

日本熱帯医学会雑誌

Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene

第16巻 第4号

昭和63年12月15日

内 容

原 著

- 実験的日本人住血吸虫症における診断用抗原の Immunoblotting 法による解析 (英文)
伊藤 誠, 佐藤 重房, M.A. Appawu, 川口 仁 277-283
- 高知県の大複殖門条虫症8例の追加
鈴木 了司, 今村 京子, 熊沢 秀雄, 岡村 宜典, 中川 佳子 285-291
- ガストログラフィンによる有鉤条虫症および無鉤条虫症の治験例
新垣 民樹, 長谷川英男, 盛島 明浩, 池間 稔,
 照喜名重順, 東恩納 厚, 金城 福則, 斎藤 厚,
 安里 龍二, 当真 嗣勇 293-299
- 重症マラリアの Qinghaosu による治療例
狩野 繁之, 辻 正周, 細谷純一郎, 鈴木 守 301-307
- マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) 感染マウス赤血球膜画分からアミノペプチダーゼの抽出精製
井上 文英, 松山 玲子, 佐藤 良也 309-316
- Leishmania donovani* ならびに *Trypanosoma gambiense* 感染マウスに対する
 inosine analog の薬物効果について
森重 和久, 安治 敏樹, 木村 Julieta Y.,
 石井 明, 綿矢 有佑, 松田 彰, 上田 亨 317-325

会 報

- 昭和63年度第2回幹事会記録 327-328
- 昭和63年度評議員会記録 328
- 第30回総会記録 328-329
- 昭和62年度会計決算書 329
- 昭和63年度会計中間報告 329
- 昭和64年度予算書 330
- 投稿規定

ANALYSIS OF *SCHISTOSOMA JAPONICUM* ANTIGENS USEFUL FOR SERODIAGNOSIS EMPLOYING SERA OF INFECTED MICE BY IMMUNOBLOTTING

MAKOTO ITOH¹, SIGEFUSA SATO¹, MAXWELL A. APPAWU²
AND HITOSHI KAWAGUCHI¹

Received June 20 1988/Accepted September 2 1988

Abstract: Antigens suitable for serodiagnosis of schistosomiasis japonica were investigated using immunoblotting in the course of the infections with *Schistosoma japonicum* in mice. Major antibodies to four adult worm antigens were found in the infected sera. Molecular weights of those antigens were determined to be 32 kD, 70 kD, 76 kD and 95 kD, respectively. Above all, antibody to the 32 kD antigen was first detected in mice sera 5 weeks after infection and was thereafter shown clearly in all of the infected mice sera throughout the experiment. From the results obtained in this study the 32 kD component was suggested to be the most useful antigen for the serodiagnosis of the disease.

INTRODUCTION

Although the most reliable diagnosis for schistosomiasis japonica is to detect eggs of the parasite directly, it is not always possible to find them in the patients (Yogore *et al.*, 1983). Thus several diagnostic methods such as circumoval precipitin test, complement fixation test, skin test and enzyme linked immunosorbent assay which detect specific antibodies of infected sera to the parasite, have been developed (Yokogawa *et al.*, 1967; Tanaka *et al.*, 1979; Sato *et al.*, 1970; Sawada *et al.*, 1968). Not only crude antigen solutions or partially purified antigen solutions from adult worms but also antigens from eggs of the parasite have been prepared and contrived for serodiagnosis (Nagata, 1982; Ishii and Owhashi, 1982; Long *et al.*, 1982; Tracy *et al.*, 1985). Further efforts have been made to identify individual parasite antigens more suitable for serodiagnosis. In this study, as the first step to identify the most suitable antigen of *Schistosoma japonicum* for serodiagnosis, we investigated specific antigens recognized by antibodies raised in murine host during the course of the infection using immunoblotting.

-
- 1 Department of Medical Zoology, Medical School, Nagoya City University, Kawasumi, Mizuho, Nagoya 467, Japan
 - 2 Parasitology Unit, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Legon, Ghana

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Male BALB/c mice 5 weeks old were used throughout this study.

Antigen Preparation

S. japonicum (Yamanashi strain) which has been maintained in our laboratory for more than 5 years was used throughout the experiment. Adult worms in pairing were obtained from infected mice 11 weeks after infection. The worms were stored at -80°C . After thawing, they were immersed in distilled water and sonicated at 4°C at 100 mA for 5 min. They were then centrifuged at $3,500 \times g$ for 5 min at 4°C . Protein content of the supernatant was determined according to the method by Bradford (1976) and adjusted to 10 mg/ml. This preparation was used as adult worm antigens and kept at -80°C until required.

Infected Mouse Sera

Each of twenty-five mice was infected with 20 cercariae percutaneously. They were divided into five groups, I, II, III, IV, and V, each groups consisting of five infected mice. Mice in group I were sacrificed at 3 weeks after infection. The whole serum was collected from each mouse, half the volume being stored as test antiserum for determining the variation of the antibody production in the mice. The rest was stored as pooled sera from each group. In the same way, the infected mice in group II were bled at 5 weeks after infection, III at 7 weeks, IV at 9 weeks and V at 11 weeks. One mouse in group V died before serum collection. The infected sera were stored at -80°C until use.

Immunization of mice

In order to obtain test antisera, three mice were each injected with 0.1 ml of antigen solution containing 1 mg protein of the adult worm antigens mixed with an equal volume of Freund's complete adjuvant (Difco Lab., U.S.A). All injections were made subcutaneously. The mice were given a booster dose 3 weeks after the initial injection of 0.1 ml of the antigen solution alone. The mice were bled by heart puncture 7 days after the final injection.

SDS-PAGE

Antigen solution was mixed with same volume of the sample buffer (2.5% SDS, 25% glycerol, 2.5% 2-mercaptoethanol in 0.125 M Tris-HCl buffer pH 6.8) and kept in boiling water for 2-3 min and then applied to 10% polyacrylamide gel (70×85 mm). The gel was prepared according to Laemmli (1970). Molecular weights of separated components were estimated with a calibration kit from Pharmacia (Sweden).

Immunoblotting

Proteins separated by SDS-PAGE were transblotted to nitrocellulose membrane (0.45μ pore size, Toyo Roshi, Japan) by Western blotting method (Towbin *et al.*, 1979). After blotting, a part of the membrane was cut and stained with Amido Black 10 B (Merck, West Germany). The surface of the rest of the membrane was blocked by blocking butter (1% casein, 0.15 M NaCl in 0.02 M Tris-HCl buffer pH 7.6). Then the membrane was immersed in sera from infected or immunized mice diluted twenty times with the blocking buffer and incubated at 37°C for 1 hour. After washing three times for 30 min, IgG antibodies which attached to antigens on the membrane were detected by peroxidase conjugated anti-mouse IgG ($\times 1,000$ diluted, Cappel Lab. Inc., U.S.A.).

RESULTS

Changes of host antibody production against S. japonicum

Production of specific IgG antibodies against adult worm antigens was investigated in the pooled sera of mice infected with *S. japonicum* (Fig. 1). No antibody to adult worm antigens was detected in sera of group I. The antibodies were first detected in the sera of group II. Thereafter, the antibody content of infected sera of groups III, IV and V increased and the four main components could be distinguished from other minor components. Their molecular weights were calculated to be 32 kD, 70 kD, 76 kD and 95 kD respectively.

Fig. 1 shows that antibody to 95 kD component was detected faintly in sera of groups II and III, and then distinctly in groups IV and V. Similarly, antibodies to 70 kD and 76 kD components which were faint in the sera of group II, but became clear in the sera of groups IV and V, while antibody to 32 kD component was present in the sera of all the groups except group I.

Individual variation of antibody production

Antibody production against the adult worm antigens was studied in test antiserum collected from individual mice in group II (Fig. 2), 5 mice in group III (Fig. 3) and 4 mice in group V (Fig. 4). Antibody to the 32 kD component was clearly detected in every serum examined. Antibody to the 95 kD component was also detected in every test serum, however, each test serum was widely different from all the others in concentration of antibody. Remarkable variation was shown in members of group V (Fig. 4).

Antibodies to the 70 kD and 76 kD components were detected in only one serum out of five in group II, in four out of five in group III, and in all in group V.

Antibodies in sera of mice infected with male worms

Mice infected solely with male worms were studied for their antibody production against

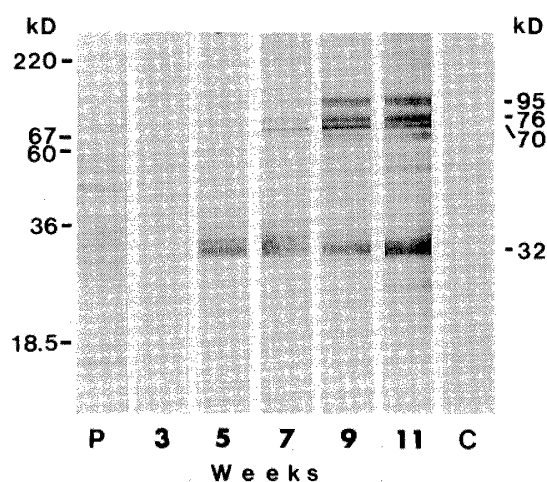


Figure 1 The immune reaction of blotted adult schistosome antigens with sera obtained from groups of mice; 3 (group I), 5 (group II), 7 (group III), 9 (group IV) and 11 weeks (group V) after infection. C, normal mouse sera; P, electrophoretic pattern of total protein stained with Amido Black 10B.

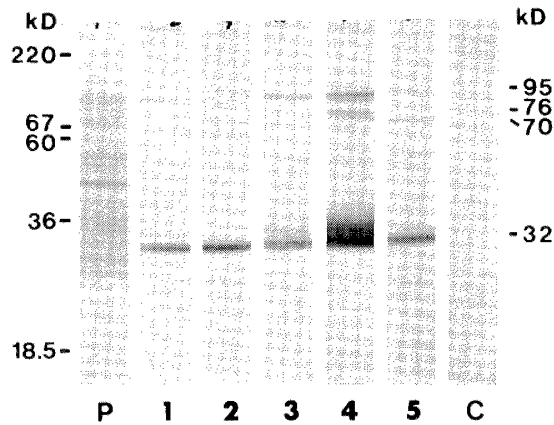


Figure 2 Individual variation of group II mice (1-5) in antibody response to adult schistosome antigens detected by immunoblotting.

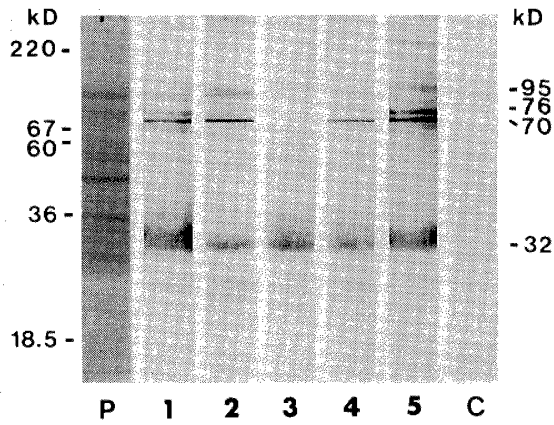


Figure 3 Individual variation of group III mice (1-5) in antibody response to adult schistosome antigens detected by immunoblotting.

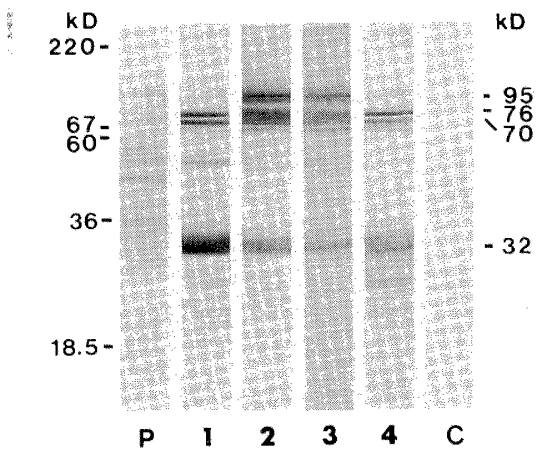


Figure 4 Individual variation of group V mice (1-4) in antibody response to adult schistosome antigens detected by immunoblotting.

adult worm antigens (Fig. 5). The infected mice were bled from the heart 11 weeks after the infection. Antibody to the 32 kD component was detected clearly in infected sera, on the other hand, antibodies to the other three components were shown to be very faint.

Antibodies in sera of mice immunized with adult worm antigens

In sera of mice immunized with whole adult worms, pattern of antibodies shown on the blotted membrane differed from that in sera from infected mice of group V (Fig. 5). Antibody to the 32 kD component was detected in infected mice sera but not in immunized mice sera. On the other hand, antibodies to the 70 kD, 76 kD and 95kD components were proved to be present in both infected and immunized mice sera. Further analysis in detail indicated that antibodies to three components which were not detected in infected mice sera were observed in immunized mice sera. Molecular weights of these components were estimated 24 kD, 37 kD and about 200 kD respectively.

DISCUSSION

Anti-*S. japonicum* antibodies produced in mice both infected with the living parasite or immunized with whole worm antigens were analyzed by immunoblotting. In infected sera sequential appearance of antibodies to four major antigen components shows that the antigens became effective as immunogens at different stages in the course of the infection. Comparing with the appearance of anti-32 kD antibodies detected in all the infected individual mice at an early stage of infection, that of antibodies to the 70 kD, 76 kD and 95 kD components was delayed. The mice with male worm infection produced little antibodies to these three components. These our observations suggest that they are specific for the late infectious stages and probably relate to egg deposition.

Individual variation of antibody production in mice against the 70 kD, 76 kD and 95 kD

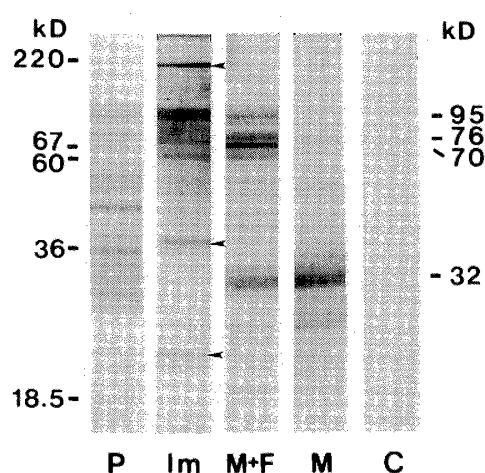


Figure 5 Reaction of blotted adult schistosome antigens with sera of mice: Im, mice immunized with adult schistosome antigens; M+F, mice infected with paired worms; M, mice infected with male worms; C, control. Arrows indicate the components detected with immunized mice sera but not with infected mice sera.

components observed in present study might be related to some difference in the worm burden, since the actual number of infecting worms was not determined in this study.

The mice immunized with adult worm antigens did not produce antibody to the 32 kD component. The reason might be that there is only a small amount of the component in the worm so that the host immune system can not recognize it when mice were immunized with it. In fact, the band of the component was very faint in protein staining of the trans-blotted membrane although the 70 kD, 76 kD and 95 kD components showed clear bands. It is speculated that in the infection the 32 kD component would be presented continuously and effectively to the host in amounts sufficient to provoke the production of antibodies. As antibody to the 32 kD component developed in mice infected with male worms, the antigen was considered to be somatic in origin.

The components detected only with the test sera of immunized mice were thought to be hidden in the inside of the parasite and not to be exposed to the host surveillant mechanisms. Modulation of host immune system elicited by living parasites may take part in this.

Ruppel *et al.* (1985) reported that sera from patients infected with *S. mansoni* possessed antibody to the distinct component (31 kD) of *S. mansoni* antigen, and the component was gut associated. The 32 kD component of *S. japonicum* discussed here seems to correspond to the 31 kD component of *S. mansoni* from several points described as follows. First, molecular weights of them are similar. Second, antibodies to them are constantly detected in all of the infected sera despite the appearance of antibodies to the other components of the worms varies. Third, the component of *S. japonicum* was not detected by sera from immunized mice as was observed with component of *S. mansoni* (Ruppel *et al.*, 1987).

As the adult worms contain only small amount of the 32 kD component, it may be difficult to obtain this component in amounts sufficient for diagnosis. However, the gene technology which has progressed during recent years may solve this problem.

Although it is not convenient for workers to use this immunoblotting for a field survey of the disease because of the equipments used, this method will be a powerful tool for a laboratory diagnosis. It is also attractive that crude antigens can be used for the serodiagnosis with profound reliability.

In conclusion, the 32 kD component of *S. japonicum* is considered to be a candidate for serodiagnosis of the disease because antibody to the component was detected in all individual mice bled 5 weeks or more after infection with *S. japonicum*.

