. The immune mice were injected i.p. with TLA, 100 µg per mouse, 2 wks after the

Departments of Veterinary Physiology and Radiology*, Obihiro University, Obihiro, Hokkaido, and **School of Basic Medicine, Tsukuba University, Ibaraki, Japan

1) This study was supported in part by Grant No. 544014 from the Scientific Research Fund of the Japanese Ministry of Education, Science and Culture

last infection. Blood was collected 6 or 24 h after the TLA injection i.p. and the serum separated. The serum was then examined to see if it possessed inhibitory effects on intracellular toxoplasma multiplication similar to that of Spl-LKs derived from immune spleen cells.

Preparation of Toxoplasma lysate antigen (TLA): TLA was prepared by the method of Igarashi et al. (4). Cell-free toxoplasma tachyzoites of the RH strain were obtained from the peritoneal cavities of mice infected 2 days before, and washed with Hanks' balanced salt solution (HBSS) by centrifugation. After washing, 10 volumes of sterile distilled water were added. The resulting suspension was sonicated with an ultrasonic vibrator (100 w Kubota, Model 200, Tokyo) for 3 min and kept at 4°C for 24 h. The lysate antigen extract was centrifuged at 10,000 rpm for 1 h. The supernatant was mixed with an equal volume of 1.7% NaCl. The total protein content of TLA was estimated by the Lowry method (8) using bovine serum albumin fraction V as a standard.

Cell monolayers: Adult mice and guinea pigs were injected i.p. with sterile 0.2% glycogen saline solution. Five days later, peritoneal exudate cells containing macrophages were harvested by washing the peritoneal cavity with heparinized HBSS. After washing by centrifugation (1,200 rpm for 5 min), the resulting sediments were suspended to a concentration of 1×10^7 nucleated cells/ml in TC-199 medium containing 10% heat-inactivated calf serum (CS), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml). This medium is referred to as TC-199-CS throughout the experiment. One ml of the suspension was placed on a multidish tray (FB-16-24, Limbro Chemical Co., Chicago) containing a round coverslip in each dish and incubated at 37°C for 4 h in the air with 5% CO₂. After 4 h of incubation, nonadherent cells were removed by repeated washings and the cultures reincubated overnight. Thereafter, they were rinsed with TC-199-CS and used as macrophage monolayers for the assay of microbicidal activity. Approximately 98% of the cells remaining on the coverslips could rapidly phagocytize carbon particles. Bovine and canine monocyte monolayers were prepared in a similar fashion by the method of Ishimine et al. (6).

Mouse kidney cell monolayers were prepared by removal of fat and fibrous tissue from the kidney and placed in HBSS in a petri dish for 1 h at 4°C. After addition of 40 ml of 0.25% trypsin, the homogenized tissue was kept at 37°C for 40 min, with stirring. It was then filtered through a glass fiber column and centrifuged at 1,500 rpm for 10 min. The pellet was washed 3 times with heparinized HBSS and adjusted to a final concentration of 5×10^5 nucleated cells/ml. One ml aliquots of the suspension were deposited onto glass coverslips in multidish trays and kept in a CO₂ incubator at 37°C for 5 days. Likewise, monolayers of human heart cells (Girardi heart cells, 03-085 line, Flow Lab. Inc. USA) was prepared by the same method as used for the other cell monolayers.

Interferon assay (IFN): IFN was assayed by the plaque reduction method using a continuous cell line of mouse L cells (clone 929) and vesicular stomatitis virus (VSV) as challenge virus (17). To the mouse L cell monolayers formed in 60-mm petri dishes, 3 ml of a twofold serial dilution of the sample in minimal essential medium containing 4% CS (MEM-4% CS) was added and incubated at 37°C for 18-24 h in a

CO₂ incubator. The monolayers then were washed twice with the same medium and challenged with 100–200 plaque forming units of VSV for 60 min. Afterwards, MEM–2%CS and 1% agar were overlaid in each dish. The plates were reincubated for 40–48 h. The second overlay was done with MEM–4%CS–0.8% agar and neutral red. Plaques were counted 4 h later. The IFN titer was determined by plotting the percentage of inhibition against different dilutions on a sheet of probit paper. It was expressed as the reciprocal of the dilution of the sample which had reduced the plaque count to 50% of the control plaque count. A standard reference IFN sample was included in each assay. It varied in titer within a twofold range. One unit of IFN in this assay was equivalent to 6 units of the reference mouse IFN standard (G–002–904–511) provided by the National Institutes of Health, Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Md., U. S. A. To differentiate regular IFN (IFN– α and IFN– β) from IFN–r, the sample was diluted to 1:16 with MEM and dialyzed against glycine-hydrochloric acid buffer, pH 2, at 4°C for 24 h. Since the IFN activity disappeared from the sample, it was suggested to be that of IFN–r. Furthermore, this activity was not influenced by heating in a water bath at 56°C for 60 min. These results lend support to the concept of previous authors (7, 16, 19).

Preparation of hydrolyzed serum (HS–LKs) and hydrolyzed spleen lymphokines (HSpl–LKs) from toxoplasma immune serum (S–LKs) and cultured spleen cell lymphokines (Spl–LKs): To 100 ml of mouse S–LKs or Spl–LKs, and mouse normal serum or supernatant from normal cultured spleen cells, 0.1 g of proteinase (refined pronase, Sigma Chemical Co., U. S. A.) was added. The mixture was incubated at 37°C for 12 h in order to break peptide bonds nonspecifically. It was then mixed with 10 ml of 10 N NaOH (pH, >12) by constant stirring and boiled at 100°C for 1 h to inactivate proteinase and antigenicity. After cooling to 4°C, the pH was adjusted to 7.0 \pm 0.1 with 10 N HCl. The hydrolyzed sample was filtered and then centrifuged at 10,000 rpm for 20 min, and the supernatant collected. That portion of hydrolyzed sample with a m.w. less than 7,000 was fractionated by Sephacryl S–200 gel chromatography with 0.01 M PBS, pH 7.2, at a flow rate of 18.6 ml/h by using a 5–AUH–JEOL automatic liquid chromatograph apparatus (Nihon Denshi Co., Tokyo). The eluate (A) was fractionated again by Toyopearl HW–40 Fractgel chromatography to collect fractions of approximately 3,000 to 5,000 m.w. The eluates were pooled, dechlorinized with double distilled water by Sephadex G–15 gel filtration, and then freeze-dried and stored. These products were referred to either as hydrolyzed serum lymphokines (HS–LKs) or hydrolyzed spleen cell cultured lymphokines (HSpl–LKs) for convenience. Normal serum and supernatant from normal cultured spleen cells were treated in a similar fashion and served as a control.

Assessment of cell microbicidal activity: Normal cell monolayers were infected with approximately 1×10^5 tachyzoites of the RH strain per dish 1 h before the addition of either S–LKs and HS–LKs, or Spl–LKs and HSpl–LKs to each chamber. The fate of the intracellular parasites was monitored by phase contrast microscopy of the infected cell cultures at regular intervals. Toxoplasma could be readily identified by its morphological appearance within cytoplasmic vacuoles. For light microscopy examination, the cultures were stained with May–Grünwald–Giemsa stain. The infection rate of cells was calculated from the number of parasites in vacuoles of 1,000

individual cells on each cover slip. The rate was 1 to 5 tachyzoites in one group and more than 6 tachyzoites in the other. To obtain a mean infection rate, experiments were repeated at least 3 to 5 times.

RESULTS

Gel filtration of proteinase-treated and hydrolyzed immune serum and spleen lymphokines after treatment: The results of fractionation of treated samples were carried out by Sephacryl S-200 gel filtration. As shown in Fig. 1 (top), untreated immune serum was separated into 3 peaks. Fractionations I, II and III were collected. Toxo-GIF was contained in Fract. I, but not in Fract. II and III. When treated with proteinase and hydrolyzed at 12 h, Toxo-GIF shifted to Fract. II, as marked with black in the figure. Toxo-GIF activity in Fract. II was of higher level than that at

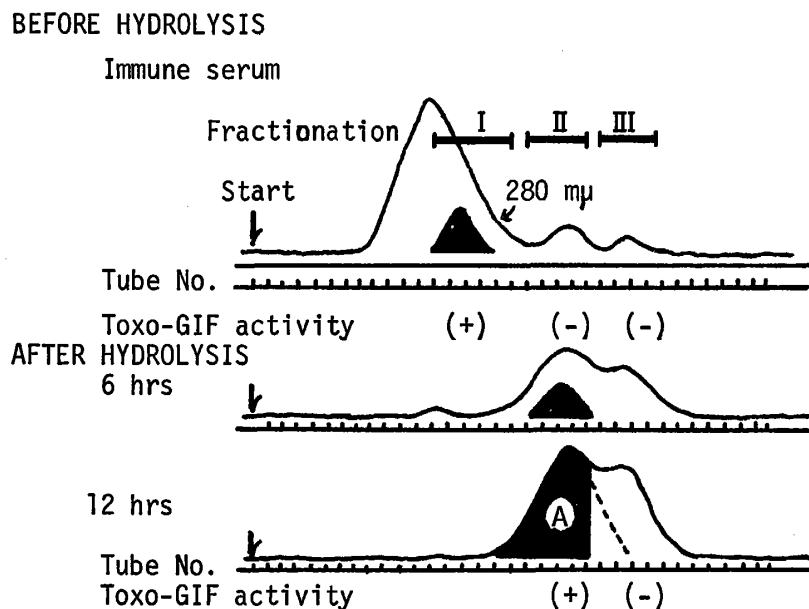


Figure 1 Chromatography Pattern on Sephacryl S-200 gel Filtration of Mouse *Toxoplasma* Immune Serum and Its Hydrolysis Samples 6 and 12 Hours After Treatment.

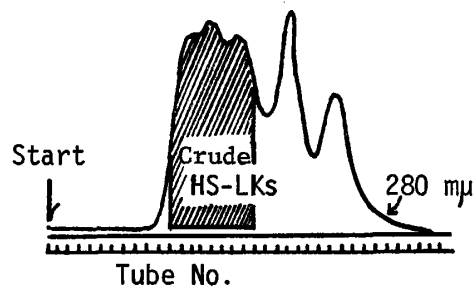


Figure 2-a Fractionation of Crude HS-LKs Previously Obtained by Sephacryl S-200 gel Filtration on Toyo-pearl Fractgel HW-40.

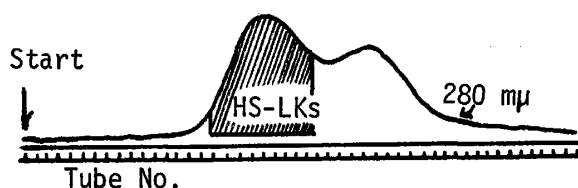


Figure 2-b Chromatography Pattern of HS-LKs Obtained by Toyo-pearl Fractgel HW-40 on Sephadex G-15.

any other time of incubation and collected as eluate (A). Eluate (A) was fractionated again by Toyo-pearl HW-40 (Fig. 2-a) and by Sephadex G-15 gel chromatography, and finally separated into 2 major peaks, as shown in Fig. 2-b. Toxo-GIF was contained in the 1st peak, but not in any other peak. The eluates from the 1st peak, being called HS-LKs from immune serum and HSpl-LKs from spleen cell cultured lymphokines. The molecular weights of HS-LKs and HSpl-LKs were estimated to be between 3,000 and 5,000 by Sephacryl S-200 and Sephadex G-15 gel chromatography after calibration with blue dextran (m.w., 1,000,000), bovine albumin (m.w., 67,000), egg albumin (m.w., 45,000), alpha chymotrypsinogen (m.w., 24,500), lysozyme (m.w., 14,300), insulin (m.w., 6,000) and insulin-chain B (m.w., 3,400) by using the same preparative method.

Amino acid composition of HS-LKs and HSpl-LKs: As shown in Table 1, analyses were performed with 1 to 3 μg of HS-LKs or HSpl-LKs. Unhydrolyzed duplicate samples were also analyzed to monitor contaminations by using the amino acid analyzer (Hitachi 835-30 type, Tokyo). The quantity of each amino acid detected in the unhydrolyzed samples was less than 5% of the amount present after hydrolysis. Acid and basic amino acids, especially aspartic and glutamic acids and lysine, were abundant in the amino acid composition of both HS-LKs and HSpl-LKs. Tryptophan was not detected by using the amino acid analyzer, however, in both HS-LKs and HSpl-LKs tryptophan was ascertained by the method of Neubauer-Rhode reaction (5).

Influence of time of bleeding on Toxo-GIF and IFN production in toxoplasma immune mice after intraperitoneal TLA injection: Two weeks after challenge with the S-273 strain of *Toxoplasma gondii*, groups of hyperimmune or normal mice were injected i.p. with 100 μg of TLA. Blood samples were obtained from the mice by cardiac puncture at different times after TLA injection. The pooled sera were tested for Toxo-GIF and IFN activity by the techniques described above. As shown in Table 2, hyperimmune mice showed an enhanced production of IFN which reached a peak 6 h after TLA injection. On the other hand, sera obtained from normal mice showed a maximum activity of IFN 24 h after TLA injection. The IFN activity in sera obtained from toxoplasma immune mice after TLA injection dropped distinctly after dialysis at 4°C against pH 2 buffer for 24 h. It remained unchanged, however, after incubation at 56°C for 60 min, suggesting IFN-r. In contrast, the IFN activity of normal mouse serum peaked 24 h after TLA injection, and dropped drastically when the serum was heated in a water bath at 56°C for 60 min. No significant decrease in serum IFN titers was seen when samples were dialyzed against pH 2 buffer

Table 1 Amino Acid Composition of HS-LKs and HSpl-LKs from *Toxoplasma* Immune Mouse

Amino acid	HS-LKs		HSpl-LKs	
	n Grams	n M	n Grams	n M
Asp	1275.00	9.586	406.40	3.055
Thr	160.25	1.346	203.93	1.713
Ser	240.08	2.286	192.76	1.835
Glu	1759.30	11.968	505.24	3.437
Gly	447.40	5.965	178.43	2.379
Ala	354.61	3.984	150.39	1.689
Cys	204.78	0.852	257.09	1.070
Val	404.83	3.454	131.77	1.124
Met	43.32	0.290	28.86	0.193
Ile	77.43	0.590	30.73	0.234
Leu	351.36	2.678	107.51	0.819
Tyr	127.37	0.702	98.94	0.546
Phe	86.34	0.522	67.10	0.406
Lys	2351.23	16.082	907.36	6.206
NH ₃	760.44	44.732	220.83	12.990
His	211.14	1.360	38.07	0.245
Arg	101.83	0.584	71.64	0.411
Pro	505.10	4.392	189.87	1.651

The amino acid residues are Asp. Aspartic acid; Thr, Threonine; Ser, Serine; Glu, Glutamic acid; Gly, Glycine; Ala, Alanine; Cys, Cystine; Val, Valine; Met, Methionine; Ile, Isoleucine; Leu, Leucine; Tyr, Tyrosine; Phe, Phenylalanine; Lys, Lysine; NH₃, Ammonia; His, Histidine; Arg, Arginine; Pro, Proline.

Table 2 Characteristics of Toxo-GIF and Interferon Present in the Sera of Immune Mice after Injection of *Toxoplasma* Lysate Antigen (TLA)

Source of sera	Antigen	Serum collection time (h) after TLA injection	Mean percentage of macrophages with Tp*			Interferon		
			0 Tp	1-5 Tp	≥6 Tp/cell	Titer	Stable at	
							pH 2	56°C
Toxoplasma immune mice	TLA** (100 µg ip)	0	90.2±6.0	9.4±5.5	0.4±0.5	<1: 40		
		6	97.4±2.5	2.2±2.0	0.4±0.5	1: 160	<1: 40	1: 160
		24	99.4±1.2	0.6±1.2	0	<1: 40		
Normal mice	TLA** (100 µg ip)	0	91.8±1.9	7.4±2.2	0.8±0.4	<1: 40		
		6	93.8±3.1	3.4±2.3	3.0±2.0	<1: 40		
		24	92.4±4.4	6.6±3.2	1.0±1.2	1: 320	1: 320	<1: 80

* Mean±SD was calculated from the results of 5 independent experiments.

** TLA, 100 µg, was injected intraperitoneally in each mouse.

for 24 h. These properties were indicative of regular IFN (IFN- α and IFN- β).

In sera collected from toxoplasma immune mice injected with TLA, Toxo-GIF activity showed a tendency to increase up to 24 h after injection. Sera collected from normal mice after TLA injection, however, showed no inhibitory effect on toxoplasma multiplication within mouse macrophages.

Determination of the in vitro inhibitory effect of HS-LKs on toxoplasma multiplication in homologous cells: Toxoplasma immune mouse serum (S-LKs) diluted to 10% in TC-199-CS inhibited toxoplasma multiplication in normal mouse macrophages after incubation for 48 h as shown in Table 3. This S-LKs showed an IFN activity

Table 3 Toxoplasma-cidal and Cytotoxic Activities of Toxoplasma Immune Mouse Serum (S-LKs) and the Hydrolyzed Serum (HS-LKs) in Normal Mouse Macrophage Monolayers

Sample added in TC-199+ 10% CS	Concentration of sample in TC-199+ 10% CS Added Cytotoxicity (%)		Mean percentage of macrophages with Tp* 48 h after inoculation			Interferon		
	0 Tp	1-5 Tp	≥ 6 Tp/cell	Titer	Stable at			
						pH 2	56°C	
TC-199+ 10% CS alone	—	—	38.6 \pm 14.0	33.4 \pm 7.1	28.0 \pm 10.8	<1:	8	
Normal mouse serum	10	—	33.5 \pm 11.0	31.2 \pm 9.5	35.3 \pm 15.8	<1:	8	
Normal mouse hydrolyzed serum	0.25	—	34.4 \pm 9.2	38.6 \pm 3.4	27.0 \pm 11.7			
	0.50	—	40.8 \pm 8.9	35.4 \pm 5.3	23.8 \pm 6.7			
	0.75	—	34.2 \pm 10.3	43.8 \pm 8.4	22.0 \pm 5.4			
	1.0	—	41.4 \pm 7.9	41.2 \pm 6.6	17.4 \pm 4.7			
	2.0	+	Destroyed the greater part of macrophages					
5.0	+	Destroyed the greater part of macrophages						
Immune mouse serum (S-LKs)	10	—	97.4 \pm 2.5	2.2 \pm 2.0	6.4 \pm 0.5	1: 160	<1: 16	1: 80
HS-LKs	0.25	—	38.6 \pm 8.9	37.4 \pm 7.4	24.0 \pm 8.6			
	0.50	—	84.6 \pm 10.0	12.2 \pm 7.6	3.2 \pm 3.4			
	0.75	—	96.2 \pm 2.8	3.6 \pm 2.4	0.2 \pm 0.4			
	1.0	—	94.2 \pm 4.0	5.8 \pm 4.0	0		<	1: 8
	2.0	+	Destroyed the greater part of macrophages					
5.0	+	Destroyed the greater part of macrophages						

* Mean \pm SD was calculated from the results of 5 independent experiments.

Toxoplasma immune serum was collected at 6 h after intraperitoneal injection of TLA.

titer of 1: 160. When it was dialyzed against glycine-hydrochloric acid buffer, pH 2, at 4°C for 24 h, the IFN activity assay revealed a great drop in activity. No change in IFN activity was exhibited, however, when the S-LKs was incubated at 56°C for 60 min. This IFN was therefore regarded as IFN-r.

HS-LKs were reconstituted with TC-199-CS to concentrations of 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, and 5% and added to normal mouse macrophage monolayers 1 h after toxoplasma inoculation in order to examine parasite multiplication. Cytotoxicity was observed when HS-LKs were added in concentration of 2 and 5%, showing a remarkable destruction of the macrophage monolayers. When the concentration of

HS-LKs was less than 1%, no cytotoxicity was noted, but toxoplasma multiplication distinctly was inhibited. Only 0.9% of the macrophages contained 1-5 parasites, and non contained more than 6 toxoplasmas. The inhibitory effect of HS-LKs was reduced correspondingly with a decrease in the concentration of HS-LKs to 1%, 0.75%, 0.5% and 0.25% when toxoplasma containing cells were 0.9%, 3.4%, 6.0% and 9.9%, respectively. No IFN-r activity was detected in any of these concentration of HS-LKs.

Hydrolyzed normal serum was also reconstituted with culture medium to concentrations of 0.25, 0.5, 1, and 2% and added to normal mouse macrophages. Cytotoxicity was observed when the hydrolyzed normal serum was added in a concentration of 2%, resulting in the destruction of most of the macrophages. When the concentration of the hydrolyzed normal serum was less than 1%, neither cytotoxicity nor inhibition of toxoplasma multiplication was noted.

Determination of the in vitro inhibitory effect of HS-LKs and HSpl-LKs on toxoplasma multiplication in heterologous cells: As shown in Table 4 and 5, Spl-LKs from toxoplasma immune mouse spleen cells cultured with TLA for 48 h, in 10% dilution, inhibited toxoplasma multiplication in normal mouse macrophages. Over 95% of the macrophages remained uninfected, with less than 1% containing more than 6 toxoplasmas after 48 h. This Spl-LKs showed a titer of 1:256 of IFN activity, which seemed to be IFN-r (Table 4). When the concentration of HS-LKs or HSpl-LKs was 0.5%, no cytotoxicity was noted, but toxoplasma multiplication in mouse macrophages was inhibited remarkably. At this concentration, no IFN activity was detected (Table 5).

Table 4 Microbicidal Activities of Normal Canine Monocytes, Bovine Monocytes and Human Heart Cells Inoculated with Toxoplasma 1 Hour Before the Addition of Toxoplasma Immune Mouse Serum (S-LKs) or Immune Mouse Spleen Lymphokines (Spl-LKs)

Cell line	Source of the addition in the medium	Mean percentage of heterologous cells with Tp* 48 h after Tp inoculation			Interferon		
		0 Tp	1-5 Tp	≥6 Tp/cell	Titers	Stable at	
						pH 2	56°C
Canine monocytes	Without S-LKs	40.2±15.8	18.4± 9.4	41.4±8.1			
	With 10% S-LKs	46.1±11.9	21.3± 7.4	32.6±7.4			
	With 10% Spl-LKs	48.3± 9.8	19.9± 8.7	31.8±6.6			
Bovine monocytes	Without S-LKs	56.5±13.9	31.1± 8.8	12.4±5.9			
	With 10% S-LKs	51.7± 9.2	27.2±10.1	21.1±7.9			
	With 10% Spl-LKs	55.8±13.1	25.5± 0.6	18.7±8.3			
Human heart cells	Without S-LKs	54.6±24.3	20.6± 9.3	24.8±9.6			
	With 10% S-LKs	58.3±13.1	18.4± 7.8	23.3±8.3			
	With 10% Spl-LKs	48.9±22.8	21.3±10.7	29.8±9.3			
Control Mouse Macrophages	Without S-LKs	45.4± 9.7	34.0± 1.7	20.6±8.0			
	With 10% S-LKs	97.4± 2.5	2.2± 2.0	6.4±0.5	1: 160	<1: 16	1: 160
	With 10% Spl-LKs	95.2± 3.6	4.2± 2.9	0.6±0.9	1: 256	<1: 16	1: 160

* Mean±SD was calculated from the results of 5 independent experiments.

Table 5 Enhanced Toxoplasma Activity of Heterologous Cells Following the Addition of Toxoplasma Immune Mouse Hydrolyzed Serum (HS-LKs) and Hydrolyzed Spleen Lymphokines (HSpl-LKs)

Cell line	Source of the addition in the medium	Mean percentage of heterologous cells with Tp* 48 h after Tp inoculation			Interferon		
		0 Tp	1-5 Tp	≥6 Tp/cell	Titers	Stable at	
						pH 2	56°C
Canine monocytes	Without HS-LKs	29.6± 5.2	51.3±3.2	19.1±2.0			
	With 0.5% HS-LKs	94.0± 4.1	4.2±2.6	1.8±2.2			
	Without HSpl-LKs	40.2±15.8	18.4±9.4	41.4±8.1			
	With 0.5% HSpl-LKs	81.0± 3.7	12.6±3.0	6.4±2.5			
Bovine monocytes	Without HS-LKs	21.2± 4.4	43.6±9.9	35.2±7.2			
	With 0.5% HS-LKs	92.4± 4.4	6.6±3.2	1.0±1.2			
	Without HSpl-LKs	56.5±13.9	31.1±8.8	12.4±5.9			
	With 0.5% HSpl-LKs	80.7± 4.5	12.8±3.7	6.5±2.1			
Human heart cells	Without HS-LKs	55.7±10.1	18.1±2.9	26.2±7.2			
	With 0.5% HS-LKs	73.2± 8.0	21.9±5.1	4.9±2.9			
	Without HSpl-LKs	54.6±24.3	20.6±9.3	24.8±9.6			
	With 0.5% HSpl-LKs	70.2±18.2	19.6±3.9	10.2±7.4			
Control							
Mouse macrophages	Without HS-LKs	45.4± 9.7	34.0±1.7	20.6±8.0			
	With 0.5% HS-LKs	91.0± 5.2	6.4±1.5	2.6±3.7	<1: 16		
	With 10% S-LKs	97.4± 2.5	2.2±2.0	6.4±0.5	1: 320	<1: 16	1: 160
	With 10% Spl-LKs	95.2± 3.6	4.2±2.9	0.6±0.9	1: 160	<1: 16	1: 160

* Mean±SD was calculated from the results of 5 independent experiments.

10% lymphokines (Spl-LKs), 10% toxoplasma immune serum (S-LKs), 0.5% hydrolyzed lymphokines (HSpl-LKs) or 0.5% hydrolyzed immune serum (HS-LKs) was mixed with the standard medium containing 10% calf serum.

Then 10% S-LKs or Spl-LKs was also investigated for inhibitory effect on toxoplasma multiplication in such heterologous cells as canine monocytes, bovine monocytes and human heart cells. No toxoplasma multiplication was inhibited by the addition of S-LKs or Spl-LKs (Table 4). However, HS-LKs or HSpl-LKs added to a concentration of 0.5% inhibited toxoplasma multiplication in canine monocytes, of which only 6% and 19% contained toxoplasma, respectively (Table 5). Similarly, inhibition of toxoplasma multiplication by the addition of HS-LKs or HSpl-LKs was also observed in bovine monocyte and human heart cell monolayers as compared with HS-LKs-free culture medium. No cytotoxicity was found in homologous or heterologous cells upon the addition of 0.5% HS-LKs or HSpl-LKs.

DISCUSSION

In previous studies, normal mouse macrophages and kidney cells were cultured with Spl-LKs from toxoplasma immune spleen cells. When infected with a virulent toxoplasma strain, the Spl-LKs-activated macrophages and kidney cells showed a significant inhibition of the intracellular multiplication of tachyzoites (4, 9, 12-15). This inhibitory activity was presumed to be due to a macrophage-activating factor or

similar activators released from immune T-lymphocytes(13). Such factors appeared to have conferred enhanced microbicidal properties to the cultured macrophages and kidney cells. Thus the term toxoplasma growth inhibitory factor (Toxo-GIF) was adopted (15). It had a calculated molecular weight of 30,000 to 40,000 in which MIF-I was also contained (4). The mouse Spl-LKs inhibited toxoplasma multiplication in mouse macrophages and kidney cells, but not in heterologous cells (9, 10).

In related, earlier studies, separate and distinct mediators from hamster lymphocytes active against *Toxoplasma* and *Besnoitia* have been indentified (3). These mediators were effective not only for macrophages but also for kidney cells and fibroblasts. They had a calculated molecular weight of 4,000 to 5,000. In our previous report (10), MIF-II and a mediator or cytotoxic factor of 3,000 to 5,000 m.w., which damages macrophage monolayers were found in the mouse Spl-LKs, but not in the Toxo-GIF. In consequence, an attempt was made to determine whether S-LKs and Spl-LKs, chemically hydrolyzed to its low-molecular components via hydrolysis, would inhibit toxoplasma multiplication in cell monolayers. These low molecular weight substances, HS-LKs and HSpl-LKs, possessing cytotoxic properties were similar to that separated by Chinchilla and Frenkel from hamsters (3). However, inasmuch as we failed to observe Toxo-GIF, the difference or similarity in the mechanism of these mediators is still unknown.

