

# 日本熱帯医学会雑誌

Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene

第11巻 第3/4号

昭和58年12月15日

## 内 容

### 原 著

- ビオチン・アベジン酵素抗体法による狂犬病ウイルスの中和抗体測定感度とワクチン  
接種者の血清抗体価の測定について (英文)  
.....七條 明久, 三舟求真人, 坂本 国昭, 山田 昭 217-224
- フィラリア旧流行地, 長崎県五島の2地区住民のフィラリア抗体価と成人T細胞白血病  
ウイルス抗体価との関連について  
.....藤田紘一郎, 田島 和雄, 月舘 説子, 小田 力, 黒川 憲次,  
Ligia Moncada, 上田 正勝, 森 章夫, 日沼 頼夫 225-233
- 実験的各種寄生虫感染に於いて出現する抗胸腺細胞自己抗体に関して (英文)  
.....小早川隆敏, 川端 真人, 朝日 博子, 熊田 三由, 保阪 幸男 235-241
- アフリカで感染したと思われる日本人のオンコセルカ腫瘍の1症例 (英文)  
.....吉村 裕之, 近藤力王至, 赤尾 信明, 大西 義博, 井門 慎介, 宮脇 晴夫 243-248
- ケニア諸地域住民の腸管寄生原虫感染状況 (英文)  
.....井関 基弘, 林 薫, SIMON, M. GATIKA, T. K. ARAP SIONGOK 249-256

### 短 報

- 青年海外協力隊員の消化管系寄生虫検査成績 (1981, 1982)  
.....山浦 常, 白坂 龍曠, 松本 克彦, 和田 芳武, 小林 和代, 岡本 雅子 257-260

### 学術記録

- 日本熱帯医学会第7回九州支部総会講演要旨 ..... 261-275

### 投稿規定

## SENSITIVITY OF THE BIOTIN-AVIDIN-PEROXIDASE (BAP) TECHNIQUE FOR RABIES VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODY ASSAY AND THE MEASUREMENT OF NEUTRALIZING ANTIBODIES OF VACCINATED HUMAN SERA

AKEHISA SHICHIGO<sup>1</sup>, KUMATO MIFUNE<sup>1</sup>, KUNIAKI SAKAMOTO<sup>2</sup>  
AND AKIRA YAMADA<sup>2</sup>

Received March 7 1983 / Accepted July 15 1983

**Abstract:** The biotin-avidin-peroxidase (BAP) technique for measuring serum neutralizing (NT) antibody against rabies virus in human sera was established. When the focus reduction rates with serial serum dilutions were plotted on a probit chart, a linear regression line was drawn. The slopes (b-value) of the regression lines were identical irrespective of the different test samples. The sensitivity of the BAP test for detecting NT antibody was highest when compared with that of the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) and mouse neutralization test. In addition, low level-antibody titer (<1:5) which could not be detected by mouse neutralization test was detected by the BAP test and the RFFIT. Serum NT antibody response was easily followed by the BAP test with individuals who received 3 doses of preexposure preventive rabies vaccine. Most of the vaccinees produced a detectable amount of serum NT antibody by a single dose of vaccine and after the second vaccination, all vaccinees produced high level of the antibody and the titers increased continuously until day 21, however, the titers on day 78, two months after the last vaccination, showed a tendency of decline.

### INTRODUCTION

NT antibody to rabies virus has been mostly measured by mouse neutralization test (Atanasiu, 1973) and rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) (Smith *et al.*, 1973). The former method requires a large number of mice and at least 2 weeks of long period until the final results can be obtained. The latter method is much more superior to mouse neutralization test for detecting antibody in every respect of the sensitivity, reproducibility and rapidity. However, this method has a disadvantage that the fluorescent staining is unstable and the stained cells easily fade out and has a difficulty in testing many specimens collectively. In order to resolve this problem, we previously studied the biotin-avidin-peroxidase (BAP) technique for measurement of rabies virus infectivity and the NT antibody to rabies virus (Shichijo *et al.*, 1982). The BAP technique provides such advantages that the specimens can be examined under an ordinary microscope and can be stored for

---

1 Department of Microbiology, Medical College of Oita, Oita 870-91, Japan 2 The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, 668 Shimizu Machi, Kumamoto 860, Japan

long period since the staining is stable.

In the present paper, we compared the sensitivity of the BAP test for detecting NT antibody with that of the RFFIT and mouse neutralization test and described the results of a trial for measuring human serum NT antibodies after the vaccination by the BAP test.

#### MATERIALS AND METHODS

1. *Virus*: The challenge virus standard (CVS) strain of rabies virus was successively passed for 6–8 times in murine neuroblastoma (N-18 clone) cells and the extracellular virus with an infectivity titer of  $10^8$  focus forming units (FFU)/ml was used as the test virus. The CVS strain-infected mouse brain suspension was used for measuring NT antibody titer by mouse neutralization test and its infectivity was  $10^6$  mouse intracerebral 50 per cent lethal dose (MIC LD<sub>50</sub>)/0.03 ml.

2. *Cells*: The N-18 cells were grown in the Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (MEM) containing 5 per cent fetal calf serum (FCS), 5 per cent calf serum (CS) and 3 g/l of NaHCO<sub>3</sub>. CER cells used for measuring NT antibody titer by the BAP test and the RFFIT were grown in the Eagle's MEM containing 5 per cent FCS and 5 per cent CS.

3. *Sera*: Fifty-two serum specimens were collected from 12 research staffs who had received preventive rabies vaccination. They received 2 doses of one ml of vaccine subcutaneously on days 0 and 7 and 0.1 ml of vaccine intradermally on day 21. Blood were taken on days 0, 7, 14, 21 and 78. The vaccine used in the study was prepared from chick embryo cell cultures infected with HEP-Flury attenuated strain of rabies virus and inactivated with  $\beta$ -propiolactone as originally developed by Kondo (1977). All the serum specimens were inactivated at 56°C for 30 min before the test.

4. *Staining of infected foci by the BAP technique*: Infected foci were stained as described previously (Shichijo *et al.*, 1982) and shown in Figure 1.

5. *Measurement of NT antibody titer by the BAP test*: Serum specimens diluted at 1:10 were subjected to two-fold serial dilution. Each diluted serum specimen was dispensed into a tube in the amount of 0.3 ml and mixed with an equal amount of virus suspension with a titer of  $4 \times 10^3$  FFU/ml. Each virus-serum mixture was neutralized at 36°C for 90 min in a water bath. As a virus control, the same virus suspension was mixed with an equal volume of the diluent instead of the serum and tested simultaneously. After neutralization, 0.05 ml/well of each mixture was inoculated onto two wells of the previously prepared CER monolayers. After incubation in a 5 per cent CO<sub>2</sub> incubator for 36 hrs, infected cells were harvested and fixed with cold acetone at 4°C for 20 min and processed for the BAP staining. The number of infected foci was counted and NT antibody titer (FR<sub>50</sub>) was calculated as described below. The number of foci at each serum dilution was divided by the number of foci in the virus control to determine a focus reduction rate. As described in the previous paper (Shichijo *et al.*, 1982), those focus reduction rates were transformed into probits and a linear regression line ( $Y=bX+a$ ) was calculated against the logarithm of serum dilution. The serum dilution which

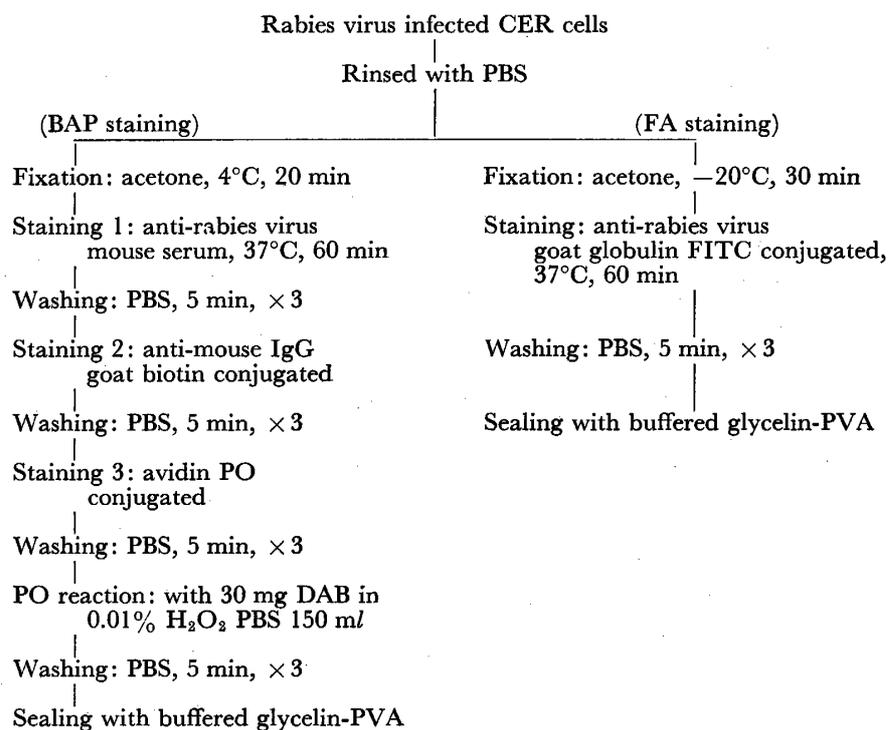


Figure 1 Procedures for the BAP staining and direct FA staining.

Abbreviation: PBS, phosphate buffered saline; PO, peroxidase; DAB, 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; PVA, polyvinyl alcohol; FITC, fluorescent isothiocyanate.

inhibits focus formation by 50 per cent ( $FR_{50}$ ) was read from the intersecting point of the linear regression line and the probit 5 and the point was then transformed into antilogarithm.

6. *Measurement of NT antibody titer by mouse neutralization test:* Mouse neutralization test was performed according to the standard procedure recommended by WHO (Atanasiu, 1973). Five weanling mice were used for each serum dilution. After neutralization of the virus suspension containing 100 MIC LD<sub>50</sub> with an equal amount of serial serum dilutions for 1 hr at 37°C, an aliquot of 0.03 ml/mouse of the mixture was inoculated into mice intracerebrally and observed for the death for two weeks. Antibody titer was expressed as a reciprocal of the serum dilution which inhibits the death by 50 per cent calculated by the method of Reed and Muench (1978).

7. *Measurement of NT antibody titer by the RFFIT:* In this method, NT antibody titer was measured as described by Smith *et al.* (1973). Each diluted serum was dispensed in the amount of 0.1 ml into 2 chambers of 8 chamber slide (Lab-Tek Products, Miles Laboratories, Naperville, Ill. USA) and incubated for 90 min at 36°C in 5 per cent CO<sub>2</sub> incubator with 0.1 ml of virus suspension whose infectivity titer was adjusted to yield 20 to 30 stained cells in 200× magnification of the fluorescent microscope in virus control. Then, 0.2 ml of CER cell suspension containing  $1.6 \times 10^5$  cells which were treated with DEAE-dextran at a final concentration of

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was introduced in each well. After incubation at 36°C for 24 hrs in a 5 per cent  $\text{CO}_2$  incubator, the chamber slides were harvested and fixed with acetone at -20°C for 30 min and processed for fluorescent antibody staining with anti-rabies goat globulin conjugated with FITC (BBL, Becton, Dickinson & Co., Cockeysville, Md. USA) as shown in Figure 1. The number of virus-infected fluorescent cells was counted under a fluorescent microscope. The reciprocal of the serum dilution which reduced fluorescent infected cells by 50 per cent was regarded as a NT antibody titer.

## RESULTS

### 1. Measurement of NT antibody titer in human sera by the BAP test: After neu-

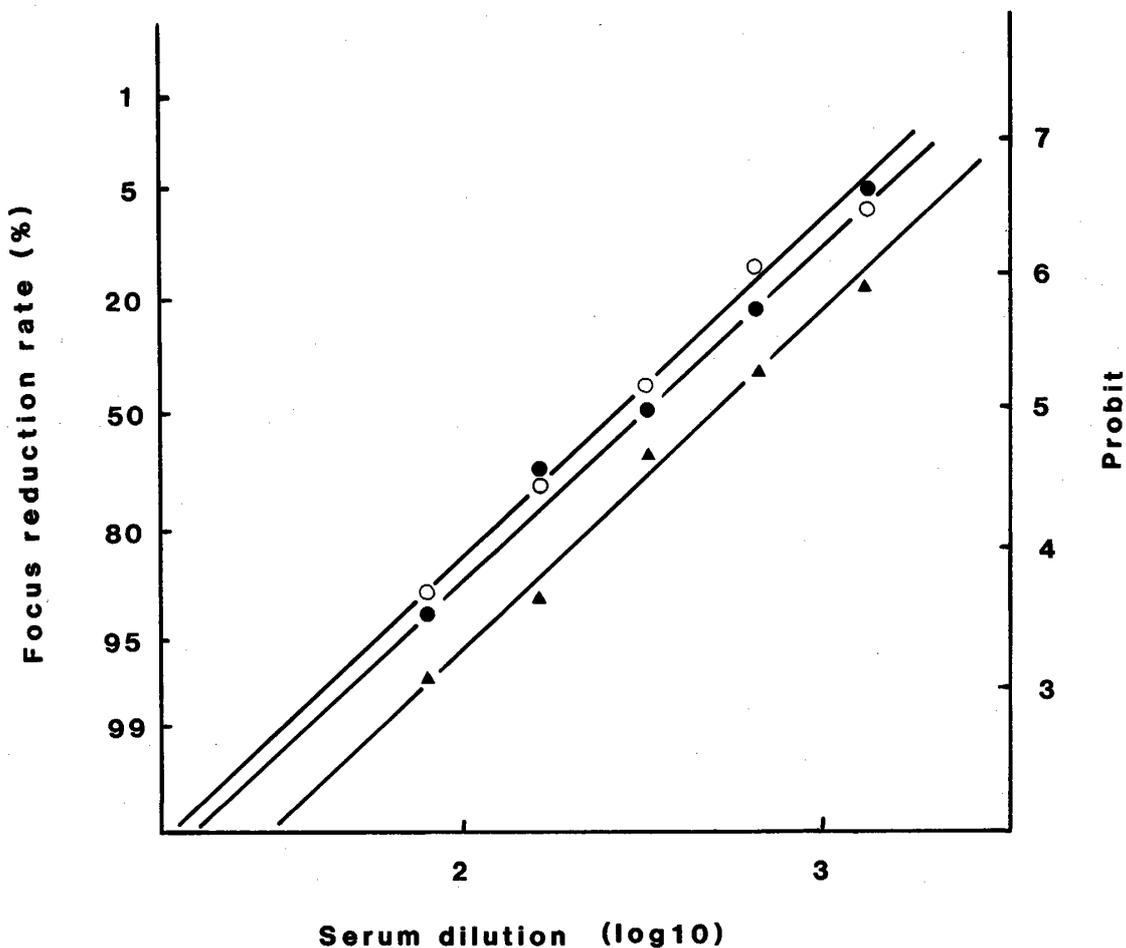


Figure 2 Neutralization of rabies virus by human sera. Stock virus containing  $4 \times 10^8$  FFU/ml was dispensed into a tube in the amount of 0.3 ml and mixed with an equal volume of human serum diluted by two-fold serial dilution (human serum: ●—●, a; ▲—▲, b; ○—○, c). Control virus was mixed with an equal volume of a diluent. Each virus-serum mixture was neutralized at 36°C for 90 min in water bath, then 0.05 ml/well of each mixture was inoculated onto CER cells for assaying the infectivity of surviving virus.

tralization of serial serum dilutions with constant infectivity titer of virus, infected foci caused by surviving virus were stained with the BAP technique. The number of infected foci was counted and then focus reduction rates of each serum dilution were calculated. When these were transformed into probits and plotted on a probit chart, a linear regression line was drawn. In human serum (a), its value of

Table 1 Comparison of neutralization antibody titers obtained by mouse neutralization test, rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) and biotin-avidin-peroxidase (BAP) test

Serum No.	Antibody titer		
	mouse NT	RFFIT	BAP
1	< 5	14	25
2	7	50	70
3	12	60	100
4	15	62	180
5	56	80	250
6	56	320	500
7	126	110	350
8	166	180	500

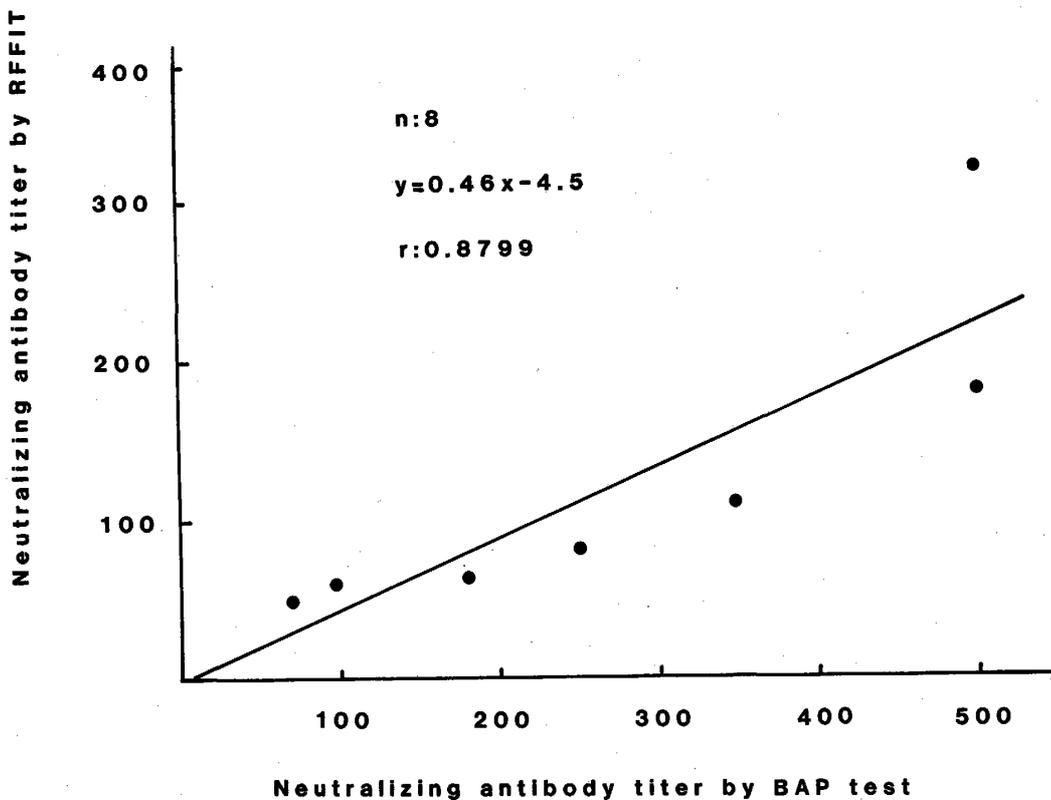


Figure 3. Correlation of the NT antibody titers obtained by rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) and biotin-avidin-peroxidase (BAP) test.

the slope (b-value) was 2.38 and showed a linear regression line of  $Y=2.38X-0.867$  (Figure 2). In human sera (b) and (c), the same b-value was obtained. The regression lines with the same b-value were also obtained in other human sera within the focus reduction rates ranging from 20 to 80 per cent, and the slopes inclined to become small below the 20 per cent or above the 80 per cent and the lines eventually became sigmoid curve (Data not shown). NT antibody titers of human sera (a), (b) and (c) estimated from the probit chart were 1:320, 1:500 and 1:270, respectively. These results suggest that under the experimental condition tested, NT antibody titers of human sera can be determined from the linear regression line with a b-value of 2.38 which can be drawn with focus reduction rates of a single or a few points of the appropriate serum dilution.

2. *Comparison of the sensitivity of the BAP test for detecting NT antibody with mouse neutralization test and the RFFIT:* NT antibody titers of vaccinated human sera were measured by the BAP test, mouse neutralization test and the RFFIT and the results were compared for their sensitivity for detecting NT antibody. As shown in Table 1, although antibody titers obtained by the three kinds of tests shows a parallel fluctuation and the antibody titers obtained by the RFFIT were closely correlated with those by the BAP test with r value of 0.889 ( $P<0.01$ ) (Figure 3), the antibody titers obtained by the BAP test were higher than those by the RFFIT and mouse neutralization test.

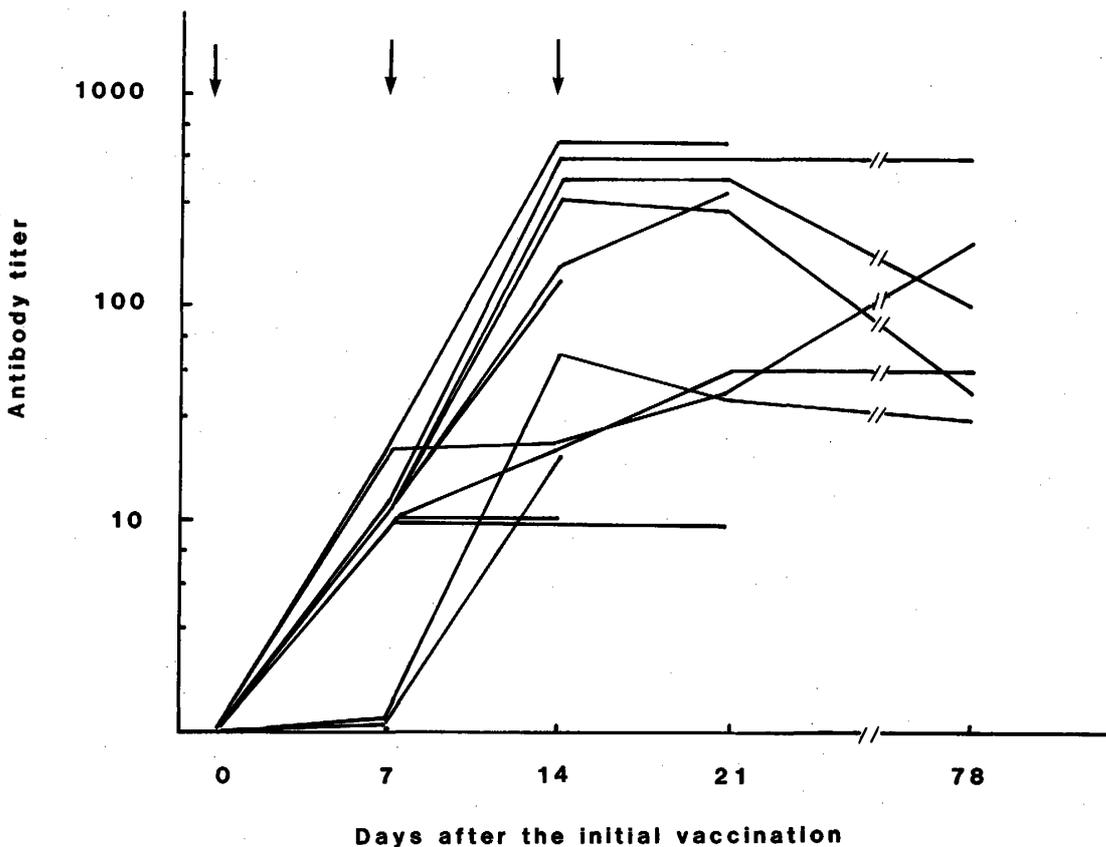


Figure 4 Production of serum NT antibodies after vaccination by human individuals. The arrows indicate the time of vaccination.