REFERENCES

- 1) Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- 2) Ishii, A. and Owhashi, M. (1982): Enzyme-linked immunosorbent assay with egg antigens of *Schistosoma japonicum*, *Parasitol. Res.*, 67, 279-287
- 3) Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685
- 4) Long, G.W., Yogore, M.G., Lewert, R.M., Blas, B.L. and Pelly, R.P. (1982): Efficacy of purified *Schistosoma japonicum* egg antigens for ELISA serodiagnosis of human schistosomiasis japonica: specificity and sensitivity, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 1006-1014
- 5) Nagata, T. (1982): Evaluation of antigen preparations derived from *Schistosoma japonicum*

- eggs for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Jpn. J. Parasitol., 31, 303-312
- 6) Ruppel, A., Diesfeld, H.J. and Rother, U. (1985): Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide, Clin. Exp. Immunol., 62, 499-506
 - 7) Ruppel, A., Breternitz, U. and Burger, R. (1987): Diagnostic Mr 31000 *Schistosoma mansoni* proteins: requirement of infection, but not immunization, and use of the "miniblot" technique for the production of monoclonal antibodies, J. Helminthol., 61, 95-101
 - 8) Sato, S., Matsuyama, S., Takei, K. and Sawada, T. (1970): Studies on hemagglutination and complement-fixation tests with fractionated antigens prepared from adult schistosome worms in *Schistosoma japonicum* infections, In: Recent advances in researches on filariasis and schistosomiasis in Japan, (ed. M. Sasa) pp. 381-391, University Tokyo Press, Tokyo
 - 9) Sawada, T., Sato, S., Takei, K., Moose, J.W. and Williams, J.E. (1968): Immunodiagnosis of schistosomiasis. III. Further purification of antigen SSC1 by DEAE Sephadex A 50 column chromatography, Exp. Parasitol., 23, 238-243
 - 10) Tanaka, H., Matsuda, H. and Nosenas, J.S. (1979): Detection of antibodies in *Schistosoma japonicum* infections by a microtechnique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Jpn. J. Exp. Med., 49, 289-292
 - 11) Towbin, H., Staehelin, T. and Goedon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354
 - 12) Tracy, J.W., Domingo, E.O. and Mahmoud, A.A.F. (1985): Evaluation of a purified *Schistosoma japonicum* glycoprotein egg antigen for the immunodiagnosis of infection in man, Am. J. Trop. Med. Hyg., 34, 92-95
 - 13) Yogore, Jr. M.G., Lewert, R.M. and Blas, B.L. (1983): Seroepidemiology of schistosomiasis japonica by ELISA in the Philippines I. Underestimation by stool examination of the prevalence of infection in school children, Am. J. Trop. Med. Hyg., 32, 1322-1334
 - 14) Yokogawa, M., Sano, M. and Araki, K. (1967): Immunoserodiagnosis of schistosomiasis japonica III. Circumoval precipitation test, Jpn. J. Parasitol., 16, 77-84 (in Japanese with English summary)

実験的日本住血吸虫症における診断用抗原のImmunoblotting法による解析

伊藤 誠¹・佐藤 重房¹・M.A. APPAWU²・川口 仁¹

日本住血吸虫症の血清学的診断に適した抗原を、マウスの同虫感染時における抗体産生をImmunoblotting法で解析することにより検索した。感染時には主に、分子量32 kD, 70 kD, 76 kD, 95 kDの虫体抗原成分に対して抗体が産生された。中でも32 kD成分に対する抗体は、感染5週目以降調べたすべてのマウスで検出された。さらに単性寄生時にも、この抗体が産生されていた。これらの結果より、この32 kD成分が日本住血吸虫症の血清学的診断に、有効であることが示唆された。

1 名古屋市立大学医学部医動物学教室

2 ガーナ大学野口記念医学研究所寄生虫学部門

高知県の大複殖門条虫症 8 例の追加

鈴木 了司・今村 京子・熊沢 秀雄・
岡村 宜典・中川 佳子

1988年7月13日 受付/1988年8月30日 受理

高知県の大複殖門条虫症に関しては、岩田、安岡(1970)が、高知市在住ではあるが患者の氏名・年齢等が不詳で、しかも採取年月日の明らかではない本種虫体を報告したのが最初で、その後熊沢ら(1981a, b)が3例、鈴木(了)ら(1985)が9例をまとめ、計13例が既に確認され、高知県がわが国でも本条虫症の多い県の1つであるとされている。

1985年以降においても、高知医科大学寄生虫学教室に同定依頼をされた各種の寄生条虫のうち、8例が本条虫であることが認められたので報告すると共に、1988年6月までのわが国の本症例についてまとめた。

症 例

県症例14(全国における第105例):土佐市在住, 39歳, 男。1985年1月9日より心窩部から臍部にかけて腹痛が出現し, 11日より下痢, 16日に下痢便とともに長さ2-3mの虫体を排出した。土佐市民病院から高知医大中央検査部を経て, 同定依頼された。ただし同定用に持参した虫体は, 長さ67cmの成熟虫体で頭節はない。その後患者に, bithionol を12錠/日を5日間連日投与したが, 虫卵, 虫体ともに検出されなかった。患者は海産, および淡水産魚類を好んで生食していた。本症例は著者らによる同定後, 植田ら(1985)により既に報告されている。

県症例15(全国における第115例):中村市在住, 54歳, 男。中村市立市民病院から検査依頼された虫体で, 1985年1月始めから数回の排便と共に虫

体が排出されたとして1月31日に受診, 下痢と軽い貧血が認められた。2月1日に bithionol で駆虫し, 505 cm の虫体が得られた。頭節はない。約1カ月後の検便では陰性。患者は海産魚を極めて好む。

県症例16(全国における第116例):須崎市で海産魚の養殖を営む32歳の男。高知市民病院から検査依頼をされたもので, 1日4-5回の下痢が続く, 1985年11月21日に排便と共に長さ118 cm の虫体が得られた。成熟虫体であるが頭節は認めない。駆虫, および後検便の有無は不明。

県症例17(全国における第121例):高知市在住, 54歳, 女。近森病院から検査依頼された虫体で, 1986年10月27日早朝に下痢便と共に長さ330 cm, 幅10 mm の虫体が排出された。さらに同日の午後に長さ12.5 cm の成熟虫体を排出した。いずれも頭節を欠く。約1週間前から下痢, 腹痛, 発熱があり, 前日には嘔吐があった。患者はカツオやマグロをよく食べているほか, 20日前にウルメイワシの酢のものを食べている。虫体排出後, 駆虫薬は服用していないが, 約1カ月後の検便では陰性であった。

県症例18(全国における第122例):安芸市在住, 48歳, 男。臨床細菌高知研究所から検査依頼された虫体で, 1987年3月20日と25日に2回にわたり, 下痢便と共に長さ合計306.4 cm, 幅9 mm の頭節のない未成熟虫体を排出した。3月25日にアミノサイジン投与するも, その後に虫体, 虫卵を認めていない。患者は日頃から海産魚類を好んで食べている。

県症例19(全国における第123例):高知市在住,

39歳，男。県立中央病院から検査依頼された虫体で，約半月前から1日4-5回の水様性の下痢と腹痛が続き，1987年9月15日と21日にそれぞれ虫体が排出された。それらの合計は長さ393.4 cm，幅10 mmで，頭節のない未成熟虫体であった。駆虫薬は投与していないが，10月12日の検便では虫卵陰性であった。患者はイワシなどの海産物を好んで食べている。

県症例20 (全国における第124例): 春野町在住，43歳，男。細木病院から検査依頼されたもので，数日前から下痢があり，1988年1月19日夜半と21日の両日に虫体の排出がみられた。1月19日分の長さは不明であるが，持参した21日分のみで全

長118 cm，幅13 mmの成熟虫体であった。頭節はない。患者は海産魚，特にドロメを好んで食べている。虫体排出後に駆虫は行っていない。しかし，その後の3回の検便ではすべて虫卵陰性であった。

県症例21 (全国における第125例): 高知市在住，52歳，男。毛山病院から検査依頼。1988年2月27日から3月2日まで下痢があり，そのうち28日と3月2日に虫体の排出をみた。持参した虫体は後者の分で，頭節のない長さ45 cm，幅7 mmの未成熟虫体であった。前者の分は本人によると，約1 mあったというのが正確な長さは不明。駆虫は行っていないが，約1カ月後の2回の検便でいずれも陰性であった。患者は海産魚，特にドロメが好き

Table 1 Summary of reported cases of diplogonoporiasis in Japan. All cases are re-numbered according to the date of report (1984-1988, June)

Case No.	Report		Patient				Worm found		
	Author	Year	Locality	Date	found	Age Sex	Length (cm)	Width (mm)	Scolex
100	Sano	1984	Shizuoka	Aug	1983	49 M	380.0	18.0	-
101	Miyahara and Maejima	1985	Fukuoka	Feb	1984	42 M	80.0	6.5	-
102	Suzuki <i>et al.</i>	1985	Shizuoka	?	?	50 M	30.0	9.0	-
103	Kanazawa <i>et al.</i>	1985	Chiba	Dec	1984	50 M	343.0	7.3	-
104	Kagei	1985	Kanagawa	?	?	? ?	500.0	17.0	-
105	Ueta <i>et al.</i>	1985	Kochi	Jan	1985	39 M	67.0	4.5	-
106	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	Aug	1983	4 F	200.0	10.0	-
107	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	Apr	1985	60 M	62.0	10.0	-
108	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	May	1985	81 M	280.0	10.0	-
109	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	May	1985	50 M	50.0	5.0	-
110	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	May	1985	43 F	180.0	7.7	-
111	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	May	1985	47 M	60.0	5.0	-
112	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	Jun	1985	42 F	180.0	3.0	-
113	Mochizuki <i>et al.</i>	1986	Shizuoka	Jun	1985	43 M	63.0	3.0	-
114	Inutuka <i>et al.</i>	1986	Nagasaki	Feb	1986	60 M	692.0	9.0	+
115	Okamura <i>et al.</i>	1986	Kochi	Feb	1985	54 M	505.0	2.3	-
116	Okamura <i>et al.</i>	1986	Kochi	Nov	1985	32 M	118.0	4.3	-
117	Yamane <i>et al.</i>	1987	Shimane	Feb	1984	60 M	300.0	5.8	-
118	Nishiyama <i>et al.</i>	1987	Osaka	Sep	1986	55 M	273.0	13.0	+
119	Yamamoto <i>et al.</i>	1987	Hyogo	May	1987	64 F	200.0	20.0	+
120	Tanaka <i>et al.</i>	1987	Kanagawa	May	1987	58 M	1,067.0	12.0	+
121	Okamura <i>et al.</i>	1988	Kochi	Oct	1986	54 F	342.5	10.0	-
122	Okamura <i>et al.</i>	1988	Kochi	Mar	1987	48 M	306.4	9.0	-
123	Okamura <i>et al.</i>	1988	Kochi	Sep	1987	39 M	393.4	10.0	-
124	Okamura <i>et al.</i>	1988	Kochi	Jan	1988	43 M	118.0	13.0	-
125	Okamura <i>et al.</i>	1988	Kochi	Mar	1988	52 M	45.0	7.0	-
126	Kamo <i>et al.</i>	unpublished data	Tottori	Jun	1978	40 M	67.0	6.0	-
127	Kamo <i>et al.</i>		Shimane	Mar	1980	51 M	545.0	10.0	-
128	Kamo <i>et al.</i>		Tottori	Jul	1984	82 M	64.0	5.5	-
129	Kamo <i>et al.</i>		Tottori	Apr	1986	57 M	360.0	13.0	-
130	Kamo <i>et al.</i>		Tottori	Jun	1987	39 M	94.0	5.5	+

でよく食べるという。

考 察

大複殖門条虫は、長崎県の28歳の男から得た虫体を、飯島、栗本(1894)が第1例として報告して以来、今日までにわが国のみから報告されている条虫で、当初、森下(1962)が25例までを、Kamo *et al.* (1971)が55例までを集計した。鈴木ら(1985)は全症例を改めて再検討して99例をまとめたが、その後に静岡10例(佐野, 1984; 鈴木(佳)ら, 1985; 望月ら, 1986)、神奈川2例(影井, 1985; 田中ら, 1987)、福岡1例(宮原ら, 1985)、千葉1例(金沢ら, 1985)、大阪1例(西山ら, 1987)、兵庫1例(山本ら, 1987)、島根1例(山根ら, 1987)、長崎1例(犬塚ら, 1986)等の諸県で本症が報告され、今回の症例と併せて125例が1988年

6月現在報告されている。このほかに福本ら(私信)によると、鳥取、島根の両県で加茂らによる未報告症例が5例あり、合計130例の本症が日本から見出されていることになる。なお、Stiles and Taylor (1902)は、アメリカで東洋から帰還した兵士の糞便中に本虫のものと思われる虫卵を見出しているが(森下, 1962)、虫卵のみでは最終的には決定し得ないので今回もその症例については削除した。100例以降を要約してまとめたものが表1である。

この表の作成にあたっては、本来は原著論文の発行順になるべきであるが、最近のように症例数が多くなると、学会発表のみのものがあり、本表に収録することができないものもある。そのため学会での発表であれ、論文の発表であれ、発表年月の早い順に採用して並べてある。

これらの患者を県別にまとめたものが図1であ

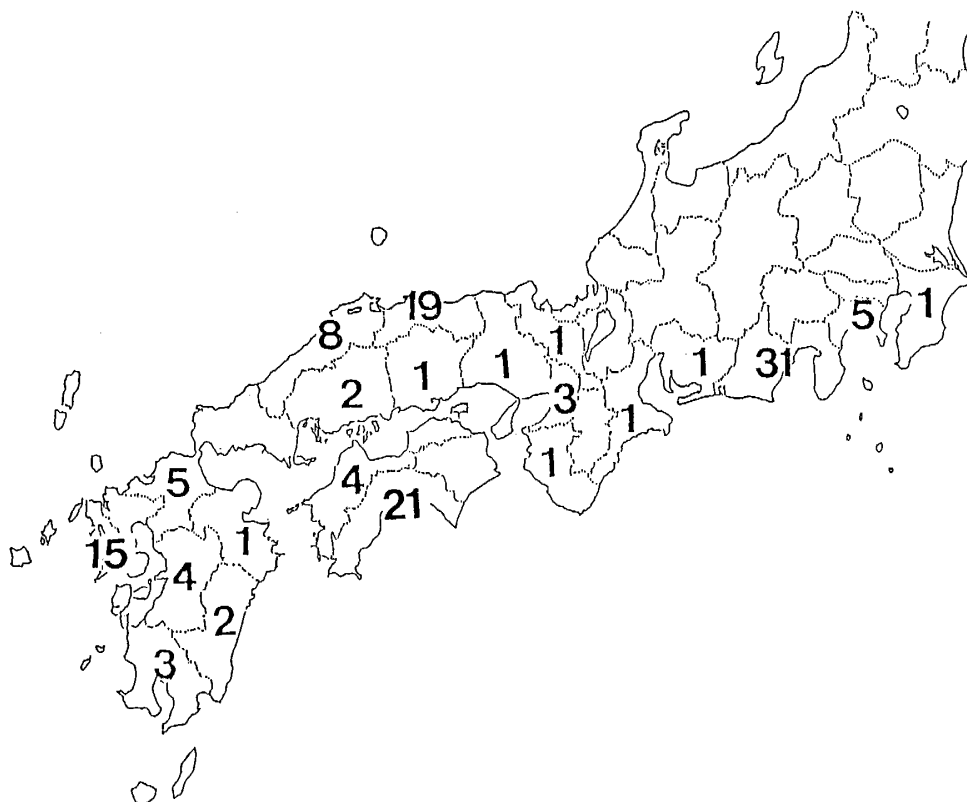


Figure 1 Prefectural incidence of diplogonoporiasis. Numbers of reported cases in each prefecture are indicated on the map.

り、1894年以来、静岡県が31例でもっとも多く、ついで高知県(21例)、鳥取県(19例)、長崎県(15例)、島根県(8例)、福岡県と神奈川県(各5例)が続き、千葉県が現在では、患者発見地の最東端で、従来いわれていたように東海地方から西日本にかけての海岸地帯に多い。

本症の最近の発生状況を調べるために、1979年以降の10年間の県別の患者数をまとめると(虫体の認められた年によったもので、虫体検出日の不明なものは除いてある)、高知県では20例、静岡県では11例、鳥取県では3例、神奈川県では2例となり、高知県が最も多い。高知県は以前には全く報告がなかったにもかかわらず、1979—1983年に9例、1984—1988年に11例が見出されているが、それ以前にも症例が存在した可能性がある。しかし適当な検査機関がなかったため、同定し得なかったことが充分に考えられる。

本症の発生状況を更に検討するため、1984—1988年の5年間における人口(1985年国勢調査による)10万人に対する患者数の割合を県別に算出してみたところ、高知県1.31、鳥取県0.49、島根県0.25、静岡県0.22、宮崎県0.09、大分県0.08、長崎県0.06、神奈川県0.03、福岡県、千葉県、兵

庫県0.02となり、高知県は鳥取県の2.7倍、島根県の5.2倍であり、実数の多い静岡県と比較しても6倍の発症数を示して最も多い。この数字については各県のおかれた環境など、すなわち、後記するような海岸の有無、海産魚の回遊、海産魚の生食の慣習や多寡、産業形態などがあって単純には比較し得ないが、およその傾向は伺えるものと考えられる。

高知県の21症例を患者の居住地別に示したものが図2で、これも海に面した地区に限られている。また、これらのほとんどの症例は、鈴木(了)ら(1985)が前回報告したように、他の県と異なり、秋から春にかけて患者の発生をみている。

本条虫の人体への感染経路は明らかではないが、海産魚の可能性は極めて高い。本症例においてもすべての患者が海産魚を好んで食べていたが、特定の魚類は推定できなかった。しかし、症例20、21はドロメを特に食べていることが認められた。ドロメは取り立てのイワシの稚魚をヌタ、もしくは二杯酢で食べるもので、高知県内では年間を通して広く食べられており、冬から春にかけてはマイワシが、春から秋にかけてはカタクチイワシが回遊の関係から主として食膳にのぼっている。ま

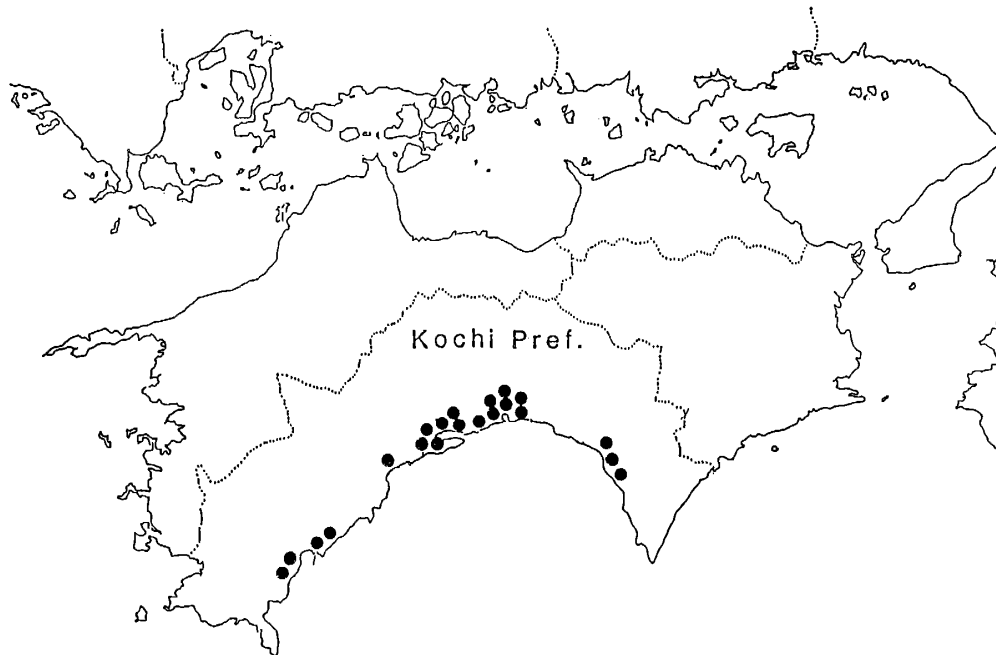


Figure 2 Geographical distribution of diplogonoporiasis within Kochi Prefecture.

