

日本熱帯医学会雑誌

Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene

第4巻 第3,4号

昭和51年12月15日

内 容

原 著

韓国濟州島のマレー糸状虫に関する研究

4 *Brugia malayi* (Che-ju strain) のネコへの感染実験 (英文)

.....中島 康雄, 青木 克己, 坂本 信, 末永 敏, 片峰 大助 163-177

直腸生検を中心とした日本住血吸虫症の研究 (1) 疫学的研究

.....加茂 悦爾, 藁袋 勝, 石崎 達 179-188

組織内マラリア原虫の新しい染色法.....岩本 宏文, 山本 利雄 189-194

国内二次感染と思われる脳性熱帯熱マラリアの一部検例

.....天野 博之, 山本 利雄, 左野 明, 高橋 泰生
蔵田駿一郎, 市島 国雄, 山辺 博彦 195-205

短 報

抗血清添加による *Leishmania donovani* 感染培養細胞の破壊 (英文)

.....真保 俊, 小早川隆敏, 石山 紘, 増田 和茂 207-211

学術記録

九州熱帯医学シンポジウム第7回学術集会講演要旨 213-222

会 報

昭和51年度第2回幹事会記録 223-224

昭和51年度評議員会記録 224

第18回会務総会記録 224-225

共同利用熱帯医学研究所設立要望書要旨 225-226

マラリア治療薬に関する要望書 226-229

投稿規定

日熱医学会誌
Jap.J.T.M.H.

日本熱帯医学会

STUDIES ON MALAYAN FILARIASIS IN CHE-JU IS., KOREA

4 Experimental transmission of *Brugia malayi* (Che-ju strain) to domestic cats

YASUO NAKAJIMA, YOSHIKI AOKI, MAKOTO SAKAMOTO,
OSAMU SUENAGA AND DAISUKE KATAMINE

Received for publication 1 November 1976

Abstract: Che-ju strain of *B. malayi* was successfully transmitted to three domestic cats by subcutaneous injection of infective-stage larvae obtained from naturally-infected *Ae. togoi*. The second generation of the strain of *B. malayi* was established in nine cats which had been inoculated subcutaneously with the infective larvae developed in laboratory-bred Nagasaki strain of *Ae. togoi*. The third generation was built up by subcutaneous inoculation in two cats through *Ae. togoi* and four cats through Liverpool strain of *Ae. aegypti*. The prepatent periods were 91-131 days. The microfilaria counts in the peripheral blood gradually increased in one third to two thirds of successfully transmitted cats. The microfilariae of Che-ju strain exhibited a sub-periodic tendency in the cat. The average infection rate of laboratory-bred Nagasaki strain of *Ae. togoi* was 69.3% with infective larvae of *B. malayi*. The mean number of larvae per mosquito was 5.8 with the infective larvae. Nagasaki strain of *Ar. subalbatus* was not susceptible to *B. malayi* infection. *B. pahangi* developed to the infective form in both *Ae. togoi* and *Ar. subalbatus*.

As to *Brugia malayi*, only the periodic and sub-periodic forms from Malaya were reported to have been successfully transmitted to domestic cats through the insect vectors, *Mansonia* mosquitoes (Edeson and Wharton, 1957, 1958; Wharton *et al.*, 1958), *Aedes aegypti* (Ramachandran *et al.*, 1960), and also *Anopheles barbirostris* (Laing *et al.*, 1961). It was described that the periodic form does not develop well in the cat with a long prepatent period and low microfilaremia, although marked nocturnal periodicity is maintained in the cat after the successful transmission (Laing *et al.*, 1961). In Che-ju Island, Korea, only the periodic form of *B. malayi* is known to cause filariasis in man; the main vector is *Ae. togoi* (Wada *et al.*, 1973).

The present paper gives the results of transmission experiments made on the domestic cats through *Ae. togoi* as well as *Ae. aegypti* from 1972 to 1976, and the results of susceptibility studies of two species of laboratory-bred mosquitoes to *Brugia* infection.