The results obtained in this experiment strongly suggest that a Spl-LKs-like substance might have existed in the toxoplasma immune mouse serum, and that HS-LKs and HSpl-LKs might have inhibited toxoplasma multiplication not only in homologous but also in heterologous cells. A Toxo-GIF or Toxo-GIF-like substance together with IFN- γ has been detected in the blood of hyperimmune mice after intraperitoneal injection with TLA.

Lymphokines produced by spleen cells usually show their greatest activity on cells from the same species (10). This phenomenon of species specificity is undesirable since it indicates that only homologous preparations can be expected to display therapeutic value. HS-LKs and HSpl-LKs, however, showed inhibitory effects on toxoplasma multiplication in heterologous cells. In addition to anti-toxoplasma activity, cytotoxicity was observed in vitro regarding both heterologous and homologous cells after HS-LKs and HSpl-LKs were added to a high concentration of 2%. The components of 3,000 to 5,000 m.w. in a part of the Spl-LKs and of normal serum was contained as cytotoxic factor in natural animals (11). In consequence, in in vivo tests, it might be inappropriate to use HS-LKs or HSpl-LKs in high concentration due to cytotoxicity. Furthermore, there is no distinct explanation whether this cytotoxicity is present naturally, or occurred as a consequence of our preparative methods for HS-LKs or HSpl-LKs.

Therefore, if cytotoxic components can be identified and removed, and if HS-LKs and/or HSpl-LKs can be collected in large volumes by any method, animal preparations likely may prove useful in enhancing the immunological and microbicidal properties of human cells as an immunopotentiator. If this phenomenon can be confirmed in vivo, it will be possible to use animal derived HS-LKs on a largescale, because this serum is an inexpensive source for the treatment of human diseases. Since the use of nonhuman HS-LKs is of significant scientific and clinical value,

further investigation is both timely and necessary for the development of this source on a large scale.

SUMMARY

Evidence was presented on the production and properties of Toxo-GIF and IFN in the circulating blood of toxoplasma immune mice, following the intraperitoneal injection of TLA. The IFN elaborated by this method was designated IFN-r. This study deals mainly with some biologically active substances derived from hydrolyzed toxoplasma immune mouse serum (HS-LKs) or hydrolyzed spleen cell cultured lymphokines (HSpl-LKs) and their effects on parasite growth not only in homologous but also in heterologous cells. The HS-LKs and HSpl-LKs, approximately 3,000–5,000 m.w., strongly inhibited toxoplasma multiplication in homologous cells, without cytotoxicity, when administered in concentration of 0.5% or less. This substance, or substances, also inhibited toxoplasma multiplication in heterologous monolayers of bovine monocytes, canine monocytes and human heart cells. This ability to inhibit toxoplasma multiplication in homologous and heterologous cells was derived not from IFN-r, but from Toxo-GIF or a Toxo-GIF-like substance.

REFERENCES

1. Babium, A. L., and B. T. Rouse. 1977. Bovine type II interferon: Activity in heterologous cell. *Intervirology* 8: 250–256
2. Carter, W. A. 1979. Bypassing the "species barrier" with carbohydrate altered interferon from leukocytes. *Cancer Res.* 39: 3796–3798
3. Chinchilla, M., and J. L. Frenkel. 1978. Mediation of immunity to intracellular infection (*Toxoplasma* and *Besnoitia*) within somatic cells. *Infect. Immun.* 19: 999–1012
4. Igarashi, I., M. Taguchi, and N. Suzuki. 1979. Fundamental studies on macrophage migration inhibitory factors in the supernatant from spleen cells in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 244: 374–382
5. Ishidate, M., T. Karimai, and Y. Nagase. 1976. Tryptophan. *The Pharmacopoeia of Japan.* pp. 980–986. Hirokawa Shoten Co., Tokyo (in Japanese)
6. Ishimine, T., H. Nagasawa, and N. Suzuki. 1979. An in vitro study of monocyte phagocytosis in the peripheral blood of healthy and Babesia infected beagles. *Jpn. J. Vet. Sci.* 41: 487–493
7. Ley, M., J. Damme, H. Claeys, H. Weening, J. W. Heine, A. Billian, C. Vermylen, and P. Somear. 1980. Interferon induced in human leukocytes by mitogens; production, partial purification and characterization. *Eur. J. Immunol.* 10: 877–883
8. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biochem.* 193: 265–275
9. Matsumoto, Y., H. Nagasawa, H. Sakurai, S. Sasaki, and N. Suzuki. 1981. Mouse spleen cell derived *Toxoplasma* growth inhibitory factor: Its effect on *Toxoplasma* multiplication in the mouse kidney cells. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 250: 383–391
10. Nagasawa, H., I. Igarashi, T. Matsumoto, H. Sakurai, C. Marbella, and N. Suzuki. 1980. Mouse spleen cell derived *Toxoplasma* growth inhibitory factor: Its separation from macrophage migration inhibitory factor. *Immunobiology* 157: 308–319
11. Nagasawa, H., Y. Takei, T. Miyagami, N. Suzuki, and Y. Omata. 1981. Toxoplasma-cidal activity of *Toxoplasma* immune beagle plasma and hydrolyzed plasma lymphokines-like peptide in

- homologous and heterologous cells. *Jpn. J. Vet. Sci.* 43: 947-950
12. Sakurai, H., Y. Takei, Y. Omata and N. Suzuki. 1981. Production and properties of Toxo-GIF and interferon in the lymphokines and the circulation of *Toxoplasma* immune mice. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 251: 134
 13. Sethi, K. K., B. Pelster, N. Suzuki, G. Piekaraski, and H. Brandis. 1975. Immunity to *Toxoplasma* induced in vitro in non-immune mouse macrophages with specifically immune lymphocytes. *J. Immunol.* 115: 1151-1158
 14. Shirahata, T., K. Shimizu, and N. Suzuki. 1976. Effects of immune lymphocyte products and serum antibody on the multiplication of *Toxoplasma* in murine peritoneal macrophages. *Z. Parasitenk.* 49: 11-23
 15. Shirahata, T., K. Shimizu, and N. Suzuki. 1977. Studies on production of biologically active substance which inhibits the intracellular multiplication of *Toxoplasma* within mouse macrophages. *Z. Parasitenk.* 53: 31-40
 16. Stewart, F. W. 1980. Interferon nomenclature. *Nature* 286: 110
 17. Taguchi, F., N. Hirano, Y. Kiuchi, and K. Fujiwara. 1976. Difference in response to mouse hepatitis virus among susceptible mouse strains. *Jpn. J. Microbiol.* 20: 293-302
 18. Takei, Y. T. Miyagami, H. Sasaki, and N. Suzuki. 1981. Microbicidal activity of *Toxoplasma* immune beagle plasma and lymphokines to *Toxoplasma* multiplication in host cells. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 250: 392-402
 19. Youngner, J. S., and S. B. Salvin. 1973. Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 111: 1914-1922

トキソプラズマ免疫マウス血清由来加水分解物質 (HS-LKs) の異種細胞内トキソプラズマ殺滅効果

桜井治久・佐藤基佳*・広瀬恒夫*

小俣吉孝**・斉藤篤志・鈴木直義

トキソプラズマ (Tp) 免疫マウスに特異抗原 (TLA) を腹腔内に注入し, 注入前, 6 および 24 時間後に血液を採取し, 血清を分離した。血清中 Toxo-GIF 活性は 24 時間で最高値を, IFN- γ は TLA 注入後 6 時間で最大活性を示した。TLA 注入 24 時間後の分離血清は酵素, 酸・アルカリ加水分解および熱処理されて, その上清を Sephacryl S-200 および Toyo-pearl Fractogel HW 40 でゲル濾過し, 分子量 3,000~5,000 の分画を集めて, これを HS-LKs と名づけた。一方, 免疫マウス脾臓細胞加 TLA 培養上清リンホカイン (Spl-LKs) が同様に操作され集められた画分が HSpl-LKs と名づけられた。

マウス腹腔マクロファージ (Mp) は TC-199 仔牛血清含有培養液で前培養され, Tp 接種後 1 時間目から免疫血清 10% あるいは HS-LKs (乾燥重量) 0.25~5.0% 含有培養液中における 48 時間目の細胞内 Tp 増殖の有無を検討した。その結果, 10% Tp 免疫血清 (S-LKs) あるいは 0.5% 以上の Hs-LKs 添加では正常マウス血清あるいは, その 0.5% 加水分解血清に比較して, 細胞内 Tp 増殖は顕著に抑制された。2% HS-LKs 添加以上では, マウス Mp は障害された。イヌ単球, 牛単球およびヒト心筋細胞内 Tp 増殖に関して, HS-LKs 添加は, その増殖効果に差があるが異種細胞内 Tp 増殖を明らかに抑制した。この HS-LKs 中には IFN- γ 活性は検出されなかった。リンホカイン中 Toxo-GIF による細胞活性は種依存性であることが広く認められている。リンホカイン様物質を含む血清が低分子量化されることによって, 種依存性を失い, 異種細胞内寄生原虫の増殖を抑制したことの意義は今後, 生物活性物質として攻究されるべきものと考えられる。

京都市内深泥ヶ池におけるアシマダラヌマカと キンイロヌマカの生態学的研究

岩 城 操

昭和57年6月2日 受付

I 緒 言

日本産熱帯性ヌマカとして知られている *Mansonia (Mn.) uniformis* Theobald アシマダラヌマカ、および *Mansonia (Co.) ochracea* Theobald キンイロヌマカは、分布学上我が国が世界の最北端に生息するものとして認められている (Yamaguti and La Casse 1950)。なかでも、京都市内東北部に位置する深泥ヶ池には、その両種が池内に混生して池の専任種となっていることは非常に興味あることである。これらの *Mansonia* 属の蚊は、東南アジアをはじめ、インド、アフリカ、南アメリカなど各地において、主にマレー系状虫、特に *Brugia malayi*、およびデング熱ウィルス等の媒介蚊として疫学的に非常に重要な種であることが証明されている (Sasa 1976, Wharton 1978, Carter 1948)。さらに *Mansonia* 蚊についての吸血活動の報告は Haddow 1954, Laurence 1960, そして Samarawichrema 1968 らによって、周日時刻的消長が調査された。また、アシマダラヌマカが、主に夜間吸血性を示すとともに、そのピークが、日没前後と日出前後の二峰性であることなどを報告している。我が国においては、北村・小垣 (1962) らによって、前述の深泥ヶ池の池畔においてライトトラップ採集を行った成績があり、松尾ら (1963) は同池内および池畔において、幼虫・蛹および成虫の周年消長の調査結果などの報告をしたが、他の蚊を交えての結果であるところから、未だくわしい生態的調査のみならず、室内飼育実験等に関しては全くといって良いほど知見

は得られていない。したがって、著者らは1964年2月より深泥ヶ池、池畔において *Mansonia* 蚊の成虫を定期的に採集し、年間消長をくわしく検討し、多発期とみられる8月には、2回の昼夜にわたる24時間採集を行うことにより、時刻的消長をも明らかにすることができた。さらに、アシマダラヌマカとキンイロヌマカの異なった走性を示す習性をも知ることができた。そして、アシマダラヌマカの雌成虫の翅長を定期的に計測することによって、季節的に翅長の変動があることが認められたので報告する。

この要旨は、第23回日本衛生動物学会西日本支部大会、および、第21回日本衛生動物学会大会において発表した。

II 調査期間および方法

調査は、1964年2月初旬より同年11月までの10カ月間で、各月平均2回、日没前1時間と日没後1時間の計2時間にわたり、ドライアイス採集法とライトトラップ採集法を行った。実施ごとに採集された蚊の中からヌマカ属2種をえらび出し、その個体数とアシマダラヌマカ雌成虫のみの翅長を計測した。また、蚊の多発期である8月8日から9日までと、8月21日の昼間、そして8月31日から9月1日までの夜間を合せた通算2回の24時間昼夜採集を行った。ドライアイス採集法は、昼夜連続して行ったが、ライトトラップ採集法は、FNK スーパーライトトラップを使用して夜間のみ施行した。

III 成績および考察

1. 周年採集成績

アシマダラヌマカおよびキンイロヌマカのドライアイス採集法による周年採集成績は、表1に示すごとく、アシマダラヌマカの採集総個体数2543

個体内、雌個体2138個体、雄個体405個体であった。この周年採集には、2月初旬より5月初旬までは全く採集されなかったが、5月下旬にやっと雌個体が数10個体と雄個体が1個体採集できたという成績であった。しかし、8月下旬では、採集数はピークに達し雌個体1395個体、雄個体194個体と全体の約半数に及んでいる結果を得た。

Table 1 Number of seasonal collection of *Mansonia uniformis* and *Mansonia ochracea* by Dry-ice method (1964)

Diary of collection	<i>Mn. uniformis</i>		<i>Mn. ochracea</i>	
	Female	Male	Female	Male
May 11	0	0	0	0
May 23	44	1	0	0
Jun. 7	335	8	0	0
Jun. 20	98	41	0	0
Jul. 10	52	36	0	0
Aug. 3	64	80	0	0
Aug. 31	1395	194	0	0
Sep. 9	147	41	0	0
Oct. 3	3	4	0	0
Nov. 12	0	0	0	0
Total	2138	405	0	0

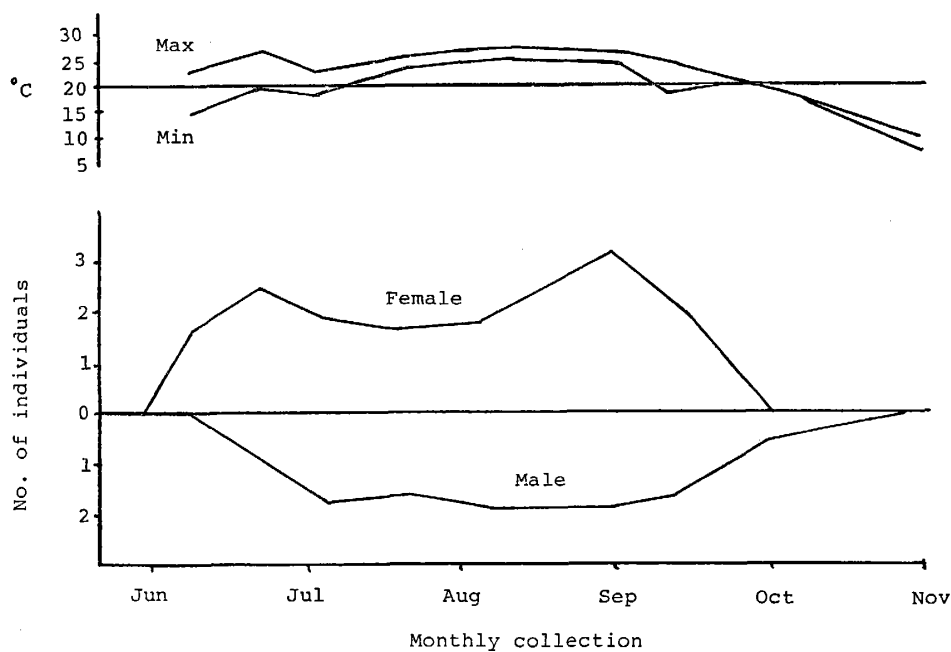


Figure 1 Seasonal fluctuation of *Mn. uniformis* and Temperature.

注) Figure 1, 4, 5, 6 の採集個体数は実数の対数値 $[\log(n+1)]$ であらわしてある。

そして、その後次第に減少して10月上旬にはほとんど飛来しなくなった。一方、キンイロヌマカは、年間を通して薄暮の時間帯にはドライアイス採集には全く飛来することがなく採集されなかった。

次に、アシマダラヌマカのための周年採集個体数を各月毎に実数の対数値であらわし、採集時の気温と照らし合わせると図1に示すごとく、6月初旬の月平均気温が20°Cに達した頃から飛来しはじめ、そして、10月初旬の20°C以下になる頃より全く飛来しなくなる傾向がみられた。しかし、

このことがアシマダラヌマカの野外における生態の一要因とは今回の成績だけでは考えられない。

2. 翅長の季節的変動

蚊の翅長値が、季節的に変動することは、すでにコガタアカイエカなどによって知られているが(上本ら1967)、ヌマカにもこのような変動がみられるかを検討するため、先に周年採集を行った際に得られたアシマダラヌマカの雌成虫のみを各月ごとに約100個体を無作為にえらび出し、その翅長を計測し翅長値の巾を図2に示した。さらに平

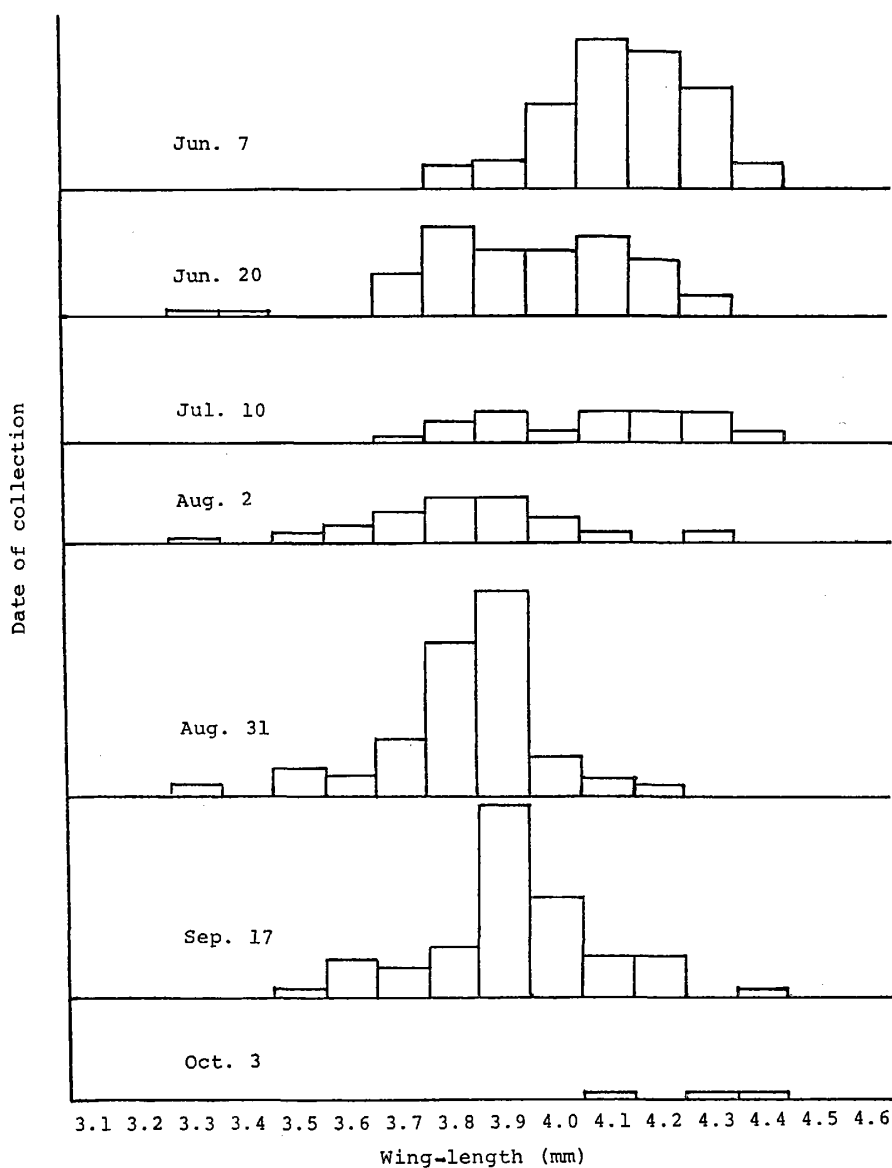


Figure 2 Seasonal variation of wing-length of *Mn. uniformis*.

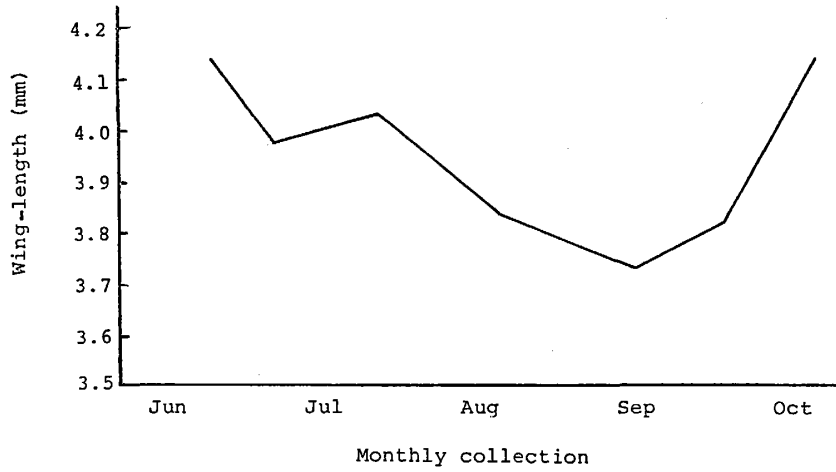


Figure 3 Seasonal variation of Mean wing-length of *Mn. uniformis* female.

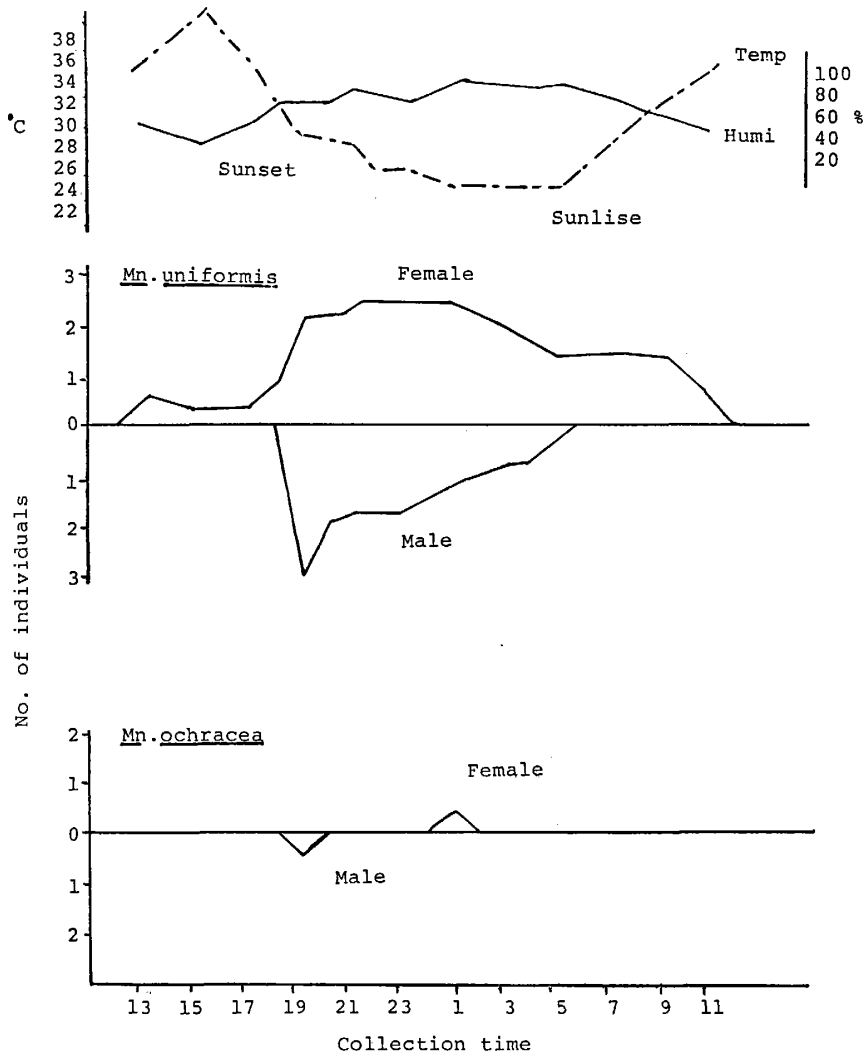


Figure 4 Observation on the durnal change of *Mn. uniformis* and *Mn. ochracea* by First dry-ice collection method and Temperature, Humidity.

均翅長の変動をグラフであらわしたのが図3である。

結果は、6月上旬の翅長は3.8mm~4.4mm, 平均4.1mmであったが、6月下旬になるとやゝ短い翅長の個体があられる。さらに、8月上旬から下旬にかけては、3.3mm~4.2mm, 平均3.7mmと短い翅長の個体が多くあられるようになる。そして、9月中旬では3.5mm~4.4mm, 平均3.8mmと8月の蚊の最盛期と思われる季節よりは少し長い翅の個体があられ、10月上旬には採集個体数も激減するが、4.0mm~4.3

mm, 平均4.1mmと6月上旬に採集された個体とほぼ同じ翅長になることが認められた。

以上のことから、アシマダラヌマカは、コガタアカイエカなどと同様に、春季と秋季に翅長が長く、夏季には短い傾向を示すところから、6月上旬に採集される個体は、池の浮島や近くの民家の南面などの暖かい場所で前年から成虫越冬した個体であるため翅長が長く、夏季は幼虫の発生水域の水温も高く幼虫の生育期間が短いため早く成熟するため翅長の短い個体が多くなるものと考えられる。その後10月上旬になると水温も低く

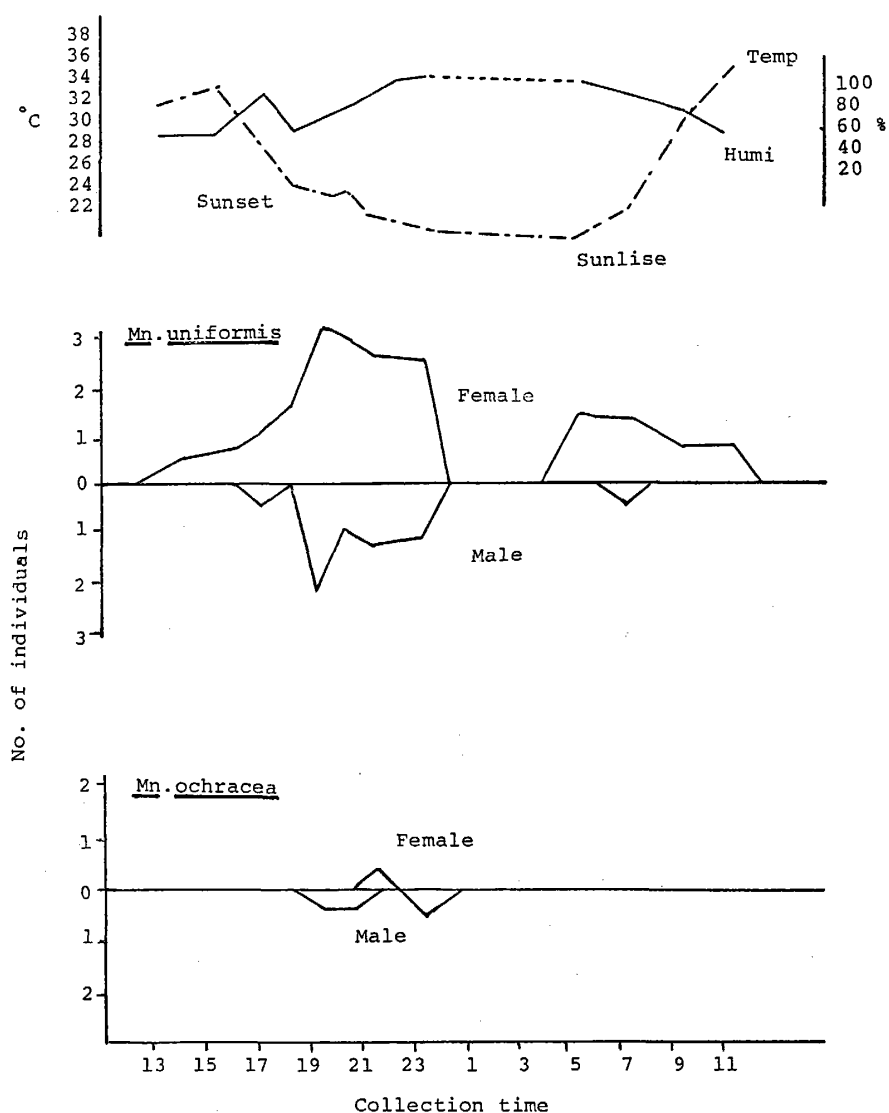


Figure 5 Observation on the durnal change of *Mn. uniformis* and *Mn. ochracea* by Second dry-ice collection and Temperature, Humidity.