た、症例17のようにウルメイワシの酢づけを食べていた事実もある。これら稚魚を含めたイワシ類の回遊と摂食との関連は今後の感染源の調査に興味深い示唆を与える。

一方、最近の高知県のアニサキス症が海岸地帯はもちろんであるが、山間部にも多発していることが報告されている(神崎ら, 1987)。海産魚類の流通機構の進捗状況から考えても、今後、海岸から離れた地域にも本症の発生の可能性があろう。

鈴木(了)ら(1985)は本虫寄生による症状は下痢、腹痛などの消化器症状をあげているが、今回の本条虫の症例もすべて数日前からの下痢があり、下痢便とともに虫体を排出している。

要 約

高知県で大複殖門条虫症の患者8例を追加し、

現在まで130例の患者がわが国で報告されていることを明らかにし、鈴木(了)ら(1985)の報告以降の症例を表に要約した。

謝 辞

症例をまとめるにあたり、各報告者から、詳細な記録など多くの御教示を得た。ここに謹んで謝意を表したい。

本症例のうち、県症例14, 15, 16については第42回日本寄生虫学会西日本支部大会(1986, 西宮)において、県症例17-21(内20, 21は追加発表)については第57回日本寄生虫学会(1988, 名古屋)において、いずれも岡村らにより発表した。なお、県症例14については、植田ら(1985)が別に報告している。

参 考 文 献

- 1) 福本宗嗣(1987): 私信による
- 2) 飯島 魁, 栗本東明(1894): 人体ノ一新条虫(裂頭虫族)ニ就イテ, 東京医学会誌., 9, 367-373, 431-437
- 3) 岩田正俊, 安岡五良(1970): 複殖門条虫の高知県における人体寄生一例, 寄生虫誌., 19, 417-418
- 4) 犬塚宏人, 西田博之, 福田義人, 竹内 稔, 篤永荘司, 中村秀三, 三松永章, 高尾善則(1986): いわしの生食が原因と考えられる大複殖門条虫症の一例, 日消化器病会誌., 84, 172
- 5) 影井 昇(1985): 神奈川県における大複殖門条虫症の第4例目一特に多生殖器保有片節について一, 第45回日本寄生虫学会東日本支部大会講演, 寄生虫誌., 35(補), 23
- 6) Kamo, H., Hatsushika, R. and Yamane, Y. (1971): Diplogonoporiasis and diplogonadic cestodes in Japan, *Yonago Acta Medica*, 15, 234-246
- 7) 金沢 保, 畑 英一, 尾崎隆彦, 藤井 司(1985): 千葉県における大複殖門条虫症の第一例, 第45回日本寄生虫学会東日本支部大会, 寄生虫誌., 35, 23
- 8) 神崎雅樹, 溝淵和久, 井上和男, 沖 勇一, 矢野哲也, 鈴木了司(1987): 山間部地域における胃アニサキス症, 第40回高知県医師会学会講演
- 9) 熊沢秀雄, 鈴木了司, 近藤慶二, 塩見文俊, 田口博国(1981a): 高知県における大複殖門条虫症2例, 寄生虫誌., 30, 113-120
- 10) 熊沢秀雄, 鈴木了司, 大倉俊彦(1981b): 高知県における大複殖門条虫症の第4例, 日熱医会誌., 9, 1-7
- 11) 宮原道明, 前島條士(1985): 福岡県における大複殖門条虫症の1例, 寄生虫誌., 34(増), 108
- 12) 望月 久, 永田 弘, 石黒 満, 大野吉夫, 伊藤二郎(1986): 静岡県における大複殖門条虫症, 予防医学ジャーナル, 209, 26-31: 第20回予防医学技術研究集会抄録集, 74-75
- 13) 森下 薫(1962): 大複殖門条虫, 日本に於ける寄生虫学の研究(森下薫, 小宮義孝, 松林久吉編), 第2巻, 324-346, 目黒寄生虫館, 東京
- 14) 西山利正, 古木純子, 高橋優三, 荒木恒治(1987): ガストログラフィンにて完全駆虫しえた大複殖門条虫症の一例, 第43回日本寄生虫学会西日本支部大会講演, 寄生虫誌., 37(補), 44

- 15) 佐野基人 (1984): 食品寄生虫, 135-139, 1 版, 南山堂, 東京
- 16) Stiles, C.W. and Taylor, L. (1902): 森下 薫 (1962) より引用
- 17) 鈴木佳余, 佐藤和文, 鈴木幸雄, 村岡幹雄 (1985): 当院で始めて検出された大複殖門条虫について, 第24回中部臨床衛生検査学会演題抄録集, 39
- 18) 鈴木了司, 岡村宣典, 熊沢秀雄, 今村京子 (1985): 高知県における大複殖門条虫症, 寄生虫誌, 34, 431-439
- 19) 田中朝雄, 橋 裕司, 金田良雅 (1987): 神奈川県第 5 例目の大複殖門条虫症, 第43回日本寄生虫学会東日本支部大会講演, 寄生虫誌., 37 (補), 17
- 20) 植田庄介, 雑賀光一, 奥宮敏可, 高橋 保, 西田政明, 是沢俊輔, 小川 昌 (1985): 大複殖門条虫の 2 例目の経験, 会報高知, 15 (2), 11-14
- 21) 山本 洋, 満永幹雄, 山本伸郎, 安治敏樹, 石井 明 (1987): 大複殖門条虫の兵庫県における第 1 例, 第43回日本寄生虫学会西日本支部大会講演, 寄生虫誌., 37 (補), 44-45
- 22) 山根洋右, 中川昭生, 阿部顕治, 福島哲仁, 尾崎米厚 (1987): 山陰における最近の医動物学的諸問題, 日本農村医学会誌., 36, 356-367

ADDITIONAL EIGHT CASES OF DIPLOGONOPORIASIS IN KOCHI PREFECTURE

NORIJI SUZUKI, KYOKO IMAMURA, HIDEO KUMAZAWA,
YOSHISUKE OKAMURA AND YOSHIKO NAKAGAWA

Received July 13 1988/Accepted August 30 1988

Thirteen human cases of *Diplogonoporus grandis* infection have already been reported from Kochi Prefecture, and in this report, additional eight cases occurring between 1985 and 1988 are described.

Since the first report on the human infection with *D. grandis* was given by Iijima and Kurimoto (1984) the total 130 human cases were recorded in Japan until 1988.

The cases of human infection with this cestode were distributed widely in the coastal areas along the Pacific Ocean and the Japan Sea in the central and the western parts of Japan. In contrast to other regions, Kochi Prefecture exhibits apparently a marked increase in the incidence of the cases in recent years.

ガストログラフィンによる有鉤条虫症 および無鉤条虫症の治験例

新垣 民樹¹・長谷川英男²・盛島 明浩¹・
池間 稔¹・照喜名重順¹・東恩納 厚¹・
金城 福則¹・斎藤 厚¹・安里 龍二³・
当真 嗣勇⁴

昭和63年7月19日 受付／昭和63年9月8日 受理

はじめに

有鉤条虫および無鉤条虫はヒトを唯一の終宿主とする条虫であり、世界的に広く分布している。しかし、現在の日本では両種条虫の症例は少なく、特に有鉤条虫の症例は極めて稀である。著者らは最近、沖縄県において有鉤条虫症および無鉤条虫症に遭遇し、近年条虫症に対する有効性が知られた消化管造影剤ガストログラフィンによる駆虫を試みた。有鉤条虫症例では本剤によって駆虫が成功し、一方無鉤条虫症例では本剤による駆虫に失敗したが、内視鏡で条虫頭部を確認し除去することができたので報告する。

症 例

症例1. 有鉤条虫症例

39歳女。主婦。沖縄県名護市在住。

戦後中国黒竜江省に居住。昭和62年6月沖縄県に移住。

主 訴: 下腹部痛。

家族歴・既往歴: 特記事項なし。

現 症: 昭和62年7月頃より下腹部痛が出現した。便中に運動性ある白色虫様のものが混入するのに気づき、県立名護病院を受診し、精査治療の目的

で当科へ紹介入院となった。糞便中に排泄された虫体様のものは、本学寄生虫学教室にて有鉤条虫受胎節と同定された。

入院時検査所見: WBC 5,800/mm³ (Eo 8%, Stab 5%, Seg 41%, Ly 32%, Mono 13%, A.Ly 1%), RBC 580×10⁴/mm³, Hb 12.9 g/dl, PLT 35.5×10⁴/mm³, ESR 7 mm/hr, CRP (-), IgE 632 IU/ml, 便潜血 (+), 尿検査異常なし。好酸球と IgE に軽度上昇を認めた。

駆 虫: 昭和62年8月27日、ゾンデを十二指腸下行脚まで挿入し、ガストログラフィンによる駆虫を試みた。X線透視下にてガストログラフィンを50 ml ずつ注入し、体位変換や圧迫を繰り返しながら肛側へ進め、空腸中央部辺りで虫体を確認することができた(図1)。ガストログラフィンを合計400 ml に達するまで注入して、虫体の下降を追跡した。虫体が回盲部に入るのを確認した後、マグコロール250 ml を追加投与した。ガストログラフィン注入の約1時間30分後に、便と共に1条の頭節を有する虫体が排泄された。排泄時、虫体は活発に伸縮運動を行っていた。

駆虫翌日から囊虫症予防の目的で、プラジカンテル1,800 mg/3分/日を3日間投与した。本剤投与による副作用は認められなかった。

昭和62年8月31日退院。現在まで囊虫症の徴候

- 1 琉球大学医学部第一内科学教室
- 2 同 寄生虫学教室 (沖縄県西原町上原207番地)
- 3 沖縄県公害衛生研究所 (沖縄県大里村2085番地)
- 4 沖縄県立名護病院 (沖縄県名護市名護1617番地)

はない。

虫体の処理: 虫体は生食水中で洗った後クロロホルム添加水道水に入れ、4°Cにて4時間放置して弛緩させ、70%エタノールにて固定した。固定後グリセリン・アルコールにて透徹し、観察した。一部の受胎節は子宮内に墨汁を注入した後、常法により脱水・透徹してバルサム封入標本とし、子宮形態の観察に供した。

形態

全形: 虫体は白色紐状で、全長が2.38 m, 総片節数約1,200である。体幅は前端より後方に向かって増大して、虫体の中央部で10 mmに達し、体後部ではやや狭くなり、後端では8.2 mm (図2)。

頭節: 頭節は僅かに膨大し、長さ1.27 mm, 幅1.12 mm (図3)。前端には鈍円錐形の額嘴が突出し、長さ0.14 mm, 基部の幅0.16 mm。額嘴の基部を囲んで、大小各14個の鉤が交互に配列し、直径0.47 mmの環を形成する (図4)。鉤の長さは大きいものが150~153 μ , 小さいもので118~120 μ である。頭節のほぼ中央に4個(背腹各2個)の吸盤を有し、その直径は0.36~0.38 mmであり、虫体前端から吸盤前縁までは、0.54 mmであった。吸盤の後方はやや隆起し、隆起後縁は円く、前端より0.97 mmに達する (図3)。

片節: 頭節直後の片節はやや片節長が大きい、そのすぐ後方では片節長は極めて小さい。以後体後方に向かって片節長は増大し、虫体の前から2/3の位置では6.5 mmになり、最後部では10~12 mmに達する。受胎節は虫体の後1/3を占める。受胎節では生殖腔は片節の中央側面に開き、子宮側枝数は片側で7~10である (図6)。

虫卵 (30個計測): 虫卵 (図5) は短楕円形で、長径45.2~55.9 μ (51.2 \pm 2.3 μ), 短径43.4~53.2 μ (48.2 \pm 2.1 μ) である。卵殻は薄く、容易に脱落する。幼虫被殻は円形ないし短楕円形であり、長径が36.4~41.2 μ (38.7 \pm 1.3 μ), 短径が34.6~38.6 μ (36.0 \pm 0.9 μ) である。壁は厚く、放射状の線条を有する。内部に六鉤幼虫を包蔵する。

これらの形態、特に頭節に鉤を有すること、子宮側枝数が少ないことから有鉤条虫と同定される。虫体の計測値も、有鉤条虫のものにほぼ一致する (Beaver *et al.*, 1984)。

症例2. 無鉤条虫症例

38歳男。建設会社社員。沖縄県佐敷町在住。

昭和59年7月から60年7月までイランでプラント建設に従事。

主訴: 便中への白色の麵類様断片の混入。

家族歴: 特記事項なし。

既往歴: 30歳時、十二指腸潰瘍のため胃の切除手術を受ける。

現症: 昭和60年6月頃より便中に運動性ある白色麵類様のものが混入するのに気付き、それを沖縄県公害衛生研究所衛生動物研究室へ持参して条虫と同定され、当院へ紹介された。持参虫体および入院後に糞便内に排泄された虫体は、本学医学部寄生虫学教室にて無鉤条虫受胎節と確認された。入院時検査所見: WBC 5,500/mm³ (Baso 1%, Eo 8%, Stab 3%, Seg 51%, Ly 31%, Mono 5%, A.Ly 1%), RBC 561 \times 10⁴/mm³, Hb 16.2 g/dl, PLT 28.4 \times 10⁴/mm³, ESR 1 mm/hr, CRP (-), IgE 340 IU/ml, 便潜血 (-), 尿検査異常なし。好酸球の軽度上昇の他は異常所見を認めなかった。

駆虫: 昭和60年7月31日ガストログラフィンによる駆虫を試みた。患者は、十二指腸潰瘍のために Billroth II法の胃切除術を受けていたので、ゾンデを容易に空腸内へ挿入することができた。X線透視下にて、ガストログラフィンを400 ml程空腸上部へ注入したが (図8), 虫体の下降は認められず、下剤投与にても少数の受胎片節が排泄されただけであった。8月1日内視鏡検査を施行し、空腸上部の輸出脚吻合部近くに、頭部を吸着させている虫体を確認することができた (図9)。頭節の吸着部位の腸壁には内視鏡的に出血、肥厚等の著変を認めなかった。附属生検鉗子で頭節の後方を切断し、患者口より虫体頭部を引き出した。その後下剤を投与して残余虫体の排泄を待つが、患者は治療に非協力的で、排便を告げなかったため、虫体を得ることができなかった。患者によれば、

ドンブリー一杯程の量の虫体が排泄されたという。8月31日退院。その後再来はない。虫体の処理: 虫体(前部および受胎節)は生食水中で洗った後クロロホルム添加水道水に入れ、4°Cで4時間放置して弛緩させ、5%ホルマリンにて固定した。固定後グリセリン・アルコールにて透徹し、観察した。一部の受胎片節は子宮内に墨汁を注入した後、常法により脱水・透徹してバルサム封入標本とし、子宮形態の観察に供した。

形態

頭節を含む虫体前部: 生検鉗子で得られたのは、長さ75 mmの頭節を有する虫体前部である。頭節は背腹からはほぼ類円形であるが、頂面から見ると1.25×1.60 mmの長方形で、その四隅に直径0.50~0.55 mmの吸盤を有する(図10)。額嘴および鉤は認められない。頸部は細く、幅0.70 mmである。前端から約5 mmの位置から後方では片節が形成されており、この虫体断片の総片節数は約200個である。また、後端の虫体幅は1.8 mmである。

受胎節: 患者が駆虫以前に排泄した受胎節は、長さ20~22.5 mm、幅7.0~7.5 mm。白色肉厚で、縦走する多数の溝が見られる。生殖腔は片節側面の中央より後方の、片節前縁から17~18 mmの位置に開口する。子宮は多数の側枝を出し、その数は片側で30~34である(図11)。虫卵(20個計測): 虫卵(図7)は短楕円形で、長径58.7~71.4 μ (64.8 \pm 3.8 μ)、短径48.5~63.8 μ (57.8 \pm 4.0 μ)である。卵殻は薄く、往々細い突起を有するが(図7)、容易に脱落する。幼虫被殻は円形ないし短楕円形で、長径35.7~38.3 μ (37.5 \pm 1.0 μ)、短径33.2~35.7 μ (33.5 \pm 0.7 μ)である。壁は厚く、放射状の線条を有する。内部に六鉤幼虫を包蔵する。

これらの形態、特に頭節に鉤を欠くこと、子宮側枝数が多数であることから無鉤条虫と同定される。虫体の計測値も、無鉤条虫のものにほぼ一致する(Beaver *et al.*, 1984)。