In addition, low level of antibody ( $<1:5$ ) which could not be detected by mouse neutralization test was detected by both the BAP test and the RFFIT. These results indicate that the BAP test is the most sensitive assay method among the three kind of tests examined.

3. *Production of serum NT antibody in vaccinees as measured by the BAP test:* Fifty-two serum specimens were collected from 12 individuals who had received 3 doses of vaccination on days 0, 7 and 21. The sera were collected on days 0, 7, 14, 21 and 78. On the 8th day after the first vaccination, NT antibody was detectable in most of the vaccinees, though it was low (Figure 4), but was undetectable in 2 (16.7%) of them. However all of the vaccinees produced fairly high titer of antibody after the 2nd vaccination and the antibody titers increased until day 21. Geometric mean titer on days 7, 14 and 21 was 1: 7.8, 1: 78.9 and 1: 128.7, respectively. On the 78th day which is about two months after the third vaccination, geometric mean antibody titer was 1: 91.9, showing a tendency of decrease in the antibody titer.

#### DISCUSSION

In the present study, immuno-peroxidase staining technique, the BAP test was tried to measure serum NT antibody to rabies virus in fairly large number of human sera and the sensitivity of the test was compared with that of the RFFIT and mouse neutralization test. The results demonstrated that when the focus reduction rates were plotted on a probit chart, a linear regression line was obtained and that the slopes of the line was constantly 2.38 in all of the sera tested, if the focus reduction rates were at least ranging within 20 and 80 per cent. This might suggest that the NT antibody can be accurately assayed by the BAP test and the titer can be determined from the regression line drawn by plotting only single or a few points of focus reduction rates, if the test serum was appropriately diluted. The sensitivity of the BAP test and the RFFIT was apparently higher than that of mouse neutralization test as expected especially in detecting low level of NT antibody. The BAP test also appeared to have higher sensitivity than the RFFIT in detecting NT antibody.

The production and transition of the serum NT antibody was easily monitored by the BAP test in many individuals after three doses of rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. Most of the vaccinees produced a detectable amount of NT antibody after a single dose of vaccine and all of them produced NT antibody by at least two doses of vaccine. The antibody levels increased continuously with the doses of vaccine until day 21, although the tendency of decrease was observed on day 78, about two months after the last (3rd) vaccination. Similar observations have recently been reported in the follow up studies of NT antibody levels in human after administration of vaccines of human or rhesus diploid cell cultures origin (Bernard *et al.*, 1982; Mertz *et al.*, 1982; Berlin *et al.*, 1982).

Although the BAP test requires more staining steps than the RFFIT and may seem tedious, the test has several advantages and is easy to perform once the experimental conditions are established and should provide a new tool in the seroepidemiological studies of rabies in which a large number of specimens have to be tested at the same time.

## REFERENCES

- 1) Atanasiu, P. (1973): Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin, WHO Monogr. Ser., 23, 314-318
- 2) Berlin, B. S., Mitchell, J. R., Burgoyne, G. H., Oleson, D., Brown, W. E., Goswick, C., McCullough, N. B. (1982): Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbed), a new rabies vaccine, J. A. M. A., 247, 1726-1728
- 3) Bernard, K. W., Roberts, M. A., Sumner, J., Winkler, W. G., Mallonee, J., Baer, G. M., Chaney, R. (1982): Human diploid cell rabies vaccine. Effectiveness of immunization with small intradermal or subcutaneous doses, J. A. M. A., 247, 1138-1142
- 4) Kondo, A. (1977): Preimmunization and postexposure treatment of inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin, Abstract. WHO/IABS Joint Symposium on Rabies, Marburg. p. 47
- 5) Mertz, G. J., Nelson, K. E., Vithayasai, V., Makornkawkeyoon, S., Rosanoff, E. I., Tint, H., and Wiktor, T. J. (1982): Antibody responses to human diploid cell vaccine for rabies with and without human rabies immune globulin, J. Inf. Diseases., 145, 720-727
- 6) Reed, L. J., and Muench, H. (1938): Simple method of estimating 50 per cent endpoints, Amer. J. Hyg., 27, 493-497
- 7) Shichijo, A., Mifune, K. and Lin, W.-J. (1982): Rapid titration of rabies virus infectivity by biotin-avidin-peroxidase technique and its application to virus neutralization test, Japan. J. Trop. Med. Hyg., 10, 245-251
- 8) Smith, J. S., Yager, P. A., and Baer, G. M., (1973): A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody, Bull. WHO, 48, 535-541

ビオチン・アベジン酵素抗体法による狂犬病ウイルスの中和抗体  
測定感度とワクチン接種者の血清抗体価の測定について

七條明久<sup>1</sup>・三舟求真人<sup>1</sup>・坂本国昭<sup>2</sup>・山田 昭<sup>2</sup>

ビオチン・アベジン酵素抗体法 (BAP) 法によって、迅速な狂犬病ウイルスの感染価の測定、及び中和抗体測定が可能であることは、先に報告した。今回、BAP 法による中和抗体測定の検出感度を、従来から用いられてきたマウスを使用する方法、及び迅速蛍光フォーカス形成抑制法 (RFFIT) による測定法とで比較した結果、BAP 法は抗体検出感度の点で、最もすぐれていることが判明した。次いで、この方法により多数の狂犬病ワクチン接種者の血中の中和抗体を測定した結果、中和抗体価の推移を鋭敏に測定することが可能であった。BAP 法は、このような結果に加えて、RFFIT と異なり、染色標本は非常に安定であり、長期の保存に耐えること、蛍光顕微鏡を要せず、通常の顕微鏡で観察可能なこと等、多くの利点があり、多数の検体処理を必要とする血清疫学の研究に有用な方法であると思われる。

## フィラリア旧流行地、長崎県五島の2地区住民の フィラリア抗体価と成人T細胞白血病 ウイルス抗体価との関連について

藤田紘一郎<sup>1</sup>・田島和雄<sup>2</sup>・月舘説子<sup>1</sup>  
小田 力<sup>1</sup>・黒川憲次<sup>1</sup>・Ligia Moncada<sup>1,4</sup>  
上田正勝<sup>1</sup>・森 章夫<sup>1</sup>・日沼頼夫<sup>3</sup>  
昭和58年6月1日 受付 / 昭和58年9月15日 受理

### 結 言

わが国におけるフィラリア症の新しい感染は、1976年の鹿児島県の報告を最後に、現在は全く消滅したものと考えられる（鹿児島県衛生部報告、1980）。しかし、かつては青森県以南の日本各地に、フィラリアの散在した流行地があり（佐々、1962）、特に、南九州とその離島に浸淫が著しく、新しい感染は現在なくなったものの、象皮病、陰囊水腫、乳糜尿などのフィラリア症で、今なお苦しんでいる住民は相当数認められている。

われわれは、日本各地の旧フィラリア流行地の住民について、その臨床症状の有無及びフィラリア仔虫 (Mf) 保有の状況について再調査し、併せて血清疫学的調査により、フィラリア流行の終焉の時期を推定してきた。前回の福井県勝山地方の調査（吉村ら、1979）に続いて、今回は、長崎県・五島の2地区、長手及び大宝地区の各住民について、フィラリア症についての同様の調査を行った。なお、大宝地区は、ジエチルカルバマジン (DEC) による薬剤治療により、また長手地区は、媒介蚊の駆除によって、1971年にはそれぞれ新しいフィラリアの感染から免れた地域である (Omori *et al.*, 1972)。

### 調査方法ならびに実験方法

長崎県・五島の長手及び大宝の両地区に在住する20歳以上の成人男女、それぞれ214名、241名と、対照として選んだ愛知県の2地区、南知多町及び日進町の住民、それぞれ179名、117名について、糞便採取と共に血清を採取した。採取した血清は、ドライアイスで凍結し、糞便は10%ホルマリン中に保存して、それぞれの研究室に持ち帰った。なお、過去 Mf を保有したと記録されている長手地区の21名の男子及び13名の女子については、別に夜間の10時から12時に採血し、厚層塗抹標本を作り、ギムザ染色後 Mf の有無を調べた。糞便については、MGL 集卵法によって腸内寄生虫卵の有無を検索した。

血清については、同一血清を大きく二分し、一方の血清は 56°C、30分間非働化後さらに3分し、1つは犬フィラリア粗抗原、他の1つはアニサキス粗抗原によって、それぞれ間接赤血球凝集反応 (IHA) を行い、住民のフィラリア抗体価及びアニサキス抗体価を求めた。これらの抗原の作製及び IHA の術式は、Fujita (1975) に準じた。

フィラリア抗原とアニサキス抗原との交差反応を除くため、第3番目の血清画分については、まずアニサキス抗原で吸収後、犬フィラリア抗原による IHA を行った。すなわち、長崎市で得られ

1 長崎大学医学部医動物学教室 2 愛知県がんセンター疫学部 3 京都大学ウイルス研究所予防治療部 4 現所属：国立コロンビア大学医学部寄生虫学教室

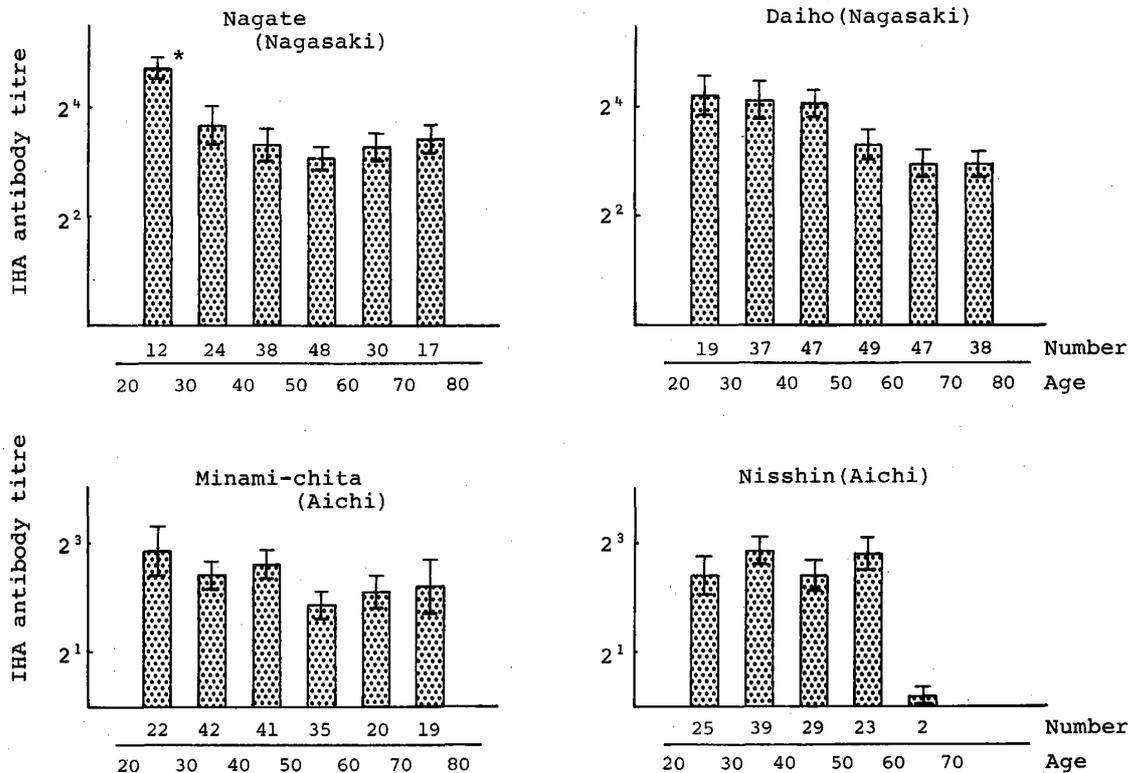
たサバの内臓よりアニキサスを集め、生理食塩水で十分に洗浄した後、凍結乾燥し、pH 7.2のリン酸緩衝液中で、ガラス及びテフロンホモジナイザーで微細化後、13,000G, 30分間遠心し、その上清部分を乾燥させた。次いで、血清 1ml に対して乾燥重量 10mg の割合でアニキサス抽出液を加え、室温で1時間反応後、さらに 4°C で24時間反応させた。反応後、4,000回転、10分間遠心して上清部分をとって、アニキサス吸収血清とした。このアニキサス吸収血清と、犬フィラリア抗原を吸着した羊赤血球との間で、IHA を起こさせ、フィラリア抗体価を求めた。なお、抗体価は2の冪数で表わした。

他方の血清画分については、Hinuma *et al.* (1981) の方法に従い、間接蛍光抗体法により、成人 T 細胞白血病ウイルス (ATLV) に対する抗体 (ATLA 抗体) を測定した。

## 成 績

### 1. 粗抗原による住民のフィラリア抗体価

長崎県・五島の長手及び大宝地区と愛知県の南知多、及び日進地区のそれぞれの住民について、犬フィラリア由来の粗抗原による地域別抗体価を求めた。フィラリア感染が10数年前まで確認されている五島の2地区住民の抗体価は、愛知県の2地区住民の抗体価より、全般的に、いずれも高くなった。また、各地区において、住民の年齢別抗体価を求め、比較したところ、図1に示すように、内陸地の愛知県・日進地区を除き、他の3地区において、40歳代以前の青壮年齢層の抗体価が、老年層の抗体価より幾分高めになった。長手や大宝地区では、10数年前よりフィラリアに感染する機会は全くなくなっており、われわれの過去の調査結果から類推すると、40歳以上の年齢層で、む



\* mean±SE of IHA antibody titre

Figure 1 Age-specific antibody titres against crude filarial antigen.

しろフィラリア抗体価が高くなることが考えられた。たとえば、前回の福井県勝山地区の調査では、40歳以上の住民のフィラリア抗体価が、それ以下の年齢層に比べ有意に高い値を示した（吉村ら、1979）。今回、五島の2地区住民の青壮年層のフィラリア抗体価が高めになった理由として、五島に供給されているサバ・イカなどがアニサキスに高率に感染しており、青壮年層がより高度にアニサキスに感作され、その結果、フィラリア抗原と交差反応を示したものと考えられる。

## 2. アニサキス抗原による住民の抗体価

長崎県及び愛知県のそれぞれ2地区において、住民のアニサキス抗体価を同様に IHA で求めた。結果は、犬フィラリア粗抗原で得られたものとほぼ同様であった。すなわち、五島の2地区住民の抗体価は、愛知県の2地区住民の抗体価より全般

的に高めになった。また、年齢別に抗体価を調べると、日進地区を除く他の3地区では、若年層ほど高い抗体価を示し、フィラリアの抗体価は、アニサキスとの交差反応の影響を多分に受けていることが考えられた。

## 3. アニサキス抗原吸収後血清でのフィラリア抗体価

アニサキスとの交差反応を除くため、あらかじめアニサキス抗原で血清を吸収後、再び犬フィラリア抗原による抗体価を、各地区別、年齢別に求めた。その結果、表1に示すように、犬フィラリア粗抗原による結果とは多分に異なる値を得た。すなわち、愛知県の2地区での、若年層の抗体価が高い傾向には変化がなかったが、五島の2地区においては、60歳以上の老年層の抗体価が相対的に高くなった。また、大宝地区の20歳代の年齢層

Table 1 Age- and sex-specific filarial antibody titres after absorption with anisakis antigen

Location	Sex	Age group						total
		21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	
	total	0.75±0.13* (12)**	0.88±0.13 (24)	0.77±0.08 (37)	0.74±0.10 (47)	1.20±0.22 (30)	1.03±0.26 (17)	0.87±0.06 (167)
Nagate, Nagasaki	male	0.50±0.00 (1)	0.75±0.16 (8)	0.70±0.11 (15)	0.69±0.11 (18)	1.12±0.31 (13)	0.83±0.33 (3)	0.80±0.09 (58)
	female	0.77±0.14 (11)	0.99±0.18 (16)	0.73±0.21 (22)	0.78±0.15 (29)	1.26±0.30 (17)	1.07±0.31 (14)	0.90±0.08 (109)
	total	1.58±0.19 (19)	0.85±0.15 (17)	0.86±0.37 (47)	0.73±0.17 (49)	0.94±0.18 (47)	1.13±0.28 (38)	0.95±0.07 (237)
Daiho, Nagasaki	male	1.71±0.29 (7)	0.71±0.18 (21)	0.73±0.18 (15)	0.53±0.17 (15)	0.42±0.14 (19)	1.33±0.36 (18)	0.82±0.10 (95)
	female	1.50±0.26 (12)	1.03±0.24 (16)	0.92±0.17 (32)	0.82±0.23 (34)	1.29±0.27 (28)	0.95±0.29 (20)	1.04±0.10 (142)
	total	0.78±0.11 (18)	0.68±0.07 (40)	0.69±0.07 (37)	0.59±0.05 (34)	0.60±0.09 (20)	0.61±0.07 (19)	0.65±0.03 (168)
Minami- chita,	male	0.77±0.14 (11)	0.55±0.05 (20)	0.67±0.09 (18)	0.50±0.00 (16)	0.59±0.09 (11)	0.77±0.15 (9)	0.62±0.04 (85)
Aichi	female	0.79±0.18 (7)	0.80±0.13 (20)	0.71±0.10 (19)	0.67±0.09 (18)	0.61±0.11 (9)	0.50±0.00 (10)	0.69±0.05 (83)
	total	1.10±0.25 (24)	0.62±0.13 (39)	0.28±0.10 (29)	0.59±0.17 (23)	0.00±0.00 (2)		0.62±0.08 (117)
Nisshin, Aichi	male	0.73±0.30 (13)	0.41±0.15 (17)	0.25±0.18 (12)	0.00±0.00 (5)	0.00±0.00 (2)		0.40±0.11 (49)
	female	1.55±0.39 (11)	0.77±0.20 (22)	0.29±0.11 (17)	0.75±0.20 (18)			0.77±0.12 (68)

\* mean±SE expressed by the second exponent of the filarial antibody titre

\*\* number of persons tested

の抗体価が異常に高くなったり、同地区の60歳代の男女の抗体価の差が、著しく開くという結果となった。このように今回の調査では、実際にフィラリア感染を受けた年齢層と、そうでない年齢層との間に、フィラリア抗体価に関して一定の関係を見出すことができなかった。

#### 4. 長崎県・五島の2地区における ATLA 抗体陽性者のフィラリア抗体価

長崎県・五島は、過去のフィラリア濃厚流行地であると共に、現在では成人 T 細胞白血病 (ATL) が好発する地域であることが知られている。そこで、われわれは、フィラリアの抗体価を測定した同じ血清について、各地区住民の ATLA 抗体価を測定した。その結果、長手及び大宝の20歳以上の健康成人の 25.4 及び 28.7% が、それぞれ ATLA 抗体陽性となった。対照に選んだ愛知県の2地区では、全く陽性者が見られなかった。

次いで、五島の2地区住民を ATLA 抗体陽性者と陰性者とに分けて、各地区ごとのアニサキス吸収後のフィラリア抗体価を比較したところ、図2のようになった。図から明らかなように、長手及び大宝両地区において、ATLA 抗体陽性者群のフィラリア抗体価は、陰性者群の抗体価に比

べ、有意 ( $P < 0.1\%$ ) に高くなった。また、両地区の ATLA 抗体陰性者の平均のフィラリア抗体価が、愛知県の2地区住民のフィラリア抗体価とほとんど同じ値になったことは興味深い。

上記と同様な調査を、フィラリア粗抗原やアニサキス抗原を使って得た抗体価で比較検討すると、図3のようになった。図からわかるように、いずれの場合も ATLA 抗体陽性者は、陰性者に比べ、それぞれの抗体価において高い値を示したが、今回は、両者の間で有意の差は認められなかった。

#### 5. ATLA 抗体陽性者の年齢別フィラリア抗体価

長崎県・五島の2地区住民を、ATLA 抗体陽性者群と陰性者群とに分け、年齢別にフィラリア抗体価 (アニサキス抗原吸収後) を求め、比較した。図4に示すように、長手地区の20歳代の1例を除き、両地区の各年齢層において、ATLA 抗体陽性者のフィラリア抗体がいずれも高くなった。特に、長手地区の60歳代で、 $P < 5\%$ 、大宝地区の50歳代、60歳代及び70歳以上の各年齢層において、いずれも  $P < 1\%$  の危険率で、それぞれ ATLA 抗体陽性者群のフィラリア抗体価が陰性住民のそれよりも有意に高くなった。

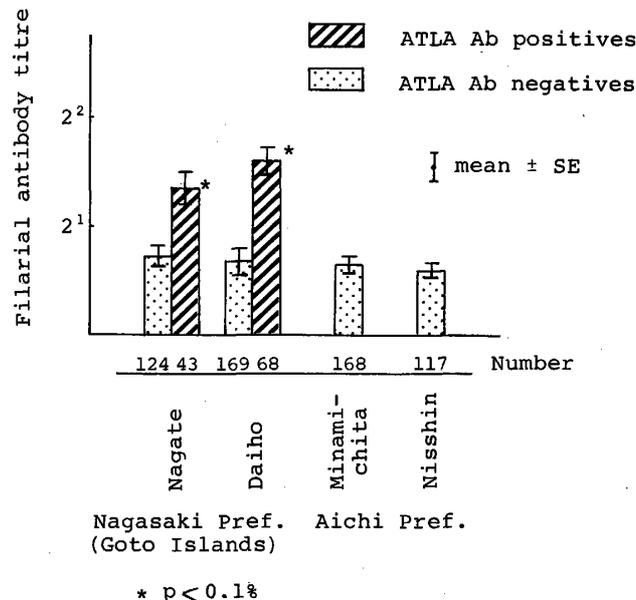


Figure 2 Filarial antibody titres after absorption with anisakis antigen among groups of persons with positive ATLA antibody and negative ATLA antibody.