MATERIALS AND METHODS

I. Experimental transmission of infective larvae to cats.

Wild *Aedes togoi* were collected early morning from the inside of the houses which *B. malayi* microfilaria carriers occupied in the endemic areas of Che-ju Island, Korea. The mosquitoes were kept in the laboratory for 8–10 days and then dissected to obtain infective-stage larvae (Table 1). Three domestic cats carried from Japan were injected subcutaneously into the inguinal regions with 114–235 infective-stage larvae divided into two to four inoculations (Table 2). Stained thick smears of 60 cmm

TABLE 1 Stage III larvae of *B. malayi* in *Ae. togoi* kept in laboratory after collection at microfilaria carriers' houses

Days after collection	No. of mosquitoes dissected	No. of mosquitoes infected	Stage III larvae			Total no.
			Site of occurrence			
			Head	Thorax	Abdomen	
8	139	37 (26.6)	56 (29.0)	110 (57.0)	27 (14.0)	193
9	454	105 (23.1)	179 (55.6)	73 (22.7)	70 (21.7)	322
10	71	14 (19.7)	48 (63.2)	19 (0.25)	9 (11.8)	76
Total	664	156 (23.5)	283 (47.9)	202 (34.2)	106 (17.9)	591

(): %

TABLE 2 Inoculation of stage III larvae obtained from naturally-infected mosquitoes to domestic cats

Date of inoculation	No. of larvae inoculated		
	Cat 1	Cat 2	Cat 3
31 Aug. '72		79	
2 Sept. '72	74		
3 Sept. '72		42	
5 Sept. '72			51
6 Sept. '72	40		
7 Sept. '72		42	48
8 Sept. '72		72	
10 Sept. '72			50
Total no. of larvae inoculated	114	235	149

peripheral blood, exclusive of occasional 30 cmm blood instead, were examined for microfilaria weekly after the inoculation (Tables 3, 4).

Furthermore, laboratory-bred *Ae. togoi* (Nagasaki strain) were fed on Cat 3

with moderate microfilaremia (Fig. 1). The infective-stage larvae obtained from the same mosquitoes were injected into the inguinal regions of 29 cats to establish the second generation in the cat (Table 5). Each of them was given 52–356 larvae as a single inoculation or divided into two. Also laboratory-bred *Ae. aegypti* (Liverpool strain) were fed on Cat 3 and kept in the laboratory at 25 C. Cat 30 received 200 infective-stage larvae developed in *Ae. aegypti*. During the prepatent period 17 cats (including Cat 30) out of 30 died, most frequently from panleukopenia.

Cat 31 was chosen for the source of microfilariae to build up the third generation in the cat (Table 7). The infective-stage larvae from *Ae. togoi* were introduced subcutaneously into the inguinal regions of Cat 34 and 35, which received 125 and 104 larvae, respectively. In addition to that, 8 cats were given 230–350 infective-stage larvae developed in *Ae. aegypti* fed on Cat 31.

The cats with microfilaremia were usually examined in circadian fluctuations in appearance of microfilariae into the peripheral blood every month or two. Blood films of 60 cmm were taken every 2 hours for 24 hours from the pinnae of the ears of cats. Periodicity studies were also made on Cat 2 before and after transportation to Los Angeles, California, by air (Table 8).

II. Susceptibility of two species of mosquitoes to *B. malayi* and *B. pahangi* infections.

Laboratory-bred Nagasaki strains of *Aedes togoi* and *Armigeres subalbatus* were fed on a cat with *B. malayi* microfilaremia under Nembutal anesthesia. The expected numbers of microfilariae taken up by mosquitoes were estimated from the quantities of ingested blood and the microfilaria counts in the peripheral blood of the cat at the time of feeding. The estimates were 1.7–4.5 for *Ae. togoi* and 2.0–7.5 for *Ar. subalbatus* (Table 11). The mosquitoes were kept at 25 C and dissected daily 1–13 days after feeding. The total number of examined *Ae. togoi* was 713 (Table 12), and that of *Ar. subalbatus* was 279 (Table 13).

Also the two species of laboratory-bred mosquitoes were fed on a dog with *B. pahangi* microfilaremia under Nembutal anesthesia, kept at 25 C and examined for the development of microfilariae to the infective larvae. The dissected number of *Ae. togoi* was 107, and that of *Ar. subalbatus* was 215 (Table 15).

III. The periodicity of *B. malayi* microfilariae in human carriers.

Blood films of 60 cmm were taken every 2 hours throughout the 24 hours from the ear lobes of 10 microfilaria carriers in the endemic areas. The blood was taken up into graduated capillary tubes. Thick films of parallel lines were made on clean glass slides, dried for about 8 hours, hemolysed in distilled water, and stained in buffered Giemsa solution.

The average counts of samples were calculated from the microfilaria counts of every individual to give the secondary histogram indicating the percentage rate of each area between two adjoining vertical lines at 2-hour interval to the total areas in the primary histogram (Era, 1959; Katamine, 1972).