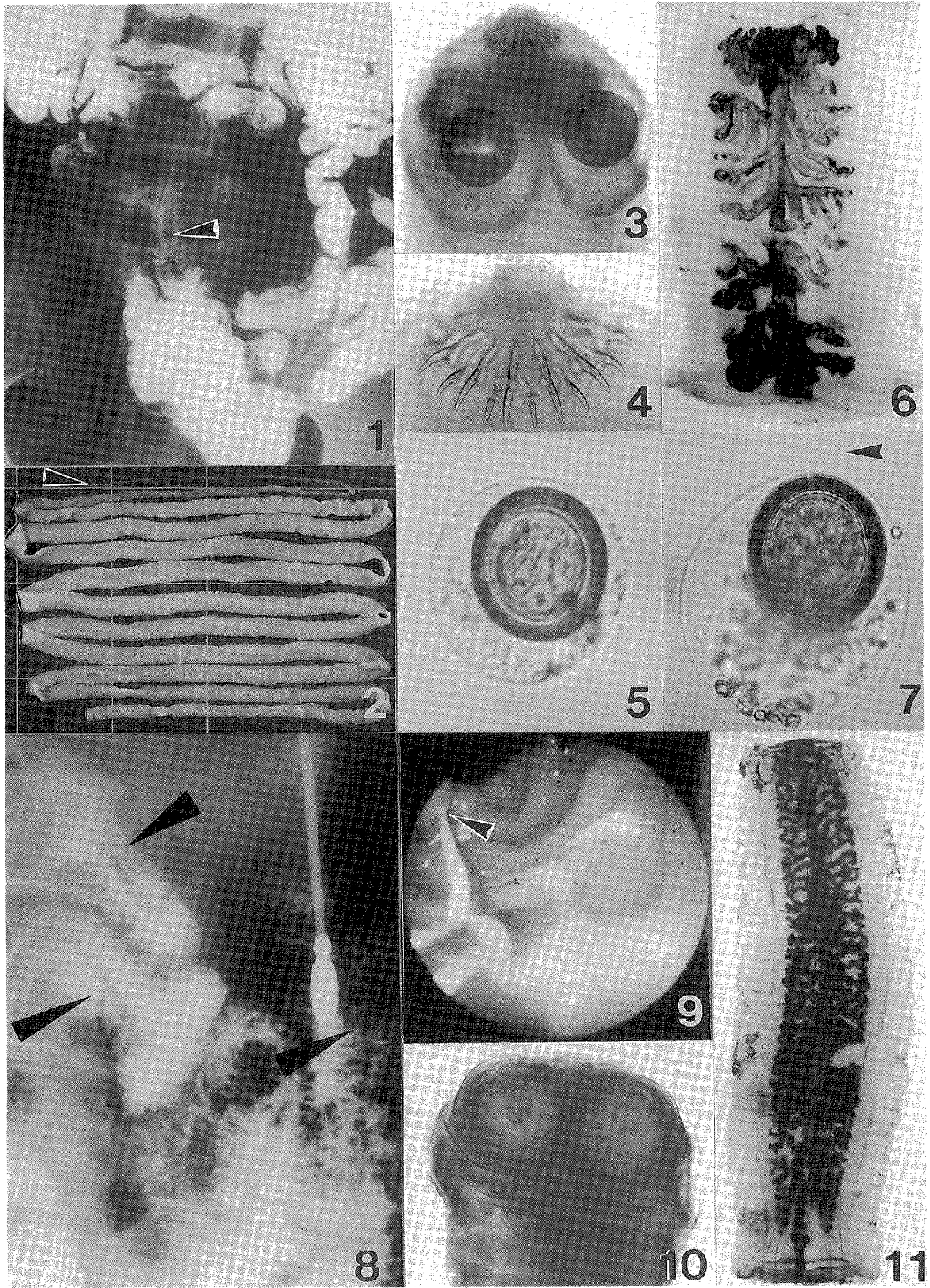
考 察

条虫症の駆虫剤として、これまで種々のものが

用いられてきた。近年では Niclosamide, Bithionol (Bitin), Paromomycin (Aminosidine), Kamala などが使用されている。これらの薬剤は下剤と併用されるが、虫体が破壊されることがあり、特に種の同定に必要な頭部は微小であるため、融解して回収不能のことが少なくない。消化管造影剤ガストログラフィンの十二指腸内注入が条虫の駆虫に有効なことは、Nakabayashiらによっではじめて報告された(Nakabayashi *et al.*, 1984)。本剤による駆虫は、虫体に損傷を与えないこと、X線透視下に虫体下降が追跡できること、副作用が少ないこと等の優れた特徴を有するため、以来無鉤条虫症、広節裂頭条虫症、大複殖門条虫症に用いられてきた(西山, 荒木, 1987; 西山ら, 1988)。しかし著者らの知る限り、有鉤条虫症に試みた報告はなく、本報告はガストログラフィンが有鉤条虫にも駆虫効果を示すことを確かめた最初のものと思われる。

有鉤条虫は人体内で片節から離脱した虫卵が胃に逆流した場合、孵化して自家感染を起こし、人体有鉤囊虫症をひき起こすことが知られている。また患者から排泄された虫卵は経口摂取されれば、直ちに感染して囊虫症を起こす。従って、駆虫に際しては虫体の破壊をもたらさないような駆虫薬の選定、駆虫方法に細心の注意が必要である。今回ガストログラフィンで駆出された有鉤条虫は活発に運動しており、外見的に虫体の破損は認められなかったが、駆虫直後の患者糞便には虫卵がみられたので、ごく一部の片節が破壊された可能性がある。しかしX線透視下では、腸から胃への逆流は認められなかった。従って慎重に用いれば、ガストログラフィンは有鉤条虫の駆虫薬として推奨できるものと考えられる。

なお、今回は囊虫症の予防を目的に駆虫後ブラジカンテル投与を行った。ブラジカンテルは組織内に寄生する吸虫類・条虫類に対して効果があり、有鉤囊虫症にも有効なことが知られている(Groll, 1982)。有鉤囊虫症の薬剤による予防法は確立されていないが、本症の、特に中枢神経系に寄生した場合の重篤性を考慮して、あえてブラジカンテル投与を行ったものである。駆虫後、半年以上を経た現在まで、患者に囊虫症の徴候は認



- Figure 1 *Taenia solium* (arrowhead) revealed in the small intestine by contrast roentgenography in Case 1.
- Figure 2 Total strobila of *Taenia solium* expelled by gastrografin treatment in Case 1. Lines are spaced at 5 cm interval. Arrowhead indicates scolex.
- Figure 3 Scolex. ($\times 36$)
- Figure 4 Rostellum and rostellar hooks. ($\times 80$)
- Figure 5 Egg. ($\times 450$)
- Figure 6 Gravid proglottid. India ink was injected to show uterine branches. ($\times 5$)
- Figure 7 Egg of *Taenia saginata* collected from a gravid proglottid obtained in Case 2. ($\times 450$)
- Figure 8 *Taenia saginata* (arrowheads) revealed in the small intestine by contrast roentgenography in Case 2.
- Figure 9 *Taenia saginata* observed in the upper jejunum by endoscopy.
- Figure 10 Scolex of *Taenia saginata* recovered in Case 2. ($\times 25$)
- Figure 11 Gravid proglottid. India ink was injected to show uterine branches. ($\times 5$)

められていない。今後さらに追跡調査が必要ではあるが、今回の駆虫は成功したと考えられる。

ところで、沖縄県は有鉤条虫の土着地として大正年間より知られていた。これは豚の飼養に、人糞を用いていたためであった。しかし戦後米軍政府による指導等で豚の飼養方法が改善され、1960年代後半からは人における成虫寄生例も豚における有鉤囊虫寄生例も報告されていない。ただし、人体内有鉤囊虫はきわめて長期にわたって残存するために、有鉤囊虫症患者は散発的に見られる(長谷川ら, 1982; 堀川ら, 1984)。今回の患者は戦後中国黒竜江省で生活しており、沖縄へは最近移住してきたこと、中国東北部は有鉤条虫の侵淫地であること、現在の沖縄県に感染源が存在しないとされること等を考慮すると、患者は中国東北部で感染を受けたものと考えられる。なお有鉤条虫成虫は、通常有鉤囊虫を含む豚肉の不完全調理されたものを摂食することによって感染するが、患者は豚肉の摂取を強く否定しているため、感染源は不明である。しかし有鉤囊虫は豚の他、イノシシ、犬、熊などにも寄生するので、これら獣肉の摂取による感染もありうる。

症例2では、頭部を切断除去することによって残余虫体が排泄されたとみることができる。条虫頭部は吸盤等の固着器官を備え、条虫が腸管内で位置を保つための必要不可欠な部分であり、また未発達ではあるが神経中枢があり、全条虫体の運動を統御している。従ってこの部分を除去されれば、虫体は腸管の蠕動運動に流されて排出される

ことになる。今回の患者は胃を切除されており、内視鏡で寄生条虫を直接観察することができたため、このような方法が取りえたのであって、きわめて稀な事例といえる。

ところで無鉤条虫症にはガストログラフィンが有効であることは、これまでの報告でも明らかである(Nakabayashi *et al.*, 1984; 西山, 荒木, 1987; 西山ら, 1988)。今回の症例でガストログラフィン投与が無効であったことの原因は、おそらく十二指腸ゾンデの挿入位置が条虫頭部より肛側に深く入り込み、頭部にガストログラフィンを作用させることができなかつたためと思われる。なおこの患者はイランにて連日のごとく牛肉を食しており、同地で感染を受けたものと考えられる。

要 約

有鉤条虫症および無鉤条虫症に、ガストログラフィンによる治療を試みた。有鉤条虫の寄生をうけた39歳の女性ではガストログラフィンが著効を示し、頭部を有する虫体が駆出された。本例は有鉤条虫症にガストログラフィンが有効であることを示した、最初の症例と考えられる。一方無鉤条虫症の38歳の男性ではガストログラフィンによる駆虫に失敗した。この患者は8年前に胃の切除術を受けていたため、空腸上部が内視鏡によって観察でき、虫体頭節の腸壁への吸着が認められたので、生検鉗子によって頭節を切除回収した。残余虫体は、下剤の投与により排泄された。本例は内

視鏡で空腸内に条虫体を確認し，頭節を除去する ことによって治療した，甚だ稀な症例と思われる。

引用文献

- 1) Beaver, P. C., Jung, R. C. and Cupp, E. W. (1984): Clinical Parasitology, 9th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 825
- 2) Groll, E. W. (1982): Chemotherapy of human cysticercosis with praziquantel. *In: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*, (ed. by A. Fisser *et al.*), 207-218, Academic Press, New York
- 3) 長谷川英男, 佐藤良也, 大鶴正満, 豊永一隆, 松井克明 (1982): 沖縄県で見出された脳内囊虫症の2例, 寄生虫誌., 31, 531-536
- 4) 堀川恭偉, 六川二郎, 宮城航一, 高良英一, 中田宗朝, 金城則雄, 久田 均 (1984): 頭節を確認した脳有鉤囊虫症の一例, 琉大医学誌., 7, 111-117
- 5) Nakabayashi, T., Ono, T., Nakai, T., Waki, K., Takahashi, S., Kitani, T., Oi, H. and Nakamura, H. (1984): A new therapy for *Taenia saginata* and *Diphyllobothrium latum* infections by duodenal administration of gastrografin, *Jpn. J. Parasitol.*, 33, 215-220
- 6) 西山利正, 荒木恒治 (1987): ガストログラフィンを用いて行った条虫症7症例について, 寄生虫誌., 36 (補), 16
- 7) 西山利正, 古木純子, 高橋優三, 荒木恒治 (1988): ガストログラフィンにて完全駆虫しえた大複殖門条虫症の一例, 寄生虫誌., 37 (補), 44

TREATMENT OF *TAENIA SOLIUM* AND *T. SAGINATA* INFECTIONS
WITH GASTOGRAFIN

TAMIKI ARAKAKI¹, HIDEO HASEGAWA², AKIHIRO MORISHIMA¹,
MINORU IKEMA¹, SHIGEYOSHI TERUKINA¹, ATSUSHI HIGASHIONNA¹,
FUKUNORI KINJYO¹, ATSUSHI SAITO¹, RYUJI ASATO³ AND SHIYU TOMA⁴

Received July 19 1988/Accepted September 8 1988

Taenia solium was successfully expelled from a 39-year-old woman by intraduodenal injection of gastrografin. This may be the first reported case of *T. solium* infection cured by gastrografin. On the other hand, gastrografin injection failed to expel *Taenia saginata* from a 38-year-old man, who had received gastrectomy 8 years ago. On this patient an endoscopic observation revealed presence of the worm in the upper jejunum, and the scolex was removed from the worm with biopsy forceps. The remaining part of the worm was expelled by the subsequent administration of a laxative. This may be the first case on which the cestode was observed by endoscopy and the scolex was removed with biopsy forceps.

-
- 1, 2 Department of Internal Medicine¹ and Department of Parasitology², University of the Ryukyus School of Medicine, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-01, Japan
 - 3 Okinawa Prefectural Institute of Public Health, 2085 Ozato, Okinawa 901-012, Japan
 - 4 Okinawa Nago Hospital, 1617 Nago, Okinawa 905, Japan

重症マラリアの QINGHAOSU による治療例

狩野 繁之¹・辻 正周²・細谷純一郎³・鈴木 守¹

昭和63年7月20日 受付／昭和63年11月10日 受理

はじめに

日本人の海外渡航者が年間600万人を越えるようになった現在、世界的なマラリア流行の巻返し現象とあいまって (WHO, 1984), 日本人の輸入マラリアの症例が増加してきている (大友, 1984)。特に、日本の様な非流行地域からの渡航者の初回感染例に、より重症なマラリアは起こりやすく (WHO, 1986), さらにクロロキン耐性マラリア流行地域が世界的に拡散している事実 (Cook, 1988) を考慮に入れると、マラリアに罹患した日本人患者に対する早期の的確な診断・治療に、特別な関心が払われてしかるべきと考える。事実、熱帯熱マラリアの輸入例で、誤診または何らかの理由により適切な治療が遅れた場合、それが重症化する例は必ずしも稀ではない。

我々は、アフリカで感染したと思われる、重症熱帯熱マラリアの輸入例を経験した。この機会をとらえて、特に重症マラリアの治療に優れた効果を発揮する artemether を本症例に適用した。Artemether は、中国において伝統的に抗マラリア作用のある薬草として使用され、1972年にその有効成分が抽出されて構造式も決定された (Bruce-Chwatt, 1981) qinghaosu (QHS, artemisinin) の誘導体である。日本における重症マラリアの QHS による治療例を報告する。

症 例

患者: 28歳, 日本人男性。無職。

現病歴ならびに渡航歴: 1987年9月15日, 成田

発。12月5日までヨーロッパ15カ国を旅行。12月6日, シリア, 10日, ヨルダンと移り, 16日, エジプトに入った。ここよりスーダンとの国境まで, エジプト国内を電車でまわり, 28日, ナイロビ(経由のみ), 29日にタンザニアに入国。タンザニアでは国中をまわり, この国で越年した。1988年1月8日, ザンジバル島へ移動し, 1月15日にはケニアに入った。1月19日から2月12日まで, ザンビアに滞在。首都ルサカからマランバ(リビングストーン)まで移動し, この間蚊に刺された記憶がある。2月12日からナイロビに3日間滞在中, 頭痛, 発熱, 悪寒戦慄が毎日あった。2月14日, 香港に到着。都市部にのみ滞在。この時も, 頭痛, 発熱が続き, バファリンTMと思われる薬を服用した。なお, クロロキン等の抗マラリア薬の予防内服は旅行中行わなかった。2月19日, 羽田に到着。2月20日, 東京の近医を受診し, 抗生物質を投与された。しかし, 21日, 22日にいたっても症状の改善がみられず, 再び同医を受診し, そこから17時15分, 都立荏原病院感染症科にマラリアの疑いで緊急入院となった。

入院時現症: 体格, 栄養とも中等。意識レベルは低下しており, もうろう状態, I度の昏睡と考えられた。眼瞼結膜に貧血があり, さらに, 眼球結膜に中等度の黄疸が認められた。胸部打聴診上, 異常なし。腹部では, 肝2横指触知, 脾は触知されなかった。心窩部圧痛はないが膨満しており, 鼓音, グル音著明で, ガスがしばしば出た。

入院時検査: 表1に示すように, 末梢血では貧血が目立ち, 白血球数は増加していたが, 血小板数は著しく減少していた。血液生化学検査では,

1 群馬大学医学部寄生虫学教室

2 都立荏原病院感染症科

3 都立荏原病院検査科

Table 1 Laboratory findings on admission

1. ESR	18 mm/hr	4. Serum protein	
2. Hematology		T.P.	4.1 g/dl
RBC	$270 \times 10^4 / \text{mm}^3$	A/G	0.7
Hb	7.9 g/dl	Alb	1.7 g/dl
Ht	23.0%	5. Immunoserological test	
WBC	$15,300 / \text{mm}^3$	CRP	12.3 mg/dl
Neut	81.3%	ASO	23 U/ml
Ly	5.7%	RA	10 U/ml
Mono	6.0%	IgG	1,830 mg/dl
Eos	0.3%	IgA	425 mg/dl
Baso	1.2%	IgM	317 mg/dl
Plts	$3.2 \times 10^4 / \text{mm}^3$	6. Hemocoagulation	
3. Blood chemistry		PT	11.8 sec
T. Bil	4.5 mg/dl	APTT	43.6 sec
TTT	10.5 U	Fibrinogen	300 mg/dl
ZTT	11.2 U	FDP	10-20 ug/ml
GOT	67 IU	7. Serological test for syphilis	
GPT	16 IU	TPHA	(-)
LDH	2,117 IU	VDRL	(+)
ALP	165 IU		
T. Chol	42 mg/dl		
CRE	1.6 mg/dl		
BUN	51.5 mg/dl		
AMY	33 IU		
Na	132 mEq/l		
K	5.1 mEq/l		
Cl	99 mEq/l		

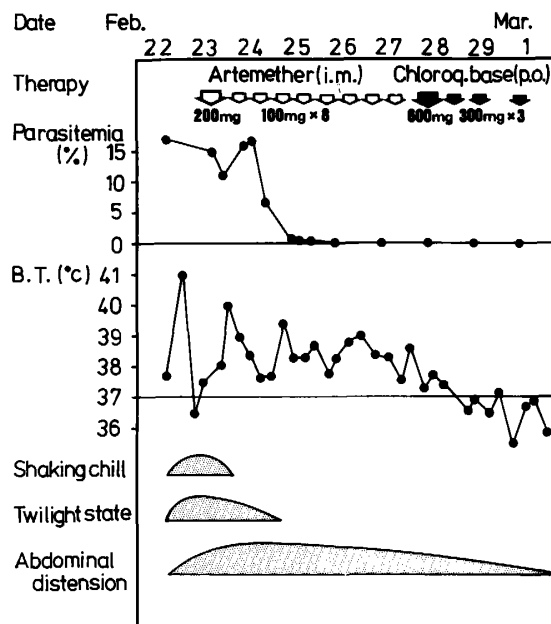


Figure 1 Clinical course of the patient.