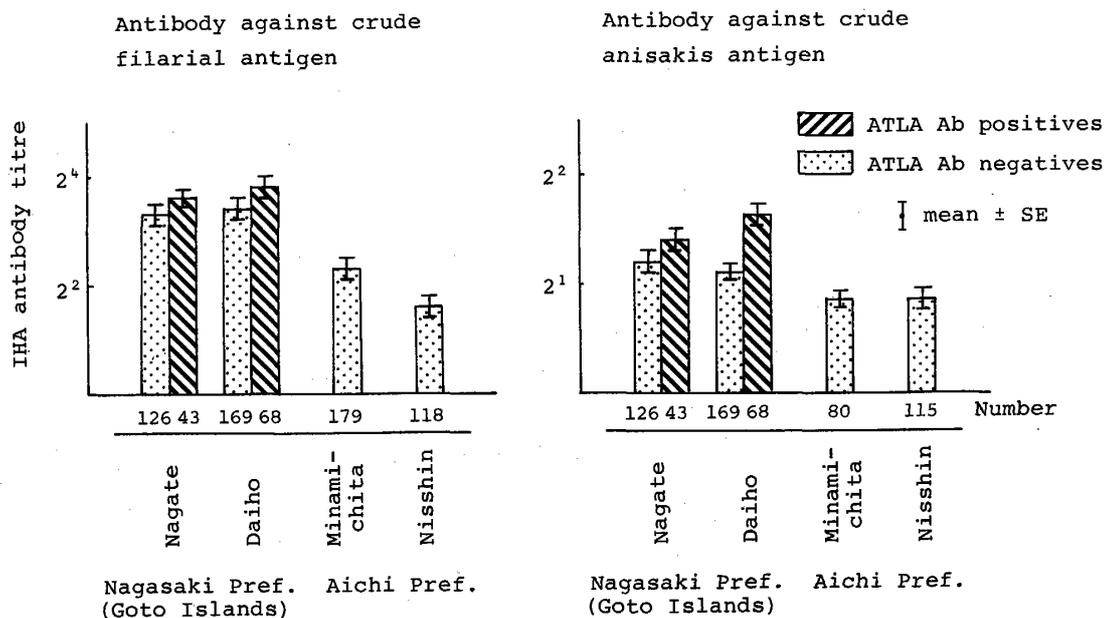


Figure 3 Antibody titres against crude filarial antigen or anisakis antigen among persons with positive ATLA antibody and negative ATLA antibody.

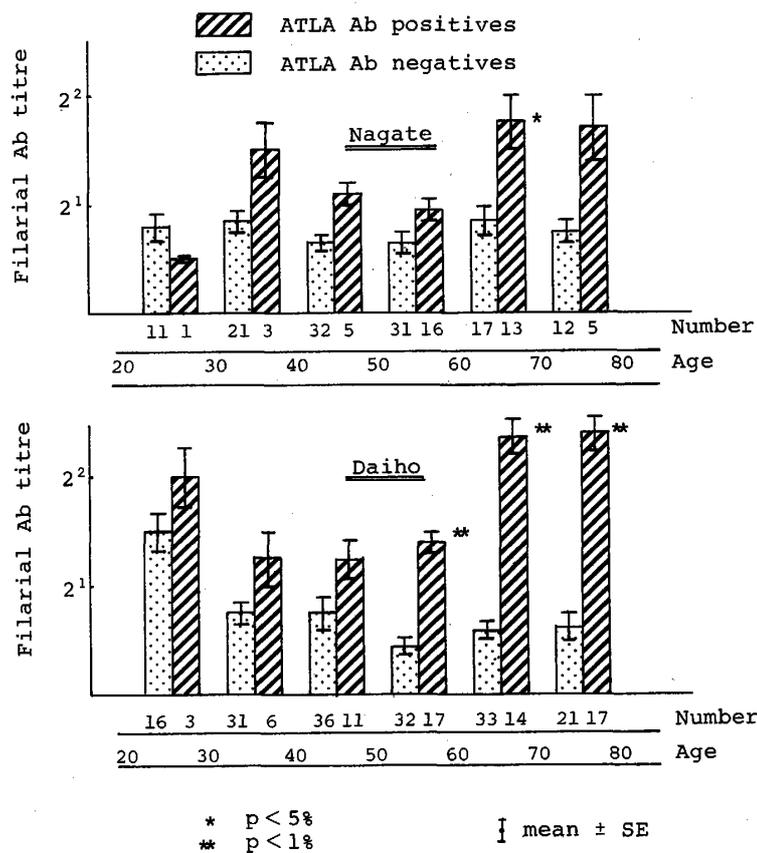
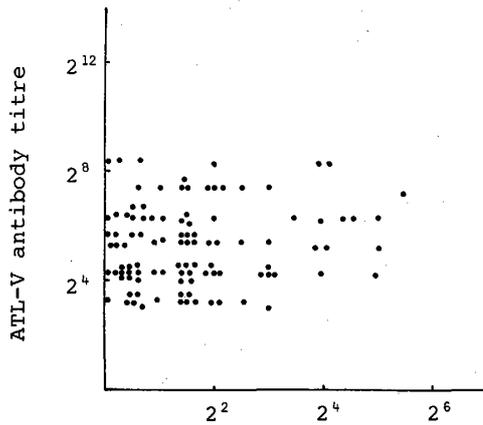


Figure 4 Age-specific filarial antibody titres after absorption with anisakis antigen among persons with positive ATLA antibody and negative ATLA antibody.



Filarial antibody titre

Figure 5 Correlation between filarial antibody titres after absorption with anisakis antigen and ATLA antibody titres of persons in Goto Islands of Nagasaki Prefecture.

しかし、ATLA 抗体価とフィラリア抗体価との間には、特別な相関が見られなかった (図5)。

#### 6. Mf 陽性既往者の ATLA 抗体陽性の割合とフィラリア抗体価

長手地区で、約10年前、Mf を確実に有していたと記録されている34名 (男21名、女13名) について、今回は特に夜間10時以降に採血し、厚層塗抹標本において Mf の有無を調べた。しかし、彼らから Mf は全く検出されなかった。

次いで、これらの住民の血清について、ATLA 抗体を測定すると共に、アニサキス抗原で吸収後

のフィラリア抗体価を求めた。この結果、34名中、ATLA 抗体陽性者が10名検出され、陽性率は29.4%となった。対照として、Mf 陽性の既往のない長手地区の133名の陽性率を求めると、24.4%となり、Mf 陽性既往者の ATLA 抗体陽性率が高いことが判明した。特に、Mf 陽性既往の女性から46%という高率で ATLA 抗体陽性者が出現していることがわかった。これは、対照の28.6%に比べ、はるかに高い値を示しており、注目される (表2)。なお、男性の場合でも、Mf 陽性既往者の方が、ATLA 抗体陽性になりやすく (19.0%、対照は13.5%)、いずれの結果も、フィラリアの感染が完全に成立した人は、その他の長手地区住民より高率に ATLA 抗体が陽性になっていることが判明した。

しかし、Mf 陽性既往者群のフィラリア抗体価は、対照に比べ、特に差は認められなかった。

#### 7. 他の諸検査結果

各地区住民の腸管内寄生虫卵の検索を行ったが、全員陰性であった。その他、尿、血液生化学、貧血などのスクリーニング検査を施行したが、五島の2地区で貧血が割合多く認められた以外には、特に重要な所見は得られなかった。

## 考 察

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、九州、南四国、南紀地方の海岸線に近い過疎地域を中心に好発し、特異的な臨床病態像を有する新しい疾患概念とし

Table 2 Percent of ATLA antibody positives and filarial antibody titres after absorption with anisakis antigen among persons of Mf positive in the past at Nagate district, Nagasaki Prefecture

Mf in the past	percent of ATLA antibody positives			filarial antibody titre		
	male	female	total	male	female	total
positive	19.0 (21)**	46.0 (13)	29.4 (34)	0.74±0.15* (21)	1.04±0.14 (13)	0.82±0.17 (34)
negative	13.5 (37)	28.6 (96)	24.4 (133)	0.84±0.11 (37)	0.91±0.10 (96)	0.89±0.07 (133)

\* mean±SE expressed by the second exponent of the filarial antibody titre

\*\* number of persons tested

て、現在確立しつつある。最近、Hinuma *et al.* (1981) は、ATL の原因と推察されている一種のレトロウイルスを発見し、成人 T 細胞白血病ウイルス (ATLV) と命名した。この ATLV に対する抗体 (ATLA 抗体) は、ATL 患者のほとんど全例の血清中に存在するが、健康成人中にも認められることが、Hinuma *et al.* (1982) によって明らかにされた。われわれが今回調査した長崎県・五島の 2 地区における 20 歳以上の健康成人の ATLA 抗体保有率は、それぞれ 25.4% 及び 28.7% であった。

一方、この ATL の地理的発生分布をみると、25 年前に実施されたフィラリア感染調査におけるフィラリア仔虫 (Mf) 保有者の分布と、ほとんど完全に一致している。この事実から、田島 (1982) は、ATL の発症が昔のフィラリア感染と何らかの関係があるのではないかと推測した。

そこで、われわれは、旧フィラリア流行地、長崎県・五島の 2 地区を選んで、フィラリアの抗体価と、ATLA 抗体陽性率との関係を調べた。その結果、ATLA 抗体陽性者群のフィラリア抗体価が、陰性者群の抗体価より有意に高いことがわかった。また、過去フィラリア仔虫を有したことのある人達は、より多くの割合で、ATLA 抗体が陽性になっていることが判明した。Tajima *et al.* (1983) は、同じく、五島の長手、大宝両地区住民について、フィラリア抗体の低値を示した群、中等度の値を示した群、及び高値を示した群と 3 段階に分けて、ATLA 抗体の陽性率を比較した。その結果、低値群の ATLA 抗体陽性者の占める割合を 1 とすると、中等度群で男は 4、女は 2.6、高値群で男は 8、女は 7.4 と、フィラリア抗体価が高くなるにつれて、ATLA 抗体陽性者の割合が増えていることを示した。以上の結果は、ATLV のウイルス血症を発現させる因子の 1 つに、フィラリア抗原の刺激が関与していることを示すものであろう。

なお、フィラリア感染と ATL 発症との関係についてのこの研究結果の解釈には問題点も多い。たとえば、フィラリア抗体価を犬フィラリア抗原で測定したので、犬フィラリア感染との関係について述べる必要のあること、また ATL がウイル

ス感染によって引き起されるものであるならば、フィラリアと同様、蚊によって媒介されることも考えられる。しかし、犬フィラリアは日本国内の犬の間でほぼ全国的に感染が認められ、ヒトには免疫反応を示すほどの感染はないと考えられること、またフィラリアを媒介する蚊は、フィラリア旧流行地以外にも現在広く日本で存在していることから、これらの問題点は一応除外して考えることができるものと思われる。

かつて、日本では青森県以南の海岸地帯には、数多くのフィラリア流行地が散在していた。それらの地域に在住していた現在 40 ないし 50 歳以上の成人が、フィラリア抗原に繰り返し暴露されていたことは十分考えられる。ATL は、最近、九州・南四国や南紀以外にも佐渡ヶ島や能登半島、秋田などの海岸地方にも低いながら集積されて発見されている。この地域は、南日本の ATL 発症地域と同様に、いずれも、かつてのフィラリア流行地である。しかし、フィラリアの新しい感染が全く消滅した現在、ATL の発症が逆に増加しつつある現状を考えると、今後、この両者の関係をさらに追求する必要があると思われる。

フィラリアは、ヒトのリンパ組織に寄生し、宿主の免疫能を攪乱することが知られている。また、T 細胞に作用して、細胞性免疫能を低下させるという報告も多い (Weller, 1978)。このフィラリア感染あるいはフィラリアの抗原刺激が、ATLV の増殖にどのように関与しているか、今後の重要な課題である。

## 要 約

フィラリアの旧流行地、長崎県・五島の 2 地区住民のフィラリア抗体価を調べた。フィラリア抗体価は、血清をアニサキス抗原で吸収後、犬フィラリア抗原による間接赤血球凝集反応で求めた。一方、同一血清について、成人 T 細胞白血病ウイルスに対する抗体価 (ATLA 抗体価) を蛍光抗体法で調べた。ATLA 抗体陽性者群のフィラリア抗体価は、いずれの地区においても陰性者群の抗体価より有意に高く、この傾向は住民の各年齢層

でみられた。また、過去において確実にフィラリアに高い陽性率を示した。以上の事実から、フィラリア感染は、ATLVのウイルス血症発現に何らかの意味で関与していることが推察される。

## 文 献

- 1) Fujita, K. (1975): Separation of *Dirofilaria immitis* allergen from the IgG-inducing antigens, Jap. J. Med. Sci. Biol. 28, 139-149
- 2) Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S. and Miyoshi, I. (1981): Adult T-cell leukemia; Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78, 6476-6480
- 3) Hinuma, Y., Komada, H., Chosa, T., Kondo, T., Kohakura, M., Takenaka, T., Kikuchi, M., Ichimaru, M., Yunoki, K., Sato, I., Matsuo, R., Takiuchi, Y., Uchino, H. and Hanaoka, M. (1982): Antibodies to adult T-cell leukemia virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan; A nationwide seroepidemiologic study, Int. J. Cancer, 29, 631-635
- 4) 鹿児島県衛生部報告書 (1980)
- 5) Omori, N., Wada, Y. and Oda, T. (1972): Eradication experiment of bancroftian filariasis in the control of vector mosquitos in Nagate Village, Nagasaki Prefecture, Research in filariasis and schistosomiasis 2, 21-30, University Park Press
- 6) 佐々 学 (1962): 日本におけるバンクロフト糸状虫症の分布, 日本における寄生虫学の研究 2, 1-34, 目黒寄生虫館
- 7) 田島和雄 (1982): 成人 T 細胞白血病・リンパ腫の疫学的研究, 癌の臨床, 28, 930-938
- 8) Tajima, K., Fujita, K., Tsukidate, S., Oda, T., Tominaga, S., Suchi, T. and Hinuma, Y. (1983): Seroepidemiological studies on the effects of filarial parasites on infestation of adult T-cell leukemia virus in the Goto Islands, Japan, Gann, 74, 188-191
- 9) Weller, P. F. (1978): Cell-mediated immunity in experimental filariasis; Lymphocyte reactivity to filarial stage-specific antigen and to B- and T-cell mitogens during acute and chronic infection, Cell, Immunol., 37, 369-382
- 10) 吉村裕之, 近藤力王至, 大西義博, 赤尾信明, 森下 薫, 池田照明, 藤森千衣子, 藤田紘一郎他 (1979): 福井県勝山地方の旧フィラリア流行地におけるフィラリア症のその後の疫学調査, 公衆衛生, 43, 512-517

CORRELATION BETWEEN FILARIAL ANTIBODY  
TITRE AND ADULT-T-CELL LEUKEMIA VIRUS  
ANTIBODY TITRE IN INHABITANTS OF  
GOTO ISLANDS, NAGASAKI JAPAN.

KOICHIRO FUJITA<sup>1</sup>, KAZUO TAJIMA<sup>2</sup>, SETSUKO TSUKIDATE<sup>1</sup>,  
TSUTOMU ODA<sup>1</sup>, KENJI KUROKAWA<sup>1</sup>, LIGIA MONCADA<sup>1,4</sup>  
MASAKATSU UEDA<sup>1</sup>, AKIO MORI<sup>1</sup> AND YORIO HINUMA<sup>3</sup>

Received June 1 1983/Accepted September 15 1983

Goto Islands belong to Nagasaki Prefecture, and bancroftian filariasis had been endemic in these subtropical islands. For about 20 years, we have carried out the eradication program of bancroftian filariasis in two villages, Nagate and Daiho Village of Goto Islands. The eradication program was planned mainly through control of vector mosquito in Nagate Village and through treatment of persons with drug in Daiho Village. As a result of this program, no new filaria infection was found recently in these areas.

On the other hand, Goto Islands are known as endemic areas of adult-T-cell leukemia (ATL). In this time, we have carried out a seroepidemiological study, and found that the groups of persons with positive ATLA antibody had significantly higher filarial antibody titre than those of persons with negative ATLA antibody in Nagate and Daiho Village.

Thirty-four persons who were recorded as microfilaria carriers about 10 years ago showed higher positive rate of ATLA antibody than that of the others in Nagate Village.

These data suggested that the filarial antigen stimulation might act as a factor in ATLV infection and/or proliferation among inhabitants in the endemic areas of filariasis and ATL.

---

1 Department of Medical Zoology, School of Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan.  
2 Division of Epidemiology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya 464, Japan. 3 Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606, Japan. 4 Present Address: Department of Parasitology, School of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogota Colombia.

## THYMOCYTOTOXIC AUTOANTIBODIES INDUCED BY VARIOUS PARASITIC INFECTIONS IN MICE

TAKATOSHI KOBAYAKAWA, MASATO KAWABATA, HIROKO ASAHI,  
MITSUYOSHI KUMADA AND YUKIO HOSAKA

Received May 27 1983 / Accepted September 1 1983

**Abstract:** The development of thymocytotoxic autoantibodies was investigated in mice infected with *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis*, *Nematospiroides dubius*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris*, *Hymenolepis nana*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium berghei* and *Plasmodium chabaudi*. The infections with all of these parasite species induced thymocytotoxic autoantibodies, although the levels of their cytotoxic activity were varied in different host-parasite combinations. The highest titer up to 1:16 was observed in the sera of mice infected with *S. japonicum* and *S. mansoni*. They have generally an optimal reactivity at 4°C but some showed greater cytotoxicity at 37°C. The cytotoxicity was completely absorbed with thymocytes. The possible mechanism(s) responsible for the production of these autoantibodies and their *in vivo* role were discussed.

### INTRODUCTION

Several strains of mice are prone to spontaneously develop autoimmune disorders and some normal strains of mice are well known to develop antithymocyte antibodies (NTA) as well as other variety of autoantibodies (Schlesinger, 1965; Howie and Helyer, 1968; Shirai and Mellors, 1971; Auer *et al.*, 1974; Harbeck *et al.*, 1978; Eisenberg *et al.*, 1979).

On the other hand, in certain parasitic infections, the production of autoantibodies including those to the liver, kidney, erythrocyte, nucleic acid and globulins has also been already documented (Hillyer, 1971; Lehman *et al.*, 1972; Jones *et al.*, 1976; Jones, 1977; Kobayakawa *et al.*, 1979). In addition, the occurrence of such NTA like autoantibodies has been recently reported in murine African trypanosomiasis and schistosomiasis japonica by the authors (Kobayakawa *et al.*, 1979; Kawabata *et al.*, 1981). Although it is not clear whether those thymocytotoxic autoantibodies are the cause or the result of the pathological process, taken together with the fact overall parasitic infections cause the generalized immune suppression to heterologous antigens (Terry, 1977), we have examined the possible presence of thymocytotoxic autoantibodies in the sera of mice infected with various parasites.