RESULTS

As indicated in Table 1 the total of 591 infective (stage III) larvae were obtained from 156 mosquitoes out of 665 dissected ones which had been collected from the microfilaria-carriers' houses and kept in the laboratory for 8 to 10 days. The infection rate of the mosquitoes corresponded to 23.2 per cent. Most of the stage III larvae were harbored in the head and thorax; less than 22% in the abdomen. The microfilariae were first found in the peripheral blood 91, 99 and 104 days after inoculation in three domestic cats which had been given the infective larvae from the naturally-infected mosquitoes (Tables 3, 4). In Cats 2 and 3 microfilaria levels

TABLE 3 Experimental transmission of *B. malayi* from naturally-infected mosquitoes to cats

Cat no.	Sex	Weight in kg	No. of larvae inoculated	No. of days observed after inoculation	No. of days from inoculation to mf. detection in blood
Cat 1	F	2.2	114	993	91
Cat 2	M	2.8	235	330*	104
Cat 3	M	3.2	149	1,095**	99

* Then transferred to Los Angeles

** Adult *B. malayi* recovered at necropsy

TABLE 4 Prepatent periods and changes of microfilaremia in cats inoculated with larvae from naturally-infected *Ae. togoi*

Cat no.	Cat 1	Cat 2	Cat 3
No. of larvae inoculated	74, 40	79, 42, 42, 72	51, 48, 50
Date of 1st inoculation	2 Sept. '72	31 Aug. '72	5 Sept. '72
Prepatent period in days	91	104	99
Date (hours on 24-hour clock)	Mf. count per 60 cmm blood		
7 Nov. (23: 00)	0*	0*	0*
2 Dec. (23: 00)	1*	0*	0*
13 Dec. (23: 00)	0	1*	1*
24 Dec. (23: 00)	0	3	2*
8 Jan. (11: 00)	1	8	14
(23: 00)	0	9	2
22 Jan. (11: 00)	0	20	16
(23: 00)	0	16	22

* per 30 cmm blood

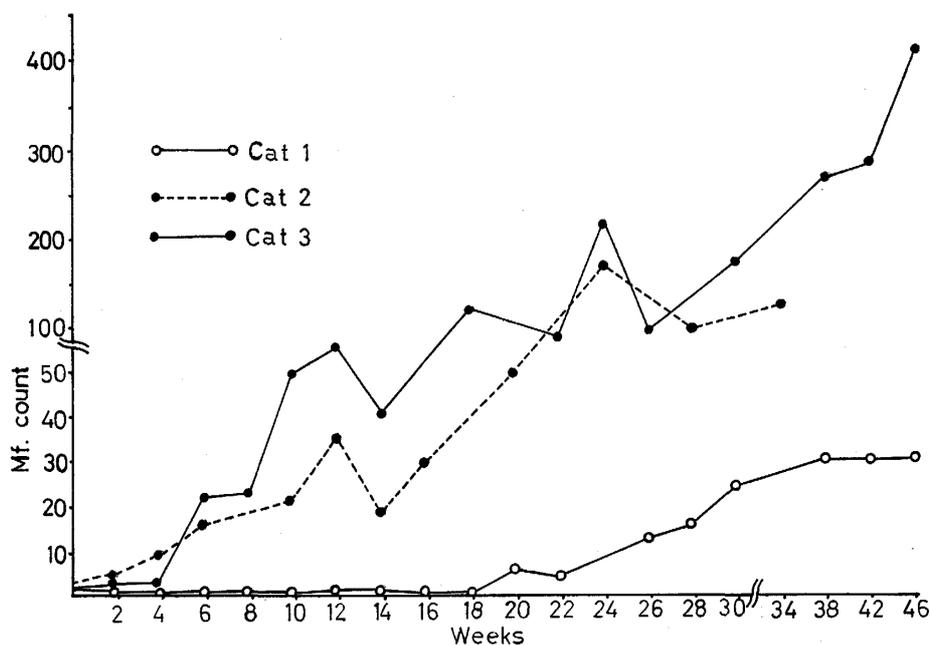


Fig. 1 Increase of microfilaria counts per 60 cmm peripheral blood after the first detection of microfilaremia in cats inoculated with larvae from naturally-infected *Ae. togoi*.