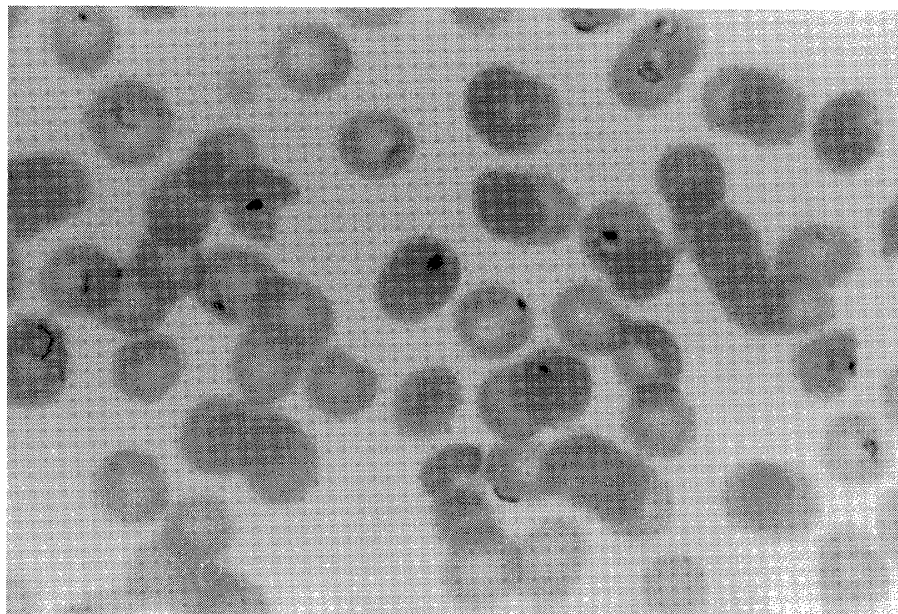


Photo. 1 Asexual *P. falciparum* parasites were observed in the Giemsa stained thin smear on the day of admission. Seventeen % of the erythrocytes were infected. (10×100)

肝機能障害、腎機能障害を強く示唆する所見が認められた。血清梅毒反応は、生物学的偽陽性を示した。腹部エコーでは hepatosplenomegaly があるが、腹水はなく、著明なガス像を認めた。

入院後経過 (図 1): 入院時ただちに末梢血薄層塗抹標本に Giemsa 染色を施して顕微鏡下に観察したところ、写真 1 のように熱帯熱マラリア原虫の輪状体を全赤血球の 17% に認めた。高熱が持続し、夜半には 41°C に達した。悪寒戦慄があったが、頭痛はなかった。しかし、次第に応答が不良になり、脳マラリアの合併が考えられた。Artemether (Kunming Pharmaceutical Factory, Yunnan China) の投与は図 1 のごとく、初回に 200 mg, 12 時間毎に 100 mg ずつ追加し、全量 1,000 mg を 5 日間でいずれも筋肉内注射した。また、治療開始前に患者から採取した血液を Trager ら (1976) による *in vitro* の培養に移し、クロロキン感受性試験を semi-micro technique (Waki *et al.*, 1986) を用いて行ったところ、クロロキン濃度 0.05 nmol/ml において分裂体への発育が 100% 抑制され、この熱帯熱マラリア原虫はクロロキン感受性であることが判明した。よって、artemether による治療後、原虫の再燃を防止

するために、2 月 28 日 chloroquine 製剤の Resochin™ を 600 mg 塩基、6 時間後、翌 29 日、3 月 1 日に各 300 mg 塩基を追加した。なお図 1 のように、2 月 26 日には原虫の消失を末梢血薄層塗抹標本で確認、生殖母体の残存も認めなかった。体温も 29 日には平熱に復した。もうろう状態も、翌 24 日には回復に向い、25 日には意識清明となった。肝機能、腎機能は改善傾向を示し、血小板数は 2 月 29 日には正常値に戻った。3 月 2 日より褐色尿が認められ、貧血はその後 1 カ月以上にわたり改善をみなかった。褐色尿中デルタアミノレブリン酸濃度は 5.1 mg/l と高値を示した。間接蛍光抗体法によるマラリア抗体価は、2 月 23 日に熱帯熱原虫抗原に対し 256 倍、三日熱原虫抗原に対し 64 倍を示し、その後図 2 に示すように変動した。血清学的にも、熱帯熱マラリア原虫の単独感染であると診断された (鈴木, 1985)。

考 察

Artemisia annua は、中国におけるマラリアの治療に十数世紀にわたり用いられてきた伝統的な薬草であるが、1972 年になって、その有効成分

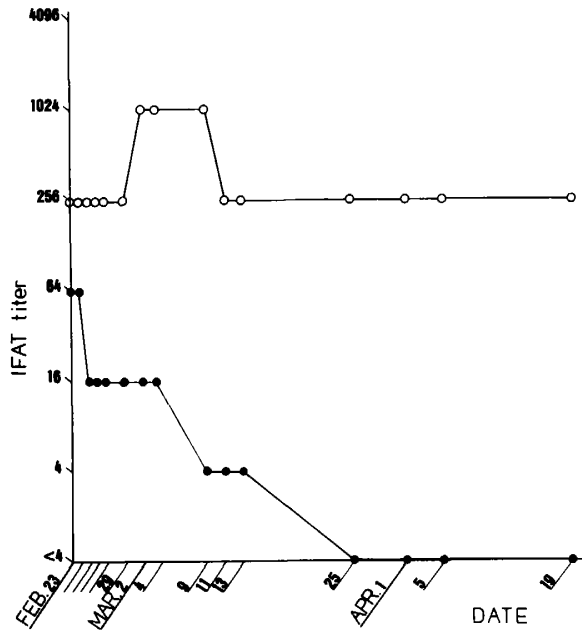


Figure 2 Time courses of IFAT titers to *P. falciparum* (○) and *P. vivax* (●). Titers to *P.f.* persisted at high level whereas titers to *P.v.* lowered rapidly.

QHS が抽出され構造が決められた。今日において200以上の QHS 誘導体が得られているが、その1つの artemether は、抗マラリア薬としての有効性、油溶性、化学的安定性などの点において優れている (Gu,1987)。QHS 誘導体が脳マラリアなどを合併した重症マラリアにおいて、特にその有効性を発揮するため (Howell,1986)、本例への適用を試みた。

熱帯熱マラリアの潜伏期間は通常12日前後といわれ (Cook,1988)、渡航歴、発症日より、本例はザンビアにおいて感染したものと考えられる。発症から10日目の都立荏原病院入院時に、マラリア原虫赤血球寄生率は17%に達し、重症マラリアの定義である5% (WHO,1986) をはるかに上っていた。さらに WHO は、重症マラリアと定義し得る合併症や重症な兆候として、脳マラリア、重症貧血、黄疸、腎不全、高熱、グラム陰性菌の混合感染、肺水腫、低血糖症、ショックや低血圧、出血、嘔吐、ヘモグロビン尿症を程度を示して記載しているが、本例も中枢神経障害の合併、41°C に及ぶ高熱、さらに WHO の定める重症マラリア

の基準に至る障害は認められないものの、貧血、黄疸のほか、腎機能障害も認められるので、重症マラリアと定義づけられる症例であると判断した。また、天野 (1984) は、マラリア重症例の基準として、血小板数5万以下をあげているが、本例においては、3万2千にまで低下している。

脳マラリアを合併した場合、artemether による昏睡からの回復にはおよそ20時間、quinine を使用した場合には、およそ50時間を要するとの報告があり (Klayman,1985)、本例の様に脳症状を伴う場合、特に artemether の速効性が期待される。人において artemether の血中最高濃度は4時間で得られ、消失半減期も4時間と短いことで (Gu,1987)、中枢神経、肝、腎、血液に障害を起こしている本例の場合に有利な条件であると判断した。中国における artemether 適用熱帯熱マラリア308症例の平均原虫消失時間は66時間、平均解熱時間は23時間である (Gu,1987)。本例では、前者が66時間、後者

は124時間と (図1)、解熱は原虫消失に遅れたが、これは重症マラリアでは起こりやすい細菌感染 (WHO,1986) がこの時併発していた可能性も考えなくてはならないが、本例において特にその証明は得られなかった。この間 artemether の投与を続けたため、全量1,000 mg の投与となった。Artemether 投与量は通例、成人において、初回200 mg、12時間毎に100 mg を4回筋注するが、本例においても、図1に示されるように、artemether 600 mg 投与時で原虫血症は回復に至っており、重症マラリアからの脱出には、標準的投与量ですでに効果がでていたと思われる。Gu (1988,私信)により勧められるのは、artemether 第1日160 mg、第2日から5日まで80 mg ずつ4回筋注の治療方法であり、これにより有効な治療効果が得られている。また、全投与量は700 mg を越えない様にすべきとのことである。毒性としては、artemether 1回投与による LD₅₀ はマウスで296 mg/kg、ラットで579 mg/kg (Gu,1987) である。人における著しい副作用は QHS には認められておらず (Bruce-Chwatt, 1981)、心、肝、

腎などに合併症のある例でも安全であると考えられているが、*in vitro*における溶血(Guら, 1986)や、網赤血球減少症(Gu, 1987)が、投与過剰時の副作用として起こりうるとされている。本例では、3月2日より褐色尿が認められ、溶血が示唆された。網赤血球は3月1日の125%をはじめとして高値を示し、貧血に起因するものと考えた。従って、本例の artemether 過剰投与による副作用は軽微であったと思われる。

QHS 誘導体は速効性を示す半面、治療後の再燃率が高いと指摘されている。1カ月後の再燃率は諸家のデータに差はあるが、artemether による場合6.7% (Gu, 1976) から10%代、QHS 錠剤の経口投与による場合は80%以上に達する (Klayman, 1985)。これらの事実から考えて、QHS 誘導体による治療後、即ち急性期の症状、原虫血症の抑制後、さらに別の抗マラリア薬による追加療法を行う必要がある。本例においては、来院時に患者から血液サンプルを採り、すみやかに *in vitro* によるクロロキン薬剤感受性テストを行い、それに感受性であることをあらかじめ確認できたので、artemether 投与後ただちにクロロキンによる追加治療に移行することができた。従って *in vitro* の熱帯熱マラリア原虫薬剤感受性テストは、QHS 誘導体による治療に際しては基準化しておく必要があると考える。

クロロキン耐性マラリア流行地域の世界的な拡散や、近年における熱帯地に赴く日本人の増加に伴い、日本人のクロロキン耐性マラリアによる重症例も報告されだしている (小花ら, 1988)。Artemether をはじめとする QHS 誘導体は、クロロキン感受性マラリアのみならず、耐性マラリアにも有効である (Bruce-Chwatt, 1981) ので、重症マラリアにおいて artemether を第一選択薬とすることの正当性が示唆される。

従来、重症マラリア治療における第一選択薬は主に quinine であった (Bruce-Chwatt, 1985)。

quinine の有効血中濃度は数時間で得られ、半減期も10時間とQHSに比べて長い (Bruce-Chwatt, 1981)。また quinine には cinchonism として一括される副作用、すなわち耳鳴り、嘔気、頭痛、視力障害などが起こり得る。さらに、心臓刺激伝達系の障害や、中枢神経系の障害もあり得る (Meredith *et al.*, 1987)。そのため本例の様に、代謝機能・排泄機能ともに障害をみる例には、使用に際し危険を伴うことが予想される。特に腎機能障害の強い場合は、ヘモグロビン尿や尿閉を誘発しやすく、むしろ quinine は禁忌であるとも思われる。従って本例は、artemether の絶対適用の症例と考えられた。

以上に示すように、artemether は、本邦における重症マラリアの治療において、今後注目されるべき抗マラリア剤と考えられる。

おわりに

ザンビアにおいて感染したと考えられる熱帯熱マラリアで、脳症状、肝機能障害、腎機能障害を合併した重症例を経験した。その治療薬として、中国において開発された QHS の誘導体の1つである artemether による治療を試みた結果、短期日で治癒にいたった。Artemether 投与終了後、クロロキンを追加して再燃を防止した。輸入マラリアの例数も増えるにつれ、重症マラリア、クロロキン耐性マラリアに遭遇する機会も多くなると考えられるので、重症マラリアの新しい治療薬として、今後 artemether の適用例を検討していく必要がある。

謝 辞

本論文作成にあたり、顧 浩明、脇 誠治両博士に助言をいただいたことを付記する。

文 献

- 1) 天野博之(1984): マラリア; その世界分布状況と熱帯熱マラリアにおける血小板減少症について, 病理と臨床, 2, 1062-1067

- 2) Bruce-Chwatt, L.J. (1981): Chemotherapy of Malaria, 2nd ed., WHO monograph series
- 3) Bruce-Chwatt, L.J. (1985): Essential Malariology, 2nd ed., 235-240, William Heinemann Medical Books Ltd., London
- 4) Cook, G.C. (1988): Prevention and treatment of malaria, Lancet, i, 32-37
- 5) Gu, H.M., Warhurst, D.C. and Peters, W. (1986): Hemolysis induced by artemisinin and its derivatives *in vitro*, Acta Pharmacologica, 7(3), 269-272
- 6) Gu, H.M. (1987): A new antimalaria drug, Injectio Artemetheri, unpublished document
- 7) Howells, R.E. (1986): Chemotherapy of malaria, Parasitology Today, 2(2), 41-43
- 8) Klayman, P.L. (1985): *Qinghaosu* (Artemisinin): An antimalarial drug from China, Science, 228, 1049-1055
- 9) Meredith, T.J., Vale, J.A. and Proudfoot, A.T. (1987): Poisoning from Cardiovascular Drugs, Oxford Textbook of Medicine, 2nd ed., 1, 6.31, Oxford University Press
- 10) 大友弘士 (1984): マラリア: わが国における現状と対策, 日熱医学会誌., 12, 101-102
- 11) 小花光夫, 山川 弘, 松岡康夫, 入交昭一郎, 狩野繁之, 脇 誠治, 鈴木 守(1988): Semi-micro technique による *in vitro* 感受性試験でクロロキン耐性を確認したナイジェリアからの熱帯熱マラリアの症例, 感染症学雑誌., (in print)
- 12) 鈴木 守 (1985): 輸入マラリアー間接蛍光抗体法診断を中心に-, 臨床医., 11, 増刊号, 506-509
- 13) Trager, W. and Jensen, J.B. (1976): Human malaria parasites in continuous culture, Science, 193, 673-675
- 14) Waki, S., Tamura, J., Jingu, M., Adachi, M. and Suzuki, M. (1986): A new technique for drug susceptibility tests for *Plasmodium falciparum* by ethidium bromide fluoroassay, Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 80, 47-49
- 15) WHO (1984): World malaria situation 1982, Wkly. Epidem. Rec., 59 (37), 281-288
- 16) WHO (1986): Severe and complicated malaria, Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 80, suppl.

A CASE OF SEVERE MALARIA TREATED WITH QINGHAOSU

SHIGEYUKI KANO¹, MASACHIKA TSUJI²,
JUNICHIRO HOSOYA³ AND MAMORU SUZUKI¹

Received July 20 1988/Accepted November 10 1988

Chemotherapy by artemether, which was one of the qinghaosu (QHS, artemisinin) derivatives, was attempted in a case of severe falciparum malaria.

A Japanese 28 years old male, after making round trip in Africa, started fever attack one week before coming back to Tokyo. On the day of admission, he developed fever at 41°C, and asexual forms of *P. falciparum* were observed in the peripheral blood of the patient at a density of 17% of erythrocytes. His consciousness was turbid; cerebral malaria was suspected. Liver was palpable by two finger breadth but spleen was not palpable. Slight jaundice was observed. On the laboratory findings, anemia was remarked and a considerable degree of dysfunction of liver and kidney was also noted. By *in vitro* chloroquine susceptibility test, the isolate showed no resistance to chloroquine.

Quinine has been used as the drug of first choice to treat severe malaria. However we considered artemether is the antimalarial of higher priority than quinine especially in the treatment of patients with dysfunctions of liver, kidney and CNS, because side effects by quinine occasionally involve those organs. In addition, the half-life of quinine in the blood is 2.5 times as long as that of artemether, which again might endanger such patients. While artemether is documented to be remarkably well tolerated in man and also appears to be safe in the cases complicated by heart, liver, and renal disorders, because of the short half-life and rapid action of the derivative.

Two hundred milligram of artemether was administered on first dose intramuscularly followed by 100 mg/dose at intervals of 12 hours to the amount totaling 1,000 mg. The asexual stage parasites from blood films were eliminated in 66 hours after starting treatment, therefore, the patient already recovered from severity when administered artemether amounted to 600 mg which is the standard total dosage. When the clinical signs were away, the patient was supplemented by chloroquine administration, because recrudescence rate of artemether within one month is recorded higher than 10 per cent.

Most Japanese are non-immuners to malaria, hence tend to develop severe malaria if treatments delay. Artemether seems to be a promising new antimalarial with high potentiality to cure such patients.

1 Department of Parasitology, Gunma University School of Medicine

2 Department of Infectious Disease, Tokyo Metropolitan Ebara General Hospital

3 Department of Clinical Laboratory, Tokyo Metropolitan Ebara General Hospital

マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) 感染マウス赤血球膜画分からアミノペプチダーゼの抽出精製

井上 文英¹・松山 玲子²・佐藤 良也³

昭和63年8月11日 受付/昭和63年11月18日 受理

はじめに

マラリア原虫が宿主赤血球内で成長していく上で、マラリア原虫が赤血球内のヘモグロビン分子をアミノ酸源として利用する、との報告がある (Sherman, 1979; 田辺, 1983)。この場合、原虫がヘモグロビンを利用する過程には、まずエンドペプチダーゼでヘモグロビン分子のポリペプチド鎖の限定分解を行い、続いて分解産物に対してエキソペプチダーゼが働き、アミノ酸レベルまで分解がすすんで原虫内に取り込まれ、アミノ酸源として利用される場合と、各ペプチダーゼの分解産物を直接原虫内に取り込んで利用するという、2つの過程が考えられる。マラリア原虫内のエンドペプチダーゼとしては、酸性プロテアーゼが報告されている (Levy and Chou 1973, 1974; Levy *et al.*, 1974; Chan and Lee, 1974; Cook *et al.*, 1961)。しかし、この酸性プロテアーゼのヘモグロビンに対する反応のメカニズムは明確ではない。

我々は、マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) 由来のエキソペプチダーゼの1種であるアミノペプチダーゼ (EC-3.4.11) を、原虫に感染した BALB/c マウス赤血球の膜から抽出し、その2, 3の物理化学的性質を調べたので報告する。

実験材料および方法

マラリア原虫に感染したマウス赤血球膜の調製: マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*, NK-65

株) に感染した赤血球を BALB/c 系マウス, 雄, 8週齢に1匹当たり 5×10^6 個を腹腔内へ投与してマラリアに感染させた。マラリア原虫に感染した血液は、マウス尾静脈より採血して塗抹標本を作り、ギムザ染色で感染率が80%以上になった時点 (腹腔内投与後5日) で、エーテル麻酔をかけて心臓よりヘパリン添加 (10単位/ml 血液) で採血した。採血後、低速遠心してバッフィーコートと血漿画分を除去した。混在する白血球および血小板は、SE-セルロースカラムクロマトグラフで十分に除去した。マラリア原虫に感染した赤血球からの膜画分の調製は、Fairbanks らの方法 (Fairbanks *et al.*, 1971) に準じて調製した (井上ら, 1985)。

マラリア原虫感染赤血球膜から酵素の抽出: 赤血球膜1容に対して10容の50 mM NaCl-50 mM Tris-HCl (pH 7.4) - 6 mM MgCl₂ を加えて平衡化して、更に終濃度が1.0% (v/v) になるように Triton X-100 を加えた。この膜懸濁液をポッター型ホモジナイザーで2°C, 5分間ホモジナイズし、次いで超音波処理を2°Cで40ワット, 1分間ソニファイヤーII (ブランソン) で行った。ホモジナイズを2°C, 9,000×gで10分間遠心した。沈渣は再度同一緩衝液を加えて、再抽出操作を2回繰り返して上清を集めた。上清はアミコンのダイアフローメンブランフィルタ XM-50で、ダイアフローセル 8 MC を用いて0.1 M NaCl-10 mM Tris-HCl (pH 7.4) に対して透析した後、約10倍に濃縮した。