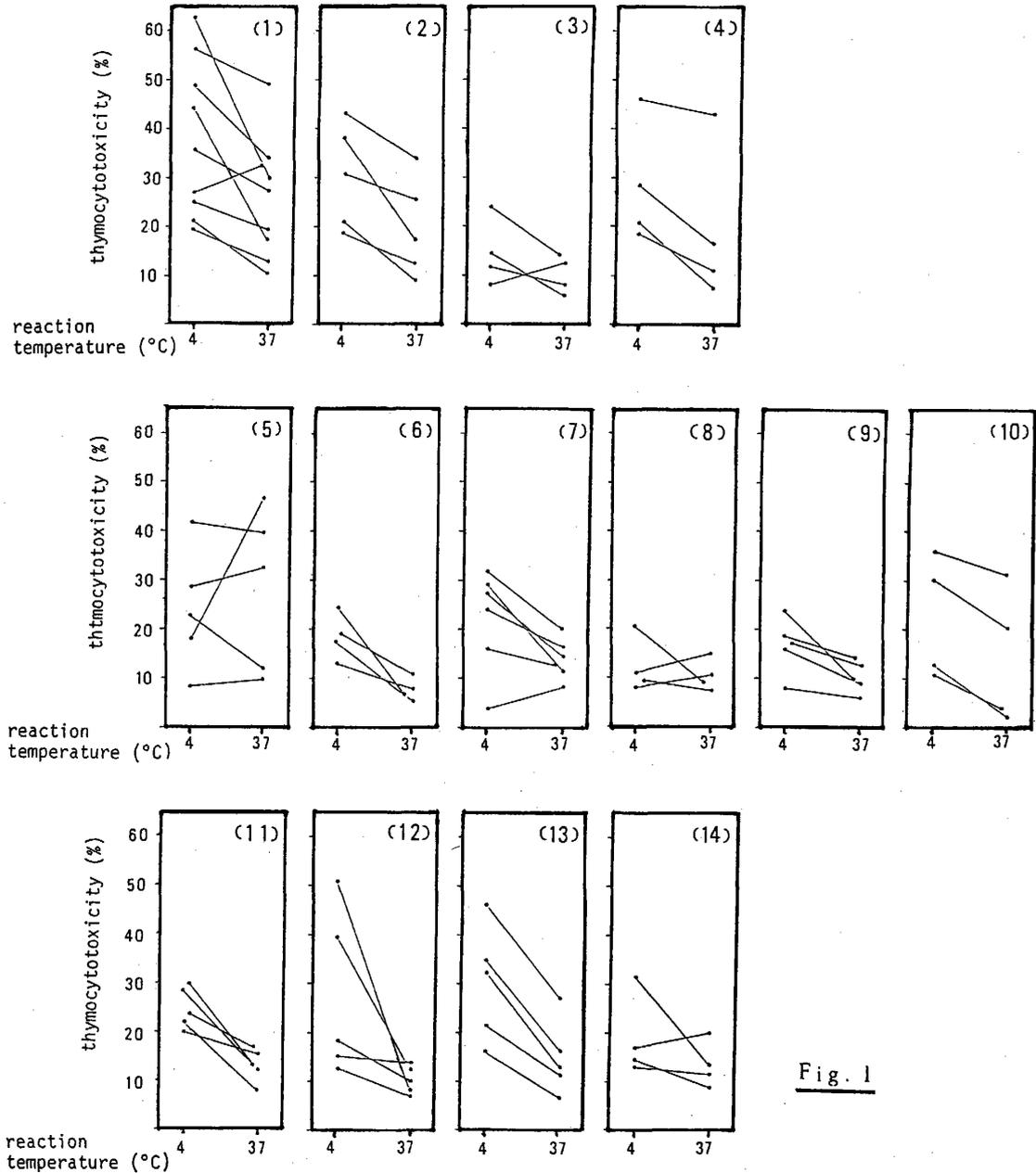


Fig. 1

**Figure 1** Thymocytotoxic activity of serum of mice infected with various kinds of parasites. Each bar represents the thymocytotoxic activity of serum of individual mouse. Test serum without complement and complement without test serum were employed as negative controls (<5%).

	(1)	(2)	(3)	(4)
parasite	<i>S. japonicum</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>S. mansoni</i>
source & route of infection	50 cercariae ip*	50 cercariae ip	50 cercariae ip	150 cercariae ip
time after infection	10 weeks	10 weeks	10 weeks	10 weeks
strain of mice	C3H/HeJms	ddY	C57BL/6J	ddY

	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
parasite :	<i>T. spiralis</i>	<i>T. spiralis</i>	<i>N. dubius</i>	<i>T. muris</i>	<i>H. nana</i>	<i>E. multilocularis</i>
source & route of infection :	500 larvae orally	500 larvae orally	300 larvae orally	100 eggs orally	50 eggs orally	300 protoscoleces ip
time after infection :	21 weeks	7 weeks	10 weeks	6 weeks	4 weeks	60 weeks
strain of mice :	ddY	BALB/c	ddY	ddY	ddY	ddY
	(11)	(12)	(13)	(14)		
parasite :	<i>T. gondii</i>	<i>P. chabaudi</i>	<i>P. vinckei</i>	<i>P. berghei</i>		
source & route of infection :	250 trophozoites ip	10 <sup>6</sup> infected rbc# ip	10 <sup>6</sup> infected rbc ip	10 <sup>6</sup> infected rbc ip		
time after infection :	10 weeks	9 days	9 days	8 days		
strain of mice :	ddY	ddY	ddY	ddY		

\*: intraperitoneally    #: red blood cells

## MATERIALS AND METHODS

### *Mice*

Female C57BL/6J, C3H/HeJms and BALB/c mice were obtained from the Institute of Medical Science, Tokyo University. An outbred strain of female ddY mice was bred and maintained in our colony. All the infections were performed at their age of 6 weeks.

### *Parasites and infection*

Stages of parasites used for the infection and the route of the infection are indicated in Figure 1.

### *Cytotoxicity assay*

Single thymocyte suspensions were obtained by teasing the thymus gently with forceps in minimal essential medium. After gravity sedimentation of tissue debris the cells were washed twice with minimal essential medium. Test procedure of cytotoxicity test is as follows. A mixture of 50 $\mu$ l of serum from infected mice with respective parasites to be tested and 25 $\mu$ l of C57BL/6J mice thymus cell suspension (10<sup>7</sup> cells/ml) in minimal essential medium was incubated for 60 min at 4°C or 37°C. The cells were washed twice with cold medium containing 3 per cent fetal calf serum and further incubated for 30 min at 37°C with 50 $\mu$ l of guinea pig serum at a dilution of 1:10 as a source of complement. The percentage of dead cells was determined by the trypan blue dye exclusion test.

### *Absorption test*

Absorption was carried out by mixing an equal volume of serum samples with packed C57BL/6J thymus cells. The mixtures were incubated for 60 min at 4°C. After centrifugation, the supernatants were tested for residual cytotoxicity.

## RESULTS

The infections with all the parasite tested induced thymocytotoxic autoantibodies in the mice (Figure 1) and this cytotoxicity was confirmed to be complement dependant since test serum and complement alone showed no more than 5 per cent dead cells. However, the cytotoxic activity of these autoantibodies is varied in different species of parasite and individual mice with the same parasite.

Titration of the thymocytotoxic autoantibodies were carried out in some representative sera from mice infected with different parasite species; *S. japonicum*, *S. mansoni*, *P. vinckei*, *P. chabaudi* and *T. gondii*. The cytotoxic titers were varied in different parasite species, ranging 1:8 to 1:16, if the dilution of the serum sample causing more than 10 per cent dead cells is considered to be the titer (Figure 2).

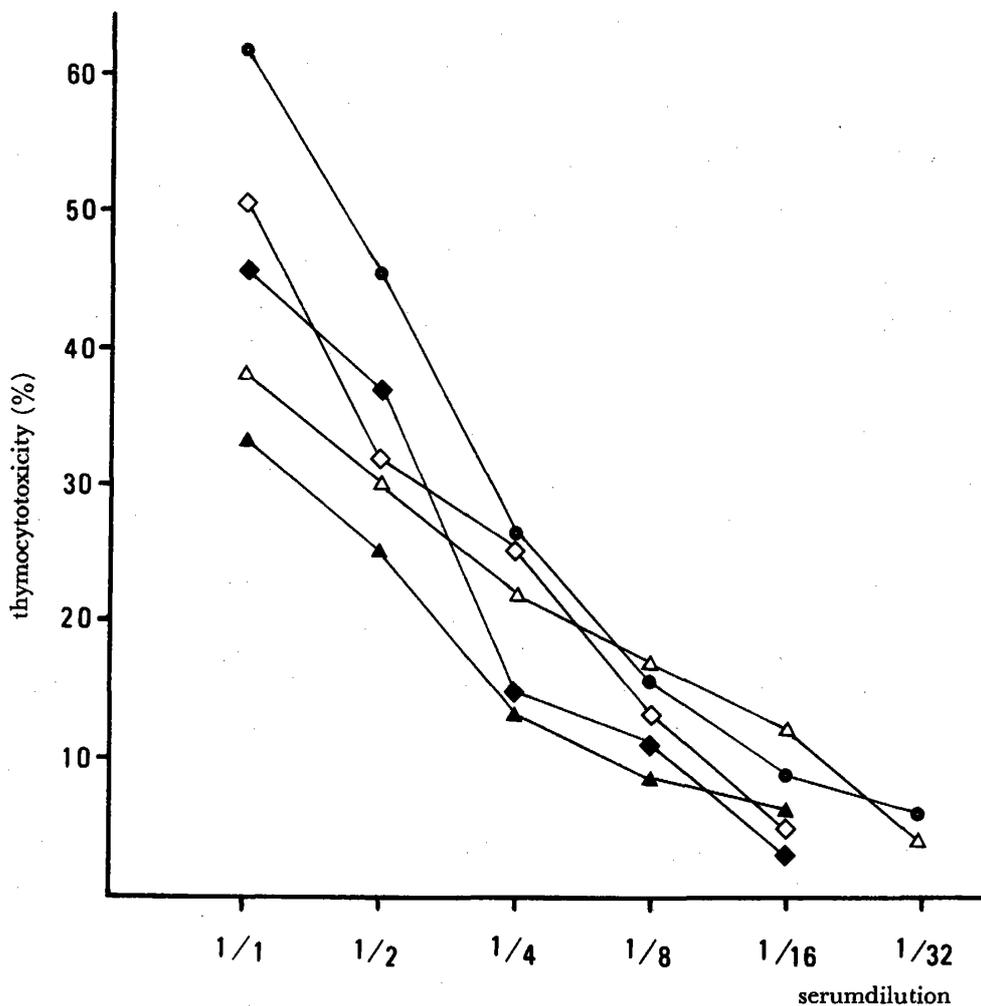


Figure 2 Titration of thymocytotoxic autoantibodies in representative sera from mice infected with following parasites.

ddY mouse infected with *S. mansoni* 8 weeks (●), *P. vinckei* 9 days (◇), *P. chabaudi* 9 days (◆), *S. japonicum* 8 weeks (△) and *T. gondii* 10 weeks (▲), each previously.

These autoantibodies have, as a rule, an optimal reactivity at 4°C, although some sera with rare exception showed stronger reactivity at 37°C, suggesting that more than a single antibody moiety appear to be involved in this cytotoxic reaction. On the other hand, thymocytotoxic activity of control sera from two to three age matched normal mice at each group of infection never exceeded 5 per cent with two exceptions, 7.2 and 8.6 per cent respectively.

Thymocytotoxic activity of the sera from mice infected with *S. japonicum*, *S. mansoni*, *T. spiralis*, *P. vinckei* and *T. gondii* was completely absorbed with thymocytes (Table 1).

Table 1 Absorption of cytotoxic effect of parasite-induced thymocytotoxic autoantibodies with thymocytes\*

Parasite	Strain of mice	Time after infection	Dead thymocytes (%)	
			Before absorption	After absorption
<i>S. japonicum</i>	ddY	10 weeks	46.6	6.9
<i>S. mansoni</i>	ddY	10 weeks	57.2	8.0
<i>T. spiralis</i>	ddY	21 weeks	29.0	5.1
<i>P. vinckei</i>	ddY	8 days	62.3	10.5
<i>T. gondii</i>	ddY	10 weeks	25.7	6.0

\* Sera were incubated with an equal volume of thymocytes from 2-month-old C57BL/6J mice at 4°C for 60 min with occasional pipetting.

## DISCUSSION

Mechanism(s) by which these thymocytotoxic autoantibodies are induced by the parasite infections is at present unknown. The occurrence of similar thymocytotoxic autoantibodies as well as other autoantibodies with various specificities found in murine African trypanosomiasis and schistosomiasis japonica has been reported to be associated with the increase of the number of IgM antibody-producing cells in their spleen (Kobayakawa *et al.*, 1979; Kawabata *et al.*, 1981). On the other hand, the *Trichinella spiralis* infected mice which were found to produce the thymocytotoxic autoantibodies in this present study did not increase the number of antihapten plaque forming cells in their spleen (data not shown). In parallel, the genetic studies by using New Zealand mice and their hybrid showed no correlation between the spontaneous production of NTA and polyclonal B-cell activations (Hirose *et al.*, 1980). Therefore, it could be conceivable that more than a single underlying mechanisms in even single host-parasite system and/or different species of parasite are likely to involve in the production of these thymocytotoxic autoantibodies.

The biological and pathological significance of these thymocytotoxic autoantibodies is at present unknown. If these thymocytotoxic autoantibodies were to have a regulatory role on thymocytes and thymus derived lymphocytes *in vivo*, they could influence many of the cellular events involved in the induction of cellular and humoral immunity. In fact, parasitic infections, as a whole, develop depressed cellular

immune functions. Immune responses shown to be impaired in them include skin allograft rejection (Wedderburn, 1974; Araujo *et al.*, 1977), increased susceptibility to oncogenic viruses (Jerusalem, 1968; Wedderburn, 1970), contact sensitivity to oxazolone (Jayawardena *et al.*, 1975), effectiveness of spleen cells in inducing GVH reaction (Freeman, 1975) and reactivity of cultured spleen cells to allogeneic cells and to other mitogenic agents (Pelly *et al.*, 1976; Corsini *et al.*, 1977; Jayawardena and Waksman, 1979). Therefore, further studies are required to elucidate whether or not those defect in cellular immune functions in mice with parasite infections are causally related to the development of thymocytotoxic autoantibodies which eventually leads to the elimination of a certain T-cell subpopulation.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was partly supported by a grant of the Ministry of Health and Welfare, Japanese Government.

#### REFERENCES

- 1) Araujo, F. G., Coelho, P. M. Z., Pereira, L. H. and Pellegrino, J. (1977): *Schistosoma mansoni*: Impairment of the cell-mediated immune response in mice, *Clin. exp. Immunol.*, 28, 289-291
- 2) Auer, I. O., Tomasi, T. B. Jr. and Milgrom, F. (1974): Natural thymocytolytic autoantibodies in NZB and other strains of mice, *Cell. Immunol.*, 10, 404-414
- 3) Corsini, A. C., Clayton, C., Askonas, B. and Ogilvie, B. M. (1977): Loss of B cell potential in mice infected with *Trypanosoma brucei*, *Clin. exp. Immunol.*, 29, 122-131
- 4) Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N., Andrews, B. S., Peters, C. J., Thor, L. and Dixon, F. J. (1979): Natural thymocytotoxic autoantibodies in autoimmune and normal mice, *J. Immunol.*, 122, 2272-2278
- 5) Freeman, J. (1975): Immunodepression in trypanosomiasis, Ph. D. Thesis, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, England
- 6) Harbeck, R. J., Hoffman, A. A., Hoffman, S. A., Shucard, D. W. and Carr, R. I. (1978): A naturally occurring antibody in New Zealand mice cytotoxic to dissociated cerebellar cells, *Clin. exp. Immunol.*, 31, 313-320
- 7) Hillyer, G. V. (1971): Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of hamsters and man infected schistosomes, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 136, 880-883
- 8) Hirose, S., Maruyama, N., Ohta, K. and Shirai, T. (1980): Polyclonal B cell activation and autoimmunity in New Zealand mice, *J. Immunol.*, 125, 610-615
- 9) Howie, J. B. and Helyer, J. B. (1968): The immunology and pathology of NZB mice, *Adv. Immunol.*, 9, 215-264
- 10) Jayawardena, A. N., Targett, G. A., Leuchars, E., Carter, R. L., Doenhoff, M. J. and Davis, A. J. S. (1975): T cell activation in murine malaria, *Nature (Lond.)*, 258, 149-151
- 11) Jayawardena, A. N. and Waksman, B. H. (1979): Suppressor cells in experimental trypanosomiasis, *Nature (Lond.)*, 265, 539-541
- 12) Jerusalem, C. (1968): Relationship between malaria infection (*Plasmodium berghei*) and malignant lymphoma in mice, *Z. Trop. Parasitol.*, 19, 94-108
- 13) Jones, C. E., Lewert, R. M. and Ozcel, M. A. (1976): Anti-liver antibody in rabbits infected with *Schistosoma japonicum*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 613-616

- 14) Jones, C. E. (1977): *Schistosoma japonicum*: anti-DNA responses, serum cryogelatinification, and cryoprecipitation phenomena in infected rabbits, *Exp. Parasitol.*, 42, 261-273
- 15) Kawabata, M., Hosaka, Y., Kumada, M., Matsui, N. and Kobayakawa, T. (1981): Thymocytotoxic autoantibodies found in mice infected with *Schistosoma japonicum*, *Infect. Immun.*, 32, 438-442
- 16) Kobayakawa, T., Louis, J., Izui, S. and Lambert, P. H. (1979): Autoimmune response to DNA, red blood cells and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis, *J. Immunol.*, 122, 296-301
- 17) Lehman, J. S. Jr., Higashi, G. I., Bassily, S. and Farid, Z. (1972): Rheumatoid factors in *Salmonella* and *Schistosoma* infections, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66, 125-129
- 18) Pelley, R. P., Ruffier, J. J. and Warren, K. S. (1976): Suppressive effect of a chronic helminth infection, *Schistosoma mansoni*, on the *in vitro* responses of spleen and lymph node cells to the T cell mitogens Phytohaemagglutinin and Concanavalin A, *Infect. Immun.*, 13, 1176-1183
- 19) Shirai, T. and Mellors, R. C. (1971): Natural thymocytotoxic autoantibody and reactive antigen in New Zealand Black and other mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 68, 1412-1415
- 20) Schlesinger, M. (1965): Spontaneous occurrence of autoantibodies cytotoxic to thymus cells in the sera of mice of the 129 strain, *Nature (Lond.)*, 207, 429-430
- 21) Terry, R. J. (1977): Immunodepression in parasite infections, *Immunity in Parasitic Diseases* (inserm, Paris), 172, 161-179
- 22) Wedderburn, N. (1970): Effect of cocurrent malaria infection on development of virus-induced lymphoma in BALB/C mice, *Lancet* ii, 1114-1116
- 23) Wedderburn, N. (1974): Immunodepression produced by malarial infection in mice. *Parasites in the immunized host: mechanism of survival*, *Ciba Foundation Symposium*, 25, 124-135

### 実験的各種寄生虫感染に於いて出現する 抗胸腺細胞自己抗体に関して

小早川隆敏・川端真人・朝日博子  
熊田三由・保阪幸男

*Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis*, *Nematospiroides dubius*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris*, *Hymenolepsis nana*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi* を実験的に感染させたマウス血清中に於ける補体依存性の抗胸腺細胞自己抗体の出現を, C57BL/6J マウスの胸腺細胞を標的とした trypan blue dye exclusion test で検索した。上記寄生虫感染は, 種及び感染個体により胸腺細胞殺滅効果に差はみられたが, 何れの種も同自己抗体の産生を誘導した。力価は, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni* 感染血清に於いて, 最高16倍であった。反応至適温度は, 概して 4°C であったが, 37°C の方がより強い殺滅効果を示す例もあり, 冷式型のみでなく, 温式型の抗体も関与するものと考えられる。なお同自己抗体は, マウス胸腺細胞で完全に吸収される。

## AN ONCHOCERCAL NODULE FOUND IN A JAPANESE INFECTED IN AFRICA<sup>1</sup>

HIROYUKI YOSHIMURA<sup>2</sup>, KAORU KONDO<sup>2</sup>, NOBUAKI AKAO<sup>2</sup>,  
YOSHIHIRO OHNISHI<sup>2</sup>, SHINSUKE IKADO<sup>3</sup> AND HARUO MIYAWAKI<sup>4</sup>

Received May 18 1983 / Accepted September 1 1983

**Abstract:** We report a case of onchocercal nodule (30×20×20 mm) located at the subcutaneous tissues of the left hip of a 34-year-old Japanese who had lived in the Republic of Guinea and the Gabonese Republic for one year and a half.

### INTRODUCTION

In recent years, the number of reports on the imported parasitic infections, such as malaria from tropical or subtropical countries have increased in Japan.

The present paper deals with the first case of *Onchocerca volvulus* infection of a Japanese man probably infected during residing in Africa for a year and half. The clinicopathological and parasitological findings were presented and the results of histomorphological comparison with other human and animal filarias were discussed.

### CASE REPORT

The patient is a 34-year-old male engineer living in Ina City, Nagano Prefecture, Japan. He was admitted to the hospital on March 16, 1980, because of a subcutaneous nodule located in the left upper quadrant of his left hip. He had lived in the mountainous and river-side areas of the Republic of Guinea, January to May 1974 and from October 1974 to May 1975. He suffered from bites by mosquitos and probably black flies while staying there. Then he moved to a remote village of the Gabonese Republic in May 1977 and stayed there for six months. He was afflicted with insect-bites likewise in the Republic of Guinea. Afterwards, he resided in the Hashemite Kingdom of Jordan for two months in 1978. During the stay in the Republic of Guinea, he suffered from hepatitis with jaundice and high fever (malaria?) and received medication.

In May 1979, the patient noticed a plum-size itchy mass at the upper quadrant of his left hip, the size of which gradually increased. Three years later, on March

---

1 The study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 56570159) from The Ministry of Education, Science and Culture of Japan. 2 Department of Parasitology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. 3 The Second Department of Pathology, School of Medicine, Shinshu University, Matsumoto 390, Japan. 4 Department of Orthopedic Surgery, Tenryu Kahan Hospital, Ina 396, Japan.

16, 1982, the tumor was surgically removed. The nodular mass measuring approximately  $30 \times 20 \times 20$  mm was elastic and sharply demarcated. White blood cell count before operation was 6,100/cmm and, 8 per cent of them were eosinophils. On April 23, 1983, a year after the surgical treatment, skin snip examinations were performed on the calf, iliac area, forearm and scapula of right and left sides according to the technique of Tada *et al.* (1973). No microfilaria was found in all specimens. The blood smears taken at daytime and midnight were also negative for microfilariae of any species of filarias.

#### OBSERVATION

Histologic sections of  $5 \mu\text{m}$  thickness were stained with hematoxylin and eosin, PAS, trichrome stain and Heidenhein's Azan.

Approximately 7–10 cross and oblique-longitudinal sections of the nematode were seen in fibrous granulation tissues composed of numerous mononuclear cells, some eosinophils, giant cells and collagenous connective tissues. No microfilaria, however, was found in the tissues (Figure 1).

The morphological features of the worm were relatively well preserved. The sections of the worm measured  $360 \times 220 \mu\text{m}$  on the average diameter. The cuticle was approximately 5 to  $7 \mu\text{m}$  thick and distinctly two-layered. On the outer layer of the cuticle in oblique-longitudinal sections,  $3 \mu\text{m}$  high transverse ridges regularly spaced at intervals of approximately  $40 \mu\text{m}$  were clearly seen, but some ridges were inconspicuous in other sections. The number of striae of the inner layer corresponding to every one external ridge was two (Figure 2).