なり幼虫の生育期間が長くなることから翅長の長い個体が出現するようになる。そして、これらの個体が気温および短日の環境条件の変化により栄養生殖分離をおこして卵巣の発育がおさえられ、体内に十分な貯蔵脂肪を貯え、活動力も次第に鈍くなり、そのまま越冬に入るものと推定される。したがって、このような翅長値の変動があるものと考えられる。

3. 時刻的消長

ヌマカの日周活動を知るため、蚊の多発期である8月に2回、前記方法で述べたごとく24時間採

集を行った。結果は、第1回ドライアイス採集法による成績を図4に、第2回ドライアイス採集法による成績を図5に示すごとく、2回の採集いずれも同じ傾向の消長がみられた。なかでも、特にアシマダラヌマカの雌成虫は、ドライアイス採集法には昼夜間を問わず飛来し、採集者に集まり盛んに吸血活動の態勢をとった。また、雄の出現は、いずれの回も日没後に一時的に多く飛来し、その後次第に減少し、明け方には全く飛来しなくなる。これに反して、キンイロヌマカは、2回の採集にはいずれも夜間に雌雄成虫が数個体飛来したにす

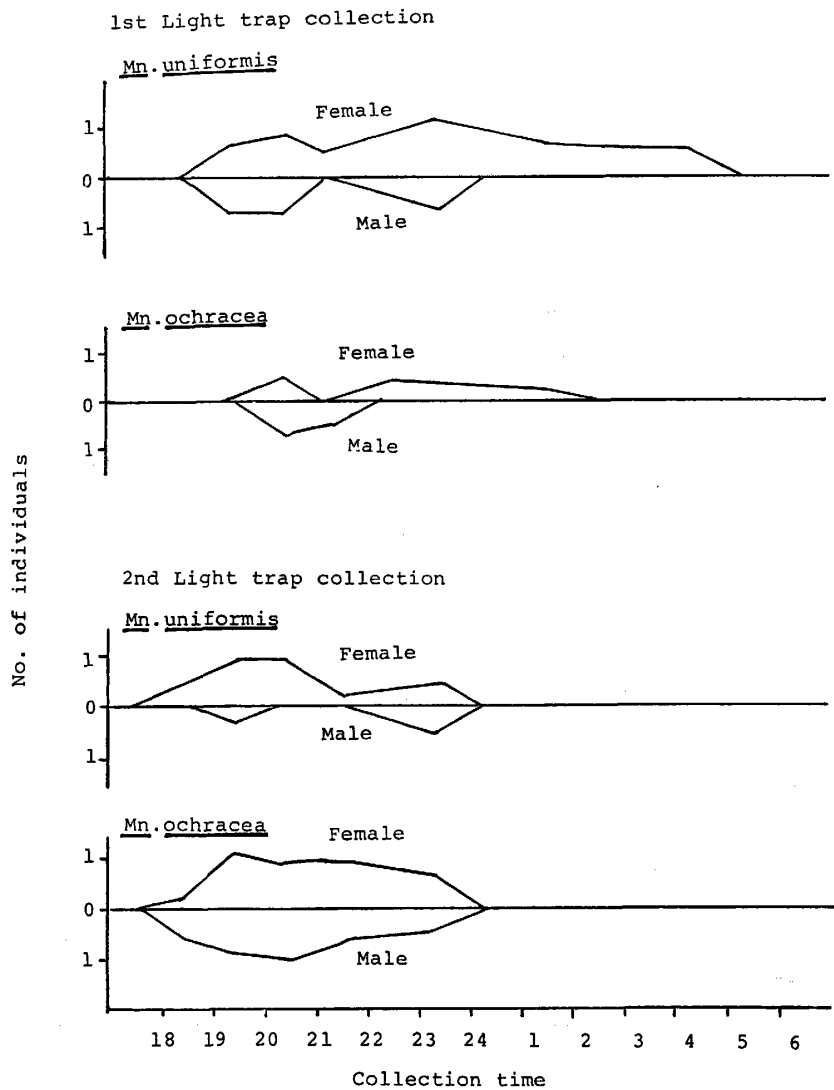


Figure 6. Differences of daily activities of adult mosquitoes in the twice collection by light-trap between *Mn. uniformis* and *Mn. ochracea*.

ぎなかった。なお、図5の夜中23時頃から明け方の5時までは小雨のため採集不可能であったことを附記しておく。

一方、ライトトラップ採集法による成績は、図6に示すごとく、アシマダラヌマカとキンイロヌマカの両種ともに数個体ではあったが採集された。なかでも、アシマダラヌマカの雌成虫は、ほとんど日没から日出まで連続して採集器に入り捕獲されたが、キンイロヌマカは、2回の採集ともに雌雄成虫が日没後に少数個体捕獲されたのみで、夜半には全く飛来しなかった。

次に2回行った昼夜採集結果を、日中（日出から日没まで）と夜間（日没から日出まで）とに分けて比較して表2に示すと、両種ともに明らかに夜行性を持っているが、ただアシマダラヌマカの雌成虫は、ドライアイス採集法に昼間帯においても数個体の採集をみることは今後検討を要する問題である。さらに、アシマダラヌマカは、ドライアイス採集法には圧倒的多数の飛来をみるがライトトラップ採集器にも捕獲された。このことは、蚊の第一次誘引は二酸化炭素であり正の走化性を示し、次に光に対する走光性も示すものと考えら

Table 2 Comparative of collection of Day time and Night time by the dry-ice method and the Light trap

1st Dry-ice collection				
Species name	Sex	Day time	Night time	Total
<i>Mn. uniformis</i>	male	0	840	840
	female	89	1152	1241
<i>Mn. ochracea</i>	male	0	2	2
	female	0	1	1
2nd Dry-ice collection				
<i>Mn. uniformis</i>	male	2	132	134
	female	96	2986	3082
<i>Mn. ochracea</i>	male	0	3	3
	female	0	1	1
1st Light trap collection				
<i>Mn. uniformis</i>	male	0	12	12
	female	0	29	29
<i>Mn. ochracea</i>	male	0	6	6
	female	0	5	5
2nd Light trap collection				
<i>Mn. uniformis</i>	male	0	3	3
	female	0	17	17
<i>Mn. ochracea</i>	male	0	25	25
	female	0	27	27

れる。一方、キンイロヌマカはアシマダラヌマカとは逆に、ドライアイス採集よりもライトトラップ採集に少数ではあるが採集されたことから、第一次誘引は光に対する走光性の結果によるものと推定された。これらのことは、両種ヌマカの野外における生態的な差異として興味ある問題として今後検討を加えなければならない。

IV 結 言

京都市東北部の深泥ヶ池に発生するヌマカ属二種（アシマダラヌマカ及びキンイロヌマカ）の生態を明らかにするために、ドライアイス採集法及びライトトラップ採集法を用いて成虫の周年採集をこころみた結果、アシマダラヌマカの成虫の活動は、5月下旬から始まり8月下旬にピークに達し、10月上旬に終わることが認められた。しかし、キンイロヌマカは、ドライアイス採集法では採集個体が得られず周年消長に関してはくわしいことは判らなかつた。また、アシマダラヌマカの雌成虫が各月あたり翅長値を計測するに足りる個体数であったので、年間翅長値変動をみたところ、コガタアカイエカなどにみられる春季と秋季に翅長が長く、夏期にはそれよりも短い翅長のものがあらわれることが確かめられたところから、越冬

は成虫越冬によるものと考えられた。さらに、ドライアイス採集法とライトトラップ採集法（夜間のみ）を併用して、蚊の多発期に二回の昼夜連続採集をこころみ、時刻的消長をみたところ、アシマダラヌマカの雌成虫は、ドライアイス採集法には昼夜を問わず飛来したが、雄成虫は薄暮から薄明までに活動することが解った。一方、キンイロヌマカは、ドライアイス採集法には全くといって良いほど飛来することはなかつた。次に、二回のライトトラップ採集法には、ドライアイス採集法では採集で来なかつたキンイロヌマカが採集された。それと同時にアシマダラヌマカも少数個体採集されているところから、両種のヌマカは、ヌマカとして同様の生態型を持つものといわれているが、アシマダラヌマカは光の刺激よりも二酸化炭素に対する走性がより強く、キンイロヌマカは二酸化炭素よりもより光に強く誘引を受けるものと推定される。しかし、これらのことはいづれも野外調査の結果にもとづくもので、さらに室内実験等を加えて検討せねばならない問題である。

本研究に終始ご指導ご協力いただいた名古屋保健衛生大学衛生学部医動物、松尾喜久男教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Carter, H. F. (1948); Records of *Filaria* infection in mosquitoes in Ceylon, *Ann. Trop. Med. Parasit* 42; 312
- 2) Haddow, A. J. (1954); Studies of the biting-habbits of African mosquitoes. An appraisal of methods employed with special reference to the twenty-four hour catch, *Bull. Ent. Res.*, 45; 199
- 3) 北村 茂・小垣 実 (1962) : 池畔の誘殺灯に捕集された蚊成虫相の周年遷移について 衛生害虫 Vol 7 No 2: 11-18
- 4) Laurence, B. R. (1960); The biology of Two Species of Mosquito, *Mansonia africana* (Theobald) and *Mansonia uniformis* (Theobald) Belonging to the Subgenus *Mansonioides* (Diptera; Culicidae), *Bull. Ent. Res.*, 51; 491-517
- 5) 松尾喜久男・田村辰夫・北村 茂・石野卯吉 (1963) : 京都市深泥ヶ池周辺における蚊の季節的消長 18回日衛動西日本支部大会 (抄)
- 6) Samarawickrema, W. A. (1968): Laboratory culture and Life Cycle of two species of Mos-

- quito, *Mansonia (Mansonia) uniformis* Theobald and *Mansonia (Mn.) annulifera* Theobald from Ceylon, Ceylon J. Med. Sci. Vol. 17, 2; 7-19
- 7) Samarawickrema, W. A. (1968); The Biting cycles and Parity of the mosquito *Mansonia (Mansonioides) uniformis* (Theo) in Ceylon, Medical Research Institute, Colombo Ceylon. Bull. Ent. Res. 58;293
 - 8) Sasa, M. (1976); Human Filariasis: A Global Survey of Epidemiology and Control. University Park Press, 819 pp.
 - 9) 上本駿一・山口洋平・戸板健一 (1967): コガタアカイエカ雌成虫の翅長の季節的推移 22回日衛動西日本支部大会 (抄)
 - 10) Wharton, R. H. (1978); The Biology of *Mansonia* mosquitoes in Relation to the Transmission of Filariasis in Malaya. Institute for Medical Reserch, Bull.; Inst. Med. Res. (Kuala Lumpur) 114 pp.
 - 11) Yamaguti, S. and La Casse, W. J. (1950): Mosquito Fauna of Japan and Korea. Office of the surgeon Hq 8 th Army Apo. 343: 65-79

ECOLOGICAL STUDY OF *MANSONIA (MN.) UNIFORMIS*
THEOBALD AND *MANSONIA (CO.) OCHRACEA*
THEOBALD (DIPTERA, CULICIDAE) IN
KYOTO CITY, MIDOROGA-IKE POND

MISAO IWAKI

Received for publication 2 June 1982

The specimens of two species of adult mosquitoes, *Mansonia (Mansonioides) uniformis* and *Mansonia (Coquillettidea) ochracea* were collected by the dry-ice collection method and the light-trap collection method at the Midoroga-ike pond which is situated in the northern part of Kyoto City from February to November in 1964. Seasonal flight activities of *Mansonia (Mn.) uniformis* were seen at this pond from the end of May to the beginning of October. Seasonal variation of wing-length of adult females of *Mansonia uniformis* were observed that the wing-length is longer in spring and autumn than in summer as well as in the case of *Culex tritaeniorhynchus*.

Namely it seems to be that *Mansonia* mosquitoes are hibernated in adult stage in their life cycle. *Mansonia uniformis* is attracted to CO₂ strongly, while *Mansonia ochracea* is aggregated to the light-trap collection method. Therefore, it is clarified that there are two different type of taxis i.e. chemotaxis for *Mansonia uniformis* and phototaxis for *Mansonia ochracea*.

蛇毒の酵素化学的研究 (第11報)

タイワンハブ毒よりアルギニンエステル水解酵素
(ME-4) の精製およびその性質

杉原久義・鬼頭玲子・二改俊章・酒井恵美

昭和57年7月9日 受付

緒 言

毒蛇咬傷によって生ずる全身性および局所性病変が蛇毒中のいかなる因子によって引き起こされるかを知るためには、各因子の単離と動物実験による証明が必要である。

著者らはタイワンハブ毒より各種の生理活性物質を単離し、その本態と作用を明らかにするための一連の研究を行っている。

蛇毒のアルギニンエステル(AE)水解酵素はキニン遊離作用、毛細血管透過性亢進作用、血液凝固作用などの極めて興味ある生理活性をもっていることが報告されている。各種蛇毒から得られた精製標品は分子量30,000前後の、熱に安定な、DFPで阻害を受けるセリン酵素であることも共通した性質である。

タイワンハブ毒は現在知られている蛇毒の中では最も強いAE水解活性をもっているが、著者らはこの毒中のAE水解酵素の分離を試み、これ迄に3種の酵素を単離し、ME-1, ME-2, ME-3と命名した。今回新たにこれらとは別のAE水解酵素を単離したので、その生化学的性質、生理活性などについて報告する。

実 験 材 料

新鮮自然乾燥タイワンハブ毒は台湾の中国血清疫苗製造所の蘇卿杼氏より入手したものをを用いた。Sephadex G-100, CM-Sephadex C-50, DEAE-

Sephacel, Polybuffer Exchanger 94 (PBE 94), Polybuffer 74, Pharmalyte pH 3-10 はファルマシア社製, α -N-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), α -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), α -N-tosyl-L-argininamide (TAA), α -N-benzoyl-L-argininamide (BAA), α -N-tosyl-L-lysine methyl ester (TLME), α -N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), bradykinin は株式会社ペプチド研究所, Soybean trypsin inhibitor (SBTI type I-S), Limabean trypsin inhibitor (LBTI type II-L), 卵白 trypsin inhibitor (EWTI type III-O), p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), benzamidine, p-chloromercuribenzoate (PCMB), diisopropyl fluorophosphate (DFP) はシグマ社製, trasyolol はバイエル株式会社より購入した。その他の試薬は試薬特級を使用した。

実 験 方 法

アルギニンエステル水解活性 Roberts(1958)の方法に準拠した。基質として TAME を用いた。適当濃度の試料 0.1 ml, 0.4 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 0.8 ml, 0.1 M 基質液 0.1 ml を混和し, 37°C, 15分間反応後, 2 M 塩酸ヒドロキシルアミンと 3.5 M 水酸化ナトリウムの等量混液 1 ml を加え反応を止め, 20分後 6% TCA (4 N HCl) 0.5 ml, 0.11 M FeCl₃ (0.04 N HCl) 2 ml で残存している TAME を発色させ, 500 nm の吸光度を測定した。活性の単位は1分間に 1 μ mol の基質を

水解する活性を1単位とした。

キニン遊離活性 Erspamer ら(1962)の方法に準拠した。前日エストラジオールを腹腔内に注射しておいた処女ラットより子宮を摘出し、De Jalon 液中に 28°C においてその収縮を測定した。基質としては牛血しょうを 60°C, 30分処理後、終濃度 10^{-3} M になるように *o*-phenanthroline を加えたものをを用いた。その 0.1 ml (基質量としては大過剰)、適当濃度の試料液 0.1 ml を 37°C, 3分間反応後、100°C に加熱して反応を止めその 0.1 ml を用いて前記ラット子宮の収縮を測定した。活性の単位はあらかじめ合成 bradykinin を用いて作製しておいた標準曲線 (0.5 μ g から 1.5 μ g までは直線性を示した) より力価 (μ g) を求めた。

毛細血管透過性亢進作用 Miles(1955)の方法に準拠した。2-2.5 kg の家兎を硫化バリウム脱毛剤で脱毛後、チンク油をぬり24時間後エバンスブルーの 20 mg を 2 ml の生理食塩水に溶かしたものを静脈内に注射後、試料液 0.1 ml を皮内に注射した。1時間後、エーテルにより殺し、皮膚をはぎとりガラス板に固定し、裏側からその青色斑の直径を測定した。10 mm を越える青色斑が認められたものを毛細血管透過性亢進作用を有するものと判定した。

出血活性 マウス背部に適当濃度の蛇毒液を皮下注射し、24時間後にエーテルにより殺して皮膚をはぎとり、裏側から出血の有無を観察した。

致死活性 適量の蛇毒液 (LD_{50} の4倍量、約 280 μ g/mouse) をマウス腹腔に投与し、24時間の生死を観察した。

Proteinase 活性 Lin ら (1969) の方法により調製した dimethylcasein を 0.1% 濃度になるよう 0.01 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解しこれを基質液とする。基質液 1 ml と蛇毒液 (50 μ g/ml) 0.1 ml を 37°C で反応させ、そのうち 0.2 ml をとり出し、100°C, 3分間加熱して反応を止める。水 0.3 ml, 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 10.15) 0.5 ml, 1.1 M トリニトロベンゼンスルホン酸水溶液 0.02 ml を加え 10分間室温放置する。1.5 mM Na_2CO_3 含有 0.2 M NaH_2PO_4 (pH 6.87) 5 ml を加え、420 nm における吸光度を測定した。活性

の単位は1分間当たり 420 nm の吸光度 1 を示す活性を1単位とした。その他、Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase, 5'-Nucleotidase, ATPase, Casein 水解活性は第1報 (1972) で報告した通りである。

結 果

アルギニンエステル水解酵素 ME-4 の分離

Sephadex G-100 ゲルろ過 粗毒 2140 mg を 0.15 M NaCl 含有 0.005 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 8 ml に溶解し、不溶性物質を遠沈除去後、同緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 でゲルろ過を行った。溶出後のタンパク量は 280nm の吸収で測定した。その結果、Fig. 1 に示すような溶出パターンが得られた。各ピークを溶出順に p1, p2, p3, p4, p5 とすると AE 水解活性は p4 にみられたので、この画分について精製を試みた。

CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィー

Sephadex G-100 で得られた p4 画分を 0.01 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で透析後、CM-Sephadex C-50 に吸着させ、素通り画分を分取した後、NaCl 濃度を 0.5 M まで直線的に上昇させたところ、Fig. 2 に示すパターンが得られた。この段階で AE 水解酵素は p1 と p6 の 2 つに分かれて溶出してくるが、p1 からはすでに ME-1 (杉原ら, 1980), ME-2 (杉原ら, 1981) が単離されている。また p6 からもすでに ME-3 (杉原ら, 1982) が単離されているが、ここでは ME-4 も混在している。今回は ME-3 のときと同様 p6 画分を集め 0.01 M NaCl 含有 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) で透析を行った。

DEAE-Sephacel クロマトグラフィー 透析した画分を DEAE-Sephacel に吸着させ、素通り画分を分取した後、食塩濃度を 0.3 M まで直線的に上昇させたところ、Fig. 3 に示すパターンが得られた。AE 水解活性は p1, p3, p4 に認められた。今回は試験管番号 180-190 (p3) を集め 25 mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.4) で透析を行った。

Chromatofocusing 透析した画分を PBE 94 に吸着させ、Polybuffer 74 (pH 5.0) で溶出した

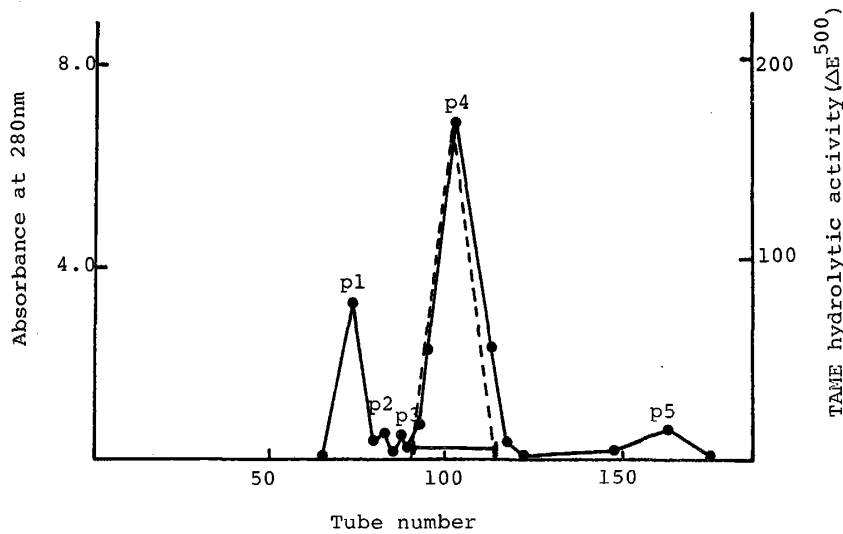


Figure 1 Gel Filtration of the Venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* on a Column of Sephadex G-100.

Trimeresurus mucrosquamatus venom (total protein 2140 mg, TAME hydrolytic activity: 51.7 units/mg) was applied to a column (5.0×100 cm) of Sephadex G-100 equilibrated with 0.005 M Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl, pH 8.5 and 3-ml fractions were collected at a flow rate of 12 ml/hr.

●—●: absorbance at 280 nm, -----: TAME hydrolytic activity.

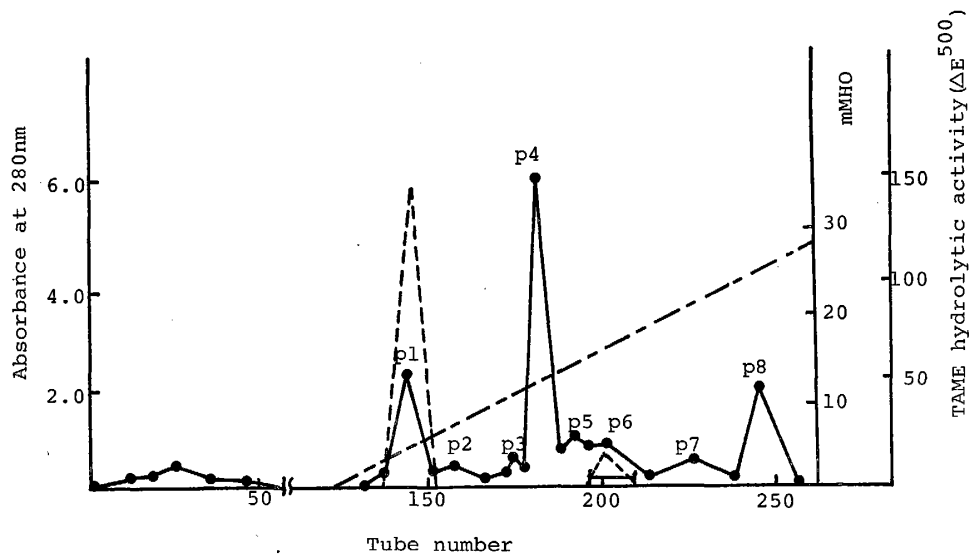


Figure 2 CM-Sephadex C-50 Column Chromatography

The TAME hydrolase fraction (total protein 1124.7 mg, TAME hydrolytic activity: 75.5 units/mg) in tubes 90-115 (indicated with black bar in Fig. 1) was applied to a column (1.9×45 cm) of CM-Sephadex C-50 equilibrated with 0.01 M acetate buffer, pH 6.0. The column was eluted with a linear gradient from 0-0.5 M NaCl in 800 ml total volume. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

●—●: absorbance at 280 nm, -----: TAME hydrolytic activity,
 ······: Conductivity.

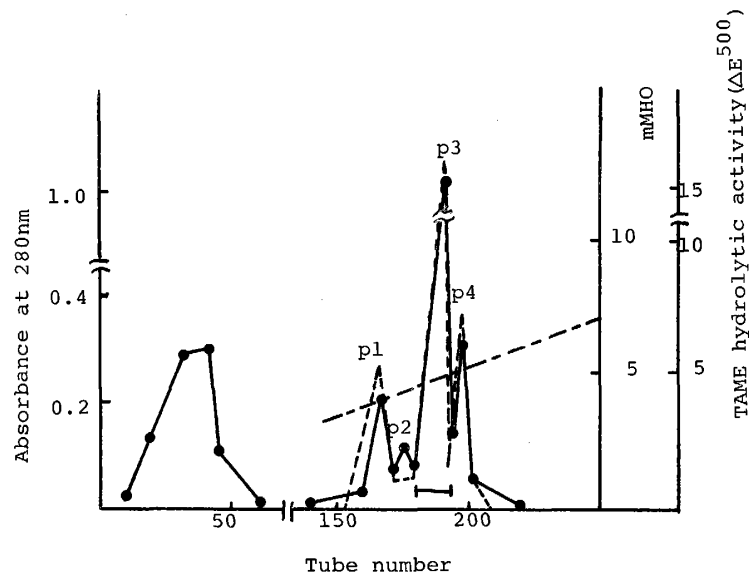


Figure 3 DEAE-Sephacel Column Chromatography

The TAME hydrolase fraction (total protein 65.0 mg, TAME hydrolytic activity: 89.9 units/mg) in tubes 196–208 (indicated with black bar in Fig. 2) was applied to a column (1.5 × 48 cm) of DEAE-Sephacel equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.2. The column was eluted with a linear gradient from 0.01 M–0.3 M NaCl in 800 ml total volume. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

●—●: absorbance at 280 nm, -----: TAME hydrolytic activity, -----: Conductivity.

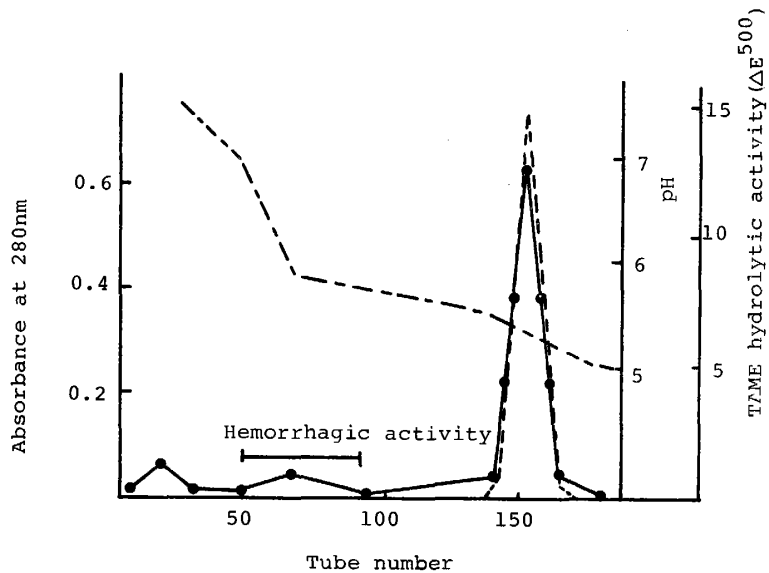


Figure 4 Chromatofocusing

The TAME hydrolase fraction (total protein 17.8 mg, TAME hydrolytic activity: 92.0 units/mg) in tubes 180–190 (indicated with black bar in Fig. 3) was applied to a column (1.0 × 43 cm) of PBE 94 equilibrated with 25 mM Imidazole buffer, pH 7.4. The column was eluted with polybuffer 74, pH 5.0. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 14 ml/hr.

●—●: absorbance at 280 nm, -----: TAME hydrolytic activity, -·-·-·: pH.