- 1 琉球大学医学部第一生化学講座
- 2 医学部 RI 実験施設
- 3 寄生虫学講座

セファデックス G-100 カラムクロマトグラフィー: 0.1 M NaCl-10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化したセファデックス G-100 カラム (3.5×98 cm) にのせ、同一緩衝液で1時間当たり 20 ml の流速でゲル濾過を行い、1本当たり 10 ml ずつ分画採取した。カラムの void volume はブルーデキストラン 2,000 を用いて調べた。蛋白質の溶出状態は、ファルマシアのシングルパスモニター UV-1 を用いて OD_{280 nm} の吸光度をモニターした。酵素活性は Ala-pNA を用いて調べた。酵素活性の高い分画を集めてメンブランフィルタ XM-50 で 5 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0, 5p8) に対して透析した後、約 10 倍に濃縮した。各分画の蛋白質濃度は日立分光光度計 101 を用いて OD_{280 nm} の吸光度を測った。

酵素活性測定法: 酵素 (アミノペプチダーゼ) 活性の測定には合成基質を用いた。用いた合成基質は L-Alanine-p-nitroanilide (Ala-pNA), L-Leucine-p-nitroanilide (Leu-pNA) それに s-benzyl-L-Cystein-p-nitroanilide (Cys-pNA) を用いた。この場合は、可視領域の 405 nm の吸光度の増加を分子吸光係数 $\epsilon_{405\text{nm}} = 9620 \text{ M}^{-1}$ を用いて活性を示した (Pfleiderer, 1970)。以下の実験の基質には、特に断わらない限り Ala-pNA を用いた。酵素反応は、50 mM リン酸緩衝液、1 mM 合成基質、それと酵素溶液を加えて全量を 1.5 ml として 37°C で 30 分または 60 分間反応させた。所定の反応時間後、反応溶液の 405 nm の吸光度の変化を測った。対照は酵素溶液の代わりに蒸留水を加えたものを用いた。蛋白質濃度は牛血清アルブミン (シグマ、フラクション V, BSA) を標準蛋白質としてバイオラッドの Protein Assay を用いて測定した。

DEAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィー: 5p8 で平衡化した DEAE-セファデックス A-25 カラム (1.5×3 cm) に約 1 ml に濃縮した試料をのせた。溶出は先ず、DEAE に吸着しない分画を 100 ml の 5p8 で洗いだし、次いで NaCl の直線濃度勾配をかけて溶出させた。分画は 1本当たり約 1 ml ずつ分取した。流速は 30 ml/hr で溶出させた。酵素活性を含む分画を集めてメンブランフィルタ XM-50 で 5p8 に透析した

後、濃縮した。

等電点電気泳動: 泳動用ゲルは LKB アンフォライン PAG plate (pH 3.5—9.5) を用いた。電極液は陽極側は 1 M H₃PO₄ を、陰極側には 1 M NaOH を用いた。泳動は LKB マルチフォー II 水平型電気泳動装置を用いて 2°C で 600 volt, 6 時間通電して、pH マーカー (LKB, pI マーカー, pI=4.7—10.6) の移動度を目安にして pH 微小表面電極により直接ゲルの pH を読み取った。測定後、ゲルは 5 mm 幅に切り出して、Ala-pNA を基質にして 37°C, 60 分間反応させて酵素活性から pI を求めた。対照は試料を添加していない部分を切り出して、試料と同様に 37°C で反応させた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動: ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、Laemmli の系 (Laemmli, 1970) から SDS を除いた 10% アクリルアミド濃度で泳動した。酵素活性の測定は、等電点電気泳動の場合と同様な方法で測った。

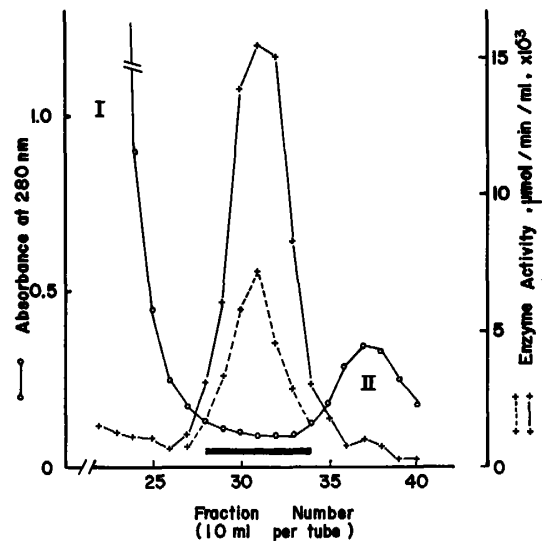


Figure 1 Gel filtration of Triton X-100 soluble fraction on Sephadex G-100

○—○ optical density of eluate at 280 nm

+---+ enzyme activity (substrate, Cys-pNA)

+--+ enzyme activity (substrate, Ala-pNA)

Fractions 28-34 were pooled.

実験結果

図1はマラリア原虫に感染したマウス赤血球膜の Triton X-100で可溶化した分画を、セファデックスG-100カラムクロマトグラフのOD_{280nm}による溶出曲線を示した。紫外部280 nmの抽出曲線には4つのピークが現れた。このカラム(3.5×98 cm)の void volume はブルーデキストラン2,000で、21番目と22番目(第1ピーク)であった。この溶出液の酵素活性はAla-pNAを基質にして測定すると図のように第1ピーク(I)と第2ピーク(II)の谷の部分(28-34番)に活性を認めた。また、酵素反応の基質をAla-pNAのかわりにCys-pNAを用いて酵素活性を測定すると、Ala-pNAと同じ様な傾向の溶出曲線を示した。

次に、ゲル濾過で酵素活性の示したピーク部分(28-34)をアミコン8 MCセルを用いてメンブ

ランフィルターXM50で5 mMリン酸緩衝液(pH8.0, 5p8)で透析した後、約3 mlまで濃縮した。この酵素活性を含むピークを、DEAE-セファデックスA-25(1.5×10 cm)でNaCl濃度を直線濃度勾配(0-2.0 M)で溶出すると、図2の溶出曲線が得られた。

酵素活性を含む8番から13番目までを集めて5 p8に対して透析し、メンブランフィルターXM50で約1 mlまで濃縮した。本酵素活性を含む分画は、以下の実験の部分精製酵素として用いた。

本酵素の各種合成基質を用いて酵素活性を調べるとAla-pNAを100%とした場合、Leu-pNAでは48%であり、Cys-pNAでは42%であった。以後の酵素活性の測定には、断わらない限り、基質としてはAla-pNAを用いた。

本酵素の分子量の算出はセファデックスG-100カラム(1.5×90 cm)によるゲル濾過法を用いた。ゲルは0.1 M NaCl-10 mM Tris-HCl, pH 7.4で平衡化した。標準蛋白質としてベーリンガー

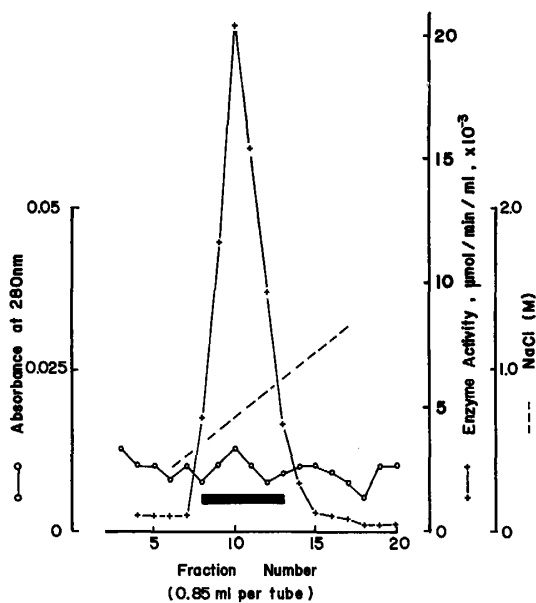


Figure 2 DEAE-Sephadex A-25 chromatography of pooled fraction (Fig. 1) with an elution gradient 0 to 2.0 M NaCl
○—○ optical density of eluate at 280 nm
+—+ aminopeptidase activity
Fractions 8-13 were pooled.

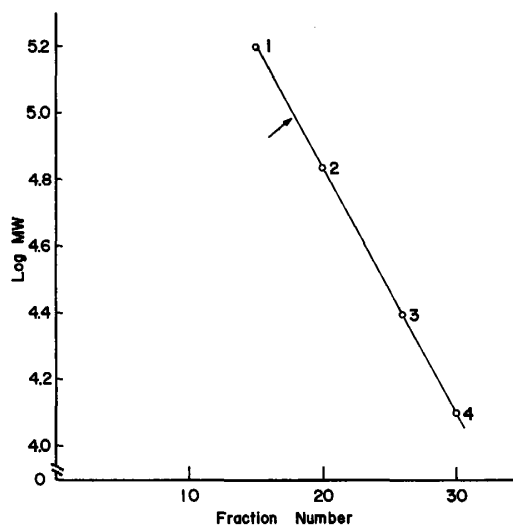


Figure 3 Determination of molecular weight of aminopeptidase by gel filtration on Sephadex G-100. Samples of 1 ml were applied to the column, and the flow rate were maintained at 10 ml/hr at 4°C.

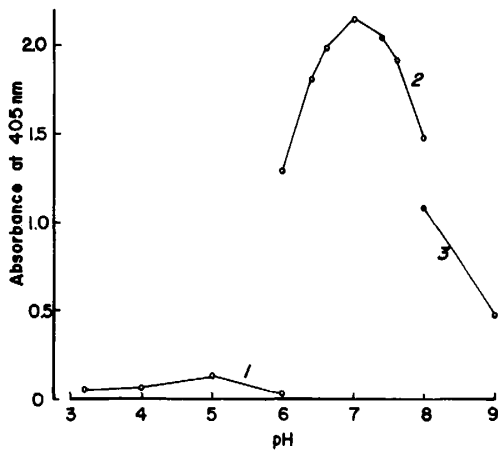


Figure 4 Effect of pH on enzyme activity. The buffer (0.1 M) used were sodium acetate, pH 3.4, 4.0, 5.0 and 6.0, sodium phosphate, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0, Tris-HCl, pH 8.0 and 9.0.

のウサギ筋肉アルドラーゼ (分子量158,000), ウシ血清アルブミン(68,000), キモトリプシノーゲンA (25,000) とチトクロームC (12,500) を用いた。溶出は1本当たり5 mlで行った。その結果, 本酵素の分子量は約100,000であった (図3)。

本酵素活性の pH 効果を図4に示した。酵素反応液には3種類の pH 範囲の緩衝液を用いた。それらは, 1. 酢酸緩衝液 (pH 3.4—6.0), 2. リ

Table 1 Effects of divalent ion on the activity of aminopeptidase

Divalent ion ^{a)}		%Activity ^{b)}
Mg ²⁺	1 mM	100
Co ²⁺	1 mM	72
Cu ²⁺	1 mM	140
Mn ²⁺	1 mM	120
Zn ²⁺	1 mM	96
Hg ²⁺	1 mM	12
Ca ²⁺	1 mM	88

a) Treatment with reagent was generally for 10 min, after which the activity determined.

b) Activity assayed using 1 mM Ala-pNA, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0.

ン酸緩衝液 (pH 6.0—8.0), それに 3. Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0—9.0) であった。本酵素の至適 pH は 7.0 であった。他の合成基質 (Leu-pNA および Cys-pNA) を用いた場合も, 同じ至適 pH であった。本酵素の Km 値 (Michaelis 定数) は Ala-pNA を基質のときは, Lineweaver-Burk プロットから 0.12 mM であった。

本酵素の 2 価金属イオンの影響 (終濃度が 1 mM での反応系) について, 2 回実験を行い, その平均値を表 1 に示した。測定結果は 2 価金属イオンを加えないときを 100% とした場合を基準にして表示した。Mg²⁺, Zn²⁺ は本酵素活性には影響を与えなかった。Cu²⁺ と Mn²⁺ は, 本酵素活性を促進する傾向を示した。本酵素活性を阻害したのは Hg²⁺ で, その阻害度は約 90% であった。Co²⁺ も約 30% 阻害したが, Ca²⁺ では 10% 位の阻害しかかからなかった。

終濃度 0.1 mM の反応系でメタロプロテアーゼインヒビターの o-phenanthroline と EDTA, チオールプロテアーゼインヒビターの monoiodoacetate と N-ethylmaleimide は, 本酵素活性には影響を与えなかった。しかし, チオールプロテアーゼインヒビターの PCMB (p-chloromercuribenzoic acid) は本酵素活性を 50% 阻害した。エンドプロテアーゼインヒビターの Bestatin は, 90% 以上の反応を阻害した。セリン, チオールプ

Table 2 Inhibition of aminopeptidase of *P. berghei*

Inhibitors	%Inhibition
o-phenanthroline, 0.1 mM	10
EDTA, 0.1 mM	6
monoiodoacetic acid, 0.1 mM	4
N-ethylmaleimide, 0.1 mM	0
p-chloromercuribenzoic acid, 0.1 mM	48
pepstatin, 0.1 mM	0
leupeptin, 0.1 mM	0
antipain, 0.1 mM	0
chymostatin, 0.1 mM	50
bestatin, 0.1 mM	90
phosphoramidon, 0.1 mM	20
E64, 0.1 mM	25

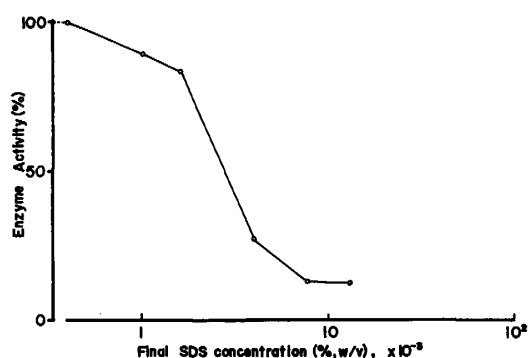


Figure 5 Effect of sodium dodecylsulfate on enzyme activity of aminopeptidase.

ロテアーゼインヒビターの Chymostatin, チオールプロテアーゼインヒビターの E64, メタロプロテアーゼ, セリンプロテアーゼおよびチオールプロテアーゼインヒビターの Phosphoramidon についてはおのおの50%, 25%, 20%ずつ反応を阻害した。しかし, カルボキシルペプチダーゼインヒビターの Pepstatin A, セリン, チオールプロテアーゼインヒビターの Leupeptin, それにチオールプロテアーゼインヒビターの Antipain は, 本酵素活性には全く阻害効果を認めなかった (表 2)。

酵素反応における各種ドデシル硫酸ナトリウム濃度における酵素活性の影響については, 図 5 に示した。図は片対数で表示した。本酵素活性は 3×10^{-3} %, w/v の SDS 濃度で酵素活性を約 1/2 に減少させる。

本酵素の単一性については, SDS の存在しない Laemmli の系で 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その結果, 本酵素では単一なバンドであった (図 6)。

一方, 本酵素の等電点を LKB アンフォライン PAG の電気泳動法で行った結果, pI は 7.25 であった。

考 察

マラリア原虫からの酵素の抽出に関して, 1980 年に Charet らが *Plasmodium yoelii nigeriensis* と *P. chabaudi* のアミノペプチダーゼの物理

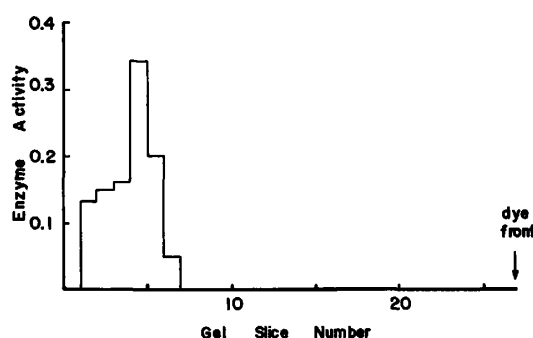


Figure 6 Enzyme activity profile of aminopeptidase after disc electrophoresis on 10% polyacrylamide. After electrophoresis, two parallel gels were sliced into 5-mm segment and enzyme activity as described under Materials and Methods.