The lateral chords were extensive and divided into two bands or sublateral bands, and two small round nuclei were seen at the base of the chord.

The paired uterine wall was thin and contained numerous developing embryos or microfilariae. The pigmented intestine measured 20– $40 \mu\text{m}$  in diameter were located in the body cavity near the uteri. Although, the muscle layer was somewhat degenerated, muscle cells and fibrillar elements were still recognized (Figure 3). Based on the above mentioned morphological characteristics which coincided with the features by Beaver and Orihel (1965) and Neafie (1972), the nematode was identified as an adult female *Onchocerca volvulus*.

Five months after nodulectomy, latex agglutination test on the patient's serum revealed antibody titers of 1:32 and 1:16 with *O. volvulus* and *O. gutturosa* antigens, respectively. Precipitation test using Ouchterlony's technique demonstrated two and one precipitin bands each against *O. gutturosa* and *D. immitis* antigens, respectively.

#### DISCUSSION

The filarial worm from a nodular mass in the subcutaneous tissue of this patient was identified as a female *O. volvulus*, due to its morphological features coinciding with the descriptions by Neafie (1972). This is the first record of the Japanese case infected with *O. volvulus*. The infection was seemed to be acquired in the Republic of Guinea or the Gabonese Republic which are endemic areas of onchocerciasis.

The species identification of filarial worms in sectioned tissues of man and animals has been made based on the morphological characteristics of worm size or diameter, cuticle, lateral chords, muscle layer and reproductive organ, particularly paired uteri harboring microfilariae (Beaver and Orihel, 1965; Eberhard, 1979; Orihel and Beaver, 1965). Among those morphological features, the cuticular architecture is most important; and then followed thickness, laminated structure, ridges, striations on the outer layer, number of cuticular striae in the inner layer, distance between adjacent ridges and the ratio of worm diameter to the distance between ridges. For the identification of filarial worm of the present case, it was needed to distinguish them not only from human filarias such as *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa*, *Dipetalonema perstans*, *D. streptocerca* which are widely distributing in Africa (Sasa, 1976), but also from animal *Onchocerca* such as *O. gutturosa* or *O. cervicalis*. Furthermore it must be morphologically distinguished *O. volvulus* from *D. immitis*, *D. repens* and *D. tenuis* which have been regarded as causative agents of zoonotic filariasis. Three authentic cases resembling *O. gutturosa* infection were reported by Azarova *et al.* (1965) in U. S. S. R., Siegenthaler and Gubler (1965) in Switzerland and Beaver *et al.* (1974) in U. S. A. . The cuticle of *O. volvulus* is relatively thin and the number of striae of the inner layer corresponding for each external ridge is two. On the contrary, the cuticle of *O. gutturosa* is thick and the number of striae is 3 or 4 between each ridge on outer layer, thus it is distinguishable from that of *O. volvulus*.

Some cases involving subcutaneous nodules due to *W. bancrofti* have been reported from various countries (Gupta, 1964; Miller and Moore, 1965; Cahill, 1967; Yuehan and Qun, 1981). Sixteen human cases of pulmonary infection with *D. immitis* and eight cases of cutaneous dirofilariasis have been reported from Japan (Yoshimura *et al.*, 1980; Yoshimura, 1983). The study of comparative morphology between *D. immitis* and *W. bancrofti* was made by Yoshimura *et al.* (1981). MacLean *et al.* (1979) reported a case of subcutaneous nodule with *D. repens* in Okinawa, Japan. The feature of sectioned tissues of *D. repens*, however, can be easily differentiated from those of *D. immitis* and *D. tenuis*.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank Dr. Paul C. Beaver, Professor Emeritus of Department of Tropical Medicine, Tulane University, U. S. A. for his helpful advice to identify the parasite in our present case.

#### REFERENCES

- 1) Azorova, N. S., Miretsky, O. Y. and Sonin, M. D. (1965): The first instance of detection of nematode *Onchocerca* Diesing 1841 in a person in the U. S. S. R. cited from 20
- 2) Beaver, P. C. and Orihel, T. C. (1965): Human infection with Filariae of animals in the United States, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 1010-1029
- 3) Beaver, P. C., Horner, G. S. and Bilos, J. Z. (1974): Zoonotic onchocercosis in a resident of Illinois and observations on the identification of *Onchocerca* species, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,

- 23, 595-607
- 4) Cahill, K. M. (1967): Bancroftian filarial nodule: Report of a case, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, 636-637
  - 5) Eberhard, M. L. (1979): Studies on the *Onchocerca* (Nematoda: Filarioidea) found in cattle in the United States I. Systematics of *O. gutturosa* and *O. lienalis* with a description of *O. stilesi* sp. n, *J. Parasitol.*, 65, 379-388
  - 6) Gupta, I. M. (1964): A subcutaneous nodule of the breast due to adult filarial worm, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 306-310
  - 7) MacLean, J. D., Beaver, P. C. and Michalek, H. (1979): Subcutaneous dirofilariasis in Okinawa, Japan, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28, 45-48
  - 8) Miller, M. J. and Moore, S. (1965): Nodular breast lesion caused by Bancroft's filariasis, *Canad. Med. Ass. J.*, 93, 711-714
  - 9) Neafie, R. C. (1972): Morphology of *Onchocerca volvulus*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 57, 574-586
  - 10) Orihel, J. C. and Beaver, P. C. (1965): Morphology and relationship of *Dirofilaria tenuis* and *Dirofilaria conjunctivae*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 1030-1043
  - 11) Sasa, M. (1976): Human filariasis. A global survey of epidemiology and control, University of Tokyo Press, 1976
  - 12) Siegenthaler, R. and Gubler, R. (1965): Der interessante Fall: Paraarticuläres Nematodengranulom (einheimische *Onchocerca*), *Schweiz. Med. Wochenschr.* 33, 1102-1104
  - 13) Tada, I., Iwamoto, I. and Wonde, T. (1973): Quantitative studies on the emergence of *Onchocerca volvulus* microfilariae from skin snips, *Jap. J. Trop. Med. Hyg.*, 1, 12-24
  - 14) Yoshimura, H., Akao, N., Kondo, K. and Ohnishi, Y. (1980): Human dirofilariasis in Japan. Case report and literature, *Internat. J. Zoonoses*, 7, 107-114
  - 15) Yoshimura, H., Akao, N. and Kamimura, K. (1981): Case report of the infection with *Dirofilaria immitis* in lung and *Wuchereria bancrofti* in epididymis by cross section morphology of worms in pathological specimens, *Japan. J. Parasitol.*, 30, 381-386
  - 16) Yoshimura, H. (1983): Human dirofilariasis. *Pathology and Clinical Medicine*, 1, 1392-1400
  - 17) Yuehan, C. and Qun, X. (1981): Filarial granuloma of the female breast: A histopathological study of 131 cases, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 1206-1210

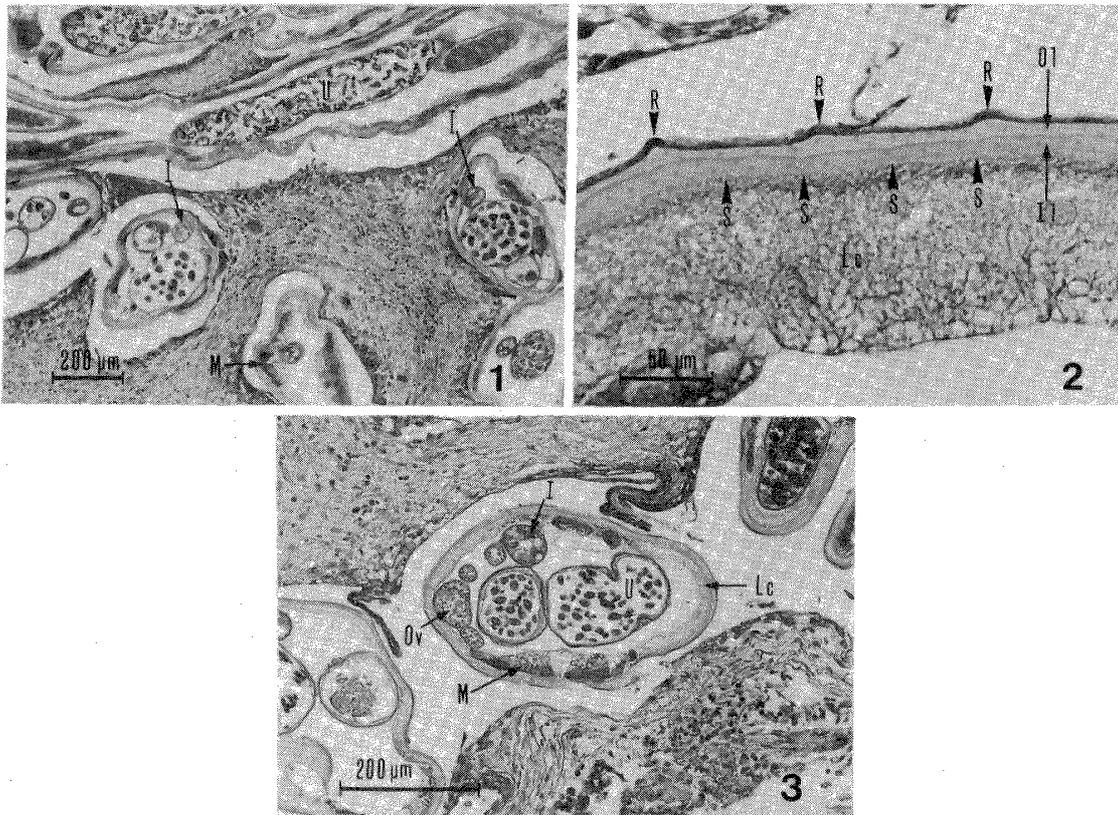


Figure 1 Transverse and longitudinal sections were surrounded by fibrous granulation tissues with giant cells. (hematoxylin-eosin stain)

Figure 2 Two-layered cuticle was clearly seen. External ridges on outer layer and striae of inner layer of cuticle were recognizable. (Heidenhain's Azan stain)

Figure 3 The transverse section of the parasite. Paired uteri, intestine, extensively developed lateral chords and muscle layers were clearly seen. (hematoxylin-eosin stain)

I: intestine II: inner layer Lc: lateral chord M: muscle layer Ol: outer layer  
 Ov: oviduct R: ridge S: stria U: uterus

## アフリカで感染したと思われる日本人のオンコセルカ腫瘍の1症例

吉村裕之<sup>1</sup>・近藤力王至<sup>1</sup>・赤尾信明<sup>1</sup>  
大西義博<sup>1</sup>・井門慎介<sup>2</sup>・宮脇晴夫<sup>3</sup>

患者は34歳男，測量技師，現在長野県伊那市に居住。主訴：左上臀部腫瘍。1974年1月より約1年間，アフリカギニア共和国の山岳河川流域で測量工事に従事。1977年5月より約半年間，ガボン共和国にてギニアと同様の環境で生活従業した。この間，飛来昆虫による刺咬に甚しく悩まされた。帰国後の1979年，左上臀部に腫瘍を認め次第に増大した。1982年3月16日皮下腫瘍摘出術施行。腫瘍の大きさ 30×20×20mm。剖面灰白色結合織性。病理組織所見：多数の好酸球と円形細胞の浸潤を伴う限局性線維性肉芽組織内に線虫の断面像を7～10箇認める。虫体横断像で大きさ 360×220 $\mu$ m（平均），角皮の厚さは5～7 $\mu$ mで2層からなり，外層にほぼ40 $\mu$ mの間隔で突起（transverse ridges）が配列している。内層には前記の各突起間に2本の線条（striae）が認められる。体腔内に2箇の子宮腔の断面があり，腔内には発育卵細胞とマイクロフィラリアが多数認められる。以上の形態学的所見を Neafie (1972), Beaver and Orihel (1965) らの記載と照合して *O. volvulus* の雌成虫と同定した。本例は日本人の *O. v.* 感染例として最初の報告例である。

## THE PREVALENCE OF INTESTINAL PROTOZOA IN NAIVASHA, KITUI, MACHAKOS, TAVETA AND NANDI HILLS AREAS IN KENYA\*

MOTOHIRO ISEKI<sup>1</sup>, KAORU HAYASHI<sup>2</sup>, SIMON M. GATIKA<sup>3</sup>  
AND T. K. ARAP SIONGOK<sup>3</sup>

Received July 18 1983 / Accepted October 1 1983

**Abstract:** During the period from May to November in 1980, a total of 2,114 stool specimens were collected from individuals living in Naivasha, Kitui, Machakos, Taveta and Nandi Hills areas in Kenya, and they were examined for intestinal protozoa by formol-ether concentration method followed by idoine-staining.

Out of 2,114 specimens 673 (31.8%) were positive for *Entamoeba histolytica*, 1,105 (52.3%) for *Entamoeba coli*, 102 (4.8%) for *Endolimax nana*, 184 (8.7%) for *Iodamoeba bütschlii*, 176 (8.3%) for *Giardia lamblia*, and 220 (10.4%) for *Chilomastix mesnili*. The total positive rate, which means the percentage of positive persons for any kinds of intestinal protozoa, was 75.1 per cent.

### INTRODUCTION

In developing countries in tropical area, the health of people and the socio-economical development have been seriously damaged and hampered by parasitic diseases. The same is true in Kenya. Malaria, trypanosomiasis, leishmaniasis and other helminthic diseases are widespread. For the purpose of controlling these parasitic diseases many researchers in KEMRI (Kenya Medical Research Institute), KETRI (Kenya Trypanosomiasis Research Institute), DDC & R (Division of Disease Control and Research, Ministry of Health), ICIPE (International Center of Insect Physiology and Ecology), University of Nairobi and some other laboratories have made various efforts. However, there have been few reports relating to the epidemiological survey on the intestinal protozoa in Kenya.

The infection of intestinal protozoa, including some medically important species such as *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*, occurs through the intake of food and water contaminated with the faecal material containing protozoal cysts. Therefore, the incidence of intestinal protozoa in a certain area may indicate the level of sanitary conditions in the respective area.

---

1 Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School, Osaka 545, Japan. 2 Department of Virology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan. 3 Division of Disease Control and Research, Nairobi, Kenya.

\* This work was carried out under the Communicable Disease Research and Control Project of Kenya-Japan Medical Cooperation Program, supported by the Japan International Cooperation Agency, started in 1979.

In this report, the authors present the result of stool examinations carried out in several areas of Kenya during the period from May to November in 1980. The objective was to make clear the prevalence of intestinal protozoa in Kenya and to provide with a guide in planning the communicable disease control program by the Government of Kenya.

#### MATERIALS AND METHODS

A total of 2,114 stool specimens were collected from individuals living in Naivasha, Kitui, Machakos, Taveta and Nandi Hills during the period from May to November in 1980. Most of specimens were originally collected for the study of schistosomiasis by the staff members of Division of Disease Control and Research (DDC & R), Ministry of Health, Nairobi. The location where this survey was conducted is shown in Figure 1. The number of specimens and the type of population in each location are shown in Table 1.

The stool specimens were emulsified in 10 per cent formol-saline at each location, and transported to the laboratory of DDC & R, Nairobi. After the helminthic ova examination, the specimens were used for the present study. They were examined by formol-ether concentration method followed by iodine-staining.

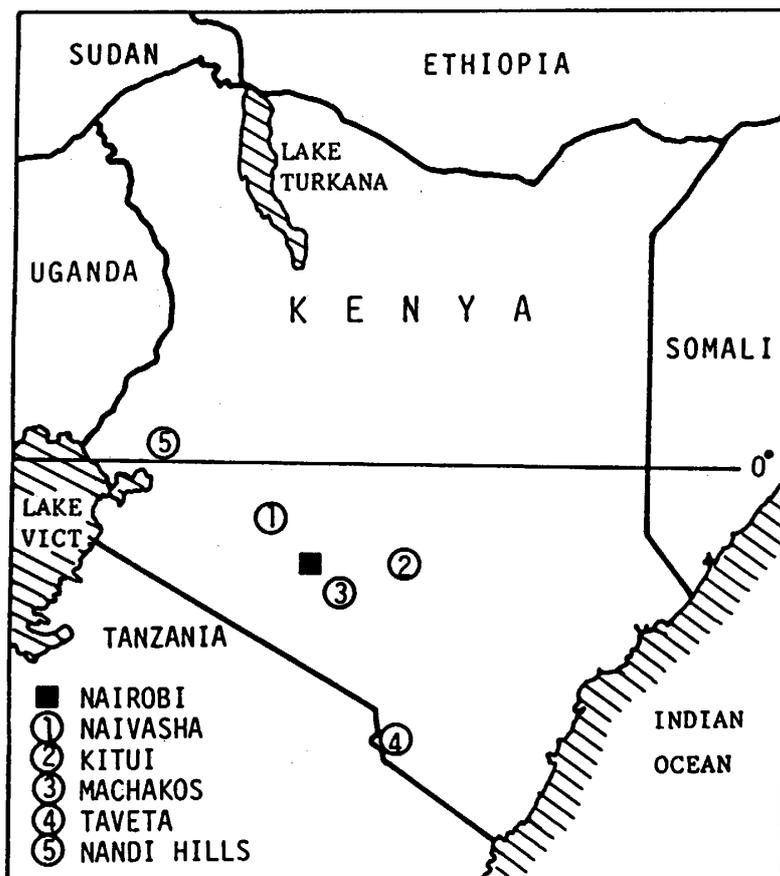


Figure 1 Map of Kenya showing locations where this survey was conducted.

Table 1 Stool specimens examined

Location	Type of population	Number of specimen
Naivasha	Farmers and their families	276
Kitui	General inhabitants	980
Masinga		
Migwani		
Mutonguni		
Machakos	Primary school children	780
Kangundo		
Taveta	General inhabitants	43
Nandi Hills	Primary school children	35
Total		2,114

## RESULTS

The prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba bütschlii*, *Giardia lamblia* and *Chilomastix mesnili* in each location is shown in Table 2. The infection rates of *E. histolytica*, *E. coli*, *G. lamblia* and *C. mesnili* by age and by sex are shown in Table 3 and Table 4 respectively.

The results are summarized as follows;

*E. histolytica*

Out of 2,114 specimens examined 673 (31.8%) were positive for this parasite. The highest positive rate was 35.1 per cent in Machakos and the lowest was 27.9 per cent in Taveta. By age, the lowest positive rate, 20.0 per cent, was seen in the youngest age group (0-4 years old). The rates gradually increased up to the middle age group and, thereafter, declined slightly. The highest positive rate appeared in the age group of 40-49 years old. The infection rates in the male and female were 27.8 per cent and 32.5 per cent respectively, but there was no

Table 2 Prevalence of intestinal protozoa in Naivasha, Kitui, Machakos, Taveta and Nandi Hills

Location	Number examined	Percentage of infection						Total positive rate (%)
		<i>E. hist.</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. nana</i>	<i>I. büts.</i>	<i>G. lamb.</i>	<i>C. mesn.</i>	
Naivasha	276	34.1	44.2	2.9	5.8	5.6	22.5	75.0
Kitui	980	28.8	46.4	5.0	9.0	7.9	9.6	70.6
Machakos	780	35.1	63.3	4.7	9.2	10.0	7.4	81.4
Taveta	43	27.9	51.2	2.3	11.6	2.3	2.3	64.0
Nandi Hills	35	31.4	34.3	20.0	8.6	17.1	14.3	74.3
Total	2,114	31.8	52.3	4.8	8.7	8.3	10.4	75.1

Table 3 Infection rates of intestinal protozoa among various age groups in Naivasha and Kitui

Age group (years)	Number examined	Percentage of infection			
		<i>E. hist.</i>	<i>E. coli</i>	<i>G. lamb.</i>	<i>C. mesn.</i>
0-4	125	20.0	26.4	16.8	6.4
5-9	321	25.5	42.4	10.0	10.6
10-14	243	34.6	46.1	8.2	13.2
15-19	135	33.3	50.4	5.2	13.3
20-29	151	35.8	55.6	5.3	12.6
30-39	103	30.1	57.3	1.9	16.5
40-49	64	43.8	64.0	1.6	15.6
50-59	46	30.4	54.3	2.2	21.7
60-69	34	32.4	58.8	2.9	20.6
70-	22	22.7	54.5	0	13.6
Total	1,244	30.4	46.9	7.3	12.9

Table 4 Infection rates of intestinal protozoa by sex in Naivasha and Kitui

Sex	Number examined	Percentage of infection			
		<i>E. hist.</i>	<i>E. coli</i>	<i>G. lamb.</i>	<i>C. mesn.</i>
Male	564	27.8	42.4	7.3	11.0
Female	680	32.5	50.7	7.4	14.4

statistically significant difference detected between them by  $X^2$ -test.

#### *E. coli*

*E. coli* was the most common species among the intestinal protozoa detected, and evenly widespread in each location. The highest infection rate was 63.3 per cent in Machakos and the average in five locations was 52.3 per cent. The change of its infection rate by age showed the same tendency as the case of *E. histolytica*. The infection rate in female, 50.7 per cent, was higher than in male, 42.4 per cent. This difference is statistically significant ( $P < 0.01$ ) in  $X^2$ -test.

#### *E. nana* and *I. bütschlii*

Positive rates of these two species were rather low. The average rates in five locations were 4.8 per cent for *E. nana* and 8.7 per cent for *I. bütschlii* respectively.

#### *G. lamblia*

The average positive rate for this parasite was 8.3 per cent. The highest rate, 16.8 per cent, was seen at the youngest age group. The rate gradually declined as the host ages became older, and especially it became extremely low at the age of 30 onward. There was no significant difference in the infection rates between the male and female in  $X^2$ -test.

*C. mesnili*

The highest, the lowest and the average positive rates for this species were 22.5, 2.3 and 10.4 per cent respectively. The lowest positive rate among age groups was 6.4 per cent in the youngest age group. Among other age groups and between the male and female there was no significant difference in the infection rate.