ところ Fig. 4 に示すようなパターンが得られた。AE 水解活性を示す試験管番号 140-160 を集め蒸留水で透析を行った。なおこの段階において出血活性と AE 水解活性が分離され、ME-4 が精製された。

最終標品の均一性

ディスク電気泳動(永井, 1967) Fig. 5 は 7.5% ポリアクリルアミドゲルを支持体とした pH 8.3 ゲルディスク電気泳動で、試料は約 5 μg を用いた。Fig. 5 に示すようにこの精製段階での標品は電気泳動的に単一になっていることがわかった。これを最終標品 ME-4 として以下の実験を行った。

分子量の測定

Weber と Osborne (1969) の方法による、0.1% SDS ディスク電気泳動法により測定を行った。5%, 6.9%, 10% ポリアクリルアミドゲルを支持体とし、3%メルカプトエタノール存在下で 1 本当たり 7 mA, 約 3 時間泳動した。標準としてファルマシア社製分子量測定マーカー (α -lactalbumin 14,400, trypsin inhibitor 20,100, carbonic anhydrase 30,000, ovalbumin 43,000, albumin 67,000, phosphorylase b 94,000) を用いて各々の移動度の差から分子量を求めたところ、分子量 28,500 と算出された。なおこの操作においても最終酵素標品は単一のバンドとして泳動した。

等電点

最終標品を 1% グリシン溶液で透析後、LKB 8100 エレクトロフォーカシング蛋白分離装置を用いて、pH 3-10 のキャリアーアンホライトで 4°C, 300 V, 24 時間泳動した後、280 nm および pH を測定し等電点を求めた。Fig. 6 に示したように単一ピークを示し、等電点は 5.31 であった。

毛細血管透過性亢進活性

Fig. 7 に示すように ME-4 の 5.3 μg を家兔皮内に接種すると接種部位の毛細血管よりエバンスブルーが透過し、著明な青色斑を形成することが観察された。

キニン遊離活性

ラット子宮を用いて活性を測定した結果、ME-4 は 131 $\mu\text{g}/\text{mg}/3 \text{ min}$ のキニン遊離活性を示した。

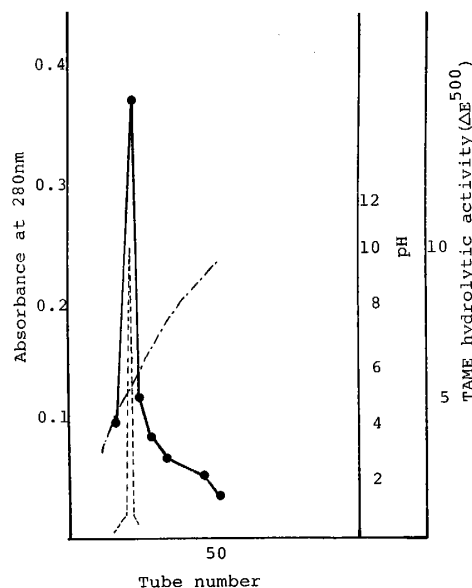


Figure 6 Isoelectric Focusing of ME-4

●—●: absorbance at 280 nm,
-----: TAME hydrolytic activity
-----: pH,

Isoelectric focusing with carrier ampholyte covering the pH range 3-10 was conducted in a column of 110 ml capacity for 24 hr at 4°C, 1.2 mg of ME-4 was put in the center of the column. 2-ml fractions were collected.

出血活性

ME-4 (5.0 μg) を家兔皮内およびマウス皮下に接種し、24 時間後にエーテル麻酔により殺し、皮をはいで皮膚の裏側より出血斑の有無を観察したが、出血斑は認められなかった。

粗毒と最終標品の各種酵素活性および生理活性の検討

Table I は粗毒と最終標品における各種酵素活性および生理活性を測定したものである。最終標品中には AE 水解活性と毛細血管透過性亢進活性、キニン遊離活性が存在し粗毒中の他の活性は認められなかった。

Table II は各精製段階における AE 水解活性の動向を示したものである。ME-4 の AE 水解活性は 152.5 units/mg で、粗毒の 51.7 units/mg に比べ 2.9 倍と上昇している。しかし収率は 1.4% であった。

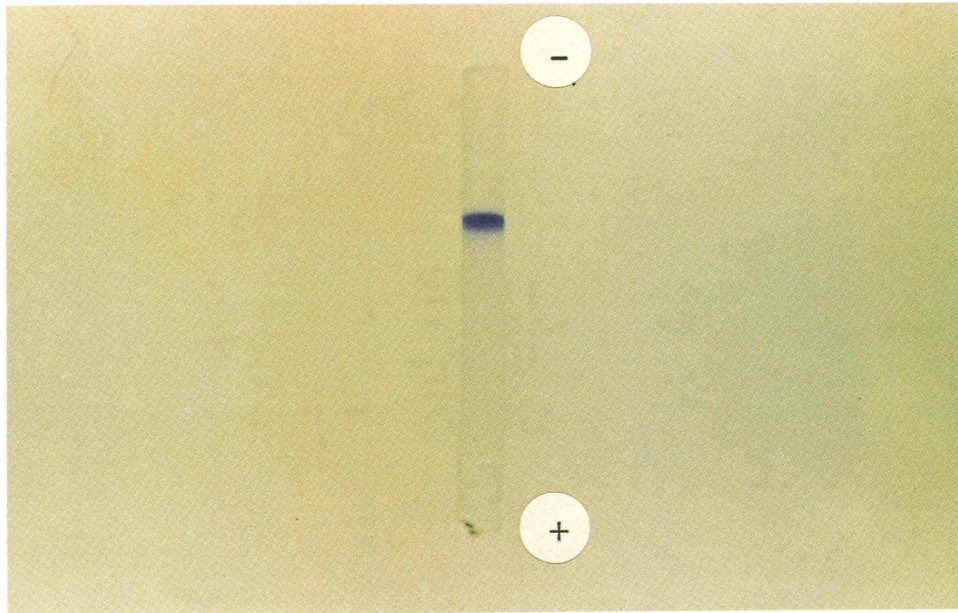


Figure 5 Disc Electrophoresis of ME-4

Disc electrophoresis was performed 7.5% polyacrylamide gels (0.5×9.0 cm, 2 mA, 4°C). The running buffer for ME-4 was 50 mM Tris-glycine (pH 8.3). The gel was stained with 0.05% coomassie brilliant blue R 250 for protein.



Figure 7 Patterns of Capillary Permeability-Increasing Activity observed from the Inside of the skin

Table I Various Enzymatic and Physiological Activities of Crude Venom and ME-4

Enzymatic activities	Crude venom	ME-4
TAME hydrolase	+ ^{a)}	+
Proteinase	+	- ^{b)}
Phosphomonoesterase	+	-
Phosphodiesterase	+	-
5'-Nucleotidase	+	-
ATPase	+	-
Physiological activities		
Kinin-releasing	+	+
Capillary Permeability-increasing	+	+
Hemorrhagic	+	-
Lethal	+	-

a) Presence of activity is indicated by +.

b) Absence of activity is indicated by -.

Table II Summary of the Purification of ME-4

Step	Protein (mg)	TAME hydrolytic activity			Yield (%)
		Units/mg	Total activity	Relative activity	
Crude venom	2140.0	51.7	110638	1.0	100
Sephadex G-100	1124.7	75.5	84915	1.5	76.8
CM-Sephadex	65.0	89.9	5844	1.7	5.3
DEAE-Sephacel	17.8	92.0	1638	1.8	1.5
Chromato-focusing	10.1	152.5	1540	2.9	1.4

基質特異性

各種基質に対する ME-4 の水解活性を検討した結果、TAME (152.5 units/mg), BAEE (71.4 units/mg) のような低分子合成アルギニンエステルを水解した。しかしリジンエステル (TLME), チロシンエステル (ATEE), アルギニンアミド (BAA, TAA) および天然高分子基質であるカゼインあるいはジメチルカゼインに対する水解活性は認められなかった。このような点より ME-4 は ME-1, ME-2, ME-3 と同様高い基質特異性を有することが認められた。

熱安定性

最終標品を 0.4 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中で 37°C, 45°C, 55°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C の各温度で 20 分間保温後、AE 水解活性を測定し、37°C での活性と比較した。70°C で 55%, 80°C で 37%, 90°C で 7%, 95°C で 3% の残存活性を示し、本酵素も ME-1, ME-2, ME-3 と同様、熱に対して比較的安定な酵素であることが認められた。

pH 安定性

最終標品を蒸留水で透析後、Britton-Robinson

緩衝液 (Britton, Robinson, 1931) pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 に加え 4°C, 24時間保温後, TAME 活性の測定条件である pH 8.5 として AE 水解活性を測定し, 最も活性の高かった pH 7.0 での活性と比較してその割合を算出した。pH 4-12 で70%以上の活性を示し, 幅広い pH で安定であった。この点でも ME-1, ME-2, ME-3 との類似性が示された。

糖の定性および定量試験

最終標品についてアンスロン硫酸法 (Roe, 1955) によりグルコースの検量線から求めた ME-4 の糖含量はグルコースに換算して 13.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ であった。

各種阻害剤による影響

最終標品約 3 μg と各種阻害剤をカッコ内に示した最終濃度になるように混合し, 37°C, 15分間保温後 AE 水解活性を測定した結果, 塩酸ベンズアミジン (10 mM), DFP (10 mM), TPCK (50 mM) によって阻害され, Trasylol (100 unit), SBTI (0.2%), LBTI (0.2%), EWTI (0.2%), Heparin (0.2%), Cysteine (10 mM), EDTA (10 mM), PCMB (0.1 mM), Iodo acetic acid (10 mM) によっては何ら影響を受けなかった。

K_m および K_i の測定

Fig. 8, 9, 10 は Lineweaver-Burk (1934) のプロット図を作製し図から K_m, K_i を求めた結果である。K_m は基質として TAME ($1.25 \times 10^{-3} \text{ M} - 20 \times 10^{-3} \text{ M}$) を用いた。その結果, K_m は $25.0 \times$

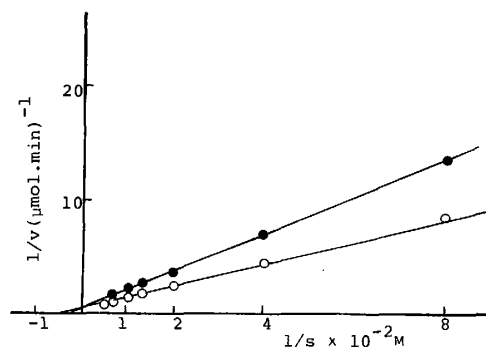


Figure 8 Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of TAME by ME-4

○—○: absence of benzamidine,
●—●: presence of benzamidine (1 mM).

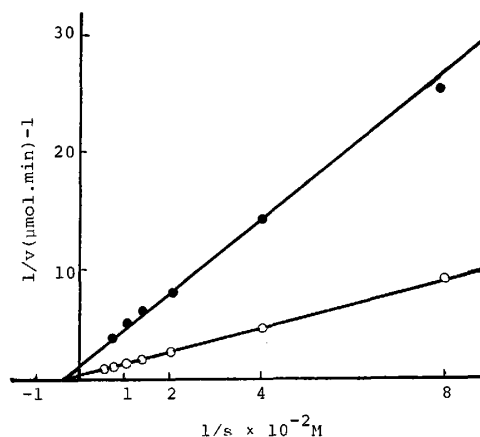


Figure 9 Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of TAME by ME-4

○—○: absence of DFP,
●—●: presence of DFP (10 mM).

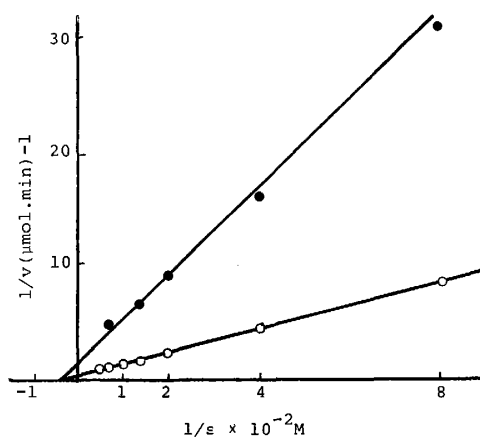


Figure 10 Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of TAME by ME-4

○—○: absence of TPCK,
●—●: presence of TPCK (1.7 mM).

10^{-3} M と測定された。K_i は塩酸ベンズアミジン (1 mM), DFP (10 mM), TPCK (1.7 mM) を用い最終標品約 3 μg と 37°C, 15分間保温したものを酵素液とし, 基質として TAME を用いて測定した。その結果, 塩酸ベンズアミジンを用いた場合は拮抗性阻害でその K_i は $0.63 \times 10^{-3} \text{ M}$, DFP, TPCK を用いた場合は非拮抗性阻害でその K_i は $4.44 \times 10^{-3} \text{ M}$, $0.57 \times 10^{-3} \text{ M}$ と測定された。

Table III Comparisons of Various Properties of ME-1, 2, 3 and 4

Property	ME-1 ^{a)}	ME-2 ^{b)}	ME-3 ^{c)}	ME-4
Molecular weight	27,000	29,800	33,000	28,500
Isoelectric point	5.95	5.62	6.93	5.31
Heat stability	Stable	Stable	Stable	Stable
pH stability	Wide range	Wide range	Wide range	Wide range
Hexoses ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	3.8	2.0	63.9	13.0
Inhibition by Benzamidine	+ ^{e)}	+	+	+
Inhibition by DFP	- ^{f)}	-	+	+
Inhibition by TPCK	-	-	+	+
Substrate specificity	High	High	High	High
Km (TAME)	4.0×10^{-3} M	4.3×10^{-3} M	7.8×10^{-3} M	25.0×10^{-3} M
Ki (benzamidine)	0.29×10^{-3} M	0.19×10^{-3} M	0.67×10^{-3} M	0.63×10^{-3} M
Ki (DFP)	-	-	3.66×10^{-3} M	4.44×10^{-3} M
Ki (TPCK)	-	-	0.43×10^{-3} M	0.57×10^{-3} M
C. P. I. ^{d)}	+	+	+	+
Kinin-releasing ($\mu\text{g}/\text{mg}/3$ min)	-	12.7	-	131
Clotting	-	-	-	-

a) cited from Yakugaku Zasshi, 100, 1035 (1980). b) cited from Yakugaku Zasshi, 101, 153 (1981). c) cited from Yakugaku Zasshi, 102, 560 (1982). d) capillary permeability-increasing activity. e) Presence of activity is indicated by +. f) Absence of activity is indicated by -.

考 察

これまでに蛇毒中の AE 水解酵素については多くの研究者によって報告が行われている。著者らはなかでも AE 水解活性の最も強いタイワンハブ毒に着目し、その生化学的、生理学的作用を明らかにするため単離精製を行っている。本毒には 5 種類の AE 水解酵素が存在しており、そのうちの 3 種は著者らによってすでに単離精製された。毛細血管透過性亢進作用を有する ME-1 と毛細血管透過性亢進作用とキニン遊離作用を併せもつ ME-2、さらに毛細血管透過性亢進作用を有する ME-3 である。今回、4 番目の AE 水解酵素として ME-4 をディスク電気泳動、SDS ディスク電気泳動、等電点分画で単一な状態で分離した。ME-4 は毛細血管透過性亢進作用とキニン遊離作用を有していた。ME-4 を ME-1, ME-2, ME-3 と比較したのが Table III である。いずれも分子量 30,000 前後の耐熱性、幅広い pH 域で安定な糖

タンパクである。しかしこの 4 酵素は DFP で阻害を受けない ME-1, ME-2 と DFP で阻害をうける ME-3, ME-4 の 2 つに分かれた。他の蛇毒に含まれている AE 水解酵素はすべて DFP で阻害をうけるセリン酵素であり、その点 ME-3, ME-4 の方が一般的であると言えよう。しかし同じ毒中にこのように 2 つのタイプがみられたことは誠に興味深いことである。これまでタイワンハブ毒から単離された AE 水解酵素はいずれも毛細血管透過性亢進作用を有していたが ME-4 も同様であった。しかし ME-4 はさらにキニン遊離作用も併せもっており、この点は ME-2 と類似している。

この ME-4 の精製にあたり、最も困難であったことは出血因子の分離であった。各種クロマトグラフィーで単一ピークとなり、ディスク電気泳動でもほとんど単一バンドと認められるようになって、出血活性が含まれていた。それ故 ME-4 は出血作用をも有する AE 水解酵素であろうかとも考えたが、クロマトフォーカシングにより完

全に出血因子と区別することができた。

タイワンハブ毒 AE 水解酵素で興味のあることは、4つの酵素すべてに毛細血管透過性亢進作用があること、その中2つはキニン遊離作用をもっているが、血液凝固作用を示すものが見出されないことである。マムシ毒では3種のうち1つが血

液凝固活性を示すし、ヒヤッポダ毒ではただ1つの精製された酵素が血液凝固因子であるのに比べ、タイワンハブ毒では4つともこの活性を示さない。

今後は残された AE 水解酵素の精製を行い、この毒に多量に含まれている AE 水解酵素の役割について考察してゆきたい。

引用文献

- 1) Britton, H. T. S. and Robinson, R. A. (1931): The Use of the Antimony-Antimonous Oxide Electrode in the Determination of the Concentration of Hydrogen Ions and in Potentiometric Titrations. The Prideaux-Ward Universal Buffer Mixture., *J. Chem. Soc.*, **1**, 458-473
- 2) Erspamer, V. and Erspamer, F. (1962): Pharmacological actions of eledoisin on extravascular smooth muscle., *Brit. J. Pharmacol.*, **19**, 337-354
- 3) Lin, Y., Means, G. E. and Feeney, R. E. (1969): The Action of Proteolytic Enzymes on N, N-Dimethyl Proteins, *J. Biol. Chem.*, **244** (4), 789-793
- 4) Lineweaver, H. and Burk, D. (1934): The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-666
- 5) 松尾雄志, 堀尾武一 (1967): 蛋白質の電気泳動的等電点分画法, 蛋核酵, **12**, 737-748
- 6) Miles, A. A. and Wilhelm, D. L. (1955): Enzyme-like globulins from serum reproducing the vascular phenomena of inflammation., *Brit. J. exptl. Pathol.*, **36**, 71-81
- 7) 永井 裕 (1967): ディスク電気泳動法, 別冊蛋核酵, 物理化学的実験法, **3**, 3-14
- 8) Roberts, P. S. (1958): Measurement of the Rate of Plasmin Action on Synthetic Substrates, *J. Biol. Chem.*, **232**, 285-291
- 9) Roe, J. H. (1955): The Determination of Sugar in Blood and Spinal Fluid with Anthrone Reagent., *J. Biol. Chem.*, **212**, 335-343
- 10) 杉原久義, 二改俊章, 二村敦子, 田中哲之助 (1980): 蛇毒の酵素化学的研究 (第8報) タイワンハブ毒より毛細血管透過性亢進作用を有するアルギニンエステル水解酵素 (ME-1) の精製とその性質, 薬学雑誌, **100** (10), 1035-1042
- 11) 杉原久義, 二改俊章, 二村敦子, 田中哲之助 (1981): 蛇毒の酵素化学的研究 (第9報) タイワンハブ毒よりアルギニンエステル水解酵素 (ME-2) の精製およびその性質, 薬学雑誌, **101** (2) 153-160
- 12) 杉原久義, 二改俊章, 森浦正憲, 神谷和人, 田中哲之助 (1972): 蛇毒の酵素化学的研究 I. 数種蛇毒の長期常温保存における各種活性の変化について, 日本細菌学雑誌, **27** (1), 47-57
- 13) 杉原久義, 二村敦子, 加藤智子, 二改俊章 (1982): 蛇毒の酵素化学的研究 (第10報) タイワンハブ毒よりアルギニンエステル水解酵素 (ME-3) の精製およびその性質, 薬学雑誌, **102** (6) 560~567
- 14) Trautschold, I. (1970): Assay Methods in the Kinin System., *Handbook of Experimental Pharmacology*, **25**, 53-81, Springer-Verlag, Berlin
- 15) Weber, K. and Osborn, M. (1969): The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis., *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412

ENZYMOCHEMICAL STUDIES ON SNAKE VENOMS. XI.
PURIFICATION AND PROPERTIES OF ARGININE
ESTER HYDROLASE (ME-4) IN THE VENOM
OF *TRIMERESURUS MUCROSQUAMATUS*

HISAYOSHI SUGIHARA, REIKO KITO, TOSHIAKI NIKAI AND EMI SAKAI

Received for publication July 9 1982

One of the arginine ester hydrolases (TAME hydrolases) of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom was isolated by a combination of gel filtration on Sephadex G-100, ion exchange chromatographies on CM-Sephadex C-50, DEAE-Sephacel and chromatofocusing on PBE 94. From 2 g of the venom 10.1 mg of purified TAME hydrolase, ME-4 was obtained. The substrate specificity of ME-4 was strictly directed to the hydrolysis of arginine ester. The esterolytic activity was inhibited by benzamidine, p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl keton (TPCK) or diisopropyl fluorophosphate (DFP).

ME-4 was proved to be homogeneous by electrophoresis on polyacrylamide gel and isoelectric focusing. The molecular weight was found to be about 28,500. Its isoelectric point was 5.31. This enzyme was a glycoprotein. The esterolytic activity of the final preparation was 152.5 units/mg (substrate; TAME). This enzyme had capillary permeability-increasing and kinin-releasing activities, but not clotting activity. This protein was stable to heat treatment, and between pH 4 and 12. Its Michaelis constant (K_m) for TAME and inhibition constants (K_i) for benzamidine, DFP and TPCK were found to be 25.0×10^{-3} M, 0.63×10^{-3} M, 4.44×10^{-3} M and 0.57×10^{-3} M, respectively.

常時照明および常時暗黒条件飼育におけるフィラリア *D. viteae* の中間宿主アフリカ産ダニ *Ornithodoros* *moubata* の生活環について

水野不二男*・野上貞雄**・圓橋正秀*・松村武男*

昭和57年7月27日 受付

緒 言

ダニ *Ornithodoros moubata* (以下 *O. moubata*) はスナネズミ *Meriones unguiculatus* に感染するフィラリア *Dipetalonema viteae* (以下 *D. viteae*) の現在知られている唯一の最適中間宿主である (Worms, 1961)。

この *O. moubata* の生活については Hoogstraal (1956) や他にも種々報告されているが、自然環境下での生活についてや、生理生態などに関する基礎的な知見は少なく不明な問題が多数ある。*O. moubata* は雌雄異体で卵生である。卵は卵塊として産下され適当なる温度および湿度によって1ヶ月以内に孵化し3対の脚を持った幼ダニが現われる。適当なる吸血によって成長し若ダニ親ダニの各期に成長する不完全変態型である。若ダニは4対の脚を持ち体制も複雑である。若ダニは第1期から第3期まで区別できる。成虫になると雌雄の生殖器が判然としてくる。フィラリア *D. viteae* を研究するにあたり、ダニ *O. moubata* の大量繁殖、フィラリア寄生のまま長期維持そして吸血時間の短縮などが重要な課題である。

著者等はそれらの課題の為に物理的条件である照明条件、温度条件の変化が *O. moubata* の成長率、産卵数、生存率そして吸血時間にどのように影響したか検討したので報告する。

実験材料と実験方法

実験に使用した *O. moubata* は帝京大学医学部寄生虫学教室より、スナネズミは長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学教室より分与され累系飼育したものを使用した。

飼育条件は飼育室を常時暗黒、常時照明そして14時間照明、10時間暗黒 (以下 14L/10D) の3条件にし、温度は 12°C・27°C・32°C・36°C の4区分にし湿度を60%±5%とした。

吸血時間については、すべての *O. moubata* は実験前6ヶ月間は飢餓状態にし、各照明下で温度を21°Cと27°Cの温度差で第1期と第5期成虫の2種類に分けた。

スナネズミの腹部を剃毛し、前田式ダニ固定器中に *O. moubata* を入れ、腹部にかぶせ、*O. moubata* が宿主皮膚から脱離しなくなった時を吸血開始とし、吸血終了は *O. moubata* が自然に宿主皮膚より脱離した時とした。

吸血後の体重比は吸血時間測定と同じ方法で吸血中に水分を排出した場合は吸取紙で吸水し天秤にて重量を測定した。

産卵数調査については、各照明条件下にて温度21°Cと27°Cにて飼育した雌 *O. moubata* をスナネズミに吸血させ産卵数を測定した。そして雌雄差の調査については第5期になった成虫について調べた。

生存率は産卵した卵を各照明条件で 21°C・

* 神戸大学医学部医動物学教室 〒650 兵庫県神戸市中央区楠町7-11-1

** 東京大学医科学研究所寄生虫部 〒108 東京都港区白金台4-6-1

27°C・32°C (各湿度60%±5%) の飼育条件で第5期になった成虫数を調べた。また同時期に各照明条件 27°C にて雌雄 *O. moubata* を吸血させ、30・60・150・400・600日目までの体重測定と生存率を調べた。

吸血後の体重変化については、照明条件を常時暗黒にし、温度は 27°C 湿度は60%±5%とし、実験項目を 1) 吸血後の雄ダニの体重変化、2) 吸血後の雌ダニの体重変化、3) *D. viteae* 感染スナネズミ吸血後の雄ダニの体重変化、4) *D. viteae* 感染スナネズミ吸血後の雌ダニの体重変化について吸血後30・60・150・400日目の体重を測定した。

孵化率については各照明条件下にて温度 21°C・27°C・32°C・36°C の温度差と、60%±5%の湿度について産下直後の卵を8日目より30日目まで観察した *O. moubata* 数を調べた。

結 果

図1 は明暗条件 および 温度条件 において *O.*

moubata の吸血時間を検討した。白丸は第1期幼虫、黒丸は第5期成虫を示す。常時暗黒条件下で飼育された *O. moubata* 群では 27°C で飼育された温度下での吸血時間が短かった。

常時照明下および 14 L/10 D 条件でも 27°C での吸血時間が短いのが認められた。

各照明条件下では第1期と第5期成虫との有意差は認められなかったが温度においては 27°C で吸血させると吸血時間が短縮された。

図2 は明暗条件および温度条件による *O. moubata* 吸血後の体重比を示している。最低は吸血後1.5倍から最高16倍を示した。第1期成虫および第5期成虫での吸血率には有意差は認められなかったが、やや第1期成虫の方が吸血率が低い傾向を示した。

また照明条件および温度差による吸血後の体重変化は有意差が認められなかった。

図3 は明暗条件および温度差にて雌成虫の産卵数と卵から孵化した成虫の雌雄の差(性差)を調べた。黒丸は産卵数、M は産卵後の成虫になった

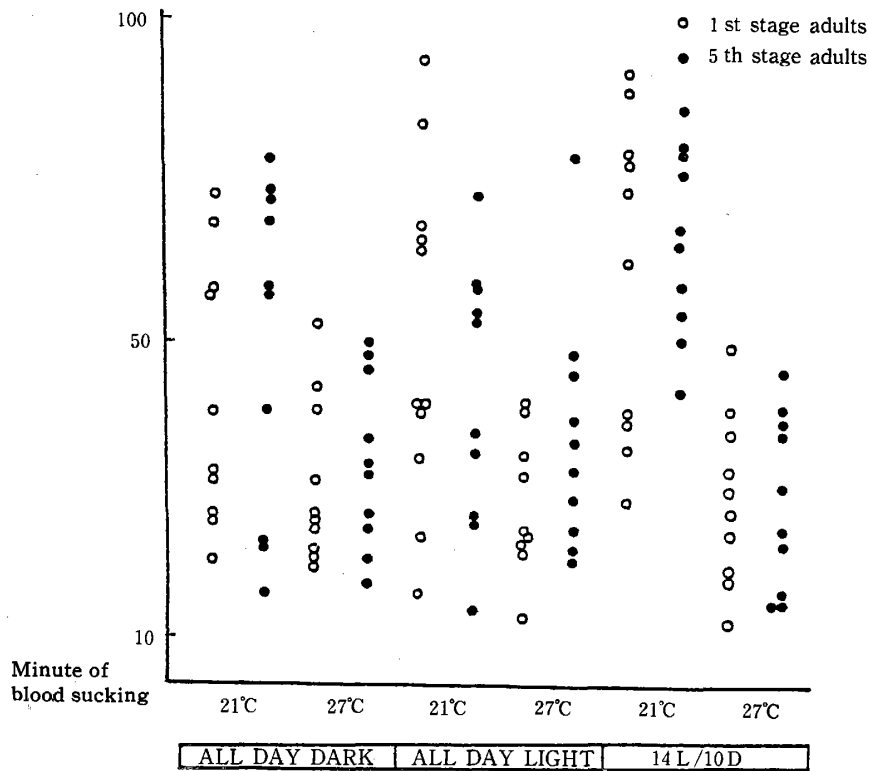


Figure 1 The blood sucking time of *O. moubata* in each lighting conditions.