化学的性質を比較している (Charet *et al.*, 1980)。一方, 1984年に Jagt らは *P. falciparum* (FCB strain) を RPMI1640 メジウムでヒト赤血球を用いて培養した。このマラリア原虫に感染した赤血球を超音波処理して, その上澄みから HPLC によるゲル濾過 (TSK Gel 3000 SW) とイオン交換クロマト (LKB UltroPac TSK 535CM) で部分精製した (Jagt *et al.*, 1984)。

マラリア原虫が宿主動物の血液循環中で成長していく過程で, 原虫は赤血球を宿主として, 赤血球内に侵入する。マラリア原虫が赤血球内で増殖するためには, 赤血球内のヘモグロビンを取り込みそれを主なアミノ酸源にして成長している (Sherman, 1979)。しかし, 成長に必要なアミノ酸源が全て宿主のヘモグロビン分子で賄われることはなく, 赤血球膜を通じて外部からアミノ酸を取り込んでいるとも考えられている。(田辺, 1983)。

我々はマラリア原虫 (*P. berghei*) が赤血球内で増殖していく過程で, 必要とする蛋白質分解酵素のアミノペプチダーゼを抽出して部分精製し, その性質を他のマラリア原虫の酵素と比較した。

個々に抽出された酵素の分子量は 10 万で, すでに報告されている *P. falciparum* のそれと同じ値を示した (Jagt *et al.*, 1984)。しかし, Charet らが *P. yoelii* と *P. chabaudi* からのアミノペプチ

ダーゼを抽出したもので分子量が両方とも9万であった。(Charet *et al.*, 1980)。これらの分子量の算出法は Sephadex G-100ゲル濾過法であり、分子量的にはこれらの間には有意の差は認められない。

本酵素が網状赤血球に由来しているかどうかを知るために、phenyl hydrazine をマウスに腹腔内投与して網状赤血球を増殖させ、この網状赤血球からの本酵素の抽出法で抽出したが、酵素活性は認められなかったため、網状赤血球に由来しているとのことは否定された。

本酵素の等電点は *P. berghei* では7.25であったが、*P. chabaudi* では4種類の pI=5.5, 5.6, 5.7および5.85を持っており、*P. yoelii* は5.2および5.4、*P. falciparum* は6.8で非常に幅広い値を持っていることを示している。(Charet *et al.*, 1980; Jagt *et al.*, 1984)。

本酵素の Km 値を Lineweaver-Burk プロットから得た値は、Ala-pNA を基質にしたとき 0.12 mM であった。この Km 値を他のマラリア原虫からのものと比較すると、*P. falciparum* > *P. chabaudi* > *P. berghei* > *P. yoelii* の順であった。一番小さい値は *P. yoelii* の 1.4 nM であった。

阻害剤については、*P. yoelii* と *P. chabaudi* では phenanthroline がよく反応を阻害するのに対して、*P. berghei* と *P. falciparum* では bestatin

がよく作用した。更に、chymostatin が *P. berghei* に、phosphoramidone は *P. falciparum* に僅かに作用した。*P. yoelii* と *P. chabaudi* では EDT-A が僅かに作用した。

また、本酵素は Hg^{2+} と PCMB で阻害を受けることから、本酵素活性には少なくとも1個の SH 基が存在することを示唆している。

一方2価金属イオンの影響は、*P. berghei* 以外は Zn^{2+} が阻害することが示された。しかし、 Co^{2+} は全酵素について僅かに作用した。

SH 阻害剤の PCMB については、*P. falciparum* のみは不明で他の種では阻害を受け、 Hg^{2+} は全てに対して作用することが判った。

本酵素の安定性は 4°C で5日間で、初めの酵素活性の約半分まで減少した。他のマラリア原虫から抽出した酵素よりは安定であった。

宿主の赤血球からマラリア原虫を遊離する方法として、マラリア原虫に感染した赤血球浮遊液を 0.747% NH_4Cl -0.017 M Tris-HCl, pH 7.65 で処理することが報告されている (Martin *et al.*, 1971)。この方法で原虫を単離させ、本酵素の抽出を試みたが、本酵素の活性は認められなかった。

本酵素が赤血球膜調整画分から抽出されたことは、原虫に由来する本酵素が赤血球膜と何らかの形で関与していることを示唆する事実であろうと考えられる。

文 献

- 1) Chan, V.L. and Lee, P.Y. (1974): Research notes: Host-cell specific proteolytic enzymes in *Plasmodium berghei* infected erythrocytes, Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health., 5, 447-449
- 2) Charet, P., Assis, E., Maurois, P., Bouquet, S. and Biguet, J. (1980): Aminopeptidase in rodent *Plasmodium*, Comp. Biochem. Biophys., 65B, 519-524
- 3) Cook, L., Grant, P.T. and Kermack, W.O. (1961): Proteolytic enzymes of the erythrocytic forms of rodent and simian species of malarial plasmodia, Exp. Parasitol., 11, 372-379
- 4) Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F.H. (1971): Electrophoretic analysis of major polypeptides of the human erythrocyte membrane, Biochemistry, 10, 2606-2617
- 5) 井上文英, 佐藤良也, 中田福市, 大鶴正満 (1985): マラリア原虫感染マウス赤血球の膜タンパク質 I. 膜タンパク質の変動とリン酸化, 日本熱帯医学会雑誌, 13, 111-117
- 6) Jagt, D.L.V., Baack, B.R. and Hunsaker, L.A. (1984): Purification and characterization of an aminopeptidase from *Plasmodium falciparum*, Mol. Biochem. Parasitol., 10, 45-54
- 7) Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685
- 8) Levy, M.R. and Chou, S.C. (1973): Activity and some properties of an acid proteinase from

- normal and *Plasmodium berghei*-infected red cell, J. Parasitol., 59, 1064-1070
- 9) Levy, M.R. and Chou, S.C. (1974): Some properties and susceptibility to inhibitors of partially purified acid proteases from *Plasmodium berghei* and from ghosts of mouse red cells, Biochem. Biophys. Acta, 334, 423-430
 - 10) Levy, M.R., Siddiqui, W.A. and Chou, S.C. (1974): Acid protease activity in *Plasmodium falciparum* and *P. knowlesi* and ghosts of their respective host red cells, Nature 247, 546-549
 - 11) Martin, W.J., Finerty, J. and Rosenthal, A. (1971): Isolation of *Plasmodium berghei* (malaria) parasites by ammonium chloride lysis of infected erythrocytes, Nature (new biology), 233, 260-261
 - 12) Pfeleiderer, G. (1970): Particle-bound aminopeptidase from pig kidney, Methods in Enzymology 19, 514-521
 - 13) Sherman, I. W. (1979): Biochemistry of plasmodium (malarial parasites), Microbiol. Rev., 43, 453-495
 - 14) 田辺和祐 (1983): マラリア感染赤血球の膜病理生物学, 蛋白質核酸酵素, 28, 103-117

ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF AMINOPEPTIDASE FROM
PLASMODIUM BERGHEI INFECTED MICE ERYTHROCYTES

FUMIHIDE INOUE¹, REIKO MATSUYAMA² AND YOSHIYA SATO³

Received August 11 1988/Accepted November 18 1988

An aminopeptidase has been purified from membrane ghosts of mouse erythrocyte infected with *Plasmodium berghei* (NK-65 strain) by a simple method involving selective extraction with 1.0% Triton X-100, and chromatography on Sephadex G-100 and DEAE-Sephadex A-25. An enzyme activity is assayable conveniently with Ala-pNA or Leu-pNA as substrate at 405 nm.

1. This enzyme has a molecular weight of 100,000 as measured by gel filtration on Sephadex G-100.
2. The enzyme is inhibited by bestatin and chymostatin, and slightly inhibited by E64 but not by pepstatin A, leupeptin and antipain.
3. The enzyme has an essential sulfhydryl group at the active site which is rapidly modified by Hg²⁺, and slowly by PCMB, but is unaffected by monoiodoacetic acid and N-ethyl-maleimide.

Department of Biochemistry¹, Medical Radioisotope Institute² and Department of Parasitology³,
University of the Ryukyus School of Medicine, Nishihara-cho, Okinawa 903-01, Japan

Leishmania donovani ならびに *Trypanosoma gambiense* 感染マウスに対する inosine analog の薬物効果について

森重 和久¹・安治 敏樹¹・木村 Julieta Y.・石井 明¹・
綿矢 有佑²・松田 彰³・上田 亨³

昭和63年7月25日 受付/昭和63年11月10日 受理

緒 言

Leishmania donovani 感染症 (Kala Azar 病) は今でも世界の熱帯、亜熱帯の各地で、蔓延しているが、治療薬としてアンチモン剤に勝るものがほとんどみられない。また *Trypanosoma gambiense* 感染症 (睡眠病) はアフリカ中央部から西部が分布域であるが、これも治療薬としては Pentamidine, その他砒素剤が用いられている (Harrison, 1984; WHO, 1984) が、より毒性の少ない殺原虫率の高いものを考えていく必要にせまられている (Croft, 1986)。

Leishmania の核酸代謝は宿主とは異なり、プリンヌクレオシドの新生合成が欠損しており、そのために寄生原虫はサルベージ経路により、宿主からプリン類の供給を受けている (Marr and Barends, 1985)。そこに着目し、Hiraoka *et al.* (1986), Wataya and Hiraoka (1984), 綿矢ら (1986) は *in vitro* において 3'-deoxyinosine, および carbocyclic inosine (c-c-inosine) が *Leishmania donovani* の promastigote または amastigote に対し毒性効果を持ち、また c-c-inosine は *Crithidia fasciculata* に対しても有効であると報告した。Marr *et al.* (1984), Fish *et al.* (1985) も *in vitro* において inosine analog のうちのいくつかは *L. donovani*, *T. gambiense*

のいずれにも有効だったと述べている。

我々は *L. donovani* 感染マウスおよび *T. gambiense* 感染マウスを用いて、3'-deoxyinosine と c-c-inosine の *in vivo* での治療効果を検討したので、その概要を報告する。

材料および方法

1) *Leishmania donovani* に対する効果

L. donovani 治療実験は3回行った。実験動物は BALB/c マウス, 8週齢, ♀, 23-28 g (Charles Rivers 社) で、random allocation によってグループ分けをした。

実験1: マウスは control 群6匹, 生理的食塩

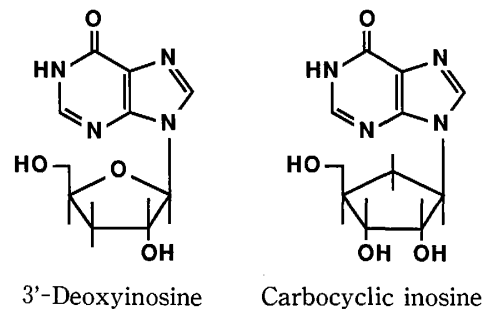


Figure 1 Chemical constitution of 3'-deoxyinosine and carbocyclic inosine.

1 岡山大学医学部寄生虫学教室 〒700 岡山市鹿田町2-5-1

2 岡山大学薬学部薬品化学教室 〒700 岡山市津島中1-1-1

3 北海道大学薬学部薬品化学教室 〒060 札幌市北12条6丁目

本論文の要旨は第29回日本熱帯医学会総会, 横浜 (1987) において発表した。

水投与群 6 匹, 3'-deoxyinosine(ヤマサ醤油株式会社より供与)(図 1) 投与群 6 匹, Pentostam (100 mg/ml, Wellcome Foundation, U. K.) 投与群 6 匹の 4 群に分けた。

実験 2: マウスは control 群 5 匹, 生理的食塩水投与群 4 匹, 3'-deoxyinosine 投与群 5 匹, c-c- inosine(ラセミ体, 東洋醸造株式会社より供与)投与群 5 匹, Pentostam 投与群 5 匹の 5 群に分けた。実験 1, 2 の薬物投与量と投与法は生理的食塩水 0.2 ml/マウス, 3'-deoxyinosine 100 mg/kg, c-c- inosine 100 mg/kg, Pentostam 400 mg/kg とし, control 群以外の, マウスに 2 日後より 1~2 日おきに 5 回ずつ全て尾静脈注射とした(以後 i. v. と略す)。

実験 3: マウスは control 群 5 匹, 生理的食塩水投与群 5 匹, c-c- inosine 50 mg/kg 投与群 6 匹, c-c- inosine 10 mg/kg 投与群 5 匹, Pentostam 投与群 5 匹の 5 群に分けた。生理的食塩水, Pentostam の投与量および回数は実験 1, 2 と同様にした。

感染虫体 *L. donovani* promastigote は東京慈恵会医科大学寄生虫学教室小林教授, 片倉博士らから提供を受けた 2S-15M 株の継代培養されたもので, その培養法は 30% の熱不活化牛胎児血清, 25 mM Hepes (pH 7.4), hemin 5 μ g/ml, hypoxanthine 0.7 μ g/ml, gentamicin 25 μ g/ml を付加した M199 培地で発育させた。それを control 群以外のマウス全てに, 1 匹当たり 1×10^8 を i. v. 接種した。

L. donovani 感染後, 治療期間中体重をモニターし, 4 週間後に, Bradley and Kirkley (1977) の方法により実験に供した全てのマウスについて, エーテル麻酔のもとに開胸し, 大動脈, 大静脈を切開, 放血した。肝重量, 脾重量を測定し, 肝 stamp smear をメタノール固定後, Giemsa 染色をした。肝 stamp smear の 1,000 肝細胞核に対する *L. donovani* amastigote を数え, これを Leishman-Donovan units (LDU) で表わし, 薬物の治療効果を評価した。なお全身に対する副作用のモニターの 1 つとして, マイクロキャピラリーによるヘマトクリット, 屈折計による血漿蛋白量の測定も行った。

2) *Trypanosoma gambiense* に対する効果

T. gambiense 治療実験は 2 回行った。実験動物には ddY マウス(北山ラベス株式会社), 7 週齢, ♂ を用いた。

実験 1: 生理的食塩水投与群 6 匹, Pentamidine (May & Baker Ltd., England) 投与群 6 匹, c-c- inosine 投与群 7 匹, 3'-deoxyinosine 投与群 6 匹の 4 群に分け, 感染 1 時間後に最初の日の治療を行い, その後, 1 日 1 回毎日, 計 4 回行ったが, Pentamidine 投与群だけはさらに 4 日間治療を行った。

実験 2: 3'-deoxyinosine の効果をさらに詳細に検討した。マウスを 3'-deoxyinosine (感染前日投与) 群 7 匹, 3'-deoxyinosine (同日投与) 群 6 匹, 3'-deoxyinosine (翌日投与) 群 7 匹, 生理的食塩水 (前日投与) 群 6 匹, Pentamidine (前日投与) 群 6 匹の 5 群に分け, 3'-deoxyinosine の 3 つの群は 1 日 1 回, 10 日間治療, 生理的食塩水, Pentamidine 投与群の治療は毎日 1 回, 4 日間とした。

薬物投与量と投与法は生理的食塩水 0.2 ml/マウス, 筋肉内注射(以後 i. m. と略す), Pentamidine 4 mg/kg, i. m., c-c- inosine 200 mg/kg, 3'-deoxyinosine 200 mg/kg 腹腔内注射とした(以後 i. p. と略す)。実験 2 の 3'-deoxyinosine 投与量は同量を i. p. 投与した。

虫体は大阪大学微生物病研究所, 中林教授から提供を受けた凍結保存の *Trypanosoma gambiense* trypomastigote を用い, マウス当たり 1.0×10^4 を i. p. 接種した。

薬物の効果判定は生存率と体重のモニターと Giemsa 染色による血液塗抹標本に対物レンズ 40 倍の鏡検で, 虫体数が 1 視野当たり 1~10 を 1+, 11~100 を 2+, 101 以上を 3+ として表わした。

成 績

1) *L. donovani* 治療実験

体重経過では図 1 に示すように control 群を含めどの治療群も, ほとんど大きな変化, 差違も認められなかった。しかし, 実験 2 での c-c- inosine 100 mg/kg 投与群だけは 4 回目の治療後

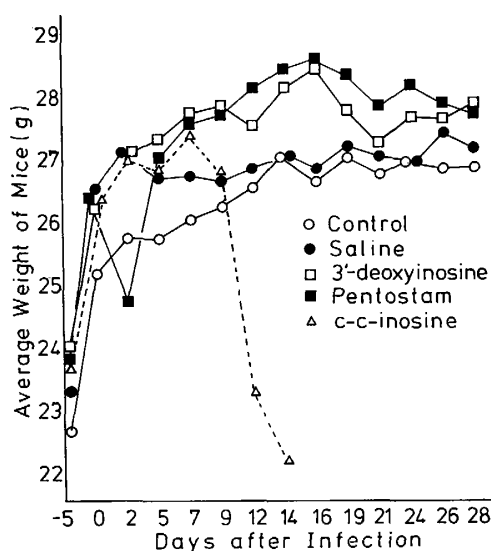


Figure 2 Time course of mouse body weight in the experiment (2) with *L. donovani*. Treatment were done at day 2, 5, 7, 9 and 12 of the infection. All of mice treated with c-c-inosine (100 mg/kg) died at day 15.

から急速に体重低下となり、15日目にはこの群の全てのマウスが死亡した。c-c-inosine 50 mg/kg 投与群, 10 mg/kg 投与群, 3'-deoxyinosine 投与群, 生理的食塩水投与群, Pentostam 投与群では体重変化はあまりなかった (図2)。

感染4週後の肝臓と脾臓の重量はどの投与群においても LDU に正比例していた。しかし、実験2の c-c-inosine 100 mg/kg 投与群は control 群と比較すると、15日目死亡時には、肝臓は72%、脾臓は50%の重量になった。しかし、c-c-inosine 10 mg/kg 投与群では生理的食塩水投与群よりも逆に肝脾とも重くなっており、control 群に比べると肝は1.09倍、脾は1.6倍であった。3'-deoxyinosine 投与群は肝脾とも生理的食塩水投与群と Pentostam 投与群の中間値となっていた (表1, 2)。

肝 stamp smear による LDU について3回の実験結果を見ると、生理的食塩水投与群で、実験1:291±128, 実験2:48±31, 実験3:29±28となり、感染数は減少した。それぞれの実験結果を総

Table 1 Liver weight in the 4th week of the infection (g)

Experiment	Control	Saline	3'-deoxyinosine	Pentostam	c-c-inosine* 100 mg/kg	c-c-inosine 50 mg/kg	c-c-inosine 10 mg/kg
1st	1.60 ±0.22	1.80 ±0.06	1.68 ±0.17	1.52 ±0.12			
2nd	1.31 ±0.10	1.40 ±0.08	1.34 ±0.04	1.33 ±0.09	0.94 ±0.05		
3rd	1.48 ±0.09	1.52 ±0.09		1.60 ±0.16		1.47 ±0.08	1.60 ±0.13
Average ratio of liver weight	1.00	1.08	1.04	1.02	0.72	1.00	1.09

*At day 15 of infection.

Table 2 Spleen weight in the 4th week of the infection (mg)

Experiment	Control	Saline	3'-deoxyinosine	Pentostam	c-c-inosine* 100 mg/kg	c-c-inosine 50 mg/kg	c-c-inosine 10 mg/kg
1st	160 ± 20	226 ± 25	181 ± 34	162 ± 14			
2nd	95 ± 6	124 ± 5	120 ± 7	114 ± 5	48 ± 6		
3rd	113 ± 5	164 ± 12		134 ± 24		152 ± 22	181 ± 39
Average ratio of spleen weight	1.00	1.39	1.20	1.13	0.50	1.34	1.60

*At day 15 of infection.

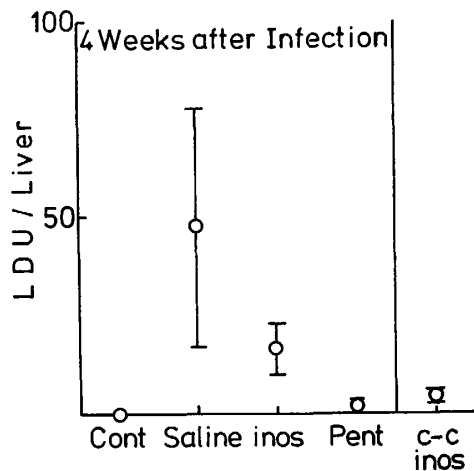


Figure 3 LDU in the 4th week of the infection in the experiment (2) with *L. donovani*. Only c-c-inosine group is measured LDU at day 15 of the infection.
Cont: Control, inos: 3'-deoxyinosine, Pent: Pentostam, c-c-inosi: c-c-inosine.