## Total positive rate

The total positive rate, which means the percentage of infected persons with any kinds of intestinal protozoa, was 75.1 per cent on the average. The highest one was 81.4 per cent in Machakos and the lowest one was 60.0 per cent in Taveta.

## Other intestinal protozoa detected

*Entamoeba hartmanni* and *Trichomonas hominis* were detected in a few cases, but *Balantidium coli* and isosporan oocysts were not detected.

## DISCUSSION

The Republic of Kenya stands almost exactly astride the Equator. However, the climate of all the locations where this survey was conducted is different from the normal limits of the textbook type of an equatorial region with its high temperature, high humidity, thick forests and heavy rainfall. The locations, except Taveta, lie on the highlands of this country. Their actual altitudes are between 1,000–2,000 m. In Nairobi, for example, temperatures are as follows; absolute maximum: 29.7°C, mean maximum: 23.6°C, mean minimum: 11.6°C, and absolute minimum: 2.5°C. The relative humidity at 3 p.m. in Nairobi, is about 50 per cent, and the mean annual rainfall is 750 to 1,000 mm. In Kenya there are two main rainy seasons; the long rains from March to May and the short rains from November to December. The climate of Naivasha, Kitui, Machakos and Nandi Hills is roughly the same as of Nairobi. Taveta locates at the foot of Mt. Kilimanjaro, near Kenya-Tanzania border, and its altitude is about 500 m. Therefore, the annual mean temperature is a little higher than other locations.

The inhabitants of these locations are mainly engaged in maize, wheat, cotton, sugar, banana and, partly in Taveta, sisal production.

The stool specimens for this survey were collected from May in the long rains, through the dry season, to November in the short rains. The main purpose of this work was to make the prevalence of intestinal protozoal infections clear in each locations. Therefore, analysis of the seasonal results was not done.

Although the iron hematoxylin staining or the trichrome staining method is recommended for the identification of amoeba species, the formol-ether concentration method followed by iodine staining was carried out in this work. Because, all the specimens had been fixed in 10 per cent formol-saline at each location for the purpose of the detection of schistosoma eggs prior to the examination of protozoa.

The results show that the intestinal protozoal infection is widespread in Kenya. About 75 per cent of specimens examined were positive for one or more protozoal

species. It is noticeable that a considerable number of children less than 5 years old has already been highly infected. This result was obtained from a single examination per person. As an infected patient does not always discharge cysts, the actual positive rate should be higher than this result in reality.

Among the intestinal protozoa detected the most common species was *E. coli* followed by *E. histolytica*, *C. mesnili* and *G. lamblia*. The life cycle of these parasites is rather simple. The infective cysts, which are resistant to environmental changes, are passed out in the faeces of infected persons, and then they are ingested by a new host. Drinking water and food, therefore, are most likely highly contaminated with faecal materials in the locations where this work was conducted.

Odhiambo and Konyango (1980) reported the prevalence of intestinal protozoa in an urban situation in Kisumu Municipality near Lake Victoria in Kenya, they stated that out of 1,432 stool specimens 338 (26.3%) were positive for amoebic infection. Kamunvi and Situbi (1981) reported the prevalence of intestinal protozoa in rural communities in South Nyanza, Kisumu Municipality. They showed that out of 906 patients 26.7 per cent were positive for *E. histolytica*, and 31.6 per cent for *E. coli*. As the stools were examined by direct method in these two surveys, the positive rates in their data might be lower than the rate obtained by concentration method as shown in the present data.

As our results and these two reports show, it is clear that *E. histolytica* infection is widespread in Kenya. And, as Rees *et al.* (1974) has already pointed out, amoebic dysentery and amoebic liver abscess are also not uncommon problem in Kenya, although the incidence of these invasive amoebiasis are not clear both in the country as a whole and in individual districts.

For the prevention and control of these parasitic diseases, it is important to promote (1) the mass-survey and treatment, (2) improvement of sanitary environment, (3) education of hygiene for school children and, finally, (4) massive campaign against parasitic diseases for general public.

These parasite control measures gave a good successful result in Japan. Morishita (1975) described on it, an excerpt of which is as follows;

The parasitic infection was originally quite common in Japan. Indeed, the result of the stool examination carried out during 1922–1926 showed that out of 1,157,322 specimens 709,438 (61.3%) were positive for *Ascaris*, 269,656 (23.3%) for hookworm, and the total egg positive rate was 73.8 per cent. Though its incidence declined year by year until the Second World War, its infection occurred explosively after the War. In 1950, the total egg positive rate in 7,026,499 specimens examined rose again to 63.8 per cent. Then the national attention focussed to this problem and the nationwide parasite control activities started. Besides the Health Center's activity, the Japan Association of Parasite Control was organized and its activities started in many Prefectures in 1949. The juridical ground of the parasite control activities in Japan is 'The Parasite Control Act (1931)'. Since the parasite infection after the last War became a serious public health problem, the Ministry of Health and Welfare stipulated in order to clarify the details of control operation. They were: 'General Essentials of Parasite Control (1959)', 'Essentials of Mass-Treatment of *Ascaris* and Hookworm Infection (1960)', and 'Mass-Treatment of Pinworm Infection

(1960)' etc. 'School Hygiene Act (1958)' enacted by the Ministry of Education stipulated that primary, secondary and high school pupils should undergo examination for *Ascaris* and hookworm at least once a year. In 1960 the Act was partly revised to include all kinds of parasites found in pupils' stool examination. Since these operations started, the incidence of all kinds of parasites has been remarkably reduced year by year. In 1965, the result of the stool examination on 12,720,315 specimens showed that the total egg positive rate became 8.7 per cent. And, at last, the rate fell to 0.49 per cent in 1980.

Among several Asian countries, The Asian Parasite Control Organization was founded and its cooperative activities started in 1974. Good results have been accumulating in these member countries.

Also in African countries including the Republic of Kenya, the soil-transmitted parasite is a quite big problem as well as the vector born parasite such as *Plasmodia* and *Schistosoma*. The most important measure for the control of parasitic diseases must be the mass-survey and the mass-treatment. For performing this operation, a suitable system and actual Acts should be prepared.

Though it may take a long period of time and require intensive efforts to control the parasitic diseases, it can be done with satisfactory results as proven in Japan.

#### ACKNOWLEDGEMENT

We wish to thank Mr. M. Masika, a laboratory assistant, and other staff members of the Helminthology Section of DDC & R, Nairobi, for their warm cooperation in performing this investigation.

#### REFERENCES

- 1) Kamunvi, F. and Situbi, A. P. (1981): A pilot study of the prevalence of human intestinal protozoa among patients attending rural health units in South Nyanza, 2nd Annual Medical Conference of Kenya Medical Research Institute and Kenya Trypanosomiasis Research Institute, Nairobi
- 2) Morishita, K. (1975): The Japan Association of Parasite Control and its activities, The Japan Association of Parasite Control, Tokyo
- 3) Odhiambo, J. and Konyango, M. (1980): Study on the prevalence of intestinal protozoa in Kisumu Municipality, 1st Annual Medical Conference of Kenya Medical Research Institute and Kenya Trypanosomiasis Research Institute, Nairobi
- 4) Rees, P. H., Mngola, E. N., O'leary, P. and Pamba, H. O. (1974): Vogel, L. C., Muller, A. S., Odingo R. S., Onyango, Z. and Geus, A. D. (ed) Health and disease in Kenya, 339-346, East African Literature Bureau, Nairobi

## ケニア諸地域住民の腸管寄生原虫感染状況

井関基弘<sup>1</sup>・林 薫<sup>2</sup>・SIMON M. GATIKA<sup>3</sup>  
T. K. ARAP SIONGOK<sup>3</sup>

1980年5月から11月の間にケニアの Naivasha, Kitui, Machakos, Taveta 及び Nandi Hills の住民 2,114人から採取した糞便についてホルマリン・エーテル法により腸管寄生原虫のシストの検査を行い感染状況を調査した。

その結果、赤痢アメーバは31.8%、大腸アメーバは52.3%と極めて高率を示し、その他は小形アメーバ4.8%、ヨードアメーバ8.7%、ランブル鞭毛虫8.3%、メニール鞭毛虫10.4%であった。腸トリコモナス及び *Entamoeba hartmanni* も少数例検出されたが、大腸バランチジウムやイソスポーラなどは検出されなかった。総陽性率（陽性総数/検査総数）は75.1%にも及び、飲料水、食物など生活環境が糞便によって高度に汚染されていることが示唆された。陽性率に男女間の有意差は認められなかった。年齢別にみると、4歳以下の乳幼児でもすでにかなり高率に感染がみられるが、ランブル鞭毛虫を除き、特に30歳代から40歳代で最高値を示した。ランブル鞭毛虫は若年齢層ほど高い陽性率を示し、4歳以下が最高であった。

本調査は日本国際協力事業団 (JICA) の医療協力「ケニア伝染病研究対策プロジェクト」の一環として行われたものであり、その撲滅対策を、戦後日本で実施され成果をあげた寄生虫予防対策事業との関連において考察した。

---

1 大阪市立大学医学部医動物学教室 2 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門（現在：大分県公害衛生センター） 3 ケニア共和国保健省

## 短 報

青年海外協力隊員の消化器系寄生虫  
検査成績 (1981, 1982)山浦 常・白坂 龍曠・松本 克彦  
和田 芳武・小林 和代・岡本 雅子

昭和 58 年 3 月 2 日 受付 / 昭和 58 年 6 月 1 日 受理

著者ら (山浦ら, 1976, 1981) は, 輸入消化器系寄生虫病の現状について調査してきた。今回は, 1981年から1982年度に帰国した, 青年海外協力隊の隊員 716名 (男性602名, 女性114名) について引続き調査した。隊員の滞在期間は2年以上, 滞在地の内訳は Table 2 の如く26カ国である。隊員の寄生虫検査は, 前回同様, ホルマリン・エーテル法, 硫酸亜鉛遠心浮遊法, 試験管濾紙培養法の3法で行った。原虫類のシストの検出にはヨード染色を用い, アメーバ類の同定には別にハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色を行った。

前報 (山浦ら, 1981) の成績を含めた帰国年度別寄生虫感染率は Table 1 の通りである。本調査での感染率は28.4%及び23.2%, 6年間合計の感染率は28.2%で共に前報で対照とした渡航前の隊員の感染率2.5%より有意に高率であった ( $P < 0.001$ )。前報合計の感染率30.7%と本報合計の感染率を比較すると, 本報に若干感染率の低下が認められる ( $P < 0.05$ )。原虫感染率は, 前報23.5%, 本報21.5%とほとんど変化はなかったが, 線虫感染率は前報の14.4%に対し本報では9.2%と低下した ( $P < 0.01$ )。性別感染率は, 男性26.6%, 女

Table 1 The cases of intestinal parasite infection among Japan Overseas Cooperation Volunteers who returned from developing countries and their infection rates (1977-1982)

Year	No. examined	Positive cases (%)	Cases parasitized by		
			Nematoda (%)	Trematoda Cestoda (%)	Protozoa (%)
1977	115	35 (30.4)	15 (13.0)	4 (3.5)	27 (23.5)
1978	225	73 (32.4)	41 (18.2)	6 (2.7)	47 (20.9)
1979	284	82 (28.9)	38 (13.4)	3 (1.1)	65 (22.9)
1980	126	40 (31.7)	14 (11.1)	3 (2.4)	37 (29.4)
Subtotal	750	230 (30.7)	108 (14.4)	16 (2.1)	176 (23.5)
1981	328	93 (28.4)	31 (9.5)	7 (2.1)	79 (24.1)
1982	388	90 (23.2)	35 (9.0)	5 (1.3)	75 (19.3)
Subtotal	716	183 (25.6)	66 (9.2)	12 (1.8)	154 (21.5)
Total	1,466	413 (28.2)*	174 (11.9)	28 (1.9)	330 (22.5)

\* The infection rate in volunteers before departure was 2.5 per cent (5/198) (Yamaura *et al.*, 1981)

性20.2%で、男女間の感染率に有意差は認められない。

1981—1982年度帰国隊員の虫種別、滞在国別寄生虫感染状況は Table 2 に示した。中でもランブル鞭毛虫感染者が90名 (12.6%) と最も多く、赤痢アメーバが16名 (2.2%) に検出された。寄

生虫感染者183名中2種感染24名 (13.1%), 3種感染11名 (6.0%), 4種以上感染3名 (1.6%) が認められ、混合感染の割合は高率であった。隊員が滞在した26カ国のうち、バングラデシュ隊員の感染率68.0%とネパール隊員の56.1%が他の国合計の感染率に比べて有意に高く ( $P < 0.001$ ), モ

Table 2 The countries where volunteers visited and the cases of intestinal parasite infection (1981-1982)

Country	No. examined	Positive cases (%)	Cases of intestinal parasite infection													
			*Al.	Tt.	Hw.	Het.	Opi.	Tae.	Eh.	Ec.	En.	Ib.	Ih.	Ibe.	Gl.	Cm.
Bangladesh	50	34 (68.0)	2	7	3	2	2		2	2	5				20	
Nepal	41	23 (56.1)	5	17						1	3	2			4	
Maldives	3															
Philippines	72	24 (33.3)	2	10		1			3	1	4				10	1
Malaysia	56	10 (17.9)		2	2						1				5	
Syria	20	10 (50.0)	4			1			1	2			1		6	
West Samoa	21	4 (19.0)			1				1	1					2	
Tonga	3	1									1					
New Guinea	3															
Solomon	3	3			3											
Honduras	27	8 (29.6)		4	1	1									5	
Costarica	20	3 (15.0)				1						1	1			
Peru	1															
Bolivia	8	3	1											1	1	
Paraguay	17	6			1	1					1	3			3	
Tunisia	16	3							1	1					2	
Morocco	30	1 (3.3)													1	
Senegal	1															
Ghana	34	9 (26.5)							5		1			1	4	
Liberia	6	1													1	
Kenya	105	10 (10.0)				1		1	1	2	2				4	
Tanzania	41	14 (34.1)				1			1	2	2	1			11	
Zambia	26	3 (11.5)									1				2	
Marawi	101	9 (8.9)		1					1	2	1				6	
Ethiopia	9	4								1			1		3	
Botswana	2															
Total	716	183	14	41	11	9	2	1	16	20	19	1	7	1	90	1
%		25.6	2.0	5.7	1.5	1.3	0.3	0.1	2.2	2.8	2.7	0.1	1.0	0.1	12.6	0.1

\* Al.: *Ascaris lumbricoides*, Tt.: *Trichuris trichiura*, Hw.: Hookworm, Het.: Heterophyidae, Opi.: Opisthorchioidea, Tae.: *Taenia* sp., Eh.: *Entamoeba histolytica*, Ec.: *E. coli*, En.: *Endolimax nana*, Ib.: *Iodamoeba bütschlii*, Ih.: *Isospora hominis*, Ibe.: *I. belli*, Gl.: *Giardia lamblia*, Cm.: *Chilomastix mesnili*.

ロッコ, ケニア, マラウイでは有意に低かった。

滞在国における感染虫種についてみると, アジア地域 (中近東を含む), 太平洋地域では線虫感染者がおのおの54名 (22.3%), 4名 (13.3%) に対し, 原虫感染者はおのおの74名 (30.6%), 5名 (16.7%) でほぼ同程度であった。一方, 中南米地域, アフリカ地域では線虫感染者おのおの7名 (9.6%), 1名 (0.3%) に対し原虫感染者はおのおの16名 (21.9%), 61名 (16.4%) で線虫感染率の低い点が目立った。前述の線虫感染率が前報より低下しているのは, アジア地域における鞭虫を中心とした線虫感染率が, 前報では29.5%あったものが本報では22.3%に低下したことが要因の1

つと思われる ( $P < 0.05$ )。なお, ガーナ隊員34名中5名 (14.7%) に赤痢アメーバが認められたことは注目された。

前報後, 渡航前の隊員については, 寄生虫病に対する教育の強化が行われているが相変わらず輸入寄生虫感染の多いことは否めない。前回の調査成績に比べて, 本報の感染率に若干の低下が認められることが渡航前の教育の効果であるならば幸いである。

青年海外協力隊事務局野村忠策氏, 同診療室各位, 及び当教室員の協力に感謝します。

#### 文 献

- 1) 山浦 常, 和田芳武, 松本克彦, 鈴木雅子, 白坂龍曠 (1976): 海外駐在員の寄生虫感染—青年海外協力隊員の感染状況から—, 熱帯, 10 (1), 18-20
- 2) 山浦 常, 松本克彦, 和田芳武, 小林和代, 岡本雅子, 白坂龍曠 (1981): 海外長期滞在者の消化器系寄生虫検査, 寄生虫誌, 30 (1), 85-89

**Short communication****A SURVEY ON INTESTINAL PARASITE INFECTION  
OF JAPAN OVERSEAS COOPERATION  
VOLUNTEERS (1981-1982)**

HISASHI YAMAURA, RYUKOH SHIRASAKA, KATSUHIKO MATSUMOTO,  
YOSHITAKE WADA, KAZUYO KOBAYASHI AND MASAKO OKAMOTO

Received March 2 1983 / Accepted June 1 1983

The stool examinations on long-term visitors to developing countries were carried out to investigate the epidemiology of parasitosis imported to Japan. The subjects of the investigation were 716 Japan Overseas Cooperation Volunteers who returned in 1981-1982. The infection rates of parasitosis among the volunteers before departure (Yamaura *et al.*, 1981) were compared as controls of this survey. Formalin-ether sedimentation method, zinc sulfate centrifugation-flotation method and Harada & Mori's test-tube cultivation method were used for stool examination. Rizopoda was identified by Hydenhain's iron-hematoxylin staining.

The results are summarized in Table 1 and Table 2:

- 1) The infection rates among returned volunteers (28.4% in 1981 and 23.2% in 1982) were much higher than the rate before departure (2.5%, 5/198) (Table 1). No relation between infection rate and sex of the volunteers was recognized.
- 2) The highest infection rate was found for *Giardia lamblia* (12.6%, 90/716). *Entamoeba histolytica* was observed in 2.2 per cent (16/716). High infection rate of *E. histolytica* was observed among the volunteers returned from Ghana (14.7%, 5/34). More than two species of parasites were found in 20.7 per cent of positive cases (Table 2).
- 3) The infection rates of volunteers returned from Bangladesh and from Nepal were 68.0 per cent and 56.1 per cent respectively.

These two rates were found to be significantly higher than that from other 24 countries. The ratio of helminth infection to protozoa infection in African and Central- and South American countries was lower than that in Asian and Oceanian countries (Table 2).

## 日本熱帯医学会第7回九州支部総会講演要旨

会期：昭和58年1月23日（日）  
会場：福岡大学医学部第2中講堂  
会長：福岡大学医学部 木船 悌嗣

### Special Guest Report Speech

#### Onchocerciasis in Guatemala

J. Onofre Ochoa Arguirre (Department of Robres Diseases, National Malaria Eradication Services, Guatemala)

### 特別講演

#### I 熱帯地域の水質と寄生虫感染

藤田 紘一郎 (長崎大・医・医動物)

#### II ハブ—その毒と駆除—

木原 大 (鹿児島大・医・第二病理)

### 一般講演

#### 1 ビルハルツ住血吸虫症患者尿中における虫卵周囲沈降反応

平田 瑞城 (久留米大・医・寄生虫)

嶋田 雅暁 (長崎大・熱帯医研・寄生虫)

D. Koech, E. Wambayi (DVBD, Kenya)

#### 2 日本住血吸虫と Manson 住血吸虫の虫卵物質の好酸球遊走活性について

大橋 真, 堀井洋一郎, 石井 明

(宮崎医大・寄生虫)

#### 3 ベネズエラで経験したスナノミ症

多田 功 (熊本大・医・寄生虫)

鈴木 博

(長崎大・熱帯医研・ウイルス)

高岡 宏行 (大分医大・医動物)

野田 伸一 (鹿児島大・医・医動物)

#### 4 グアテマラ産 *Simurium ochraceum* の唾腺染色体分析

平井 啓久 (熊本大・医・寄生虫病)

上本 驥一

(グアテマラ・オンコセルカ症プロジェクト)

#### 5 キンバラナガハシカにみられる酵素多形

塚本 増久, 堀尾 政博

(産業医大・医動物)

宮城 一郎 (琉球大・医・医動物)

#### 6 インドネシアにおけるネッタイシマカ及びヒトスジシマカの生態とデング熱ウイルスに対する感受性について

小田 力 (長崎大・医・医動物)

五十嵐 章

(長崎大・熱帯医研・ウイルス)

森 章夫 (長崎大・医・医動物)

堀田 進

(神戸大・医・国際交流センター)

#### 7 狂犬病ウイルス赤血球凝集抑制 (HI) 試験実用の試み

万年 和明, 石川 和正, 三舟求真人

(大分医大・微生物)

#### 8 ケニア国におけるロタウイルス検出の年間推移

牧野 芳大

(長崎大・熱帯医研・ウイルス)

松本 一郎 (岩手医大・細菌)

千葉 靖夫 (札幌医大・小児科)

O. A. Mohammed, P. O. Ogaja,

A. M. Kibue, J. M. Muli,

G. W. Nakitare (VRC, Kenya)

- 9 ケニア国における細菌性下痢症の疫学調査  
宇都宮明剛, 森 賢治, 林 敏明,  
岩永 正明, 内藤 達郎  
(長崎大・熱帯医研・病原細菌)
- Z. W. Gatheru, F. Sang, N. Koske  
(KEMRI, Kenya)
- J. N. Kaviti (NPHLS, Kenya)
- 10 暑熱順化の形成機序に関する研究  
小坂 光男, 土屋 勝彦, 井元 孝章,  
大渡 伸, 藤原真理子  
(長崎大・熱帯医研・疫学)
- 11 ラテンアメリカにおける社会医学的諸問題  
—特にブラジル北東部の課題評価とラテン  
アメリカにおける健康指標の多変量解析—  
山口 誠哉, 加納 克己, 城石 幸博  
(筑波大・社会医学)
- 12 戦後沖縄の医療事情とその社会的背景  
照屋 寛善, 平良 一彦, 宮城 重二  
(琉球大・医・保健・保健管理)

### 海外レポート

- 1 ベネズエラ  
多田 功 (熊本大・医・寄生虫病)
- 2 ケニア  
野島 尚武 (鹿児島大・医・医動物)
- 3 サモア  
木村 英作 (長崎大・熱帯医研・寄生虫)
- 4 中華人民共和国  
石井 洋一 (九大・医・寄生虫)

## Special Guest Report

### ONCHOCERCIASIS IN GUATEMALA

J. Onofre Ochoa A.

Department of Robles Diseases (Onchocerciasis)  
National Malaria Eradication Service  
Guatemala, Guatemala C. A.