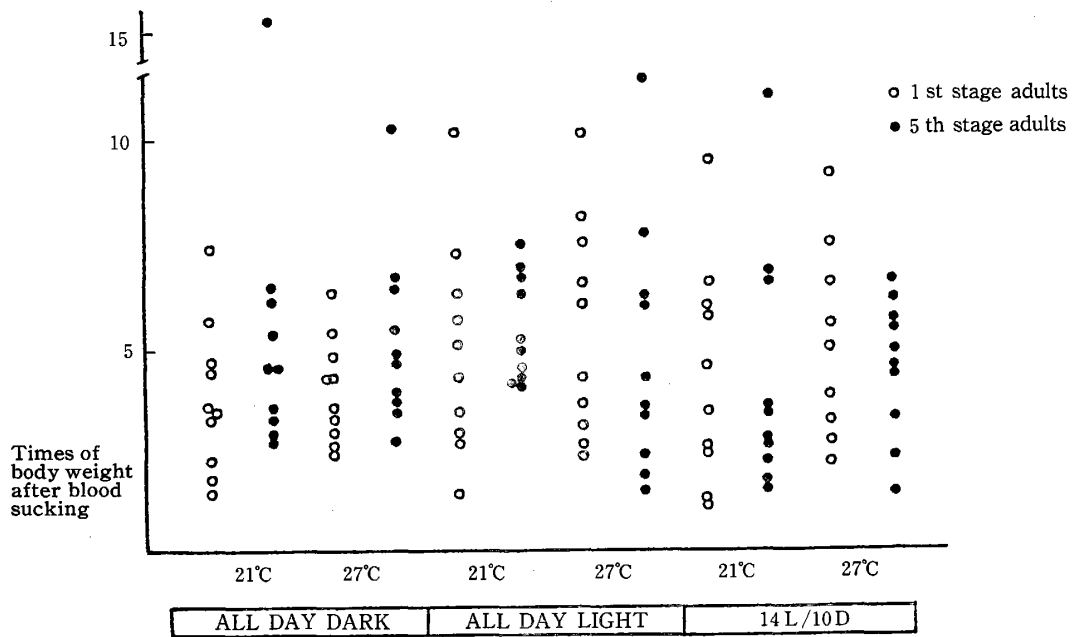


Figure 2 The ratio of body weight after blood sucking of *O. mbubata* in each lighting conditions.

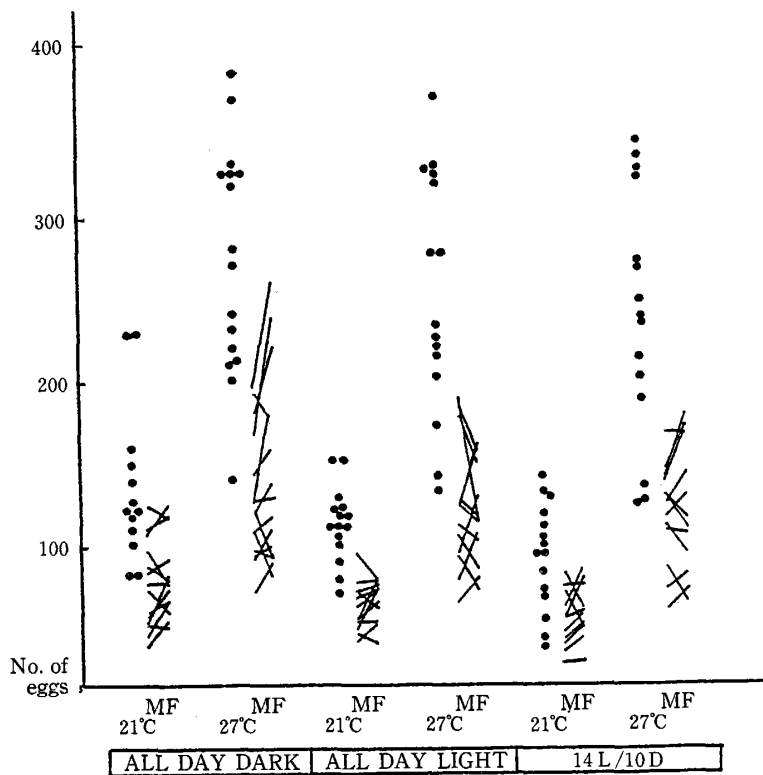


Figure 3 The production of eggs and ratio of sex of *O. moubata* in each lighting conditions.

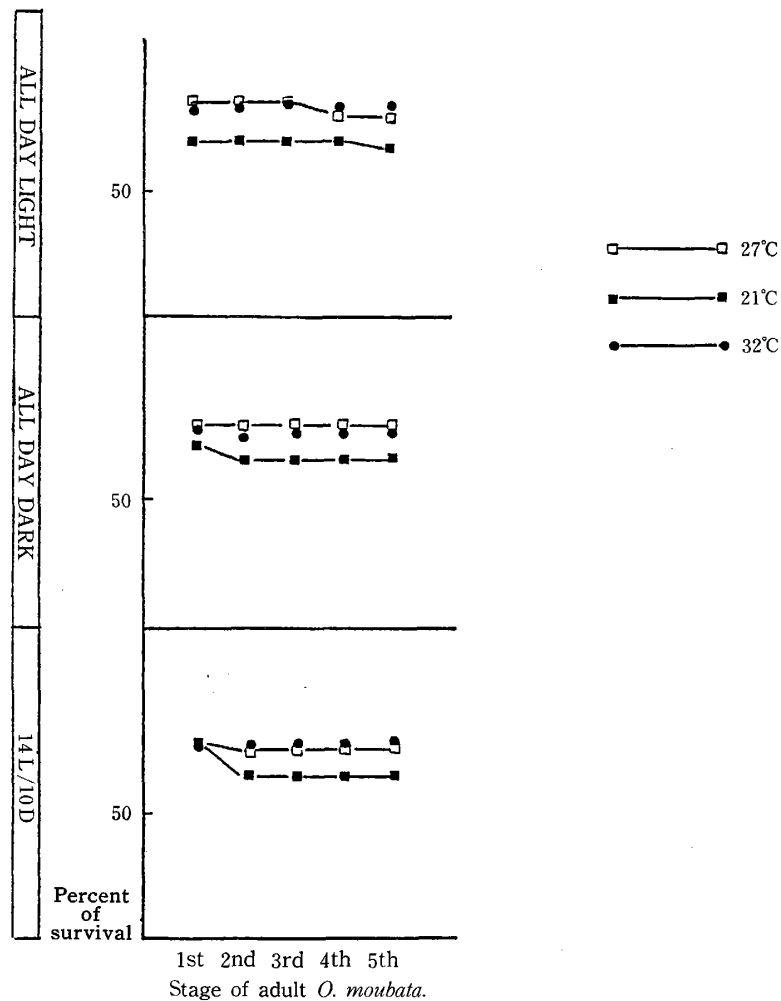


Figure 4 The survival ratio of *O. moubata* in each temperature.

雄 *O. moubata* 数, F は産卵後成虫になった雌成虫数を示している。

産卵数は 27°C の温度条件下で飼育した *O. moubata* に有意に多く認められ, 常時暗黒群では常時照明群に飼育された *O. moubata* より産卵数が多かった。また産卵の性差は雌 *O. moubata* の方がやや多かったが統計的な有意差は認められなかった。そして照明条件および温度条件が雌雄産卵の比率には特に影響を示してなかった。図 4 は明暗条件下で 21°C・27°C・32°C の温度条件にて成長 5 期までの生存率を追跡調査した。縦軸は生存率, 横軸は第 1 期から第 5 期の成虫発育過程を示している。図では暗黒群の 27°C と 32°C で高い生存率を示している。

図 5 は吸血後 600 日目までの体重変化を追跡した結果である。*O. moubata* は温度 27°C, 湿度 60% ± 5%, 照明条件は常時暗黒にて飼育した。黒丸は雄, 白丸は雌 *O. moubata* を示している。吸血後雌は 30 日以内に産卵するので, 吸血後 30 日目で雄の体重と比較すると約 2 倍の体重減になっている。

150 日目になると雄の体重は吸血直後の 50% 以下になり雌では 20% 前後になり, 上背部と下腹部を被っている体表が一枚の紙の様に平坦になる。

雌雄 *O. moubata* は 400 日目前後より体重減少が少くなり, この頃より雄の死亡率が高くなり, 600 日目を経過すると動きはほとんど止まり, 吸血する体力もなく死亡する *O. moubata* が多くな

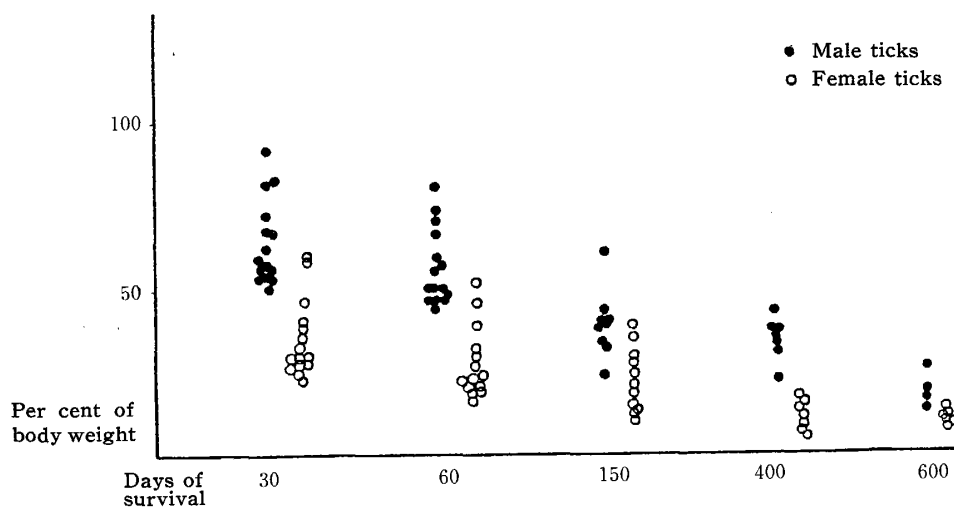


Figure 5 The survival ratio of adult female and male *O. moubata* at 27°C.

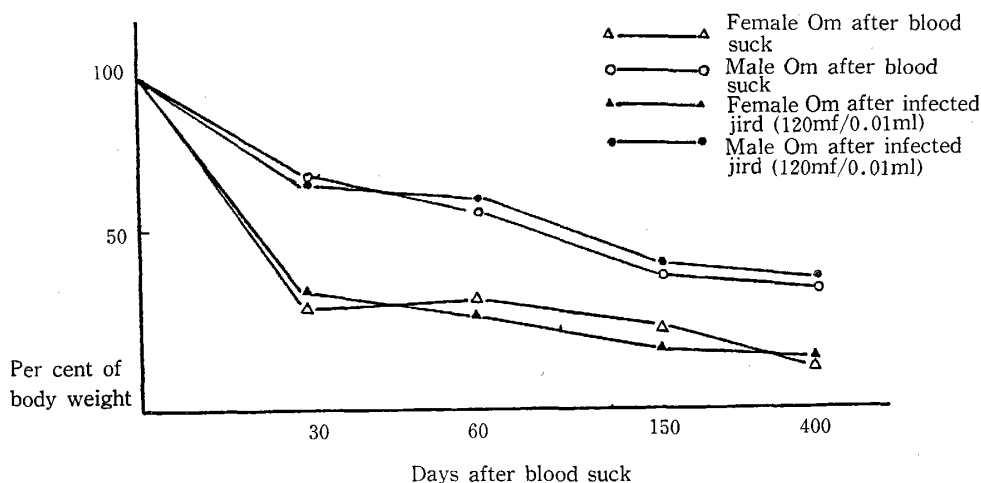


Figure 6 The change of body weight after blood suck at 27°C.

る。

図6は体重減少を400日目まで追跡しているが、雄、雌 *O. moubata* を *D. viteae* 感染スナネズミに吸血させ、*O. moubata* 体内にマイクロフィラリアを取り込んだ *O. moubata* の体重減についても調査した。

縦軸は体重変化、横軸は吸血直後からの日数を示し△は雌、▲は感染スナネズミに吸血させた。○は雄、●は雄を感染スナネズミに吸血させた。図では雌雄間とも統計的有意差は認められなかった。

図7は各照明条件と温度条件が *O. moubata* の

孵化に対して、どのように影響したかを調べた。

温度は 21°C・27°C・32°C そして 36°C の4段階に分けた。

常時照明群において 27°C と 32°C が産卵後8日目より孵化が開始され15日目で約50%の卵が孵化したが、21°C と 36°C での孵化率は悪かった。

常時暗黒群にては10日目・27°C で14%、32°C で32%の孵化率であったが、21°C と 36°C では18日目頃から孵化を始めた。14L/10D群では32°C で10日目に12%の孵化率を示したが、36°C では産卵17日目で2%だけが孵化した。

温度条件に関しては、21°C で常時照明群が

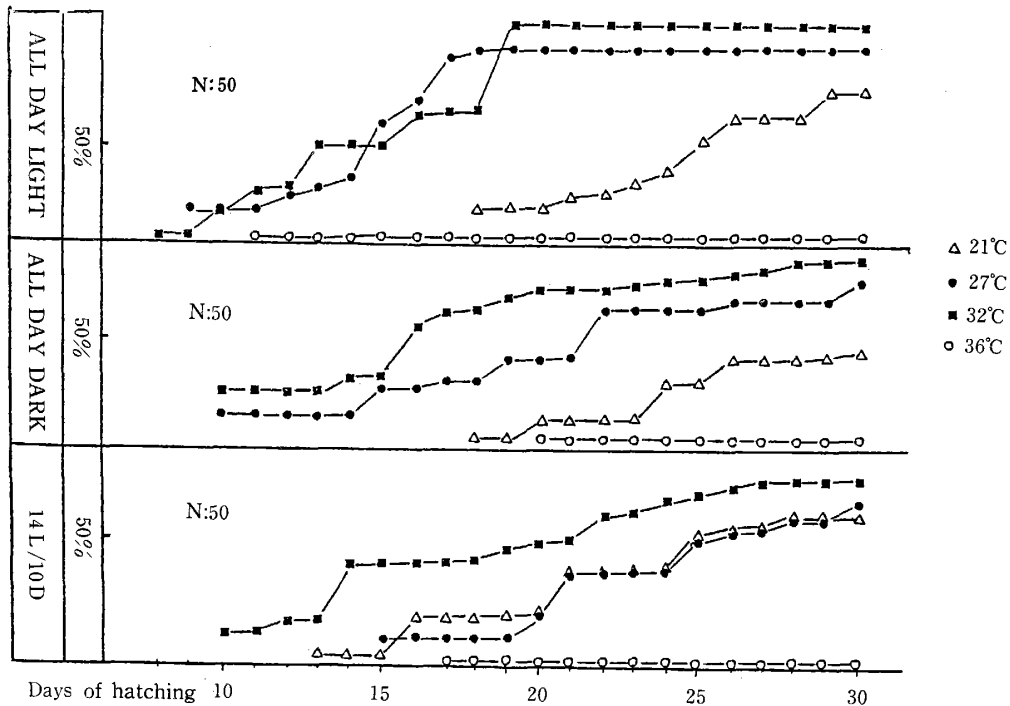


Figure 7 The hatching time of eggs from *O. moubata*.

30日目までに孵化したのが72%, 14L/10Dが58%, 常時暗黒群が42%であった。27°Cでは常時照明群が30日目まで92%の孵化率, 常時暗黒群では72%, 14L/10Dでは62%, 32°Cでは常時照明群は84%, 常時暗黒群では86%, 14L/10D群では82%と孵化率が高く, 36°Cでは全照明条件下で2%の低い孵化率であった。

考 察

吸血時間の短縮は定量的実験を効率化する。照明条件が吸血に要する時間に影響しない。そしてまた図1で示しているように27°Cで吸血時間が短い事が判明した。しかしながら吸血部位, *O. moubata*の飢餓状態, 個体差によっても吸血時間のちがうことが分った。吸血部位についても吸血場所に太い末梢血管があれば短時間に吸血できるし, また細い血管にあれば吸血時間が長くなる。幼虫と成虫との吸血時間差は幼虫の方が小さいので吸血時間も短いと思っただが, 10倍以上も大きい成虫でも吸血場所, 飢餓条件で, 時間差が認められた。

藤崎 (1980) は吸血時間に関してダニ宿主の取り付き行動から始まる複雑な要因があると述べている。吸血中または吸血後に *O. moubata* から排出する水分 (Coxal fluid) も体重増に関与しているが吸血した血液量の半分から2/3を排出する。

吸血後の体重増に関して Londono (1976) はダニ成虫 *O. tartakowski* 種を *D. viteae* 感染スナネズミの血液を吸血した場合, 吸血前の体重の2~6.27倍に増量したと報告している。著者らの場合各照明条件は吸血後の体重には影響しなかったが1.5倍から16倍と個体差が大きかった。産卵数については宿主側の動物種によって影響されると言われている。Mango (1977) は *O. moubata* を牛血液と豚血液に吸血させた場合, 豚血液を吸血した方が産卵が多かったと述べている。また照明条件について, 藤崎 (1980) はフタトゲスダニやシエルツエマダニは光によって産卵の週期があると報告している。著者等の実験では温度27°Cの常時暗黒飼育した方が産卵数も多かった。そして各種照明条件で27°Cが21°Cより最適と判明した。

湿度に関しては Hitchcock (1955) は牛に寄生するダニ *Boophilus microplus* 種では産卵には影

響しないと報告している。著者等も60%±5%の条件で実験した。しかし彼は、この種のダニは22~23°Cが最適だと報告している。

Sweatman (1968) はダニ *Hyalomma aegyptium* 種では20~35°Cで産卵したが、15°Cの低温や40°Cの高温では産卵しなくなり、30~35°Cが最適でまた産卵前の温度も重要であると述べている。Wright (1971) はアメリカの家畜に寄生するダニ *Amblyomma maculatum* 種は27°C・80%の湿度が最適であるが、4種類の照明条件では産卵数になんら影響はないと報告している。

産卵後の卵の雌雄差についての報告はないが、図3では性差が判別できた。成虫の性差を調べたが、照明条件による差異は認められなかった。

照明条件における生存率は暗黒で27°Cと32°Cにおいて比較的生存率が良好であるが、Mango (1977) は血液の種類によっても成虫になる比率も変わると報告している。これらの実験でも今後、動物差を変え実験をしてみる必要があると思われる。著者らの実験でも適当な吸血をくり返さなくても、図5に示すように600日以上も吸血なしに生存できる。吸血後の体重減少については雌は吸血後30日以内に産卵するので、産卵後は産卵数にもよるが、体重が1/2から2/3に減少する。*D. viteae* を感染スナネズミの血液で雌雄 *O. moubata* に吸血させ、血液と一緒にマイクロフィラリアを取り込んだ場合に、*O. moubata* の生存率変化を調べたが、0.01 ml 中120匹前後のマイクロフィラリアの取り込みでは *O. moubata* の生存率には何んら影響を示さなかったが、200~500マイクロフィラリア/0.01 ml の場合であると *O. moubata* の生存に影響を示した。

この実験にて感染幼虫保存 *O. moubata* を長期間生存させる至適血中マイクロフィラリア密度も判明した。

孵化率については各照明条件において27°Cと32°Cが最適であった。Hitchcock (1955) は、牛

に寄生するダニでは照明条件より湿度と温度が重要で、湿度が85~90%・温度27°C~30°Cで最適の孵化率を示したと報告している。

以上 *O. moubata* は吸血時の吸血時間・体重変化・産卵数・孵化率・生存率に関しては照明条件が有意に影響しないが、温度は27°C~32°Cが適温である事が判明した。しかし長期間飼育する場合は21°C位の温度が最適と思われる。この実験では光・温度の影響について調査したが、Dethier (1957), El-Ziady (1958) は、その他に湿度や臭いも吸血ダニは敏感であると述べている。Nevill (1964) や Garcia (1962) そして Sasa (1957) らは、吸血ダニ、吸血蚊はCO₂に大変敏感であると報告している。今後は光とか温度とかの物理的条件の他に湿度の変化とCO₂の変化をも加えていけば、詳細な *O. moubata* の生態が明らかにでき、*D. viteae* のスナネズミ感染実験における貴重な中間宿主として今後さらに活用され得よう。

要 約

常時照明、常時暗黒、そして14時間照明と10時間暗黒の3条件と温度21°C・27°C・32°C・36°C下の飼育が、アフリカ産ダニ *Ornithodoros moubata* の吸血時間、体重変化、産卵数、孵化率そして産卵後の雌雄比率にどのように影響したか検討した。

その結果、照明条件に関しては *O. moubata* の生活になんら影響を示さなかったが、温度では27°Cから32°Cが最適温度であった。また長期生存には21°Cが適当と思われる。

謝 辞

本研究にあたり御助言を賜りました東京大学医科学研究所寄生虫部の松田肇先生および帝京大学医学部寄生虫学教室の前田龍一郎先生に深謝申し上げます。

引用文献

- 1) Dethier, V. G. (1957): The sensory physiology of blood-sucking arthropods. Exp. Parasit.,

- 6:68-122
- 2) El-Ziady, S. (1958): The behaviour of *Ornithodoros erraticus*, small form, towards certain environmental factors. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 51:317-336
 - 3) 藤崎幸蔵 (1980) : マダニと宿主の相互作用., *日獣会誌.*, 33 : 109-112
 - 4) Garcia, R. (1962): Carbon-dioxide as an attractant for certain ticks (Acarina: Argasidae and Ixodidae), *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 55:605
 - 5) Hitchcock, L. F. (1955): Studies of the non-parasitic stages on the cattle tick, *Boophilus microplus (canesrini)* (Acarina: Ixodidae). *Aust. J. Zool.*, 3: 295-311
 - 6) Hoogstraal, H. (1956): African ixodoidea. I. Ticks of the Sudan Research Report NM 005 050, 29. 07 U. S. Navy Medical Research.
 - 7) Londono, I. M. (1976): Transmission of microfilariae and infective larvae of *Dipetalonema viteae (Filarioidea)* among vector ticks, *Ornithodoros tatakowski (Argasidae)*, and loss of microfilariae in coxal fluid. *J. Parasit.*, 62: 786-788
 - 8) Mango, C. K. A. (1977): *Ornithodoros moubata*: Breeding in vitro. *Exp. Parasit.*, 42: 282-288
 - 9) Nevill, E. M. (1964): The role of carbon dioxide as stimulant and attractant to the sand tampan, *Ornithodoros savignyi (audouin)*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 31: 59-68
 - 10) Sasa, M., Tanaka, H., Ueno, Y and Miura, A. (1957): Notes on the bionomics of unengorged larvae of *Trombicula scutellaris* and *Trombicula akamushi*, with special reference to the hosts. *Japan. J. Exp. Med.*, 27: 31-43
 - 11) Sweatman, G. K. (1968): Temperature and humidity effects on the oviposition of *Hyalomma aegyptium* ticks of different engorgement weight. *J. Med. Ent.* 5: 429-439
 - 12) Worms, M. J and Terry, R. J. (1971): *Dipetalonema witei*, Filarial parasite of the jird, *Meriones libycus*. I. Maintenance in the laboratory. 47: 963-970
 - 13) Wright, J. E. (1971): Response of ovipositing *Amblyomma maculatum* Koch (Acarina: Ixodidae) to photoperiod. *J. Med. Ent.*, 8: 529-531

LIFE CYCLE OF AFRICAN TICKS, *ORNITHODOROS MOUBATA*
AS A VECTOR OF FILARIAE *DIPETALONEMA VITEAE*
AT THE CONDITION OF CONTINUOUS LIGHT
AND CONTINUOUS DARKNESS

FUJIO MIZUNO*, SADA0 NOGAMI**, MASAHIDE MARUHASHI*
AND TAKEO MATSUMURA*

Received for publication: July 27, 1982

Life cycle of African ticks, *Ornithodoros moubata* as a vector of *Dipetalonema viteae* were studied on 1) blood sucking time, 2) rate of body weight change, 3) production of eggs, 4) rate of sex after blood suck and 5) rate of hatching time under the condition of continuous light and continuous darkness, and 14 hours light and 10 hours darkness at different temperatures (21°C, 27°C, 32°C and 36°C).

As the result, the different condition of light shows no effect upon the life of *O. moubata*, while the suitable temperature of *O. moubata* for long life is between 27°C and 32°C and for the longest one, 21°C.

* Department of Medical Zoology, Kobe University School of Medicine, Kobe, Hyogo 650, Japan

** Department of Parasitology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

COMPARISON OF PHYSIOLOGICAL RESPONSES TO HEAT BETWEEN SUBTROPICAL AND TEMPERATE NATIVES

SEIKI HORI*, HEIKICHIRO IHZUKA* AND MASASHI NAKAMURA**

Received for publication July 27 1982

Abstract: Anthropometric measurements, measurements of skin temperatures and rectal temperature at 30°C and measurements of physiological responses to heat were made on 30 young male residents of Okinawa who were born and raised in Okinawa (Group O) and 30 young male residents of Okinawa who were born and raised in main islands of Japan but move to Okinawa less than two years (Group M) in summer. Sweating reaction was examined for 60 min by immersing both legs in stirred water bath of 42°C in room of 30°C and 70 R. H. Group O showed thinner skinfold thickness, slender body shape, higher skin temperature at 30°C, smaller sweat volume with lower Na concentration in sweat, less rise in core temperature, and less increase in heart rate during heat exposure than group M. It is assumed that group O might have superior capacity for nonevaporative heat dissipation and better efficiency of sweating for cooling the body than group M. It is concluded that the acclimatization to heat of subjects in group O, subtropical natives, had advanced further than those in group M, immigrants of temperate natives to subtropical zone, and heat tolerance of the former is superior to that of the latter.

INTRODUCTION

Body temperature of men is maintained within a narrow range in spite of a wide change in environmental temperature by regulating both heat dissipation and metabolic heat production. It is well known that changes in circulatory function and sweating are the main physiological responses to heat exposure and relative importance of heat dissipation by evaporation of sweat increases as the ambient temperature rises (Robinson, 1949; Belding and Hertig, 1962). Heat dissipation from the skin is in proportion to the body surface area while the metabolic heat produced in the body is rather in proportion to the body weight when body weight is displaced as in the case of walking. Therefore, greater ratio of body surface area to body weight is favorable to regulation of body temperature in heat when the skin temperature is higher than ambient temperature (Coon et al., 1950). The subcutaneous fat prevents heat transfer from the core to the shell and thinner subcutaneous fat layer is favorable to heat dissipation (Burton and Bazett, 1936). When unacclimatized individuals are repeatedly exposed to heat, physiological responses to heat are changed and heat acclimatization occurs (Eichna et al., 1950; Senay, 1972). In short-term heat acclimatization, a marked lessening of cardiovascular strain accompanied with increase in body fluid, less rise in core temperature due to an earlier

* Department of Physiology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan. ** Department of Hygiene, Nagasaki University, School of Medicine, Nagasaki, Japan. ** Deceased.

onset of sweating and more profuse sweating with lower salt concentration at a given sweating rate are observed (Adolph, 1946; Williams et al., 1967). In long-term heat acclimatization, physical characteristics are changed so as to favor heat dissipation, rise in core temperature, sweat volume and salt concentration decrease when exposed to the same heat load (Dill et al., 1938; Christensen, 1946). These adaptive changes in physiological responses to heat and physical characteristics are favorable to tolerate heat stress (Hori, 1978). Okinawa, subtropical zone, has hot and long summers and temperate winters, whereas the main islands of Japan have neither long summer nor long cold winter. Thus, residents of Okinawa are more acclimatized to heat than residents in the main islands of Japan. We then attempted to compare physiological responses to heat and physical characteristics of residents of Okinawa who were born and raised in Okinawa with those of residents of Okinawa who were born and raised in the main islands of Japan in order to elucidate the different characteristics of acclimatization of men between short-term heat acclimatization and long-term heat acclimatization.