合してみると、3'-deoxyinosine 投与群は生理的食塩水投与群の約36%を示し、c-c-inosine 100 mg/kg 投与群 (4 ± 0.5) は Pentostam 投与群 (2 ± 0.5) に近い数値であった (図3)。実験3における c-c-inosine 50 mg/kg 投与群は生理的食塩水投与群の59%を示し、c-c-inosine 10 mg/kg 投与群は生理的食塩水投与群よりも、むしろ増加していた (図4)。

実験3の際行ったヘマトクリット値と血漿蛋白質量をみると、c-c-inosine 50 mg/kg 投与群はヘマトクリット、血漿蛋白質量とも他の群より低値を示した。Pentostam 投与群は血漿蛋白質量の低さが目立った (図5)。

2) *T. gambiense* 治療実験

体重経過では、実験1で生理的食塩水、3'-deoxyinosine、Pentamidine 投与群はいずれも日数経過とともに増加していったが、c-c-inosine 投与群だけは増加傾向を見せなかった。実験2では5つのグループ、3'-deoxyinosine(前日)、3'-deoxyinosine(同日)、3'-deoxyinosine(翌日)、生理的食塩水、Pentamidine はいずれも、日数とともに低下していった。

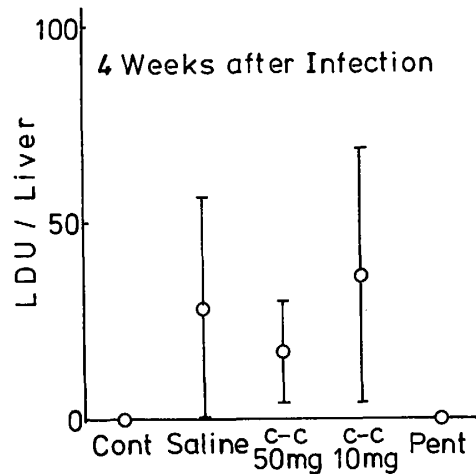


Figure 4 LDU in the 4th week of the infection in the experiment (3) with *L. donovani*.
Cont: Control, c-c-50 mg: c-c-inosine 50 mg/kg, c-c-10 mg: c-c-inosine 10 mg/kg, Pent: Pentostam.

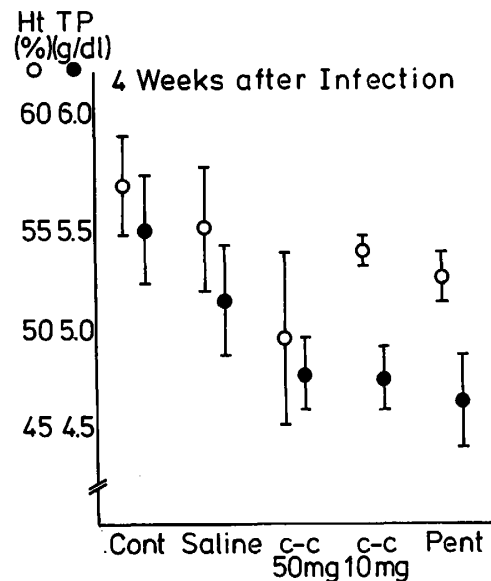


Figure 5 Values of hematocrit and plasma total protein in mice at the 4th week of the infection in the experiment (3) with *L. donovani*.
Cont: Control, c-c-50 mg: c-c-inosine 50 mg/kg, c-c-10 mg: c-c-inosine 10 mg/kg, Pent: Pentostam.

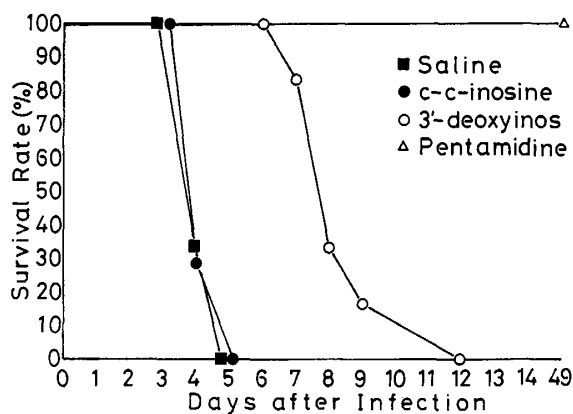


Figure 6 Survival rate in the experiment (1) with *T. gambiense*. Treatment was done at day 0, 2 and 3 of the infection. Only Pentamidine group treated for 4 more days.

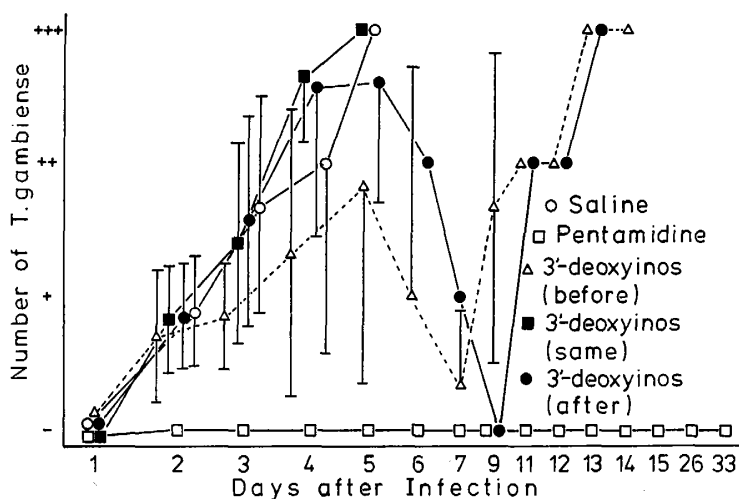


Figure 7 Time course of parasite number on blood smear in the experiment (2) with *T. gambiense*.
 -:0, +:0-10, 2+:11-100, 3+: \leq 101

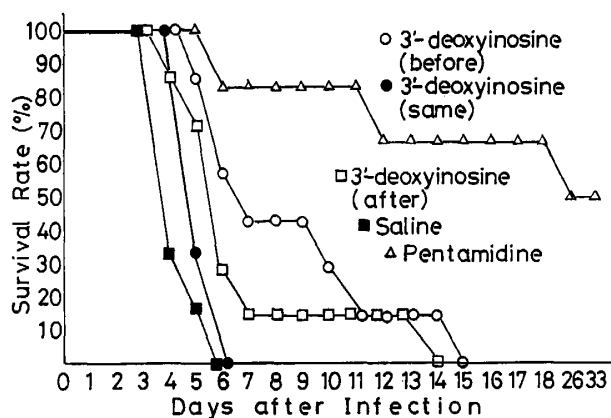


Figure 8 Survival rate in the experiment (2) with *T. gambiense*.

感染後のマウスの生存率は実験1において、3'-deoxyinosine は生理的食塩水投与群の約2倍生存し、また5日目までは血液塗抹でも1+以下であった。一方、c-c-inosine 投与群は生理的食塩水投与群とはほぼ変わらず、血液塗抹でも3日目には3+となり、5日で死亡した(図6)。実験2では Pentamidine 投与群を除く治療群の中で、3'-deoxyinosine (前日投与) 群が生理的食塩水投与群の約2倍生存し、血液検査でも Pentamidine を除くどの投与群よりも少し低い値(2+以下)を11日目まで示していた(図7)。3'-deoxyinosine (同日投与) 群は生理的食塩水投与群と同じ6日目には死亡した。3'-deoxyinosine (翌日投与) 群は7匹のうち1匹だけは14日目まで生存したが、それ以外は6日目に死亡した(図8)。

考 察

L. donovani 治療実験において、Segovia and Martin-Luengo(1986)によれば犬由来の強毒株 *L. donovani* amastigote はハムスターグループに接種後、10~14日で全てのハムスターが死亡したと述べているが、今回の実験で用いた2S-15M株の promastigote によって死亡したものはなかった。感染4週後の LDU は Katakura and Kobayashi (1985)によれば平均800だったが、我々の生理的食塩水投与群での平均は123であり、この株で実験を重ねるごとに LDU が低下していった。譲渡直後の株を、何回か培養を重ねたためと思われる。従って、今回の病原体はあまり強毒性を表わさなかったことになる。

肝脾重量は大部分の治療グループで LDU と正比例していた。しかし、c-c-inosine 100 mg/kg 投与群の肝脾重量は control 群よりも軽くなっていた。それは薬物の毒性のためと思われる。Katakura and Kobayashi (1985)、片倉、小林(1986)はこの株による感染マウスの肝脾はともに1.3~1.9倍になったと述べているが、我々の実験では1.1~1.4倍であった。

治療に用いた c-c-inosine は 10 mg/kg, 50 mg/kg では効果は見られなかった。100 mg/kg 投与では、LDU を比較すると生理的食塩水投与

群に比し、約92%の減少効果を示した。ところが5回目の投与後、マウスは体重低下をきたし、死亡した。50 mg/kg 投与群でも control 群に比しヘマトクリットは低く、血漿蛋白質量も正常値(5.7~7.3) (関ら, 1981)に比べ低くなっていたことから c-c-inosine は肝臓又は造血系に毒性を示したのではないかと思われた。このことから少量で効果をあげるためには、リポゾームによる c-c-inosine の封入を、今後考慮すれば解決するかもしれない。

3'-deoxyinosine は生理的食塩水投与群に比し、約63%の減少効果を有したので、投与回数を増やすとか、リポゾームに封入する方法を用いればさらに効果が上がると思われる (Black *et al.*, 1977; Croft, 1986)。

現在、最もよく治療に使用されている Pentostam は従来の文献通り (Harrison, 1984; WHO, 1984)圧倒的效果を見せ、LDU から見ると、生理的食塩水投与群に比し平均98%の減少効果だった。しかしながら、血漿蛋白質量が低下したので、肝毒性が示唆された。

結局、LDU からみた治療効果は Pentostam, c-c-inosine 100 mg/kg, 3'-deoxyinosine 100 mg/kg, c-c-inosine 50 mg/kg, 生理的食塩水の順となった。

c-c-inosine の *in vitro* での効果は Hiraoka *et al.* (1986), Wataya and Hiraoka (1984)によれば *L. donovani* promastigote に対し EC_{50} は 1.3×10^{-7} M, amastigote には 7.5×10^{-6} M, 3'-deoxyinosine は promastigote に対し 4.43×10^{-7} M で、amastigote に対しても効果があったとしている。*in vivo* で c-c-inosine は 100 mg/kg i. v. で著効を示した。3'-deoxyinosine は 100 mg/kg i. v. で有効性を見せたが、少し不足のようであった。

最近、海外の多くの文献に allopurinol の *in vitro*, *in vivo* での報告が発表されているが、成績内容が確立されていない (Berman, 1985)。

T. gambiense の治療実験において、c-c-inosine は生理的食塩水投与群とほぼ同じ survival rate を示した。Hiraoka *et al.* (1986) の *in vitro* における *Crithidia fasciculata* に対する

c-c-inosine の EC_{50} は 1.9×10^{-7} M であったが、*in vivo* では c-c-inosine は *T. gambiense* に対し無効であった。

3'-deoxyinosine は 200 mg/kg 投与で生理的食塩水投与群の約 2 倍の survival rate (図 5) を示し、また実験 2 の前日投与群で 9 日目までの血液塗抹標本の虫体数は中等度以下で、マウスの半数は生存し、生存率は 2.5 倍 (図 6, 7) で、結果として増量により有効性が増した。しかし、効果はまだ不十分で、治療の応用はまだ検討せねばならない。

この実験の Pentamidine 投与群も 3 匹のマウスが死亡したが、虫体は見られないので、Pentamidine の副作用であったかもしれない。

このように Pentamidine も毒性が強く、Sursamin sodium もこれ以上の副作用を有すると思われる (Beaver *et al.*, 1984)。

要 約

L. donovani promastigote 2S-15M 株を感染させた BALB/c マウスに対し、3'-deoxy-

inosine は 100 mg/kg, 1~2 回おき 5 回、静脈内投与で約 63% の治療効果、c-c-inosine は 100 mg/kg, 1~2 日おき 5 回静脈内投与で約 92% の治療効果が見られた。しかし、c-c-inosine は 100 mg/kg の量では副作用が見られた。

T. gambiense trypomastigote を感染させた ddY マウスに対し、3'-deoxyinosine は 200 mg/kg, 腹腔内投与、感染前日からの治療で、少し治療効果を示したが、有効と言えるまでには至らなかった。また c-c-inosine 200 mg/kg, 腹腔内投与は無効であった。

謝 辞

今回の治療実験に際し、*L. donovani* promastigote 2S-15M 株を提供頂いた東京慈恵会医科大学寄生虫学教室小林昭夫教授、片倉 賢博士、また *T. gambiense* trypomastigote を提供頂いた大阪大学微生物病研究所中林敏夫教授に深謝します。Pentostam を分与された東京大学医科学研究所、田中 寛教授に深謝します。

文 献

- 1) Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp, E.W. (1984): Clinical Parasitology, 9th ed. pp 85, Lea & Febiger
- 2) Berman, J.D. (1985): Leishmaniasis, 130-133, Elsevir Sci. Pub., Amsterdam, New York and Oxford
- 3) Black, C.D.V., Watson, G.J. and Ward, R.J. (1977): The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis, Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 71, 350-352
- 4) Bradley, D.F. and Kirkley, J. (1977): Course of *Leishmania* infection in mine, Clin. Exp. Immunol., 30, 119-129
- 5) Croft, S.L. (1986): Liposomes in the treatment of parasitic diseases, Pharm. Int., 9, 229-233
- 6) Fish, W.R., Marr, J.J. and Berens, R.L. (1985): Inosine analogs as chemotherapeutic agent for African trypanosomes, Antimicrob. Agents Chemother., 27 (1), 33-36
- 7) Harrison, C.S. (1984): Hunter's Tropical Medicine, 6th ed., W. B. Saunders Co., 552-565
- 8) Hiraoka, O., Sakata, H., Iguchi, S., Matsuda, A., Ueda, T. and Wataya, S. (1986): Carbocyclic inosine as a potent anti-leishmanial agent, Biochem. Biophys. Res. Commun., 134 (3), 1114-1121
- 9) Katakura, K. and Kobayashi, A. (1985): Enhancement of infectivity of leishmania, J. Parasit., 71 (3), 393-394
- 10) 片倉 賢, 小林昭夫 (1986): ドノバンリユーシュマニアの前鞭毛型強毒株のマウス体内における増殖の特性, 寄生虫誌., 35 (1), 8

- 11) Marr, J.J., Barends, R.L., Cohn, N.K. and Nelson, D.J. (1984): Biological action of inosine analogs in leishmania and trypanosoma spp., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25 (2), 292-295
- 12) Marr, J.J. and Barends, R.L. (1985): *Leishmaniasis*, 65-78, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, New York and Oxford
- 13) Segovia, M. and Martin-Luengo (1986): Comparative study of the virulence of two *Leishmania donovani* isolates of different origin, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 80, 5, 519-524
- 14) 関 正利, 平嶋邦猛, 小林好作 (1981): 実験動物の血液学, 313-325, ソフトサイエンス社, 東京
- 15) 綿矢有祐, 佐竹弘靖, 平岡 修, 松田 彰, 上田 亨, 王 炳南, 森重和久, 石井 明 (1986): 抗リューシマニア活性を有する inosine analog の検索とその作用機構について, *寄生虫誌.*, 35 (増), 103
- 16) Wataya, Y. and Hiraoka, O. (1984): 3'-Deoxyinosine as anti-leishmanial agent, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123 (2), 677-683
- 17) WHO (1984): *The Leishmaniasis*, 23-61, WHO, Geneva

THERAPEUTIC EFFECT OF INOSINE ANALOGS
IN MICE INFECTED WITH *LEISHMANIA DONO-*
VANI OR *TRYPANOSOMA GAMBIENSE*

KAZUHISA MORISHIGE¹, TOSHIKI AJI¹, JULIETA Y. KIMURA¹, AKIRA ISHII¹,
YUSUKE WATAYA², AKIRA MATSUDA³ AND TOHRU UEDA³

Received July 25 1988/Accepted November 10 1988

BALB/c mice infected with *L. donovani* and ddY mice infected with *T. gambiense* were treated with inosine analogs (carbocyclic inosine and 3'-deoxyinosine) for appraising therapeutic effects. The mice infected with *L. donovani* promastigotes were treated with 5 different doses of each drug administered on alternate days. Four weeks after the infection, impression smear of the liver was prepared to determine the parasite load which was expressed as LDU by 1,000 hepatic cell nuclei. In the mice infected with *L. donovani*, 3'-deoxyinosine 100 mg/kg i. v. showed about 63% effect as compared with the group of mice administered saline, and carbocyclic inosine 100 mg/kg i. v. showed about 92% effect as compared with saline. The mice infected with intraperitoneal injection of *T. gambiense* trypomastigotes were treated with drugs once a day for 4-8 days. The effect of drugs was measured by counting number of parasite on blood smear stained with Giemsa solution and survival rates of the mice. The group infected with *T. gambiense* and treated with carbocyclic inosine died all on the fourth day. On the other hand, 3'-deoxyinosine showed an effect to some extent. The mice treated with 3'-deoxyinosine showed twice longer survival time than the mice administered saline.

Department of Parasitology, Okayama University Medical School¹, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University² and Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University³

JAPANESE JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE

Vol. 16 No. 4

December, 1988

CONTENTS

Original article

- Itoh, M., Sato, S., Appawu, M.A. and Kawaguchi, H.
Analysis of *Schistosoma japonicum* Antigens Useful for Serodiagnosis
Employing Sera of Infected Mice by Immunoblotting 277-283
- Suzuki, N., Imamura, K., Kumazawa, H., Okamura, Y. and Nakagawa, Y.
Additional Eight Cases of Diplogonoporiasis
in Kochi Prefecture (in Japanese) 285-291
- Arakaki, T., Hasegawa, H., Morishima, A., Ikema, M., Terukina, S.,
Higashionna, A., Kinjyo, F., Saito, A., Asato, R. and Toma, S.
Treatment of *Taenia solium* and *T. saginata* Infections
with Gastrografin (in Japanese) 293-299
- Kano, S., Tsuji, M., Hosoya, J. and Suzuki, M.
A Case of Severe Malaria Treated with Qinghaosu (in Japanese) 301-307
- Inoue, F., Matsuyama, R. and Sato, Y.
Isolation and Some Properties of Aminopeptidase from *Plasmodium*
berghei Infected Mice Erythrocytes (in Japanese) 309-316
- Morishige, K., Aji, T., Kimura, J.Y., Ishii, A., Wataya, Y.,
Matsuda, A. and Ueda, T.
Therapeutic Effect of Inosine Analogs in Mice Infected with
Leishmania donovani or *Trypanosoma gambiense* (in Japanese) 317-325

Published by

JAPANESE SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE

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