After several times of negotiation, the cooperative project of the Government of Japan and Republic of Guatemala for research and control of the onchocerciasis was established in July 1975. A five years plan including the preparatory, attack and evaluation phases, start in October 1975. In May 1980, JICA extend the project for another three consecutive years (1981 to 1983) in order to establish the effective methods for vector control and suggest the future plan to be widely applicable in Guatemala.

During the period, 43 Japanese experts and 28 Guatemalan people from different academic level worked together on research and vector control. Until now in the present time actually there are about 60 peoples including Japanese experts. The project will be end this year in September 1983.

Until now forty scientific papers were published and about 45 more will be also published at the end of the project.

After the first extensive study made by Dalmat in 1955, a lot of new information on Guatemala onchocerciasis had been added by Japanese experts in our project and most of them can be acquired in the available data already published. The most revelant results obtained are: a) the possibility of carry out a vector control using larvicide for interrupt the transmission of the onchocerciasis. b) to discover that the more efficient vector in Guatemala is *S. ochraceum*. c) to find and select the main streams in which *S. ochraceum* breed. d) to clear that *S. ochraceum* is not a single species but a species complex in which are at least four subspecies. e) to establish a practical and standardized methods for diagnosis.

With regards to the first successfully experimental control with Temephos (abate) in a small scale, the application has been extended to the other region of the Pilot Area of San Vicente Pacaya, Escuintla. The preliminary results show marked reduction of the blackfly population, mainly in *S. ochraceum* the main target.

At the present time, there is no possibility to use chemoterapy or prophylaxis in the control program as a mass treatment but experimental trials with DEC has been conducted at one of the hospital, with good-results. There is also the possibility to launch in 1983 a small scale experimental mass treatment with DEC in one of the localities of the endemic area. Several experimental investigations which were done from the begining of the project are still under observation, specially those in the immunological and entomological side.

The investigations for vector control and the onchocerciasis eradication are satisfactory and progressing every day, but biside the progress and the basic information obtained, we are facing one of the more delicated year, because this year is the end of our project and we Japanese and Guatemalans must obtain promissory results and to prepare the recomendations for future vector control in Guatemala.

If the program suddenly stopped in September 1983, there would be Chaos in the maintainance of Onchocerciasis Department and, frankly speaking, I don't know exactly what will be the future of our program if JICA abandon his medical cooperation. We are very worry about this problem and one of our delirium is how to obtain financial budget to follow the recomendations given by the Japanese

mission. Also we are worry because we are confronting the presence of qualified and trained technicians to continue the eradication of the onchocerciasis and to maintain the valued equipment donated by JICA for this project.

The main objective in mind is to launch a integral vector control in the endemic areas, step by step, following the recomendations and suggestions of the Japanese mission. If it will not be possible our near control is to choose a more economical way such as nodulectomy and to continue investigating the feasibility of the eradication of the onchocerciasis. Chemotherapy as a complement, seems suitable way if we can use as a mass treatment.

## 特別講演 I

## 熱帯地域の水質と寄生虫感染

藤田紘一郎 (長崎大・医・医動物)

最近、わが国企業の熱帯地域への進出及び一般邦人の渡航が著しく増加しているが、彼らが熱帯地域で罹患し、苦しんでいる病気は、A型肝炎、腸チフス、アメーバ赤痢などの経口感染症である。

我々は、これらの経口感染症の重要な感染源が、熱帯地における飲料水にあると考え、世界各地の発展途上国の飲料水を細菌学的及び化学的に調査した。同時に、飲料水とこれら経口感染症との関連をみるため、これらの飲料水を使用している邦人の腸管寄生虫の感染率を調べた。なお、別に、邦人の子供を対象にセロファンテープ法による蟯虫検査を行った。

その結果、在留邦人の糞便から主として回虫卵が見出され、その他、鞭虫、無鉤条虫、肝吸虫などの虫卵が検出された。腸管寄生虫感染率はインドネシア在留邦人に最も高く、次いで、南西アジア、東アフリカ、中南米などに在留する邦人の順であり、中近東のカタール在留邦人の場合は全員陰性であった。また、これらの在留邦人が飲用している水から、多くの割合で大腸菌群が検出され、この割合と邦人の腸管寄生虫陽性率との間に、高い相関( $r=0.957$ )が認められた。しかし、寄生虫感染率と飲料水の過マンガン酸カリ消費量との間には相関関係は見出されなかった。また、在留邦人の子供を対象に施行した蟯虫感染の有無は、飲料水の汚染とは全く無関係であった。

以上の事実は、腸管寄生虫と同じように糞便を介して感染するとされるA型肝炎など、重篤な経口感染症の伝播に、飲料水が重要な役割を演じていることを思わせる。

次に、インドネシア在留邦人について、その腸管寄生虫感染率の経年的変化と、飲料水水質検査結果の変化を比較して、その相関関係を調べた。

1978年度の邦人の腸管寄生虫感染率は8.0%であった。また、蟯虫感染率も8.3%であった。これらの陽性者にコンバントリンを1クール分だけ与えて翌年まで放置し、さらに翌年検査したところ、腸管寄生虫陽性率は4.8%に減少していた。しかし、蟯虫の感染率はあまり変化せず、むしろ最近では逆に増加する傾向がみられた。腸管寄生虫のうちで、回虫は感染率の減少傾向が著しかったが、鞭虫の感染率にはほとんど変化がみられなかった。

一方、インドネシアの飲料水の汚染度は、経年的に変化なく、最近でもかなりの割合で糞便系汚染にさらされていることが判明した。次いで、寄生虫陽性者が飲用している水のみを取り上げて、全体の水質検査成績と比較したところ、腸管寄生虫陽性者が飲用している水は、全体の成績よりかなり汚染された飲料水であることが判った。たとえば、1979年の寄生虫陽性者全員が、大腸菌群陽性の飲料水を使用していることが明らかにされた。

在留邦人は、糞便系汚染のある飲料水を、煮沸して飲用しているが、日常生活において生活用水として使用している限り、何らかのルートで経口的に体内に摂取し、経口感染症に罹患しているものと考えられる。すなわち、腸チフス、流行性肝炎、アメーバ赤痢及び種々の腸管寄生虫のような経口感染症を予防するには、ただ単に、飲料水のみを煮沸するだけでは不十分であることが示された。インドネシアのように、飲料水が高度に糞便系の汚染にさらされているような国においては、飲料水のみでなく、生活用水全体を浄水濾過殺菌することが必要であろう。

## 特別講演 II

### ハブ—その毒と駆除—

木原 大 (鹿児島大・医・第二生理)

蛇毒はその強い生理活性から、古くより研究者の興味をひいてきた。毒蛇による被害の多い国ではその治療法の改良のために、蛇毒の研究が盛んに行われたことは当然として、一方蛇毒の成分がタンパクであることが分るにつれ、生化学領域でも重要な研究課題として取りあげられている。

演者は以前よりハブ毒の研究に従事してきたが、その間に“溶血毒素”として良く知られているホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (以後 PLA<sub>2</sub>) や、そのインヒビターの精製、あるいは血液凝固に関与する酵素等について検討してきた。

このような毒の研究あるいは治療法の研究が進むにつれ、ハブに対する恐怖はかなり薄れてきたが実際に咬傷は依然として発生しており、完全に安全であるためにはハブを駆除する以外に方法がない。

1977年に奄美ハブ駆除対策研究会が組織され、演者もメンバーの一員として駆除対策の調査を進めてきた。その中で主に誘引捕獲に関連した仕事について紹介してみたい。

#### 1. ハブ毒について

蛇毒から既に20種を越える酵素が報告されている。演者はハブ毒中の PLA<sub>2</sub> について研究を行った。PLA<sub>2</sub> は蛇毒を代表する酵素の1つで、*in vitro* で溶血作用を持つことから「溶血因子」と称されてきた。ハブ毒中の PLA<sub>2</sub> はゲル濾過、イオン交換クロマトの組合わせで均一に精製でき、分子量は14,000で通常ダイマーとして存在する。pI 7.9 の弱塩基性タンパクで、N 端は Pyr. Glu. で始まる点が他の蛇毒にみられない特徴である。1/2Cys. 残基を14個も持っており、これが本酵素の安定性の一因であろうと考えられている。また1個しか含まれていない His. 残基を BPB で修飾すると、完全に失活することから His. が活性

発現に重要な役割を担っているものと考えられる。

PLA<sub>2</sub> は BrCN で処理すると、ただ1個含まれるメチオニル結合が切断され、2個の断片になる。この2個の断片を適当な条件下で一諸にすると、分子の再構成が起こり活性が再現する。

一方ハブの血液中にはこの PLA<sub>2</sub> に対するインヒビターが存在し、両者はモル比1:1で結合し、PLA<sub>2</sub> 活性を完全に阻害する。ハブ血液中にはこの外、プロティナーゼや出血因子に対するインヒビターも存在し、治療への利用の可能性について興味をひかれる。

ハブ毒中のプロティナーゼはフィブリンを溶解し、プラスミン様の活性を持っている。またハブ毒中にはカゼイン分解能は持たないが、フィブリノーゲンを分解する酵素が存在する。ハブ毒を特徴づける出血因子やこれらの諸活性を総合して考えると、ハブ毒は生体に対して強い出血をひき起こし、かつ凝固を阻害するというのがその本質ではないかと思われる。

またハブ毒 PLA<sub>2</sub> は動物に注射することにより、壊死を起こす。そして PLA<sub>2</sub> 注射後血中の CPK 活性を測定してみると、時間とともに増大する。この CPK 活性の上昇は咬症患者でも認められており、PLA<sub>2</sub> は現在ハブ咬症の後遺症として恐れられている、壊死の原因物質の1つである可能性がある。

#### 2. ハブ駆除について

南西諸島の住民がハブの恐怖からのがれる為には、できるだけハブの生息数を減らすことが必要である。この目的で1977年に「奄美ハブ駆除研究会」が発足した。この中で演者は主に誘引捕獲の研究に従事してきた。野外において適当な構造を持つ捕獲箱を設置することにより、ハブを捕獲することが可能である。しかしこの時、ハブに対し

て誘引作用を持つものを捕獲箱中に置く必要がある。現時点では生きたネズミでのみ成功している。しかし生きたネズミを用いる限り管理の煩雑さや、トラップ構造に対する制約等から事業の大規模化は難しい。そこで生きたネズミ以外の誘引物質の開発が強く望まれてきたが、誘引効果判定法がなく著しく支障をきたしている。しかし最近になりハブの舌の出し入れを利用した判定法が開発されつつある。一日も早くこの方法が確立さ

れることが望まれている。

また捕獲されたハブの性比の調査から、著しい偏りがあることが分った。その原因として雌雄の行動の差が考えられていたが、孵化実験の結果、孵化時に既に偏りがあることが判明した。

このようにハブの行動あるいは生態には未知の問題が数多く残されており、その一端について紹介した。

## 一 般 講 演

### 1 ビルハルツ住血吸虫症患者尿中における虫卵周囲沈降反応

平田 瑞城 (久留米大・医・寄生虫)

嶋田 雅暁

(長崎大・熱帯医研・寄生虫)

D. Koech, E. Wambay

(DVBD, Kenya)

ビルハルツ住血吸虫症の高浸淫地である Kwale District (Kenya) の小学生より尿を集め、Tawfik and Galil (1977) に従い虫卵を洗浄、回収した。光顕下に虫卵を観察した時、虫卵周囲沈降物様の存在を認めた。沈降物はトリプシン処理 (pH 8.0) で解離せず、ペプシン処理 (pH 2.8) で消失した。蛍光抗体法にて  $\gamma$ -グロブリンの検索を行った所、沈降物に一致して IgG, IgM の沈着を認めた。また尿上清の硫酸沈殿法で  $\gamma$ -グロブリン分画に COP 反応活性がみられた。ペプシン処理虫卵で尿中 COP 反応の再現を試みた時 31/49 (65.3%) に COP 陽性であった。radial immunodiffusion で尿中の血清成分の測定を行ったが、沈降物形成に関与する成分、IgG, IgM, IgA, C3 の含有を認めた。尚 COP 陽性となった尿では全例 IgG 陽性であった。ビルハルツ住血吸虫症の免疫診断にヒト由来の虫卵を使用した COP 反応の有用性が報告されているが、いずれも虫卵は生理的食塩水洗浄のみで使用されており、特に尿中 COP に注目した報告をみない。無処理の虫卵では誤った陽性判断が下される危険性があるため、注意されるべき現象と考えられる。

### 2 日本住血吸虫とマンソン住血吸虫の虫卵物質の好酸球遊走活性について

大橋 真, 堀井洋一郎, 石井 明

(宮崎医大・寄生虫)

日本住血吸虫 (Sj) とマンソン住血吸虫 (Sm) 感染における虫卵結節形成の免疫機構の違いが多く、この研究によって指摘されてきた。この原因として

虫卵抽出液 (SEA) の抗原性の違い及び虫卵に含まれる SEA の含量の違いなどが考えられるが、今回の実験は好酸球遊走因子 (ECF) に着目し、両者の SEA に含まれる ECF の成分の比較をした。好酸球遊走活性はケモタキシスチェンバーを用い、ミリポアフィルター内に遊走したモルモット好酸球の数をカウントした。遊走活性は dose-dependent であり、同一蛋白濃度では Sj SEA の方がより高い活性を示した。Checker-board assay により SEA のケモタキシス活性が証明されたが、幾分かのケモカイネシス活性も認められた。Sephadex G150 で SEA をゲル濾過すると高分子と低分子の ECF の存在が認められ、両 ECF の活性の強さはほぼ同じであった。これらの性質は、Sj と Sm で共通であった。高分子 ECF は、100°C の熱処理及びプロナーゼ処理には安定であるが、過ヨウ素酸処理によりほぼ完全に失活した。これらの性質も Sj と Sm で共通であった。一方低分子の ECF は熱、プロナーゼ及びカルボキシペプチダーゼ A 処理に対して安定であった。またトルエンにより抽出される事実より、低分子の ECF は疎水性の強い物質であることが示された。以上の結果より好酸球遊走因子に関しては Sj SEA が Sm SEA よりも高い比活性をもつことが示されたが、ECF の組成の違いは明示されなかった。また住血吸虫虫卵由来の ECF は今まで報告されている ECF-A, ECF-C, ECF-L, ECF-G 等とは分子量、化学性状などの違いより別個の物質であることが示された。

### 3 ベネズエラで経験したスナノミ症

多田 功 (熊本大・医・寄生虫病)

鈴木 博

(長崎大・熱帯医研・ウイルス)

高岡 宏行 (大分医大・医動物)

野田 伸一 (鹿児島大・医・医動物)

患者らは1982年10月10日から12月7日までベネズエラを訪問し、その期間のうち10月19日から11

月2日までブラジル国境に近い Parima に滞在した。メンバー4人のうち3人がそこでスナノミ (*Tunga penetrans*) の寄生を受けた。スナノミは中南米・アフリカに分布し、雌雄とも吸血するが、受精した雌はさらに人や他の哺乳類の真皮内に侵入する寄生性のノミである。患者らの症状は異物感と痛みであったが、時間が経過しノミが大きくなると異物感と痛みが増し、化膿する場合もあった。治療は外科的に除去し抗生物質軟膏を塗布した。虫体を除去した後は異物感と痛みは消えた。

症例1: ○木○, 男43歳。

左足の第4指の爪下1カ所に寄生をうけた。除去したのが Parima を離れて7日後でかなり大きくなり、すでに化膿し、除去時に出血が見られた。除去後の傷口は直径5mmあり、その後2カ月は色素斑が見られた。

症例2: ○田○一, 男34歳。

左足の母指の爪廓1カ所、右足の母指の爪廓1カ所、爪下2カ所、底側1カ所の合計5カ所に寄生を受けた。4カ所は Parima を離れる1日前、他の1カ所は Parima を離れて1日後に除去した。除去が早かったので出血は見られなかった。

症例3: ○田○, 男48歳。

左足の第4指の爪廓、爪下、左足の母指と第2指の間、第3指爪下各1カ所の合計4カ所に寄生をうけた。Parima を離れる日、離れて5日後と7日後に各1カ所を除去したが他の1カ所は Parima を離れて25日後に除去したため非常に大きくなり、除去後の傷口も大きくなった。

#### 4 グアテマラ産 *Simulium ochraceum* の唾腺染色体分析

平井 啓久 (熊本大・医・寄生虫病)

上本 驥一

(グアテマラ・オンコセルカ症プロジェクト)

グアテマラ共和国におけるオンコセルカ症の主要伝播ブユは *Simulium ochraceum* である。最近この種における姉妹種の存在の有無が問題となっている。これを細胞遺伝学的に検討するため幼虫の唾腺染色体を分析した。

6集団の451個体を分析した結果多くの逆位多型及びバンド多型が観察された。6集団の内、Finca Brote (FB), Finca las Cascadas de Nica (FCN) 及び Finca Recreo (FRY) の3集団はオンコセルカ症高浸淫地である。また、Finca el Rincon (FRS) 及び Finca San Isidro (FSI) (以前は中程度の流行地であった) は非常に低い流行地であり、そして Finca la Ruda (FRQ) は非流行地である。

今回は、これらの集団において観察された多くの染色体多型の中から雄性決定因子に関連した多型に着目した。逆位 IL-3 は第1染色体の 20A<sub>2</sub>~22A バンド間の逆位であるが、FB, FCN 及び FRY の雄にそれぞれ38%, 33%及び45%の頻度でヘテロ IL-3 が出現した。IL-1 (26A~31B<sub>1</sub>), IL-2 (34B~41A<sub>1</sub>) 及び 39A<sub>1</sub> ヘテロバンドは、低い頻度 (8%~33%) ではあるが、FRQ 以外の5集団の雄だけに見られた (全てヘテロ)。IIIL-11 は第3染色体長腕の非常に大きな逆位であるが、FRQ 集団だけの雄100%に観察された。IL-1, IL-2 及び 39A<sub>1</sub> ヘテロバンドは常に同時に同個体に出現した。またこれらの多型群が IL-3 及び IIIL-11 と同時に出現することはなかった。すなわちこれら3種の多型はそれぞれ独立したものである。

以上の様にこれら5種の多型は雌個体には全く見られず雄だけに出現するものであり雄性決定因子を含む染色体多型だと考えられる。Rothfels らは、姉妹種間における染色体の相違は固定された逆位、性染色体部位の違い、及びその集団に特異な染色体多型が大きな特徴であるとしている。このことから *S. ochraceum* には少なくとも3種の姉妹種が存在することが推測された。

#### 5 キンバラナガハシカにみられる酵素多形

塚本 増久, 堀尾 政博

(産業医大・医動物)

宮城 一郎 (琉球大・医・医動物)

キンバラナガハシカ *Tripteroides bambusa* は台湾から日本本土、朝鮮半島、中国大陸へと広く南北に分布する蚊であるが、宮古島、沖縄本島、奄

美大島に至る列島弧には生息せず、また西表島、石垣島にのみ別の亜種 *yaeyamensis* が生息するという奇妙な分布を示している。そこで台湾、八重山列島、屋久島、九州北部の各地から得られた幼虫を用いて、アクリルアミドゲル電気泳動法による酵素多形の有無、地理的変異、亜種間の差の有無などを生化学的に比較した。その結果、エステラーゼやロイシンアミノペプチダーゼでは何本かの主要活性バンドが検出され、どの地方の材料でも顕著な多形現象（個体変異）が示されて、各亜種または地理的分布を反映するような特徴的なアイソザイムは認められなかった。一方、乳酸脱水素酵素（LDH）の場合には西表島、石垣島及び屋久島からの材料では共通の1本のバンドしか示さなかったのに対し、九州北部の各地から採集された材料では泳動度の変異が著しく、基本的なバンドのみを示すもの、泳動度の遅いバンドを示すもの、これらの雑種と考えられるバンドを呈するものなどが混在していた。LDH でこのような顕著な多形現象を示した蚊は今のところ日本ではこのキンバラナガハシカのみであるのは注目すべきであろう。このような LDH の多形が九州南部にも存在するかどうか、また九州以外の日本本土ではどうなのかを知ることは極めて興味深い。*Tripteroides* 属の蚊は日本ではこの1種のみであるが、熱帯のフィリピン及びニューギニアではそれぞれ30数種も知られており、この属の分化の中心地であると言われている。その分布の北辺日本では目下種の分化が行われつつあるのではなからうか。また、宮古島から奄美大島迄の列島弧にはなぜこの普通種が分布していないのか、それが何を意味しているのかなどは大きな謎として残されたままである。

#### 6 インドネシアにおけるネッタイシマカ及びヒトスジシマカの生態とデング熱ウイルスに対する感受性について

小田 力 (長崎大・医・医動物)  
五十嵐 章  
(長崎大・熱帯医研・ウイルス)  
森 章夫 (長崎大・医・医動物)  
堀田 進

(神戸大・医・国際交流センター)