MATERIALS AND METHODS

Thirty young male residents of Okinawa who were born and raised in Okinawa (Group O) and 30 young male residents of Okinawa who were born and raised in one of the main islands of Japan but moved to Okinawa in less than 2 years (Group M) were selected as subjects. Experiments were performed in summer. The subjects were instructed to fast and rest for at least 2 hours prior to the experiment in order to minimize any effects of specific dynamic action and exercise on body temperature. After staying at rest in a climatic chamber maintained at 30°C of T_a with about 70% R. H., rectal temperatures and skin temperatures of subjects, dressed in shorts only, were measured, then the subjects sitting at rest immersed their legs up to the knees into a stirred water bath of 42°C for 60 min. Cutaneous sites for measurement of skin temperatures are forehead, chest, back, forearm, hand, calf and foot (Hori et al., 1977). Rectal temperature was recorded continuously by a copper-constantan thermocouple throughout the experiment and local skin temperatures were measured with pyrometer. Body weight was measured before and immediately after heat exposure, using a platform balance with an accuracy of ± 5 g and net body weight was obtained by subtracting the weight of shorts. The local sweat rate of the chest and back was measured successively at 15 min intervals by the filter paper method (Ohara, 1966). Na in sweat was eluted from the filter paper with distilled water and its concentration was determined by flame photometry. The average value of mean Na concentration of sweat on the chest and back, and body weight loss without correction of body weight loss through respiration were used in calculation of the total salt loss. The skinfold thickness was measured with a caliper 2 sec after a pressure of 10 g/mm² of the caliper jaw surface was applied to the skin at the following sites.

Upper arm: halfway between the shoulder and the elbow over the biceps muscle.

Subscapular: below the tip of the scapula.

Chest: at the juxta nipple.

Abdomen: adjacent to the umbilicus and also along the midaxillary line at the umbilicus level.

Waist: between the ribs and iliac crest at the lateral part of waist.

Thigh: half down, over the rectus femoris muscle.

Body surface area was calculated by the following formula of Takahira:

$$S = 0.007246 \times W^{0.425} \times H^{0.725}$$

Where: S=Body surface area in sq meters

W=Body weight in kg

H=Height in cm

The numerical heat tolerance indices and their components were calculated as follows (Hori et al., 1974):

$$I = \sqrt{A^2 + B^2 + C^2}$$

$$S = \frac{B}{\sqrt{A^2 + C^2}}$$

$$A = \frac{\Delta W}{0.07 \times W}$$

$$B = \frac{\Delta T_{re}}{40.6 - T_{re}}$$

$$C = \frac{\Delta S}{0.75 \times W}$$

Where: W=Body weight before the experiment (kg)

ΔW =Weight loss at the end of heat exposure (kg)

T_{re} =Rectal temperature before the experiment ($^{\circ}C$)

ΔT_{re} =Rise in rectal temperature at the end of heat exposure ($^{\circ}C$)

ΔS =Salt loss estimated from mean Na concentration in sweat and body weight loss (g)

RESULTS

1. Anthropometrical measurements

Mean values and standard deviations for age, height, body weight and body surface area of groups O and M are shown in Table 1. The mean values of height

Table 1 Characteristics of subjects ($\bar{X} \pm S. D.$)

Group	Number	Age (yr)	Height (cm)	Weight (kg)	B. S. A. (m ²)	D. R. (month)
O	30	22.8 \pm 2.0	166.2 \pm 4.5	57.7 \pm 6.0	1.65 \pm 0.10	—
M	30	23.1 \pm 1.6	168.7 \pm 3.7	62.5 \pm 5.7	1.72 \pm 0.09	13.1 \pm 3.9

O: Residents of Okinawa who were born and raised in Okinawa.

M: Residents of Okinawa who were born and raised in the main islands of Japan.

B. S. A.: Body surface area.

D. R.: Duration of residence.

and body weight for group O were smaller than those for group M though these differences were not statistically significant. The ratio of body surface area in m² to body weight in kg for group O (0.0286) was considerably greater than that for group M (0.0275). Thus it can be said that subjects in group O have more favorable body shape for heat dissipation when compared with those in group M. The mean values and standard deviations of regional skinfold thickness are shown in Table 2.

Table 2 Skinfold thickness ($\bar{X} \pm S. D.$)

Group	Upper arm (mm)	Subscapular (mm)	Chest (mm)	Abdomen (mm)	Waist (mm)	Thigh (mm)
O	5.9±1.6	7.8±1.4	6.7±1.8	7.5±2.0**	6.6±1.5**	6.6±1.7**
M	7.0±2.6	8.4±2.8	7.5±2.3	9.6±3.1	8.1±2.4	8.4±2.5

O, M: The same as in Table 1.

** Significant differences between two groups at 1% level.

All the mean values of regional skinfold thickness for group O were smaller than those for group M. Among these differences, there were significant differences in mean values of skinfold thickness of abdomen, waist and thigh. The mean value of skinfold thickness in the extremity in comparison with that in the trunk was smaller in group O than in group M.

2. Rectal temperature and skin temperatures

The mean values and standard deviation of rectal temperature and skin temperatures at 30°C before sweat test are shown in Table 3. The mean values of rectal

Table 3 Rectal temperature and skin temperatures at 30°C ($\bar{X} \pm S. D.$)

Group	Tre	Forehead	Chest	Back	Forearm	Hand	Calf	Foot
O	37.4±0.2	35.6±0.5*	34.4±1.0	34.8±0.9	35.3±0.8	35.4±0.8	34.9±0.6	34.6±1.0
M	37.4±0.3	35.3±0.6	34.1±0.8	34.4±0.7	35.0±0.6	35.0±0.8	34.7±0.6	34.4±0.9

O, M: The same as in Table 1.

* Significant difference between two groups at 5% level.

temperature in both groups were identical. All the mean values of skin temperature for group O were greater than those for group M. Among these differences, the mean value of skin temperature on the forehead for group O was significantly greater than that for group M.

3. Physiological responses to heat exposure

The mean values and standard deviations of body weight loss, mean Na concentration in sweat, rise in rectal temperature and increase in heart rate were shown in Table 4. The mean values of body weight loss and Na concentration in sweat for group O were significantly smaller than those for group M. The mean values of rise in rectal temperature and increase in heart rate at the end of the experiment

Table 4 Body weight loss, mean Na concentration in sweat, rise in rectal temperature and increase in heart rate ($\bar{X} \pm S. D.$)

Group	ΔW (kg)	C (mEq/L)	ΔT (°C)	ΔP (beats/min)
O	$0.39 \pm 0.11^*$	$34.3 \pm 11.0^*$	0.41 ± 0.13	13.4 ± 6.4
M	0.46 ± 0.13	40.0 ± 11.8	0.44 ± 0.14	15.0 ± 6.6

O, M: The same as in Table 1.

ΔW : Body weight loss.

C: Mean Na concentration in sweat.

ΔT : Rise in rectal temperature.

ΔP : Increase in heart rate.

* Significant differences between two groups at 5% level.

for group O were considerably smaller than those for group M. These results indicate that the magnitude of physiological responses induced by heat exposure as a whole was smaller in group O than in group M.

4. Heat tolerance indices and their components

The mean values and their standard deviations of heat tolerance indices and their components calculated using data obtained in the present experiment were shown in Table 5. The mean values of index I and components A, B and C for group O

Table 5 Relative water loss, relative rise in core temperature, relative salt loss and heat tolerance indices ($\bar{X} \pm S. D.$)

Group	A	B	C	I	S
O	0.097 ± 0.024	0.128 ± 0.035	$0.019 \pm 0.004^{**}$	$0.158 \pm 0.031^*$	1.30 ± 0.56
M	0.105 ± 0.028	0.138 ± 0.029	0.023 ± 0.004	0.175 ± 0.025	1.28 ± 0.40

O, M: The same as in Table 1.

A: Relative water loss.

B: Relative rise in core temperature.

C: Relative salt loss.

I: Heat tolerance index.

S: $\frac{B}{\sqrt{A^2 + C^2}}$

* Significant differences between two groups at 5% level.

** at 1% level.

were smaller than those for group M while mean value of index S for group O was slightly greater than that for group M. There were significant differences in the values of index I and component C between two groups. Thus it can be said physiological strain induced by the same heat load for group O was smaller than that for group M.

DISCUSSION

It is known that heat acclimatization appears not only in physiological function concerning regulation of body temperature but also in physical characteristics i.e. body shape and body composition (Coon et al., 1950; Prosser, 1964). As shown in Table 1 and 2, the ratio of body surface area to body weight for group O was greater than that for group M and the mean value of skinfold thickness for group O was smaller than that for group M. It is known that a rise in ambient temperature results in a decrease in the caloric intake and subcutaneous fat might decrease by lower caloric intake (Johnson and Kark, 1947). Deposit of subcutaneous fat prevent heat transfer between the body and environment due to its lower thermal conductance (Burton and Bazett, 1936). Heat dissipation increases as the body surface area becomes larger and metabolic heat produced in the body is proportional to the body weight during movements of the body as in walking. Thus, it may be assumed that physical characteristics of individuals in group O result from long-term adaptation to hot climate and are favorable to body temperature regulation. As shown in Table 3, all the skin temperatures measured for group O were higher than those for group M. These results showed subjects in group O had higher mean skin temperature than those in group M. Body heat is dissipated by radiation, convection and the evaporation of water and heat dissipation by both radiation and convection is proportional to the temperature gradient between skin surface and air. Since sweating did not occur or sweating rate was very low at 30°C before dipping the legs of subjects into hot water bath, heat dissipation for group O was greater than that for group M. These results indicate that the ability of heat dissipation without sweating for group O was superior to that for group M. The mean values of rectal temperature before sweating in both groups were identical and the temperature gradient between core and shell was smaller in group O than in group M. Since the value of temperature gradient between core and shell at rest is approximately inversely proportional to the coefficient of heat conductance of the body, subjects in group O had higher heat conductance of the body and superior capacity of heat transfer from the core to the periphery than those in group M. Many investigators reported that the blood volume increased as a result of heat acclimatization (Bass and Henschell, 1956; Senay, 1972). Consequently higher skin temperature and higher heat conductance of the body for group O might be due to an increase in blood volume with an improvement of the skin circulation as well as thinner subcutaneous fat layer induced by long-term heat acclimatization. As shown in Table 4, sweat volume and salt concentration in sweat for group O were significantly smaller than those for group M. As already reported by many investigators, the subjects sweat more readily and profusely while the salt concentration in sweat at a given sweat rate decreases after repeated heat exposures (Dill et al., 1938; Adolph, 1946). On the other hand, both sweat volume and salt concentration in sweat decrease during exposure to a hot environment after long-term heat acclimatization (Christensen, 1946). It may thus be concluded that characteristics of sweating response of subjects in group O reflect long-term heat acclimatization of subtropical natives. As shown

in Table 4, rise in rectal temperature and increase in heart rate during heat exposure were smaller in group O than in group M. These results are in good agreement with other reports concerning heat acclimatization (Adolph, 1946; Robinson et al., 1943; Bass, 1963). Evaporation of sweat from the skin is dependent on the degree of wetness of the skin and the difference in vapor pressure between on the skin surface and that in the surrounding air. The increase of sweat represents only wasted sweat for heat dissipation after wetness of the overall skin has taken place and a higher concentration of salt in sweat decreases the difference in vapor pressure between the skin surface and the surrounding air. A smaller volume of sweat with a lower salt concentration in sweat in group O suggests that the efficiency of sweat for cooling the body in subjects in group O was better than that in group M. Therefore, the better efficiency of sweat for cooling the body and superior capacity of nonevaporative heat dissipation of subjects in group O might be one reason for the less rise in core temperature in spite of smaller sweat volume. Since core temperature is the dominant factor in determining heart rate at rest, less rise in heart rate for group O might be due to less rise in rectal temperature for group O. Heat tolerance of group O was compared with that of group M by numerical heat tolerance indices. As shown in Table 5, the mean value of index I for group O was significantly smaller than that for group M. Since the value of index I represents the magnitude of strain induced in the body, smaller value of index I indicates superior heat tolerance. Accordingly, heat tolerance of subjects in group O was superior to that of subjects in group M when heat tolerance was assessed by numerical heat tolerance index. The value of index S represents the ratio of relative rise in core temperature to relative water loss and relative salt loss and the parameter "a" represents the magnitude of strain in terms of water-electrolyte metabolism (Hori et al., 1974). Figure 1 represents I versus S plot for groups O and M. In this figure, iso-sweating lines are drawn by connecting

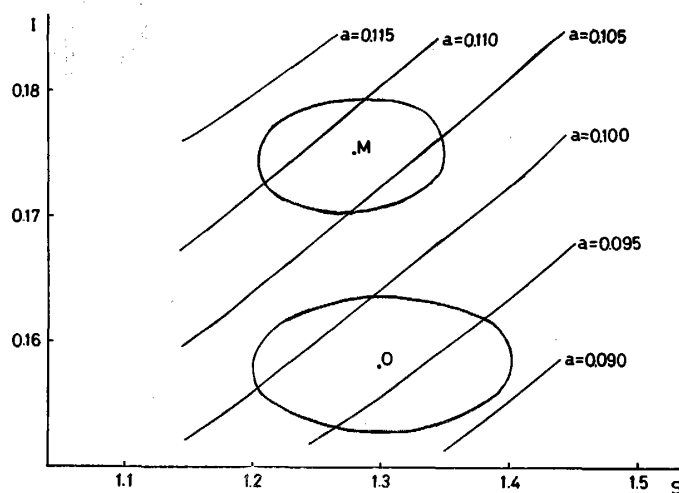


Figure 1 Relationship between indices I and S.

O. M: The same as in Table 1.

Isosweating lines were drawn with their values of parameter.

Circles: Drawn around the means with radiuses of standard errors

the points of the same value of parameter "a", $A \left(1 + \frac{C^2}{A^2}\right)^{\frac{1}{2}}$ (Hori et al., 1974). It is obvious from the figure the circle drawn around the means with radiuses of standard errors for group O is located in the lower region when compared with that for group M, i.e. the value of "a" for group O was smaller than that for group M. The smaller value of "a" with smaller value of index I for group O indicates that subjects in group O had better efficiency of sweat for cooling the body than those in group M. From these results, it may be concluded that subtropical natives, subjects in group O, had superior heat dissipating capacity without sweating, better efficiency of sweat for heat dissipation and superior heat tolerance when compared with temperate natives, subjects in group M.

REFERENCES

- Adolph, E. F. (1946): The initiation of sweating in response to heat, *Am. J. Physiol.*, 145, 710-715
- Bass, D. E. and Henschell, A. (1956): Responses of body fluid compartments to heat and cold, *Physiol. Rev.*, 36, 128-144
- Bass, D. E. (1963): Thermoregulatory and circulatory adjustments during acclimation to heat in man, in: *Temperature, Its Measurements and Control in Science and Industry*, ed. by Herzfeld, C. M. Reinhold, New York, Vol. 3, pp. 229-305
- Belding, H. S. and Hertig, B. A. (1962): Sweating and body temperature following abrupt changes in environmental temperature, *J. Appl. Physiology*, 17, 103-106
- Burton, A. C. and Bazett, H. C. (1936): A study of the average temperature of the tissues, of the exchange of heat and vasomotor responses in man by means of a both calorimeter, *Am. J. Physiol.*, 117, 36-54
- Christensen, W. R. (1946): Long term acclimatization to heat, *Am. J. Physiol.*, 148, 86-90
- Coon, C. S., Garn, S. M. and Birdsell, J. B. (1950): A study of the Problems of Race Formation in Man, Charles Thomas, Springfield, Illinois
- Dill, D. B., Hall, F. G. and Edwards, H. T. (1938): Changes in composition of sweat during acclimation to heat, *Am. J. Physiol.*, 123, 412-419
- Eichna, L. W., Park, C. R., Nelson, N., Horvath, S. M. and Palmes, E. D. (1950): Thermal regulation during acclimation in a hot, dry (desert type) environment, *Am. J. Physiol.*, 163, 585-597
- Hori, S., Inouye, A. and Ihzuka, H. (1974): Indices and sweating patterns for the assessment of heat tolerance, *Jpn. J. Physiol.*, 24, 263-275
- Hori, S., Ohnaka, M., Shiraki, K., Tsujita, J., Yoshimura, H., Saito, N. and Panata, M. (1977): Comparison of physical characteristics, body temperature and basal metabolism between Thai and Japanese in a neutral temperature zone, *Jpn. J. Physiol.*, 27, 525-538
- Hori, S. (1978): Index for the assessment of heat tolerance, *J. Human Ergol.*, 7, 135-144
- Johnson, R. K. and Kark, R. M. (1947): Environment and food intake in man, *Science*, 105, 378-379
- Ohara, K. (1966): Chloride concentration in sweat; its individual, regional, seasonal and some other variations, and interrelationship between them, *Jpn. J. Physiol.*, 16, 274-290
- Prosser, C. L. (1964): Perspectives of adaptation; theoretical aspects, in: *Adaptation to environment, Handbook of Physiol.*, Sect. 4, Am. Physiol. Soc., Washington, D. C. pp. 11-25
- Robinson, S., Turrell, E. S., Belding, H. S. and Horvath, S. M. (1943): Rapid acclimatization to work in hot climates, *Am. J. Physiol.*, 140, 168-176
- Robinson, S. (1949): Physiological adjustment to heat, In: *Physiology of Temperature Regulation and the Science of Clothing*, ed. by Newburgh, L. H. Saunders, Philadelphia, pp. 193-231

- Senay, L. C., Jr. (1972): Changes in plasma volume and protein content during exposures of working men to various temperatures before and after acclimatization to heat: Separation of the roles of cutaneous and skeletal muscle circulation. *J. Physiol.*, 224, 61-81
- Williams, C. G., Wyndham, C. H. and Morrison, J. F. (1967): Rate of loss of acclimation in summer and winter, *J. Appl. Physiol.*, 140, 168-176

亜熱帯人と温帯人との高温曝露時の生理的反応の比較

堀 清記*・飯塚平吉郎*・中村 正**

沖縄住民から、沖縄生育者の青年30名(O群)、本土生育者で沖縄移住後2年以内の青年30名(M群)をえらび、身体計測、室温30°Cのときの安静時皮膚温と直腸温、高温曝露時の生理的反応を夏季に測定した。発汗反応は30°C、湿度70%の室内で、下腿に42°Cの温浴を60分させて測定した。

O群はM群と比較して、皮下脂肪厚が薄く、瘦身傾向を示し、30°Cにおける皮膚温が高く、発汗量と汗の塩分濃度が低く、暑熱曝露時の中枢温上昇と心拍数の増加が少なかった。

O群はM群と比較して、発汗のない状態での放熱能力が優れており、汗の身体冷却効率がよいことが推定された。亜熱帯人であるO群の被検者は温帯生育者の亜熱帯移住者であるM群の被検者より暑熱環境によく馴化し、耐熱性が優れていることが結論された。

* 兵庫医科大学第一生理学教室 663 西宮市武庫川町1-1 0798-45-6385

** 長崎大学医学部衛生

学教室(故人)

DIURNAL BITING ACTIVITY OF FOUR ZOOPHILIC SPECIES OF *SIMULIUM* IN AN AREA ENDEMIC FOR HUMAN ONCHOCERCIASIS IN GUATEMALA*¹

YOSHIHISA HASHIGUCHI*², ISAO TADA*³, OTTO FLORES C.*⁴
AND HIROYUKI TAKAOKA*⁵

Received for publication July 31 1982

Summary: The biting activity of four zoophilic species of *Simulium* was examined in an area endemic for human onchocerciasis in Guatemala, using bovine baits. The surveys were performed at three sites within San Vicente Pacaya county (SVP) from daylight until nightfall of two days in January 1979. A total of 8,203 blackflies were collected from the baits throughout the collections. Of these flies, 6,531 (79.6%) were *Simulium metallicum* s. l.; 977 (11.9%), *S. pulverulentum*; 654 (8.0%), *S. callidum*; and 41 (0.5%), *S. rubicundulum*. Biting activity of *S. metallicum* s. l. peaked between 0800 to 0900 hours and a second peak was noted between 1500 to 1600 hours. *S. callidum* also exhibited two peaks, one in the morning and the other, more pronounced, in the late afternoon, immediately before the night-fall. The remaining two species, *S. pulverulentum* and *S. rubicundulum* were mainly mid-morning attackers of cattle. Thus, the rate of species composition was presumed to differ within a day.

INTRODUCTION

With regard to human onchocerciasis in Guatemala, many entomological studies have been carried out in connection with the transmission of the disease. The data reported hitherto incriminated *Simulium ochraceum* as the most important vector, followed by *S. metallicum* s. l. and *S. callidum* (Dalmat, 1955; De Leon & Duke, 1966; Garms, 1975; Collins, 1979). The first species is markedly anthropophilic, while the second and third are markedly zoophilic in their blood feeding behaviour (Dalmat, 1955; Wilton & Collins, 1978). Recently, Collins *et al.* (1981) studied on the diurnal patterns of biting activities of these species including *S. downsi*, using human baits. With animal baits, on the other hand, little has been investigated about the biting activity of Guatemalan blackflies, *Simulium* spp. Such a study will give an information for a better understanding of the vector biology in the transmission of human onchocerciasis and/or bovine and equine onchocerciasis. Because the animals with onchocerciasis were commonly found in the areas endemic for human onchocerciasis

*¹ This study was supported by the Ministry of Public Health, Republic of Guatemala, and by the Japan International Cooperation Agency (JICA). (ORCOP No. 63) *² Department of Parasitology, Kochi Medical School, Nankoku City, Kochi, 781-51, Japan *³ Department of Parasitic Diseases, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, 860, Japan *⁴ Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, Ministerio de Salud Pública A. S., Guatemala, Guatemala, C. A. *⁵ Division of Medical Zoology, Medical College of Oita, P. O. Box 37, Oita, 870-91, Japan

in Guatemala (Hashiguchi *et al.*, 1981). The present paper deals with the results of surveys on the diurnal activity and species composition in the cattle-biting of *S. metallicum* s. l., *S. callidum*, *S. pulverulentum* and *S. rubicundulum*.

MATERIALS AND METHODS

Fly collections were performed at three sites, *Finca* San José Guachipilín, *Finca* Tullio and *Finca* Terranova, within San Vicente Pacaya (SVP), Department of Escuintla, Guatemala. SVP is the pilot area since June 1976, under the Onchocerciasis Control Project established by the Guatemalan and the Japanese Governments. The present study sites, about 650 m to 700 m above sea level, situated on the Pacific slopes of the Sierra Madre. All the blackfly collections were made on three cows at the respective sites; two collecting men and one animal bait were arranged in every collection. The two men captured the flies which were biting on the animal bait, using an aspirator. The collections were carried out from daylight until night-fall of the two consecutive days in January 1979. The blackflies captured were kept in sample tubes, separating them with hour-intervals, respectively; thereafter they were killed with 10% formalin. After taking the samples to the laboratory, the numbers and species compositions of the flies were assessed in each hour-interval.

RESULTS

Of 8,203 blackflies collected, 6,531 (79.6%) were *S. metallicum* s. l.; 977 (11.9%), *S. pulverulentum*; 654 (8.0%), *S. callidum*; and 41 (0.5%), *S. rubicundulum* in the present surveys. The result indicates that the first species is the most dominant among the flies engorging on the animal in the area (SVP).

In Fig. 1, the numbers of blackflies captured during two consecutive days at the three sites were summed up, and the biting densities were expressed as percentages of the flies in hour-interval, among the total collections of the respective species throughout the days. Biting activity of *S. metallicum* s. l. reached a peak between 0800 to 0900 hours, and the second peak was found between 1500 to 1600 hours. *S. callidum*, on the other hand, exhibited the first distinct peak of the biting activity in the period from 1700 to 1800 hours, followed by the second from 0800 to 0900 hours. In *S. pulverulentum* only one remarkable peak of the activity was noted during the hours from 0900 to 1000, while *S. rubicundulum* indicated two peaks, one, more distinct, in the early morning (0800 to 0900 hours), the other in the early afternoon (1300 to 1400 hours).

In Fig. 2, the species composition was expressed as percentages of each fly species, among the total numbers of the four species captured in each hour-interval throughout the collections. *S. metallicum* s. l. was the dominant cattle-biting species in the survey area (SVP) from daylight until night-fall, though there were two troughs, one in the late morning and the other in the late afternoon. In connection with these troughs, *S. pulverulentum* showed a relatively high rate of the composition in the species during the hours from 1000 to 1100, whereas *S. callidum* composition increased steadily from 1500–1600 and peaked at the hours, 1700–1800, immediately before the night-fall. The remaining species, *S. rubicundulum*, was constantly low in the composition through-

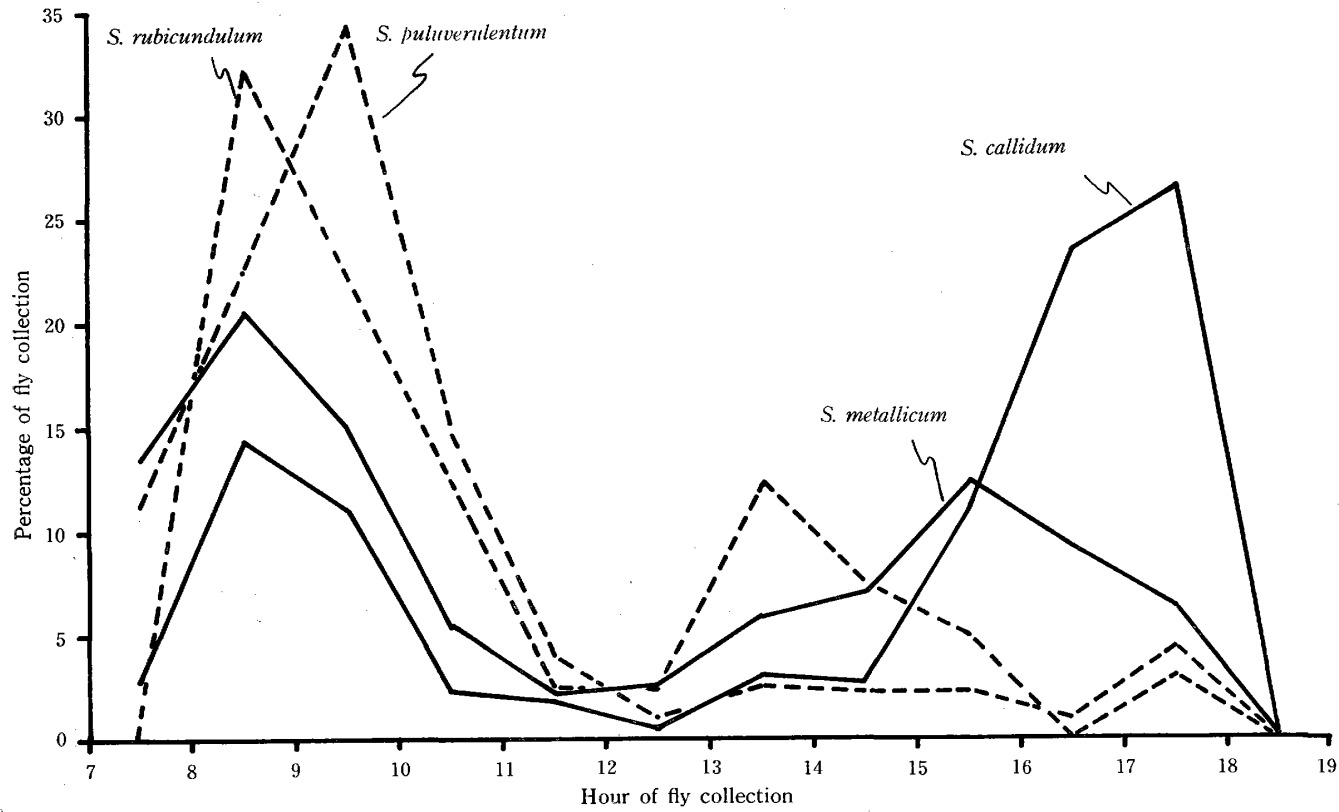


Figure 1 Diurnal cattle biting activity of four zoophilic species of *Simulium* in San Vicente Pacaya, Guatemala.