gradually rose to 174 and 417 microfilariae per 60 cmm blood film, respectively, during one year observation after the first detection in the peripheral blood, whereas in Cat 1 microfilaria levels were low, varying from 0 to 31 per 60 cmm film throughout the period of observation (Fig. 1). The microfilariae detected in the cats were identified as *B. malayi* microfilariae because their morphological characteristics were exactly the same as those obtained from the human carriers in Che-ju Island (Aoki *et al.*, 1976). The microfilariae were first detected 102–131 days after inoculation in the peripheral blood of 8 cats of the surviving 13 which had been inoculated to establish the second generation in the cat. Although the peripheral blood of Cat 23 remained negative during the period of 138 days under observation, the necropsy revealed the microfilariae in the pulmonary blood vessels. Thus, the second generation of *B. malayi* was established in 9 cats which had received the infective larvae developed in *Ae. togoi* (Table 5). The microfilariae in the peripheral blood increased gradually in 6 cats, while Cats 16 and 17 produced low counts of 0 to 4 per 60 cmm blood throughout the period of observation (Fig. 2, Table 6).

The third generation was built up in 6 cats out of 10 cats inoculated with the infective larvae from the mosquitoes fed on Cat 31. Two of them had received the larvae developed in *Ae. togoi* and four those developed in *Ae. aegypti*. The prepatent periods were 95–114 days (Table 7). The counts rose to 52 and 183 microfilariae per 60 cmm peripheral blood in Cats 34 and 40, respectively, 10 weeks after the first detection of microfilariae, and to 285 in another 10 weeks in Cat 40 which had been given the infective larvae developed in *Ae. aegypti* (Fig. 3). In the others microfilaria levels remained rather low.

TABLE 5 Experimental transmission of *B. malayi* from Cat 3 to Cats 4-33 to establish the second generation in the cat

Cat no.*	Sex	Weight in kg	No. of larvae inoculated	No. of days observed after inoculation	No. of days from inoculation to mf. detection in blood
Cat 4	F	2.0	130 60	314	115
Cat 5	F	1.5	112	311	102
Cat 9	F	1.7	217	159	110
Cat 14	F	2.5	200 155	441	
Cat 16**	M	2.2	52	392	131
Cat 17	F	2.4	159	743	117
Cat 18	M	1.9	92	159	
Cat 21	F	2.6	186	205	
Cat 23***	F	2.5	200	135	
Cat 24	F	2.4	200	395	
Cat 31	M	4.5	200	582	117
Cat 32	F	3.3	178	461	117
Cat 33	F	2.7	200	434	103

* The cats died shortly after inoculation were not included in the table

** Adult *B. malayi* recovered at necropsy

*** Necropsy revealed microfilariae in the pulmonary blood vessels

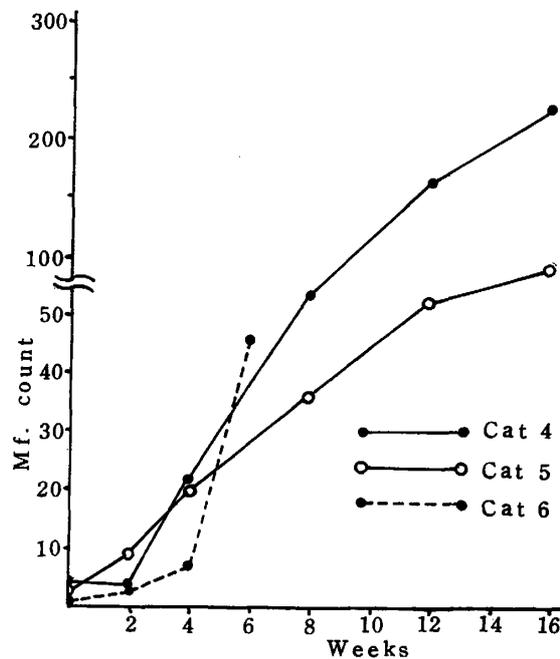


Fig. 2 Increase of microfilaria counts per 60 cmm peripheral blood after the first detection of microfilaremia in Cats 4, 5, 9 inoculated with infective larvae of *B. malayi* from Cat 3.

TABLE 6 Increase of microfilaria counts per 60 cmm peripheral blood in Cats 16-33 after the first detection of microfilaremia

Cat no.	Mf. count at weeks after the 1st detection of microfilaremia																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	20	24
Cat 16	1	0	1	1	0	1	3	4	1			0		3			
Cat 17	1	2	0	0	1	2	0	0	2	1			0		2		
Cat 31	5		118		213		317					368					867
Cat 32	2		9					67									102
Cat 33	16		12			150											174

TABLE 7 Experimental transmission of *B. malayi* from Cat 31 to Cats 34-43 to establish the third generation in the cat