1982年1月にインドネシアのジャカルタ市でデング出血熱の研究の一環としてネッタイシマカとヒトスジシマカの生態の調査とこれらの蚊成虫についてウイルス分離を実施した。一般にネッタイシマカは人家内で、ヒトスジシマカは屋外で採集された。デング熱の流行地で採集したネッタイシマカからはデングウイルス1型が分離されたが、ヒトスジシマカからはデングウイルスは検出されなかった。しかし、ネッタイシマカから2~4型のウイルスが、ヒトスジシマカからはどの型のウイルスも分離されなかった理由については未解決のままになっている。今回はこれらの点について検討した。蚊からのウイルス分離とは別に1981及び1982年にインドネシア大学付属病院で患者の血液からウイルス分離を実施したところ、2と3型ウイルス保有患者が多く、1型ウイルスを持ったものは少なかったが、流行地において1型ウイルスが存在していることが確認された。一方、採集したネッタイシマカは19個体と極めて少なかった。以上のことから、偶然1型ウイルス保有蚊だけが採集されてウイルス分離に供されたものと想像される。デングウイルス(2型)をジャカルタ系のヒトスジシマカに実験的に感染させた結果、感受性があることがわかった。ウイルス分離に供したヒトスジシマカの大多数は流行地よりかなり離れたインドネシア大学医学部構内で採集されたものである。この蚊の個体群の年齢構成を不定期に調査したところ、その大多数は未経産雌であった。これらの事実を考え合せると、ウイルス分離に使用したヒトスジシマカは一般に羽化して間もなく吸血に来たものであって、デングウイルスを保有していなかったものと考えられる。

#### 7 狂犬病ウイルス赤血球凝集抑制(HI)試験 実用化の試み

万年 和明, 石川 和正, 三舟求真人  
(大分医大・微生物)

狂犬病ウイルスのHI試験について、使用赤血球の検討、血清中のインヒビターの除去法の検討を行った。

1) プロメリンで処理したヒト赤血球では従来使用されているガチョウ赤血球に比べて8倍ないし16倍感度が上昇した。走査型電顕で観察するとヒト未処理赤血球への吸着ウイルス粒子数にくらべて、プロメリン処理ヒト赤血球に吸着するウイルス粒子数ははるかに多かった。このことから、プロメリン処理によってウイルス吸着に対する感度が非常によくなることが示唆された。

2)  $\beta$ -リポ蛋白質であると言われていた血清中のインヒビターの除去には従来カオリンが用いられてきたが、完全に除去できない場合がある。そこで局法軽質無水ケイ酸(アエロジル)を用いてインヒビターを完全に除去できる血清の最低希釈濃度・処理条件・アエロジル除去の条件等について検討した結果、4%アエロジルと1:2希釈血清とを等量にまぜて室温20分処理すると完全にインヒビターが除去できることがわかった。処理後の血清中にごく微量のアエロジル粒子が除去しきれずに残って自然凝集反応の一因となったが最終処理検体をさらに1:2に希釈して反応を開始することで問題はなくなった。またアエロジルが水中で負に荷電しているため陰イオン交換樹脂で抗体グロブリンに影響することなく取り除くことができ、この条件については検討中である。

3) 血清をアエロジル処理することと、プロメリン処理ヒト赤血球を使用することとの組み合わせでHI試験を行うと、ヒト免疫血清、マウス免疫腹水とも従来の方法と比較して、4~8倍の感度で高くHI抗体を検出できた。またこの方法により20倍以下のHI抗体の動きを検索することが可能となった。

## 8 ケニア国におけるロタウイルス検出の年間推移

牧野 芳大

(長崎大・熱帯医研・ウイルス)

松本 一郎 (岩手医大・細菌)

千葉 靖夫 (札幌医大・小児科)

O. A. Mohammed, P. O. Ogaja,

A. M. Kibue, J. M. Muli,

G. W. Nakitare (VRC, Kenya)

ケニアにおけるロタウイルスの流行がどのようなものであるかを知るために、毎月、セントラル州ニエリ地区(海拔1,800m)で1981年9月-1982年9月の期間、及びコースト州モンバサ地区(海拔20m)で1981年7月-1982年9月の期間、州立病院・クリニック等で、5歳以下の小児の便を採取し、市販のロタウイルス検出用キット(ロタザイム)及び我々の試作したELISA法を用いて、ロタウイルス抗原の検出を行った。高地で、やや涼しい環境にあるニエリ地区では、ロタウイルスは7月以外の毎月検出され、ピークは1月及び9月に見られた(胃腸炎患者の34.3%及び21.4%)。一方、低地で暑い環境にあるモンバサ地区では、ロタウイルスは毎月検出され、そのピークは7月及び1月に見られた(胃腸炎患者の51.5%及び29.5%)。調査期間中、ニエリ地区では55/454検体(12.1%)が、またモンバサ地区では151/741検体(20.4%)がロタウイルス陽性を示した。ロタウイルスの流行と気候との明確な相関は見られなかったが、乾期に多く雨期に少なくなる傾向が見られた。年齢分布では、6カ月未満の乳児で最も高いロタウイルスの検出率を示した。

## 9 ケニアにおける細菌性下痢症の疫学調査

宇都宮明剛, 森 賢治, 林 敏明,  
岩永 正明, 内藤 達郎

(長崎大・熱帯医研・病原細菌)

Z. W. Gatheru, F. Sang, N. Koske

(KEMRI, Kenya)

J. N. Kaviti

(NPHLS, Kenya)

国際協力事業団の「ケニア国伝染病研究対策プロジェクト」の目的としての下痢症の解明において、細菌学的な分野から原因菌の疫学調査を行った。ケニア南部海岸地区を対象とし、6医療施設への外来下痢患者の下痢便を検体とし、1981年10月から1982年7月までの、10カ月間の成績を報告した。

999検体から赤痢菌228株、病原大腸菌80株、サルモネラ35株、計343株(34.3%)であったが、コレラ菌、腸炎ビブリオは検出されなかった。分離率が最も高かったのは、最大雨期5月の57.5%

(赤痢菌 42.4%, 病原大腸菌 7.0%, サルモネラ 7.9%) であった。

年齢群別では、5歳以上での検出率は34~42%であったが、0-4歳では20.8%であり、この年齢群ではロタウイルス、キャンピロバクターなどの可能性が考えられた。また血液便 163 検体からは赤痢菌が76%に検出され、病原大腸菌 4.9%, サルモネラ 2.4%であったが、陰性の結果が18.4%であり、赤痢アメーバなどの原因が推定された。

赤痢菌の血清型別では、亜群Bフレキシネルが73.6%, 亜群Dソネネが12.2%であり、個々の菌型では、フレキシネル 2a が31.1%, フレキシネル 1b が17.1%で優位であった。病原大腸菌ではO124: K72 が11株、サルモネラではB群が17株で優勢であった。

当地区では下痢症の治療には、殆どの場合 TC が用いられている。TC, SM, CP, AB-PC, NA に対する薬剤感受性試験を行って、100mcg/ml 以上耐性の高度耐性菌の頻度を見ると、赤痢菌の場合 TC 単独耐性が12.2%, TC・SM 2 剤耐性が2.9%, TC・AB-PC 2 剤耐性が0.4%, TC・SM・AB-PC 3 剤耐性が0.4%に見られた。3種の病原菌を通じて、SM は最も効果がなく、NA が最も抗菌力が良好であった。

住民の利用する飲料水の定性試験で、病原大腸菌 O86a: K61 が検出され、水系感染の危険性が示唆された。

#### 10 暑熱順化の形成機序に関する研究

小坂 光男, 土屋 勝彦, 井元 孝章,  
大渡 伸, 藤原真理子

(長崎大・熱帯医研・疫学)

体温調節の中樞神経系における階層状機構や視床下部外中枢温度感受性の概念に立脚して、暑熱・寒冷順化ウサギに温度刺激を加えて体温調節反応を誘発し、その発現温度閾値や反応量を指標として体温調節や温度順化の中樞機序を究明している。

方法: 正常・対照ウサギや視床下部の視束交叉前部 (PO/AH) を X-線の多門照射にて局所破壊したウサギを更に暑熱及び寒冷環境条件下で飼育

して温度順化ウサギを作成し、人工気象室にて、これらウサギに皮膚温度刺激を加えて体温調節の熱産生や熱放散反応を誘起させ、特に今回は後者の反応に注目して直腸温、耳介皮膚温、呼吸頻度を同時連続記録しそれをコンピュータ解析した。

結果: ①温度刺激に対する諸生体反応の発現温度閾値に関しては無傷の寒冷順化ウサギの直腸温は対照の温度非順化ウサギの直腸温に比し低温側に移動、②無傷の暑熱順化ウサギでは対照ウサギのそれに比し高温側に移動する。③一方、暑熱順化や寒冷順化ウサギの両群で体温調節反応の量的変化をみると順化初期で増加、順化の進行に伴って減少があり、所謂、Habituation (慣れ) の現象を呈する。④正常対照ウサギと PO/AH 破壊ウサギとでは耳介皮膚血管拡張反応の量に有意の差はなく、panting (浅速呼吸) の量を比較すると PO/AH 破壊ウサギで25%の有意な減少が認められた。⑤PO/AH 破壊の寒冷順化と暑熱順化の両群で直腸温を比すると前群は後群より常に 0.3~0.5°C 下降、放熱反応の発現温度閾値も前群は後群より低温側に移動。⑥皮膚血管拡張や panting の量を⑤の2群のウサギで比較すると寒冷順化群は暑熱順化群より有意に減少しており、PO/AH 破壊・寒冷順化ウサギにも熱保存反応の残存を示唆する結果である。

結語: 体温調節や温度順化の中樞機序は CNS の階層状機構によって調節されている事が今回の PO/AH 破壊暑熱順化・寒冷順化ウサギにおける体温調節反応発現温度閾値変化や反応量の変化の解析によって明らかになった。

#### 11 ラテンアメリカにおける社会医学的諸問題 —特にブラジル北東部の課題評価とラテン アメリカにおける健康指標の多変量解析— 山口 誠哉, 加納 克己, 城石 幸博 (筑波大・社会医学)

まずブラジル北東部住民の健康水準を評価するとともに、ラテンアメリカ24カ国を対象に、特に社会医学的に国民の健康に関係すると思われる指標を用い、種々の解析を行い、それぞれの国の特徴を補足することを目的としたが、因子分析及び

クラスター分析により24カ国のそれぞれの特徴を見ることができた。年間一人当たりの収入からみてもわかるようにラテンアメリカ諸国は世界全体の諸国の中でも発展途上の国が多く、しかも人口増加率も高い。国民の健康、生活に関し、特に大国であるブラジルの将来は決して手をこまねいて座視しうる現状ではないことがわかる。特にブラジル北東部、アマゾン地区の開発は総合的視野から、あらゆる分野にわたっておし進めなければならないであろう。

この諸調査研究にて将来さらに詳細に解明せねばならない点が多く見いだされたが、その中の重要な項目をあげて、将来のラテンアメリカ研究における社会医学的目標を示したい。

クラスター分析の結果、2つのクラスターと見なされるグループが認められたが、それらをクラスターに集めた要因としては、因子分析で見限り生活程度、生活様式が主たる役割を果たしていると思われる。

一方、アルゼンチン、バルバドスは他の諸国から遠く離れ、その国の特徴は極めて異質なものとみなされる。

## 12 戦後沖縄の医療事情とその社会的背景

照屋 寛善, 平良 一彦, 宮城 重二  
(琉球大・医・保健・保健管理)

戦後沖縄の医療事情は、沖縄戦・米軍占領・異民族統治・日本復帰と、政治的にも経済社会的にも大きな変動に伴い、独特な推移と展開をたどってきた。行政区域的には東西 1,000km, 南北 400km に及ぶ広大な海域に42の有人離島(昭和55年

国勢調査)をかかえ、それらは環海性・狭小性・隔絶性等により経済・社会の発展が遅れている。沖縄は去る大戦で、地上戦を展開した全国唯一の県であるが、当時の戦没者総数中約65%が県民であり、環境の破壊と社会秩序の荒廃は激しかった。医師・歯科医師等の人的資源及び病院・診療所等の物的資源は全国平均の60%以下の低い状況にあり、保健医療供給体制の確立には困難な状況にある。戦後一貫して社会防衛的な感染症対策と救急医療に重点が置かれ、特にマラリアは米軍による資材供与、DDT 導入のほか、防圧班を組織し軍民一体となってその防圧に努めた。その結果、1963年以来今日まで新発生はない。結核と性病は米軍の基地建設に並行して1940年代の末頃から猛烈に流行した。早速保健所が地区毎に建設され両疾患の無料治療制度がとられたが、当初は必ずしも成功しなかった。軍用地料の改善と思給、見舞金等日政援護金の支給並びに地場産業に対する日政特惠措置や輸出拡大・資本導入等日琉一体化政策が1960年以降とられるに従って沖縄経済は活気を呈した。電気水道も普及し初め寄生虫・トラコーマが、次いで結核事情が明るい見通しとなってきた。罹患率の外に感染症は死因統計上も年々減少し、悪性新生物・脳血管疾患・心疾患等が1960年代以降逆に上昇して現在では全く逆転している。フィラリアは1965年以降撲滅対策が進められ日本復帰後も継続されたが、マイクロフィラリアが集検で見られないところから1980年以降、その対策は打ち切られた。基地派生の公害問題は現在でも随時随所に折々発生している。

## 海外レポート

## 1 ベネズエラ

多田 功 (熊本大・医・寄生虫病)

1982年10月から11月にかけての1カ月間、私達は文部省海外学術調査「南米型及び中米型オンコセルカ症伝搬機構の比較研究」のためベネズエラ国アマゾナス州に滞在した。同州のオンコセルカ流行地はアマゾナス州南東部のパリマ山脈とその西側である。この地域からブラジルにかけてはヤノママ族とよばれるインディオが居住している。ヤノママは世界でも最も未開な種族の1つであり、日常生活は殆ど裸体である。シャボノと呼ばれる集合家屋に60-80人程度の男系大家族をなして住み、簡単な農業(バナナ、キャッサバ)と狩を行って暮している。文字は無いが独特の言語系を持っている。数字は3以上を識別できないとされている。特徴的なことは一人一人が固有の姓名を持たないことである。更に名をたずねることは現地でのタブーの1つである。一種の麻薬を有するが酒類を知らない。政府はこの居住地を保護区とし、その生存をおびやかす外来者(物)を制限している。ヤノママはNa塩を全く摂取しないために年齢と共に血圧が上昇することが無いので知られている。彼らの塩は専らある種の植物に由来するK塩である。このようなヤノママは特にパリマ山地では非常に高いオンコセルカ症浸淫に悩んでいる。その実態はまだ明らかでない。私達は伝搬ブユの自然感染、実験感染、吸血習性、発生源などの諸調査、更にはヒトにおける仔虫保有状況などの調査とを行った。これらの結果を中米の場合と比較し、南アメリカ大陸の同症についてのプロフィール作製とを旨としている。なお今回のレポートではベネズエラ側共同研究者との申し合わせにより研究成果にはふれなかった。

## 2 ケニア

野島 尚武 (鹿児島大・医・医動物)

昨年(1982)のほぼ1年間、ケニア国に滞在し、

以下のことを行った。東海岸に近い Kwale 地区でビルハルツ住血吸虫症の浸淫が再確認されたことから、その疫学調査を行っている。その一環として比較研究の為、媒介貝の生態を通してケニアでのビルハルツ住血吸虫症及びマンソン住血吸虫症の広がりを見ることになった。先に演者は媒介貝の卵子の発育に及ぼす温度のみならず気圧の影響を認め、アフリカ・中近東に生息する貝の分布を説明する一要因に気圧の影響を追加した。そして今回は媒介貝が有する“乾燥に対する抵抗性”とその貝類の広がりとの関係についてみてみた。

調査地区は乾季はよく干上がって、連日の太陽は水源という水源を干していく。ついには貝が生息する池、河川から全ての水生生物が消え失せ、コンクリート様に固まった土塊のみを露出させ、時に数カ月を経る。

しかしこの時、魚、カエル、カニそして媒介貝はどこかに生息していて、再び現われたのは驚異である。

先ず、3カ月も干上がった池の底で媒介貝類の検出を行う目的で、野外で土塊を水槽に投入すると、多数のカエルの他に少数のカニと目的の媒介貝が出現した。この事実をきっかけに実験室内で貝の乾燥に対する抵抗性が検討された。その結果、湖に住む貝と河川に住む貝とに乾燥に対する抵抗性の違いをみた。同心円に中に向かって乾燥し、時に完全に乾燥する湖での自然条件に対し、泉水を源とする河川での自然条件がそれぞれ lake snail, canal snail にどう影響したかは不明であるが、両方ともかなりの乾燥抵抗性を有し、lake snail が更に強い抵抗性を示して4カ月以上の夏眠をするものさえいることが判明した。苛酷な自然のアフリカで現在の媒介貝類の広がりがなるほど納得できる貝の生物学的特性をかいま見た気がした。

### 3 サモア—西サモアにおけるフィラリア症の研究コントロール対策—

木村 英作

(長崎大・熱帯医研・寄生虫)

西サモア国では、昼間亜定期出現性のバンクロフト糸状虫の流行がみられる。主な媒介蚊は、*Ades polynesiensis* 及び *Ae. samoanus* の2種で、前者は昼間吸血性、後者は夜間吸血性である。

1964年より WHO 及び UNICEF の援助のもとにフィラリア症対策が開始され、全島民を対象としたジエチルカルバマジン (DEC) による集団治療が1965-66年 (総量 90mg/kg, 体重) 及び1971年 (総量 72mg/kg) の2回実施された。これらの治療により、仔虫保有率は1964年の20%より、1967年約2%, 1972年約0.2%と著明な減少をみた。その後既知の陽性者のみを対象に DEC 治療を続けていたが、仔虫保有者率は次第に増加し、1979年には 1ml ノクレポア—フィルター法及び 60cmm 厚層塗沫法でそれぞれ4.5%, 3.8%という結果が得られた。

仔虫保有者数の急激な増加が危惧されたため、再度 DEC による集団治療が考慮され、その中で DEC 年1回投与法の検討がなされた。DEC 60mg/kg・体重の年1回投与法は、仔虫陽性者を陰転化させる効果は著明でないものの、仔虫密度を80~90%減少させ、毎年繰返すことによってフィラリア症伝搬のポテンシャルを著明に減少させることができると考えられた。

1982年6月より、この DEC 年1回投与法による集団治療法が、蚊コントロール対策、健康教育と平行して開始され、第1年次治療はすでに完了し、90%以上の高い治療率が得られている。この

集団治療は4年間継続される予定で、現在第1年次治療の効果判定、第2年次治療の準備等の作業がすすめられている。

### 4 中華人民共和国

石井 洋一

(九大・医・寄生虫)

中国医学科学院の招聘により北京、西安、上海の医学科学院、及び関連研究所・病院を訪問した。目的は学术交流であったが、各所で今後の交流のあり方についての協議及び講演が計画され、友好交流の道がさらに限りなく広いものとなることを願っての晩秋の14日間の旅であった。熱帯医学領域では、中国医学科学院基礎医学研究所、北京友誼医院熱帯医学研究所、中国医学科学院寄生虫病研究所、上海第二医学院免疫学研究所などで日本住血吸虫症、肺吸虫症、フィラリア症、マラリア、リーシュマニア症などの疫学から診断、治療にわたる広範な研究が実施されていた。

これら内容の解説論文を参考まで記した。

- 1) Mao Shou-pai and Shao Bao-ruo (1982): Schistosomiasis control in the People's Republic of China, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31(1), 92-99
- 2) Zhong Hui-lan *et al.* (1981): Recent progress in studies of *Paragonimus* and paragonimiasis control in China, *Chinese Med. J.*, 94(8), 483-494
- 3) Zhong Hui-lai *et al.* (1981): Present situation of filariasis in China, *Chinese Med. J.*, 94(9), 567-584
- 4) Zhong Huilan *et al.* (1982): New types of lymph gland leishmaniasis in China, *Chinese Med. J.*, 95(4), 303-306
- 5) Zhou Zu-jie (1981): The malaria situation in the People's Republic of China, *Bull. W. H. O.*, 59(6), 931-936

# JAPANESE JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE

---

Vol. 11 No. 3, 4

December, 1983

---

## CONTENTS

### Original article

- SHICHIJO, A., MIFUNE, K., SAKAMOTO, K. AND YAMADA, A.  
Sensitivity of the Biotin-Avidin-Peroxidase (BAP) Technique for Rabies Virus  
Neutralizing Antibody Assay and the Measurement of Neutralizing Antibodies of  
Vaccinated Human Sera ..... 217-224
- FUJITA, K., TAJIMA, K., TSUKIDATE, S., ODA, T., KUROKAWA, K., MONCADA, L., UEDA, M.,  
MORI, A. AND HINUMA, Y.  
Correlation Between Filarial Antibody Titre and Adult-T-Cell Leukemia Virus  
Antibody Titre in Inhabitants of Goto Islands, Nagasaki, Japan (in Japanese) .....225-233
- KOBAYAKAWA, T., KAWABATA, M., ASAHI, H., KUMADA, M. AND HOSAKA, Y.  
Thymocytotoxic Autoantibodies Induced by Various Parasitic Infections in Mice .....235-241
- YOSHIMURA, H., KONDO, K., AKAO, N., OHNISHI, Y., IKADO, S. AND MIYAWAKI, H.  
An Onchocercal Nodule Found in a Japanese Infected in Africa .....243-248
- ISEKI, M., HAYASHI, K., GATIKA, S. M. AND SIONGOK, T. K. A.  
The Prevalence of Intestinal Protozoa in Naivasha, Kitui, Machakos, Taveta and  
Nandi Hills Areas in Kenya .....249-256

### Short communication

- YAMAURA, H., SHIRASAKA, R., MATSUMOTO, K., WADA, Y., KOBAYASHI, K. AND OKAMOTO, M.  
A Survey on Intestinal Parasite Infection of Japan Overseas Cooperation Volunteers  
(1981-1982) (in Japanese) .....257-260

Published by

JAPANESE SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE

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