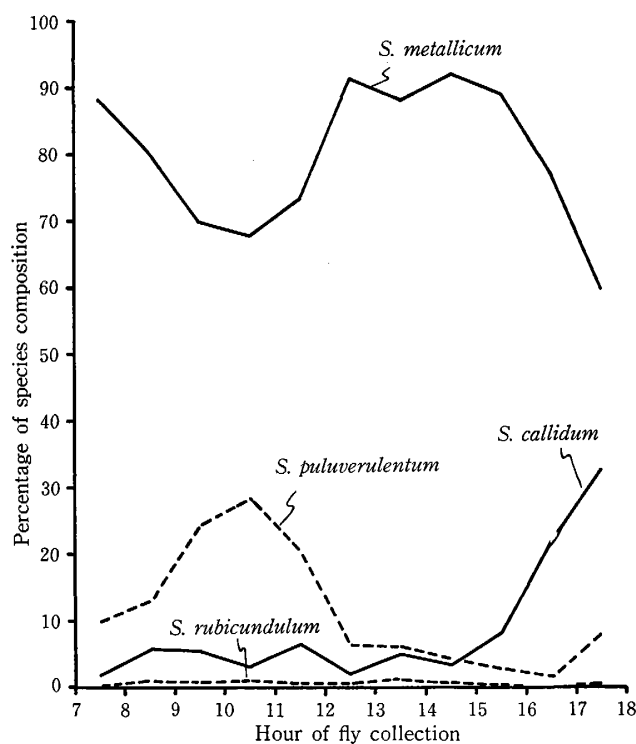


Figure 2 Diurnal species compositions of cattle biting flies of four zoophilic species of *Simulium* in San Vicente Pacaya, Guatemala.

out the day, only 41 individuals being collected during the fly catching.

DISCUSSION

Among the present zoophilic blackfly species, both *S. metallicum* s. l. and *S. callidum* are known to bite man, and they are considered to be potential vectors of human onchocerciasis. Apparently, these blackflies are markedly zoophilic in their blood feeding activities. It would be, therefore, necessary to investigate the biting activity of the flies using animal baits, in terms of an understanding of the vector biology.

When the present fly collections were made on the bovine baits, *S. metallicum* s. l. and *S. callidum*, respectively, showed two distinct peaks of biting activities in the day, one in the morning and the other in the afternoon. According to Collins *et al.* (1980) who worked with human baits, the man biting activity of *S. callidum* peaked at 1500–1700 hours, and *S. metallicum* s. l. was also somewhat more active in the afternoon, particularly between 1400 and 1700 hours at *Finca Los Tarrales* in Guatemala; their study area has a similar elevation with the present study sites. These peak biting activities of the both species are slightly different from those found in the present surveys. The discrepancy may be caused by the host difference between human and bovine baits. Thus, it is assumed that there will be some difference in the host preference of the flies, according to the time of the day.

Most of *S. pulverulentum* and *S. rubicundulum*, were found to have a distinct peak

activity mainly in the mid-morning. This indicates that both of them are morning attackers of the animals in SVP. On the other hand, these two species were found to be hardly attracted by men (fly collectors), suggesting that they are solely zoophilic. The present study area (SVP) being a highly endemic zone of bovine and equine onchocerciasis with *O. gutturosa* and *O. cervicalis*, respectively (Hashiguchi *et al.*, 1981), it seems likely that these species including *S. metallicum* s. l. and *S. callidum* are involved in the transmission of non-human onchocerciasis though the vector of the disease remains still to be determined in Guatemala. In addition, the area is also known as the endemic focus of human onchocerciasis with various intensities of the infections in the residents of villages and plantations within SVP (Tada *et al.*, 1979). In such an area, the possible infection of *S. metallicum* s. l. and *S. callidum* with the larvae of bovine or equine *Onchocerca* should be taken into consideration, especially in the evaluation of the vector control of the human disease.

In species composition of the flies, there were only four species which landed on the bovine baits for blood feeding. Although *S. ochraceum*, the principal vector of human onchocerciasis in Guatemala, was commonly found during the fly catching in the study sites, none of this species was attracted by the bovine baits. In SVP, *S. metallicum* s. l. was the dominant bovine attacker in each hour-interval throughout the days. A relatively high composition of *S. pulverulentum* was noted in the morning, whereas *S. callidum* composition increased in the late afternoon.

Further detailed examinations on the biting activity of these zoophilic and/or anthropophilic species should be made in future, in relation to their ovipositions and host seeking behaviours, as mentioned by Garms (1975) and Collins *et al.* (1981) on the anthropophilic species, *S. ochraceum*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Sincere gratitude is extended to Drs. J. J. Castillo O., H. A. Godoy B., H. Figueroa M., H. Takahashi, F. J. Aguilar, S. Hayashi for their encouragement throughout the present study. Thanks are also due to the owners of three *Finca*s San José Guachipilín, Tullio and Terranova for their supports during the field phase of this study. The present work was carried out by the helpful assistance of our collaborators in Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, Guatemala. We wish to show our sincere thanks to all of those who participated in the field examination.

REFERENCES

- 1) Collins, R. C. (1979): Onchocerciasis transmission potentials of four species of Guatemalan Simuliidae, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28, 72-75
- 2) Collins, R. C., Merino, M. E. & Cupp, E. W. (1981): Seasonal trends and diurnal patterns of man-biting activity of four species of Guatemalan black flies (Simuliidae), *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 728-733
- 3) Dalmat, H. (1955): The black flies of Guatemala and their roles as vectors of onchocerciasis, *Smithson Misc. Coll.*, Vol. 125, No. 1., 425 pp

- 4) De Leon, J. R. & Duke, B. O. L. (1966): Experimental studies on the transmission of Guatemalan and West African strains of *Onchocerca volvulus* by *Simulium ochraceum*, *S. metallicum* and *S. callidum*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 735-752
- 5) Garms, R. (1975): Observations on filarial infections and parous rates of anthropophilic black flies in Guatemala, with reference to the transmission of *Onchocerca volvulus*, Tropenmed. Parasit., 26, 169-182
- 6) Hashiguchi, Y., Tada, I., Ochoa, J. O. A., Recinos, C. M. M. & Molina, P. A. (1981): Bovine and equine onchocerciasis in Guatemala, especially in San Vicente Pacaya, J. Parasitol., 67, 286-287
- 7) Tada, I., Aoki, Y., Rimola, C. E., Ikeda, T., Matsuo, K., Ochoa, J. O. A., Recinos, C. M. M., Sato, S., Godoy, B. H. A., Castillo, O. J. J. & Takahashi, H. (1979): Onchocerciasis in San Vicente Pacaya, Guatemala, Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 67-71
- 8) Wilton, D. P. & Collins, R. C. (1978): An entomologic and parasitologic survey for onchocerciasis in western El Salvador, Am. J. Trop. Med. Hyg., 27, 499-502

グアテマラのオンコセルカ症流行地における4種のブユの 牛に対する吸血活動の日周期性について

橋口義久*1・多田 功*2・Otto Flores C.*3・高岡宏行*4

グアテマラのオンコセルカ症流行地の一つである San Vicente Pacaya 郡の3地点において牛を餌としてブユの吸血活動について調査した。調査は連続2日間終日行い、4種のブユを含む合計8,203個体の雌成虫が採集された。最優先種は *S. metallicum* s. l. (79.6%) で、以下 *S. pulverulentum* (11.9%), *S. callidum* (8.0%) および *S. rubicundulum* (0.5%) であった。*S. metallicum* s. l. の吸血活動には、午前中の8-9時と午後の3-4時に各々第1および第2の山を示す二峰性の日周期が認められた。また *S. callidum* も同様の二峰性を示したが、大きな山は日没直前にみられた。一方、他の2種の日周活動はいずれも一峰性で、その山は午前中にみられた。このように、各ブユ種別に吸血活動の日周パターンが異なることを反映して相対的種構成比は一日のうちの時刻によって異なる傾向を示した。

*1 高知医科大学環境保健医学講座寄生虫学教室 *2 熊本大学医学部寄生虫病学教室 *3 グアテマラ共和国厚生省マラリア防圧研究所 *4 大分医科大学病理学講座医動物学教室

RAPID TITRATION OF RABIES VIRUS INFECTIVITY BY BIOTIN-AVIDIN-PEROXIDASE TECHNIQUE AND ITS APPLICATION TO VIRUS NEUTRALIZATION TEST

AKEHISA SHICHIJO¹, KUMATO MIFUNE¹ AND WHEI JUN LIN²

Received for publication September 24 1982

Abstract: The rapid titration method of the infectivity and the neutralizing antibody of rabies virus was established by the use of immuno-peroxidase (biotin-avidin-peroxidase) staining technique in microslide culture chambers. This method offers high sensitivity and reproducibility and would provide a new mean for the rapid diagnosis of rabies and the seroepidemiology of rabies virus.

INTRODUCTION

Many studies have been reported on the quantitation of infectious rabies virus *in vitro* (Yoshino *et al.*, 1966; Sedwick and Wiktor, 1967; Matsumoto and Kawai, 1969; Schneider, 1973; Buckley and Tignor, 1975; Strating *et al.*, 1975). However, the plaque titration method can be applied, in general, for only laboratory-passaged virus strains and requires a longer incubation period to obtain the results. In contrast, in fluorescent antibody (FA) technique, rapid and reproducible titration can be attained using the culture cells sensitive to rabies virus and even street strains can be quantitated by counting fluorescent foci on the cells (Smith *et al.*, 1977).

Recent progress of immuno-peroxidase techniques provides a new mean to detect viral antigens in the infected cells (Benjamin, 1974; Miller *et al.*, 1974; Gerna *et al.*, 1976) and to quantitate the infectivity of virus (Hahon *et al.*, 1975; Okuno *et al.*, 1977, 1979). This technique has several advantages when compared with FA technique. The samples can be examined with a light microscope and stored for long time after fixation according to the stability of the staining. Thus if the technique is applicable for virus neutralization test, this should be the most suitable method for determining the neutralizing antibodies against rabies virus of large number of specimens.

Among the immuno-peroxidase techniques, the use of biotin-avidin interaction system has been proved to be highly sensitive for the detection of cell-associated antigens and has been extensively employed for immunohistochemistry (Guesdon *et al.*, 1979; Warnke *et al.*, 1980; Hsu *et al.*, 1982).

Therefore, the present study was begun with an application of biotin-avidin-peroxidase (BAP) technique for the infectivity assay of rabies virus and virus neutralization test with an ultimate goal of an application for the immunoelectron-microscopic studies of the virus.

1 Department of Microbiology, Medical College of Oita, P. O. Box 37, Oita 870-91, Japan

2 Department of Virology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

MATERIALS AND METHODS

Virus: The plaque purified CVS strain (Buckley and Tignor, 1975) of rabies virus was grown in murine neuroblastoma cells (N-18 clone) and stored at -75°C until use.

Cells: Murine neuroblastoma cells and CER cells (Smith *et al.*, 1977) were grown in Eagle minimum essential medium (MEM) supplemented with 5% fetal calf serum and 5% calf serum and antibiotics. CER cells were used for the infectivity assay of rabies virus throughout the study. Microslide culture chamber (10 chambers, Bellco Glass, Inc. NJ, U. S. A.) (Fig. 1) received 0.25 ml/chamber of cell suspensions at a cell density of 8×10^4 cells/ml of medium and the cells were incubated at 37°C in 5% CO_2 incubator until the monolayers of the cell completed.

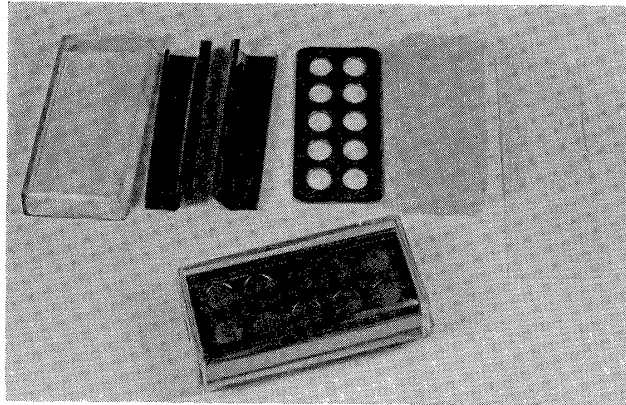


Figure 1 Microslide culture chamber (10 chambers per slide). The culture chamber can be used repeatedly only by changing a bottom slide glass.

Staining of the cells by BAP technique: CER cell monolayers on microslide culture chambers were inoculated with $50 \mu\text{l}$ /chamber of serially diluted virus suspensions and incubated for 90 min at 37°C for virus adsorption. Then the inoculum was removed and the cells were incubated for various periods with Eagle MEM supplemented with 5% fetal calf serum and 2% Sephadex G-200. At intervals, the cells were washed with phosphate buffered saline (pH 7.4, PBS) and fixed with cold acetone for 20 min. The cells were first reacted with anti-rabies virus mouse ascitic fluid for 60 min at 37°C . After washing with PBS 3 times, the cells were then stained with biotinyl-anti-mouse immunoglobulin (Ig) G goat serum (E. Y. Laboratories, Inc. CA, U. S. A.) at an appropriate dilution for 60 min at 37°C and finally stained with avidin conjugated with peroxidase (E. Y Laboratories, Inc. CA, U. S. A.) for 60 min at 37°C . Peroxidase reaction was done with H_2O_2 and 3, 3'-diamino benzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemicals, MO, U. S. A.) as described by Graham and Karnovsky (1966). The slide was sealed with buffered glycerin and the stained foci were counted under an ordinary light microscope.

Kinetics of virus neutralization: Anti-rabies virus mouse ascitic fluid was pretreated

with 25% kaolin suspension as described by Smith *et al.*, (1973). Virus suspension containing 10^6 focus-forming unit (FFU)/0.1 ml was mixed with an equal volume of serially diluted anti-rabies virus mouse ascitic fluid and incubated at 36 C in water bath. At intervals of incubation, 0.2 ml of the mixture were taken and diluted immediately one hundred fold and kept in ice. The samples were then inoculated onto the cell monolayers in microslide culture chambers and assayed for the infectivity of surviving virus. Control virus suspension with virus diluent only was treated similarly.

RESULTS

Formation of foci: Development of infected foci on CER cells by rabies virus was examined. Cell monolayers were infected with approximately 200 FFU of the virus and incubated. At intervals, samples of the slides were taken and processed for BAP staining and the number of foci (Fig. 2) was counted. As shown in Fig. 3,

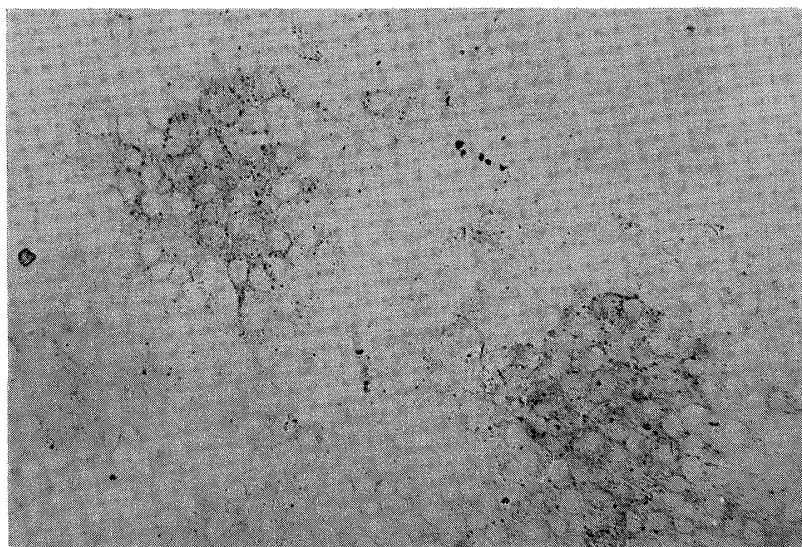


Figure 2 Stained foci of rabies virus-infected CER cells by biotin-avidin-peroxidase (BAP) technique.

the foci became countable at 16 hr after infection. The number of foci increased thereafter until 32 hr after infection and reached a maximum although the size of focus increased even thereafter and became uncountable at 40 hr because of the combinations with adjacent foci. From this observation, the number of foci was counted after 32 hr of incubation in the following experiments.

Relationship between the number of foci and virus dilution was next examined. Aliquots of serial twofold dilutions of appropriately diluted virus were inoculated on the cells and the number of foci was counted at 32 hr after infection. Fig. 4 shows a linear relationship between the logarithms of the virus dilution and the number of foci per chamber, indicating that one focus was produced by one infectious particle of virus.

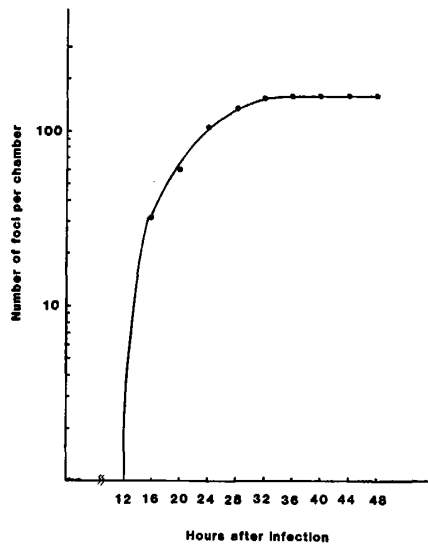


Figure 3 Development of foci on CER cells infected with rabies virus as measured by the BAP technique.

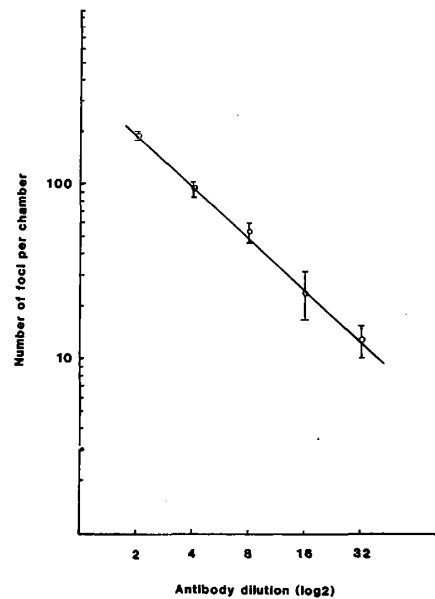


Figure 4 Linear response of rabies virus focus formation in CER cells. Serial twofold dilution of virus was done with virus diluent. Fifty microliters of each dilution was inoculated onto the CER cells and the number of foci was counted after 32 hr of incubation. The average numbers of foci in triplicate chambers were shown.

Simultaneous experiments with FA staining technique showed an identical dose response of fluorescent focus formation by rabies virus (Data not shown).

Kinetics of virus neutralization: The optimum incubation period of virus-antibody mixtures for measuring neutralizing antibody was determined at 36 C. Fig. 5 shows the results of the kinetic studies examined with 10^6 FFU/ml of virus and different dilutions of anti-rabies virus mouse ascitic fluid. Although the virus was neutralized by more than 90% after 15 min of incubation, the neutralization progressed gradually until 90 min of incubation and completed in each dilution of ascitic fluid. Only 28% of the virus was inactivated after 2 hr of incubation.

Thus, the incubation of 90 min at 36 C was selected as the conditions of the following neutralization tests.

Determination of neutralizing antibody titers of anti-rabies virus mouse ascitic fluid: Two lots of mouse ascitic fluid were diluted by twofold dilution starting 1:800. Each dilution was incubated with an equal volume of virus suspension containing 400 FFU of virus /0.1 ml and incubated at 36 C for 90 min. Fifty μ l of the mixtures were then inoculated onto the cells and assayed for surviving virus by BAP technique. The percent of focus inhibition was obtained by dividing the number of foci in test samples by the number of foci in control virus sample which was done in parallel only with the medium.

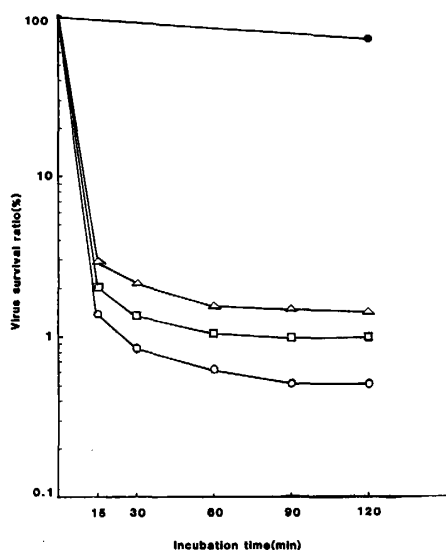


Figure 5 Kinetics of neutralization of rabies virus. Rabies virus containing 10^6 FFU/ml was mixed with an equal volume of anti-rabies virus mouse ascitic fluid diluted 1:250 (○—○), 1:500 (□—□), or 1:1000 (△—△) and incubated at 36°C . Virus control was incubated with virus diluent only. At intervals of incubation, two hundred microliters of the mixture were taken and the infectivity of surviving virus was assayed.

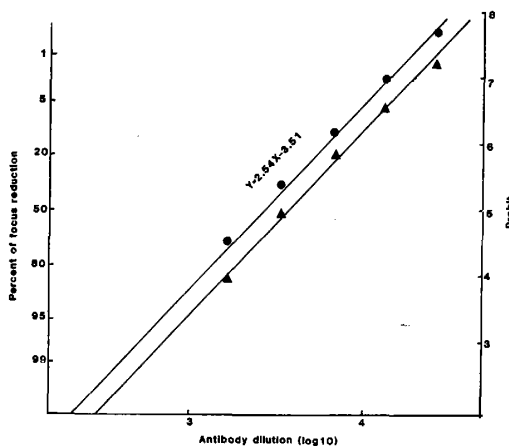


Figure 6 Neutralization of rabies virus with two preparations of anti-rabies virus mouse ascitic fluid.

The percent of focus reduction was transformed into probit and a probit regression line ($Y=a+bX$) was calculated against the logarithms of antibody dilution (X). As shown in Fig. 6, probit of the percent of focus reduction fitted to the obtained probit regression lines at various concentrations of antibodies. The slopes of the probit regression lines of two preparations of anti-rabies virus mouse ascitic fluid were same. Thus the fifty percent focus reduction titer of neutralizing antibody of a given serum can be estimated from the probit regression line.

DISCUSSION

An immuno-peroxidase (BAP) technique was applied to the rapid titration of rabies virus infectivity and virus neutralization test. The results indicated that the BAP technique can be replaced by FA technique for the titration of rabies virus infectivity. This application to virus neutralization test would provide a new method especially for determining neutralizing antibody titers of a large number of specimens since immuno-peroxidase staining method has several advantages over the FA technique as mentioned previously.

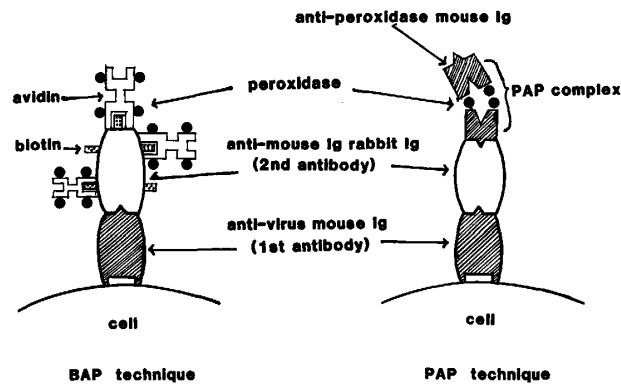


Figure 7 The principle of BAP staining technique and the comparison with PAP (peroxidase-anti-peroxidase) staining technique.

The principle of BAP technique (Fig. 7) is based on extremely high affinity of avidin (affinity constant, $10^{15} M^{-1}$) to the biotin which is a vitamin with a molecular weight of 244 and derived from the diet and intestinal bacteria. Ig or proteins can be covalently coupled with many molecules of biotin without loss of biological activities of the proteins. Avidin is a basic glycoprotein of approximately 68000 of molecular weight which is present in eggs. Each avidin molecule possesses four binding sites for biotin while each biotin molecule is capable of binding to only one avidin molecule (Moss *et al.*, 1971). The binding is extremely resistant to dissociation. One molecule of avidin can be conjugated with more than two molecules of horseradish peroxidase.

Thus the use of antiviral Ig (first antibody), biotinyl anti-Ig serum (second antibody) and peroxidase conjugated avidin for the staining of viral antigens in the cells should provide higher sensitivity and specificity than the peroxidase-labelled antibody techniques or peroxidase-anti-peroxidase (PAP) staining technique as has been studied and proven by Guesdon *et al.* (1979). In addition, BAP technique has one more advantage over the PAP technique, i.e. the peroxidase conjugated avidin can be used to biotinyl anti-Ig prepared in any species of animals, while in PAP technique, PAP complex should be prepared each in corresponding animal to which antiviral serum (first antibody) is prepared (Fig. 7).

REFERENCES

- 1) Benjamin, D. R. (1974): Rapid typing of herpes simplex virus strains using the indirect immunoperoxidase method, *Appl. Microbiol.*, 28, 568-571
- 2) Buckley, S. M. & Tignor, G. H. (1975): Plaque assay of rabies serogroup viruses in Vero cells, *J. Clin. Microbiol.*, 1, 241-242
- 3) Gerna, G., Vasquez, A., McCloud, C. J. & Chambers, R. W. (1976): The immunoperoxidase technique for rapid human cytomegalovirus identification, *Arch. Virol.*, 50, 311-321
- 4) Graham, R. C., Jr. & Karnovsky, M. J. (1966): The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291-302
- 5) Guesdon, J., Ternynck, T. & Avrameas, S. (1979): The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques, *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 1131-1139

- 6) Hahon, N., Simpson, J. & Eckert, H. L. (1975): Assessment of virus infectivity by the immunofluorescent and immunoperoxidase techniques, *J. Clin. Microbiol.*, 1, 324-329
- 7) Hsu, S. & Raine, L. (1982): Versatility of biotin-labelled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections, *J. Histochem. Cytochem.*, 30, 157-161
- 8) Matsumoto, S. & Kawai, A. (1969): Comparative studies on development of rabies virus in different host cells, *Virology*, 39, 449-459
- 9) Miller, M. H., Karnovsky, M. J. & Diamandopoulos, G. Th. (1974): An improved immunoperoxidase technique for identifying SV-40 V and T antigens by light microscopy, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146, 432-437
- 10) Moss, J. & Lane, M. D. (1971): The biotin dependent enzymes, *Adv. Enzymol.*, 35, 321-347
- 11) Okuno, Y., Sasao, F., Fukunaga, T. & Fukai, K. (1977): An application of PAP (peroxidase-anti-peroxidase) staining technique for the rapid titration of dengue virus type 4 infectivity, *Biken J.*, 20, 29-33
- 12) Okuno, Y., Fukunaga, T., Srisupaluck, S. & Fukai, K. (1979): A modified PAP (peroxidase-anti-peroxidase) staining technique using sera from patients with dengue hemorrhagic fever (DHF): 4 step PAP staining technique, *Biken J.*, 22, 131-135
- 13) Schneider, L. (1973): Cell monolayer plaque test; in *Kaplan and Koprowski Laboratory techniques in rabies*, pp. 339-342
- 14) Sedwick, W. D. & Wiktor, T. J. (1967): Reproducible plaquing system for rabies, lymphocytic choriomeningitis, and other ribonucleic acid viruses in BHK-21/13S agarose suspensions, *J. Virol.*, 1, 1224-1226
- 15) Smith, A. L., Tignor, G. H., Mifune, K. & Motohashi, Y. (1977): Isolation and assay of serogroup viruses in CER cells, *Interviol.*, 8, 92-99
- 16) Smith, J. S., Yager, P. A. & Baer, G. M. (1973): A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody, *Bull. W. H. O.*, 48, 535-541
- 17) Strating, A., Mitzel, J. R. & Slater, E. A. (1975): Plaque assay of rabies virus on porcine kidney cell monolayers, *J. Clin. Microbiol.*, 2, 126-128
- 18) Warnke, R. & Levy, R. (1980): Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A biotin-avidin-horseradish peroxidase method, *J. Histochem. Cytochem.*, 28, 771-776
- 19) Yoshino, K., Taniguchi, S. & Arai, K. (1966): Plaque assay of rabies virus in chick embryo cells, *Arch. ges. Virusforsch.*, 18, 370-373

ビオチン，アビジン，ペルオキシダーゼ法（免疫酵素抗体法）

による狂犬病ウイルス感染価の迅速測定法と

そのウイルス中和抗体測定への応用

七 條 明 久¹・三 舟 求真¹・林 慧 君²

マイクロスライドチェンバーを使用し、免疫酵素抗体法（ビオチン，アビジン，ペルオキシダーゼ法）による狂犬病ウイルス感染価およびウイルス中和抗体価の迅速測定法を確立した。この方法は迅速であるのみならず、感度，再現性も優れており，従来から使用されている蛍光抗体法に代って狂犬病の迅速診断あるいは血清疫学に有用な新しい方法となるものである。

日本熱帯医学会九州支部第5回大会講演要旨

会 期: 昭和56年2月1日(日)
会 場: 熊本大学医学部第2講義室
会 長: 熊本大学医学部 多田 功

目 次

特 別 講 演

熱帯地を歩いて

片峰大助 博士 (長大・熱研・所長)

ワークショップ I

熱帯病を現場で考える

1 ケニア

嶋田 雅暁 (長大・熱研・寄生虫)

鳥山 寛 (長大・熱研・病理)

2 グアテマラ

高岡 宏行(大分医大・病理・医動物)

吉村 健清 (産医大・公衛)

3 中国

中村 正 (長大・医・衛生)

4 インドネシア

高岡 長雄 (荒尾・高岡病院)

ワークショップ II

医学部学生の熱帯医学研究活動

1 全国的動向と熊大熱医研

山下 耕一

2 長崎大学熱医研活動

大野 康治, 木村 和也

(長大・医・学 III)

3 九州大学熱医研活動

田中 耕二

(九大・医・学 I)

ワークショップ III

熱帯のトピック

1 世界のムカシウサギを追って

鈴木 博 (長大・熱研・ウイルス)

2 オンコセルカ症の皮ふ症状

野中 薫雄 (長崎中央病院・皮膚)

追加発言

坂本 信 (長大・熱研・寄生虫)

3 東アフリカにおける肝疾患とカポジ肉腫の疫学と病理

板倉 英世 (長大・熱研・病理)

4 東南アジア・西アフリカを旅して

福島 英雄 (鹿大・医・熱研)

特別講演

熱帯地を歩いて

片峰大助 (長崎大・熱研・寄生虫)

講演抄録なし

ワークショップ I.