Cat no.	Sex	Weight in kg	No. of larvae inoculated	Vector	No. of days observed after inoculation	No. of days from inoculation to mf. detection in blood
Cat 34	M	4.1	125	<i>Ae. togoi</i>	265	104
Cat 35	F	3.7	104	<i>Ae. togoi</i>	232	95
Cat 36	F	3.3	300	<i>Ae. aegypti</i>	170	
Cat 37	M	3.7	300	<i>Ae. aegypti</i>	128	102
Cat 38	F	2.8	230	<i>Ae. aegypti</i>	170	
Cat 39	M	3.0	350	<i>Ae. aegypti</i>	165	
Cat 40	M	4.2	350	<i>Ae. aegypti</i>	265	97
Cat 41	M	3.2	300	<i>Ae. aegypti</i>	282	
Cat 42	M	3.7	300	<i>Ae. aegypti</i>	282	114
Cat 43	M	1.9	280	<i>Ae. aegypti</i>	282	114

In contrast to the marked nocturnal periodicity in the human carriers from Che-ju Island, moderate numbers of microfilariae always appeared in the peripheral blood of the cats in the daytime and the nocturnal rise in the microfilaria counts was less obvious (Figs. 4, 5, Tables 8, 9, 10). Usually the peak counts were only two to three times greater than the lowest counts in the cats. The pattern in the cat exhibited a sub-periodic tendency of the microfilariae.

As shown in Table 8 the highest microfilaria count was recorded at 10 p.m. and the lowest at noon in Japanese standard time in Cat 2 shortly after the transportation to Los Angeles, California, by air. Although the periodic changes in numbers of microfilariae at 2-hour intervals were not marked, the highest count was found at noon and the lowest at midnight in Japanese standard time 18 weeks afterwards.

Adult worms were recovered only from Cat 3 and 16. The worms which harbored in the perirenal adipose tissue were identified as *B. malayi* from their morphological characteristics (unpublished data).

In *Ae. togoi* most of ingested *B. malayi* microfilariae exsheathed in the stomach,

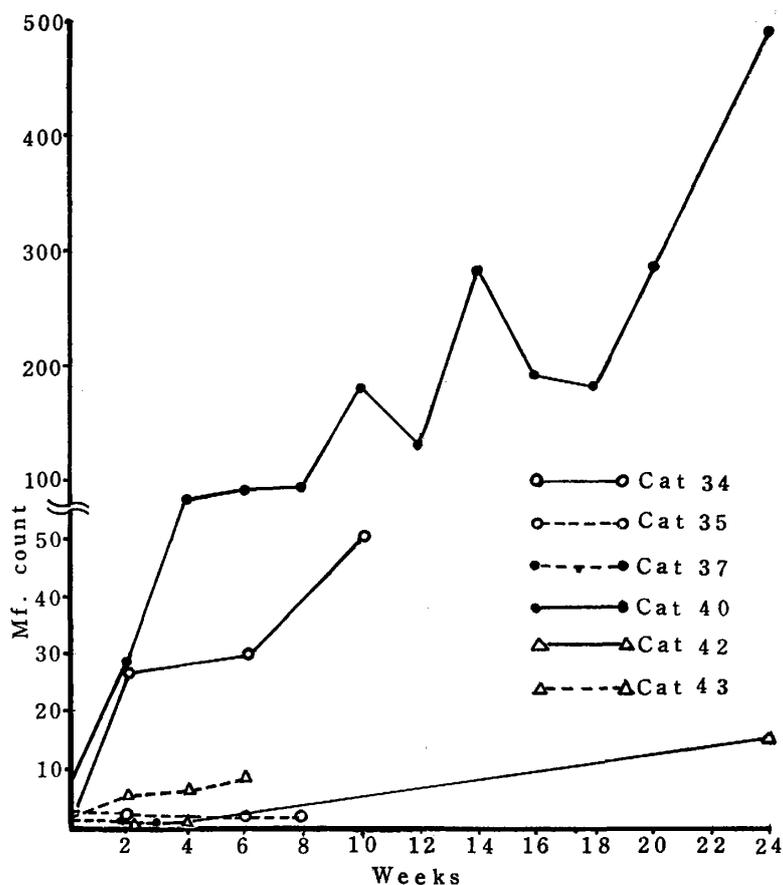


Fig. 3 Increase of microfilaria counts per 60 cmm peripheral blood after the first detection of microfilaremia in Cats 34-43 inoculated with infective larvae of *B. malayi* from Cat 31.

TABLE 8 Microfilaria counts per 60 cmm blood in Cat 2 at 2-hour intervals before and after transportation to Los Angeles. The cat was sent by air late in July, 1973

Date of examination	Mf. count at Japanese standard time on 24-hour clock												
	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00	04:00	06:00	08:00	10:00	12:00
14 Jul. '73	53	47	51	55	103	123	88	109	46	118	130	88	55
22 Aug. '73	31	54	69	64	72	106	89	88	92	88	53	40	51
8 Jan. '74	242	206	208	159	212	223	142	164	172	228	190	189	201

penetrated the stomach wall early, migrated into the thorax and began to grow in the muscles. At 25 C the larvae developed to stage II in 6 days and to stage III in 9 days after intake. The infective larvae finally tended toward the proboscis. The average infection rates were as high as 75.0% with stage I larvae, 69.0% with

TABLE 9 Microfilaria counts per 60 cmm peripheral blood at 2-hour intervals in Cat 31 at the 66th week of microfilaremia and in Cats 40 and 42 at the 24th week

Cat no.	Mf. count at hours on 24-hour clock													
	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00	04:00	06:00	08:00	10:00	12:00	
Cat 31	393	410	208	263	298	223	355	224	366	215	289	171	361	
Cat 40	506	647	393	500	485	331	507	430	516	464	590	533	590	
Cat 42	1	6	12	17	25	15	18	9	13	7	8	10	11	

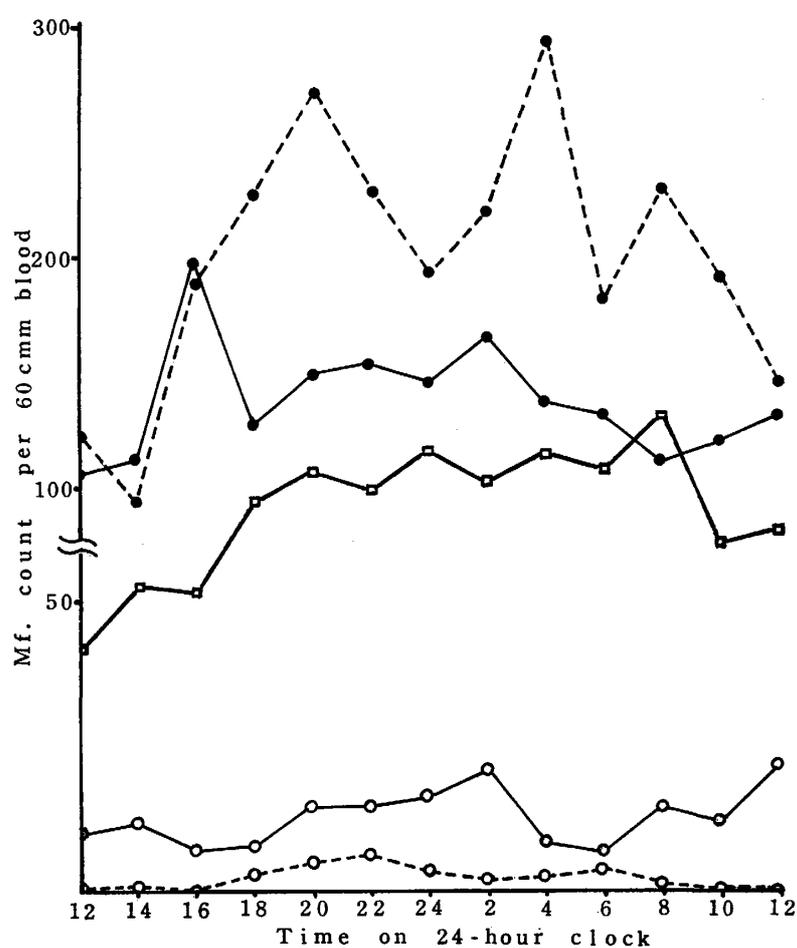


Fig. 4 Periodicity of the microfilariae of *B. malayi* in Cats 1-3 at the 27th week of microfilaremia and at the 86th week.

Open circles connected by solid line, Cat 1 at the 27th week; open circles connected by broken line, Cat 1 at the 86th week; open squares connected by solid line, Cat 2 at the 27th week; solid circles connected by solid line, Cat 3 at the 27th week; solid circles connected by broken line, Cat 3 at the 86th week.

TABLE 10 Microfilaria counts at 2-hour intervals in human carriers of *B. malayi* from Che-ju Is.