熱帯病を現場で考える

1-1. 現代医学に迫るサバンナの気迫

嶋田 雅暁 (長崎大・熱研・寄生虫)

〇〇先生、「熱帯医学」についてフィロソフィーを語れという日本からの手紙、戸惑いながらの返事になります。

それにしても、アフリカの広大な自然の中でそこに生活を営む人々を見るとき、現在の「熱帯医学」というものに絶望に近いものを感じるのは私一人でしょうか。一体、人類が月に立つ時代に、たかが(こんな言い方は誰かに怒られそうです)風土病のひとつやふたつ何故撲滅とまでは言わなくてもコントロールできないのでしょうか。他人はそれを経済の問題だと一言で片付けるかもしれませんが。第一こんな疑問は私自身の力不足から出るものであってそれ以外の理由などないのかもしれませんが。しかし、それにしてもこの無力感だけは間違いのないものです。

元来、「現代医学」というものはアフリカに対して有効性を持っていないのではないかと考えてしまうのはこんな時です。確かに西欧合理主義を基盤にした現在の医学は多くの幸せを人類にもたらしました。にもかかわらずこのアフリカの現実です。西欧医学ですら熱帯病を克服できなかったと考えるより、西欧医学だからこそ歯がたたないと考える方が事はスッキリするような気がします。アフリカにはアフリカの合理性に基く医学が必要なのかもしれません。そしてそれこそ真の「熱帯医

学」なのでしょう。

そう考える時、アフリカ人でもなく西欧人でもない私が西欧の武器=現代医学を持ってアフリカに行くその立場は果たして何なのだろうということにしかありません。まったくやりきれない気持ちです。西欧医学=現代医学を自分の武器として更に磨き上げるのか、あるいはもっと別の武器を造り出すのか、いずれにしてもやゝメランコリックな気分で筆を置きます。

1-2. ケニアにおける調査活動を通じて

鳥山 寛 (長崎大・熱研・病理)

今まで3年間ケニアで行ってきた調査は主として、B型肝炎の疫学調査であり、具体的に説明すると、ケニア国内の州立病院、地区病院を廻って外来患者の血清を採取し、それを日本に持ち帰り、肝炎ウイルスの抗原、抗体を検索するというケニア側から見れば極めて略奪的な仕事、又病理学という立場からはやや逸脱したものであるが、現段階の基礎的な調査としてはやむを得ないものと思われる。そういう点で臨床とタイアップし診療を行いながら調査をするという事が、発展途上国においては、その場しのぎの方法かもしれないが、ある程度は必要だと思われる。実際に現地を調査を行って一番感じるのは、フィールドに入り込めば入り込むほど、現地の国内問題に関わらざるを得なくなるという事である。例えばケニアに於ては根深い部族間の対立が存在するが、知らず知ら

ずのうちの中に組み込まれ、気づいて見ると、どちらかの部族の側に立っているという場合がある。リサーチャーとしては、第3者的に物を見、考えるというのが必要であろうが、実際フィールドに入り現地の連中と生活しているとそういう醒めた立場を貫くのは非常に難しいと思われる。又醒めた態度で現地の連中に対するという事にも疑問が残る。日本と全く違った赤道下の高温乾燥の地で仕事をするというのは実際に非常に辛く、一日の仕事を終えて宿舎に戻る頃にはフラフラになり、常に鼻出血に悩まされるという経験もあるが、それでもその疲労の中に日本では得られない安らぎが見い出せるのは一体どういう事だろうかと自問自答しているが、その結論は未だ出ていない。自分でも意味のわからない安らぎが結局は自分を熱帯に送り出すエネルギーであり、それがいわゆるアフリカの毒そのものかもしれない。今年も現地に出るつもりである。そろそろ中毒症状があらわれてきたのかもしれない。

2-1. グアテマラにおける オンコセルカ症研究撲滅対策から

高岡 宏行 (大分医科大・医動物)

国際協力事業団による中米・グアテマラ共和国におけるオンコセルカ症研究撲滅対策プロジェクトは1975年から1980年にかけて5年間実施され引続いて3年間の予定で第2次プロジェクトが継続中である。演者は1978年8月から1980年1月までの1年半、派遣専門家としてグアテマラに滞在し第3・4年次の計画に参加した。プロジェクト前半期間中の業務実施の結果や経過については第1・2次業務報告書及び計画打合せ調査団報告書等に詳述されている。ここでは司会者の申し出に沿ったプロジェクトの実験的・複合的性格、年次計画、その実施状況、実際の業務内容などを簡単に紹介し、プロジェクト実施に伴って生じた困難・問題について話題を提供した。上記報告書等に記された問題点を整理すると、1) 海外医療調査のあり方を問う問題、2) 現地カウンターパートと共同研究を行う上での問題、4) 現地住民の検診に関する問題、の3点に分けられる。これらに含まれ

る問題は専門家個人の適切な対応によって解決されるものとそうでないものがある。本プロジェクトの対象とした人オンコセルカ症は我国には存在せずほとんどの専門家が初めて取組むものであり、従って、自ら流行地で多くを学び、年次計画に決められた業務を遂行しつつ現地カウンターパートに技術指導を行うというものであった。演者の属した昆虫部門では現地フィールド作業員をカウンターパートとした媒介ブユ駆除方法の開発に關した野外調査が主体であった。この体験から、1) 相手国の色々の事情を早く熟知し、2) カウンターパートの立場に立ち、理解を示し、信頼感をもって対等につきあい、プロジェクトの目的計画を十分認識させ主体性をもって参照できるように配慮すること、の重要性を痛感した。

2-2. グアテマラでのオンコセルカ症に対する住民検診の問題点

吉村 健清(産業医科大学・公衆衛生)

グアテマラの保健衛生レベルは他の発展途上国と同様非常に低い。これはグアテマラで死亡率12.7、乳児死亡率27.3という数値や、死因順位の10位以内は、ほとんどが感染性疾患、栄養障害によるものであることに示されている通りである。このような状況の中で、日本とグアテマラ政府の共同プロジェクトである「オンコセルカ症研究対策プロジェクト」に参加して住民検診を実施した。当プロジェクトではベクターコントロールの効果を人間側から評価するために同一人の経年変化を見る必要にせまられたが、オンコセルカ症の治療なしに毎年検査を行えば必ず受診率の低下がおこってくる。この受診率の低下を防ぐためにどのような考え方で、どのような方策をとったかについて述べる。

頭初は、受診率の向上を目指して、娯楽映画の上映、インスタントカメラによる家族写真の撮影をやっていた。しかし住民へのプライマリーヘルスケアの重要性に気付いて、現在は次のような方策をとっている。

1. 住民検診に現地医師(医学生)による健康相談、指導を組み入れる。

2. 栄養食品配布—検診受診者に年4回、粉ミルク、小麦粉、食用油等の食品配布。

3. 衛生教育—住民一人一人に一般衛生教育、指導を行うと同時に当プロジェクトの意義を理解させる。

4. 対象住民との十分な事前の打ち合わせ—住民の検診に対する不満、要望を聞き改善に努力する。

以上のように、住民を単に研究の対象としてみるのではなく、熱帯地に生活しているが我々と同じ人間であるという考えにたって住民の検診をやらなければ、フィールドの調査活動は成功しないであろう。

3. 中国

中村 正 (長崎大・医・衛生)

1980年8月下半2週間熱帯研片峰、内藤両教授に伴し中国行、14日15:30大村発、上海經由北京空港20時着。初訪の中国、その予想した広大さも機上からでは感うすし。翌15日中国医学科学院に黄家駟院長訪問、中国の医学研究・教育の概要を承る。医者は中国國務院教育部(文部省相当)と衛生部の両部の管下にある、全国に医学校116、年限は短きは5年、長きは8年と多岐にわたる由。医療も発展途上にある中国が高水準の医師養成とともに末端に広くこれを布及さすべく、いわゆる「はだしの医者」を養成しつつある現状、察して余りあり(因みに文革時代に3年制に抑えられし由)。又医療と共に予防衛生活動に重点が置かれある由、感染性諸疾患に長年悩み来たこの国として当然な事となつかる。医学の研究所は諸領域併せ全国に20あり、医学科学院の管下にある由、15日午後より20日まで衛生研究所を初めに伝染病、ウイルス、熱帯医学などの各研究所を歴訪、いづこにも「熱烈歓迎長崎大医学訪中団」の文字飾られしに此の国らしさを覚え乍ら、予防衛生重点主義を再痛感す。臨床医、予防医いづれも公務員でありその処遇も又同じ由。見学の合間帝制時代の御陵の一つ定陵と万里の長城見学、この国5千年の長史と力に打たる。21日抗洲に飛び、衛生実験院など訪れ、半日を西湖に遊び中国の古きロマン

を偲ぶ。双峰なる部落の生産大隊を訪れ革命もたらせる生産増大と生活水準向上の程を見せらる。24日汽車(此国は火車)で上海へ。寄生虫昆虫両研究所、上海第一医学院(医大)訪問、学生は臨床・予防両コースに分かれ教育されあり、予防重点を三度覚えさせらる。上海近郊青浦の生産大隊に到り、住血吸虫症淫浸の地から河川改修の人海土木工事で之を駆逐せし跡を見せらる。前演者2人は熱帯現地で覚えし無力感を訴えられしが、両氏よ、熱帯病対策は虫(病原)のみならず、環境と宿主を併せた多岐長期の大戦であり、兄らは虫を追ふ一人の捨石に徹せられよ。思ふに中国は広し。熱帯学者就中九州の諸士の研究進出活動が望まれる。

4. インドネシアでの経験

高岡 長雄

今日「急を要する海外への医療対策」に、病気にもなれない在外邦人、企業と個人のリスクで自衛、望まれる政府の医療協力、外務省、厚生省も対策の検討をし、発展途上国への医療技術援助を進めおるが、アフリカ、中近東では日本のライセンスで許可するところがあるが、正式に日本医師免許による診療許可はASEAN諸国では困難であります。

インドネシアに対し、JICA、IMFJ、日本熱帯医学協会等数十団体より幾多の協力がなされおり、更に日本在外企業協会(会長永田敬生立造船会長)や在外邦人医療対策討論部会等設立され、今回鈴木総理ASEAN諸国歴訪に際し、各国に科学技術協定の調印をし、医療(イ国に対し)、農業等の共同研究及び交流を約束されました。

私は第二次大戦中、イ国に駐留したことあり、昭和39年以降約16年に亘り歩を運び、現地各界(スハルト大統領主治医Dr. Max、夫人実弟ハルトモ少将等)の人々と交流を重ね、今回高野医師(九大昭13年卒)が保健省の許可を受け、労働許可(労働者)、移住許可(法務省、移民局)を正式に認可を得て、合併方式でDr. Bayuのクリニックで診療できることになりました。

今日米国を凌ぎ、常時数千人の日本人が滞在し、

400社に及ぶ合弁日系企業に数万人のイ国人従事し、国土は日本の5倍もあり、1億4千万の人口にイ国人医師は8千人弱であり、6百万のジャカルタ市に日本大使館付の渡辺医務官一人であり、他は推して知るべし。昨年12月中部ジャワ、ソロ

市の反華僑暴動や近年途上国でナショナリズム高まり、必要でも拒む傾向強く、折角取得したこの方式を、私のライフワークとして継続し、政府民間の医療支流の絆として、生生発展を祈念して止みません。

ワークショップ II.

医学部学生の熱帯医学研究活動

1. 全国熱帯医学活動の動向と熊大熱帯医学

山下 耕一 (熊大熱帯医学)

我々、熊大熱帯医学では、発会するに当り、熱帯医学とは何なのか、何をしていけばよいのか、問題になりました。そこで我々は全国大学の熱帯医学活動の問題点、現状を知ることによって我々の方向性を見い出そうと思い、全国の大学にアンケートを出し、熱帯医学活動をしている20校のサークルのうち、14校から、回答を得ました。サークル名によると、熱帯医学、国際保健、無医地区を対象としたものです。アンケートの結果として、まず発会年度では、ここ10年内の発会が11校を占めております。もっと歴史のある研究会があるはずですが、何らかの理由で中断していると思われる。次に、現在までの総会員数が、30人をこえるのは、5校しかなく、卒後、熱帯医学関係に従事されているOBは、14人しかいません。また現役会員数をみると、10人前後の会が、多いようです。発会の動機としては、熱帯への興味、視野の拡大が、多いですが、カンボジア難民問題をきっかけとするものが数校にあります。OBとの交流は、報告書、報告会が、多いようです。

国際的視野を得ることや、フィールドワークでの体験を、熱帯医学活動の意義として挙げていますが、問題点としては、資金、会員の獲得に困難があるようです。これは、大学学生・一般人の熱帯医学への関心が低いことにもよるでしょう。しかし、カンボジア難民問題を契機として、医学生アジア交流会議が開催されたことから考えても全く無関心ではないと思われ、全国での熱帯医学活

動サークルがまとまれば、情報も豊富になり、活動も活発になると思われます。また、熱帯医学に従事される諸先生方をお願いしたいこととして、学生に対し熱帯の現状を知らせ、刺激して、関心を持つ学生を増やすべく、御尽力頂けたらと思います。

2. 長崎大学熱帯医学国内活動の問題点について

大野 康治 (長大医・MIII)

国内活動の目的としては学生が共同生活をしてあるひとつのことをやりとげる努力をすることにあると思います。活動テーマの選定については、実際の現地活動も含めて教官の御指導が不可欠であります。資金については寄付金に頼るには批判も多く、なるべく自己調達ができるように努力しています。実際の現地活動に関しての注意点は、現地の住民とのコンタクトを十分にとり細心の注意を払って活動すること、必要な動物捕獲に関しては国の許可があるものもあるので前もって準備しておくことなどがあげられます。最後に、成果のまとめについては、報告書はなるべく早くまとめること、現地住民への還元を決断して忘れてはいけないことなどが必要であります。

「長崎大学熱帯医学国外活動」

木村 和也 (長大医・MIII)

1980年夏期フィリピン研修を通して感じた、学生が海外研修を行う際の留意点について述べた。

第1に、研修先を早期に決定することが重要である。それが決定されて初めて、予算がたち、資金集め、勉強等の準備にとりかかることができる。

語学訓練その他も含めて、1、2ヶ月ではとても準備できるものではなく、早期からの余裕のある準備が必要である。今回の研修の成果として、①国内では見ることのできない熱帯病患者に接することができ新しく見聞を広めることができた。②多くの感染症の蔓延の実態を知り、自分たちなりに医学の概念を深めることができた。③語学力の重要性を痛感した。以上我々は、フィリピン研修を通じて貴重な体験を得ることができたが、諸先輩はじめ多くの方々の御援助があってはじめて実現しているということを常に心に留めておかねばならない。

3. 九州大学熱帯医学研究会の活動について

田中 耕二 (九大・医・学 I)

当会は1965年に学生の発案によって『熱帯医学の研究、海外への調査団派遣、各国との学術交流等により医学の発展に寄与し人類への貢献を目的』として発足した。活動は沖縄班と海外班にわかれており、沖縄班は石垣市伊原間地区、西表島西部地区、与那国町に検診団を派遣し、海外班は、フィリピン、タイ、マレーシア、シンガポール、

バングラディッシュ、インドで研修や、調査を行って来た。

沖縄班は当初健康診断の後投薬治療を行っていたが、これは現地の医療システムの破壊になりかねないことを悟り、健康診断にもとずいた住民の健康台帳の作製、衛生教育、疫学調査にその主力を置くようになった。

沖縄の開発が進むにつれて八重山地区の医療状態も改善され、特に県の行う巡回検診が高い受診率をあげる事で当会が八重山地区で果してきた役割もうすれてきたため今年より宮古郡多良間村に場所を変えて、健康診断と衛生教育を行って行く予定である。

一方海外班は、昨年はバングラディッシュの ICDDR. B. で下痢性疾患の基礎と臨床を研修し、また九州大学の公衆衛生学教室に協力してインドのマドラスで菜食主義者と消化器系のガンとの関係についての資料を集めました。

これらの活動を行う中で当会は人材、資金、及び経験の不足という問題をかかえており、今年からは海外班の派遣を見合わせ沖縄班のみを派遣する予定である。

ワークショップ III.

熱帯のトピック

1. 世界のムカシウサギを追って

鈴木 博 (長大・熱研・ウイルス)

日本のアマミノクロウサギ *Pentalagus furnessi*, メキシコのメキシコウサギ *Romerolagus diazi*, アフリカのアカウサギ *Pronolagus rupestris* の3種は、今から3,000~4,000万年前の始新、漸新世に繁栄していたとされるムカシウサギ亜科 (Palaeolaginae) に属し、現存するウサギ科 (Leporidae) のうちで最も原始的な形態を遺すウサギ類である。この亜科には他に10属が含まれるが何れも化石種のみであり、前述の現存する3種が生きた化石と云われる所以でもある。従ってこれらのウサギ類は生物進化に関する古い歴史の情報を提供する生

きた貴重な材料であるとも考えられる。

我が国の奄美大島、徳之島にだけ生息するアマミノクロウサギについて、1971年以来、その生態、内部・外部寄生虫の調査を続けているが、この中、特にこの宿主に特異的に寄生するクロウサギチマダニ *Haemaphysalis pentalagi* の存在が知られていた。

其の後の筆者の調査からダニ類の一群、恙虫の中にもクロウサギワルヒツツガムシ *Walchia pentalagi*, ナカヤマタマツツガムシ *Cordiseta nakayamai* の2種がクロウサギにのみ寄生している事実を明らかにした (1977)。

とりわけ、*Cordiseta* 属はメキシコを基産地とする恙虫であることを知り、ムカシウサギ亜科に

属するメキシコウサギ, 更に, アフリカに分布するアカウサギについて, その生態と, 特異的に寄生する内部・外部寄生虫を指標にして宿主及び寄生虫の類縁関係, 宿主-寄生虫の適応, 進化の過程を明らかにする 目的で 文部省 海外学術調査を行った。

調査の結果の概要をスライドを中心に述べる。

2. オンコセルカ症の皮膚症状

野中 薫雄(国立長崎中央病院皮膚科)

オンコセルカ症の皮膚病変としてオンコセルカ腫瘍, オンコセルカ皮膚炎, 皮膚掻痒, 下肢前脛部色素脱失, 皮膚萎縮, リンパ節腫大, 象皮病などの報告が見られている。演者はグアテマラ共和国のオンコセルカ流行地において住民検診を行う機会を得たので, グアテマラのオンコセルカ症における皮膚病変の観察を行い, アフリカ型における皮膚病変との比較検討を行った。

オンコセルカ皮膚炎は慢性経過をとる汎発性の皮膚炎として報告されているが, グアテマラにおいては本症罹患住民の1.5%にみられ, 皮疹は色素沈着, 苔癬化が著明であった。オンコセルカ皮膚炎の頻度は非常に低く, その発生機序は *Onchocerca volvulus* 感染に加えて何らかの他の要因が想像された。また, これらの皮膚炎は成人型アトピー性皮膚炎に類似しており, 両者に血清 IgE 値の上昇をみることから両者の類似点を更に検索する必要性を感じた。皮膚病変の病理組織学的検索では皮膚真皮内にミクロフィラリアを検出するも, 病変との関連は不明確であった。

色素脱失斑は一般に下腿前面にみられ, アフリカ型に報告されているいわゆる pretibial depigmentation に一致する症例もみられた。しかし色素脱失斑のみならず癬痕が多く, その鑑別が困難な場合もみられた。その他, オンコセルカ症に高頻度にみられる症状としてリンパ節腫大が著しかったが, アフリカ型にみられる hanging groin などは見られなかった。また, 流行地住民の皮膚にはブユ刺点 (*Simulium* bite point) が多数みられ, 殊に上半身におけるブユ刺点の陽性率はミクロフィラリア陽性率との相関性がみられ, 感染の

関与を皮膚症状より推測し得る可能性が示唆された。

3. 東アフリカにおける 肝疾患とカポジ肉腫の疫学と病理

板倉 英世 (長崎大・熱研・病理)

熱帯地疾患の疫学と病理学的調査研究を行うにあたって, 熱帯環境と疾患の病態の特異像との関連性を追求するというのも研究上の一つの観点と考えられる。我々は熱帯にも温帯にも広く分布している肝臓疾患と, 熱帯を主とした比較的限局した地域にみられる Kaposi 肉腫について病理形態学的方法を中心とした疾患の本態を探っている。目下のところは, 赤道東アフリカを主要な調査地域としているが今後は中央および西アフリカ, さらに東南アジア方面の研究者と共同で調査を進めていく計画を持っている。肝臓の病変は種々のウイルス, 原虫, 寄生虫によって, また各種物質の代謝異常によっても惹起される。我々は今までにケニア各地の住民の B 型肝炎ウイルス 関連抗原抗体の保有率やそのサブタイプなどを免疫血清学的に調べ, 同時に病理組織学的に肝炎・肝硬変・肝癌などを調べて, 住民の種族による感染率やサブタイプの特徴, さらに肝臓疾患とくに肝癌と B 型肝炎ウイルスとの関連性などを病理学および疫学両面から同じ地域において見出した。アフリカ大陸中央部から南部にかけては住民の肝臓に鉄沈着が見られることが以前から報告されている。我々は東アフリカにおいても鉄沈着症の多くの材料を得て, 鉄と肝臓病変との関連性を, 径口的鉄摂取, 輸血後鉄沈着, 特発性鉄沈着などについて検討出来る機会も持った。住血吸虫症も東アフリカに多いが, これは肝臓に肝線維症や肝硬変を惹き起すので, 肝臓における肝細胞の再生から癌化までの病変と線維症との関連性を検討する場合に好適な材料である。各種原虫によっても肝臓病変が生じるが, 慢性化しても上記の各疾患ほどには強い形態学的変化を来さないことは興味があるところである。Kaposi 肉腫は赤道アフリカや地中海沿岸に多いといわれ, その原因は勿論, 病理組織発生も不明の点が多い。東アフリカ各地において

我々も調査を進めており、特定の地方・種族に多い傾向にあるようで、また病理組織発生について興味ある知見を得つつある。

4. 東南アジア・西アフリカを旅して

(熱帯地における糸状虫症、マラリア、住血吸虫症、肝炎浸淫の現況)

福島 英雄・鮫島洋子

(鹿大・医・熱研)

わが国においては、糸状虫症、マラリア、住血吸虫症などは撲滅対策が成功しているが、熱帯においては、依然として、マラリア、糸状虫症、癩などは多い。又、肝炎も多く、海外へ行く日本人にとっては、大きな問題となっているので、これら疾病の現在の浸淫状態について述べる。

糸状虫症は対策が成功している地域は、日本、スリランカ、南太平洋の島々のみで、熱帯においては、依然として、本症の浸淫に悩まされている。

糸状虫の種別に浸淫地区をみると、*Wuchereria bancrofti* は世界中、*Brugia malayi* はアジア(南・東南・東)のみ、*Timor filaria* はアジア(チモール島、フローレス島)のみ、*Loa loa* はアフリカ(熱帯雨林地帯)のみ、*Dipetalonema perstans* は南米と中央アフリカの他、西南アジア、*Dipetalonema streptocerca* は西・中央アフリカのみ、

Mansonella ozzardi は中央アメリカ、西インド諸島のみ、*Onchocerca volvulus* は熱帯アフリカ、中南米の他、イエメンに浸淫している。

15%以上の濃厚浸淫地区は、*Wuchereria bancrofti* では54ヶ国(アジア:8, 南太平洋:21, アフリカ:20, アメリカ:5)、*Brugia malayi* は8ヶ国、*Timor filaria* はチモール島のみ、*Loa loa* は2ヶ国、*Dipetalonema perstans* は13ヶ国、*Dipetalonema streptocerca* は1ヶ国、*Mansonella Ozzardi* は7ヶ国、*Onchocerca volvulus* は14ヶ国である。

マラリアは残留噴霧により、1960年頃は抑圧可能と考えられたが、その後、DDT 使用中止、薬剤耐性原虫、媒介蚊の出現により、増加しつつある地域が多く、76年は72年の2.3倍の751万人が発病し、76年末、高度汚染が89国(居住者1,548,615,000人)あり、他の54国(499,355,000人)でも再蔓延の危険性がある。

次に吸血吸虫も農業灌漑開発に伴い蔓延している地域が、アフリカ、西アジア、ブラジルなどでみられ、大きな社会問題となっている。

日本人におけるA型肝炎ウイルス抗体の保有率の低下に伴い、熱帯に赴任、旅行する際は、若い日本人はγグロブリンの投与をうけるべきである。

JAPANESE JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE

Vol. 10 No. 3, 4

December, 1982

CONTENTS

Original article

- SAKURAI, H., SATO M., HIROSE, T., OMATA, Y., SAITO, A. and SUZUKI, N.
Microbicidal Activity of Hydrolyzed Toxoplasma Immune Mouse Serum (HS-LKs) in
Heterologous Cell Cultures183-195
- IWAKI, M.
Ecological Study of *Mansonia (Mn.) uniformis* Theobald and *Mansonia (Co.) ochracea*
Theobald (Diptera, Culicidae) in Kyoto City, Midoroga-ike pond197-205
- SUGIHARA, H., KITO, R., NIKAI, T. and SAKAI, E.
Enzymochemical Studies on Snake Venoms. XI. Purification and Properties of Arginine
Ester Hydrolase (ME-4) in the Venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*207-217
- MIZUNO, F., NOGAMI, S., MARUHASHI, M. and MATSUMURA, T.
Life Cycle of African Ticks, *Ornithodoros moubata* as a Vector of Filariæ *Dipetalonema*
viteae at the Condition of Continuous Light and Continuous Darkness219-227
- HORI, S., IHZUKA, H. and NAKAMURA, M.
Comparison of Physiological Responses to Heat Between Subtropical and Temperate
Natives229-237
- HASHIGUCHI, Y., TADA, I., FLORES C, O. and TAKAOKA, H.
Diurnal Biting Activity of Four Zoophilic Species of *Simulium* in an Area Endemic for
Human Onchocerciasis in Guatemala239-244
- SHICHIJO, A., MIFUNE, K. and LIN, J. W.
Rapid titration of rabies virus infectivity by biotin-avidin-peroxidase technique and its
application to virus neutralization test245-251

Published by

JAPANESE SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE

c/o Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University
12-4 Sakamoto-machi, Nagasaki, 852, Japan