Carrier no.	Mf. count per 60 cmm blood at hours on 24-hour clock												
	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00	04:00	06:00	08:00	10:00	12:00
1	150	182	445	829	1,019	967	917	997	763	751	303	169	65
2	119	57	115	260	895	972	1,206	1,436	1,306	968	492	150	128
3	73	43	134	315	526	439	460	604	469	507	165	67	33
4	49	30	44	83	269	215	208	272	324	185	62	60	33
5	140	153	285	599	885	1,002	1,059	1,053	819	730	539	193	152
6	72	47	176	513	741	772	808	662	807	610	210	44	51
7	7	3	10	42	111	113	80	90	93	116	37	23	2
8	20	4	12	7	67	246	164	147	109	111	29	21	10
9	61	56	68	82	263	499	418	572	376	373	219	116	82
10	0	1	0	0	8	9	17	21	19	16	20	6	4

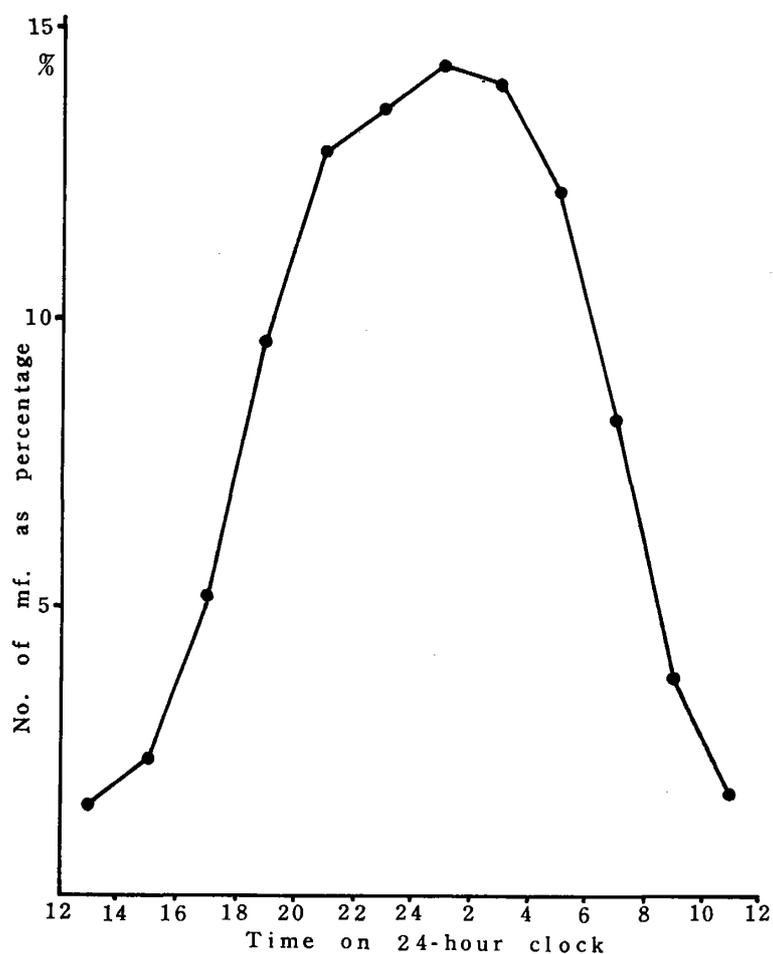


Fig. 5 Secondary histogram drawn from average counts of 10 human carriers. The number of microfilaria as percentage indicates the rate of an area between two adjoining vertical lines to the total areas in the primary histogram.

stage II and 69.3% with stage III (Table 14). The individual counts of larvae varied considerably among the dissected mosquitoes. A mosquito, for instance, harbored more than 40 infective larvae. The mean number of larvae per mosquito (e.g. 5.8 with stage III larvae) was greater than the expected number of microfilarial intake (i.e. 1.7–4.5 per mosquito) which was estimated from the concentration of microfilariae in the cat and the quantity of blood ingested by *Ae. togoi* (Tables 11, 12).

TABLE 11 Expected numbers of *B. malayi* microfilariae taken up by *Ae. togoi* and *Ar. subalbatus*

Lot no.	Species	Mf. count per 60 cmm blood	Weight of blood-meal (mg/mosquito)	Expected no. of mf. per mosquito
1	<i>Ae. togoi</i>	52	2	1.7
2	<i>Ae. togoi</i>	52	2	1.7
5	<i>Ae. togoi</i>	90	3	4.5
7	<i>Ae. togoi</i>	94	2.5	3.9
3	<i>Ar. subalbatus</i>	40	3	2.0
4	<i>Ar. subalbatus</i>	40	3	2.0
6	<i>Ar. subalbatus</i>	150	3	7.5

TABLE 12 Susceptibility of laboratory-bred *Aedes togoi* to *B. malayi* infection

Lot no.	Stage I larvae			Stage II larvae			Stage III larvae		
	No. of mosquitoes		Mean no. of larvae per mosquito	No. of mosquitoes		Mean no. of larvae per mosquito	No. of mosquitoes		Mean no. of larvae per mosquito
	dissected	infected (%)		dissected	infected (%)		dissected	infected (%)	
1				4	4 (100.0)	1.5	94	66 (70.2)	3.7
2				5	2 (40.0)	1.5	144	84 (58.3)	3.4
5	6	4 (66.7)	5.3	2	1 (50.0)	2.0	148	117 (79.0)	6.5
7	34	26 (76.5)	11.2	76	53 (69.7)	8.0	200	139 (69.5)	7.6
Total	40	30 (75.0)	10.4	87	60 (69.0)	7.3	586	406 (69.3)	5.8

In *Ar. subalbatus* most of *B. malayi* microfilariae died in the stomach cavity without penetrating the stomach wall. A few found in the thoracic muscles did not develop and died 2 or 3 days later. Consequently, the larvae were not detected in *Ar. subalbatus* dissected after the 5th day of intake (Tables 13, 14).

As shown in Tables 14 and 15, *Ar. subalbatus* was much more susceptible than *Ae. togoi* to *B. pahangi* infection in contrast to *B. malayi* infection. Although *B. pahangi* microfilariae developed to stage III at 25 C 11 days after intake in both species of mosquitoes, the mean number of infective larvae per mosquito was 5.4 in *Ae. togoi* and 22.9 in *Ar. subalbatus*.

TABLE 13 Susceptibility of laboratory-bred *Armigeres subalbatus* to *B. malayi* infection

Lot no.	Stage I larvae			Stage II larvae			Stage III larvae		
	No. of mosquitoes		Mean no. of larvae per mosquito	No. of mosquitoes		Mean no. of larvae per mosquito	No. of mosquitoes		Mean no. of larvae per mosquito
	dissected	infected (%)		dissected	infected (%)		dissected	infected (%)	
3	46	14 (30.4)	1.8	19	0 (0)	0	20	0 (0)	0
4	63	26 (41.3)	1.6	12	0 (0)	0	8	0 (0)	0
6	50	40 (80.0)	3.4	11	0 (0)	0	50	0 (0)	0
Total	159	80 (50.3)	2.5	42	0 (0)	0	78	0 (0)	0

TABLE 14 Development of Che-ju strain of *B. malayi* in laboratory-bred Nagasaki strains of *Ae. togoi* and *Ar. subalbatus*

Stage of larvae	Days after feeding	<i>Ae. togoi</i> No. of mosquitoes		<i>Ar. subalbatus</i> No. of mosquitoes	
		dissected	infected (%)	dissected	infected (%)
		I	1-5	40	30 (75.0)
II	6-8	87	60 (69.0)	42	0 (0)
III	9-13	586	406 (69.3)	78	0 (0)

TABLE 15 Development of *Brugia pahangi* in laboratory-bred Nagasaki strains of *Ae. togoi* and *Ar. subalbatus*

Stage of larvae	Days after feeding	<i>Ae. togoi</i> No. of mosquitoes		<i>Ar. subalbatus</i> No. of mosquitoes	
		dissected	infected (%)	dissected	infected (%)
		I	1-5		
II	7-9			14	14 (100.0)
III	11-13	107	63 (58.9)	159	152 (95.6)

DISCUSSION

It is generally accepted that *Ae. togoi* breeding in rock pools on the seacoast is the main vector of *B. malayi* in the endemic areas of Che-ju Island (Katamine *et. al.*, 1973; Wada *et. al.*, 1973), whereas *Anopheles sinensis* is suspected to be a probable vector in the inland Korea (Kim *et al.*, 1973). Our present results indicate that the laboratory-bred Nagasaki strain of *Ae. togoi* is competent to develop Che-ju strain of *B. malayi* microfilaria to the infective form and useful as a laboratory vector. It is interesting that *Ar. subalbatus* (Nagasaki strain) is not susceptible to *B. malayi* infection, though the closely related species, *B. pahangi* develops to the infective larva in this mosquito. It was reported that Liverpool strain of *Ae. aegypti* is more susceptible to both periodic and sub-periodic forms of *B. malayi* from Malaya than two other strains of *Ae. aegypti* (Ramachandran *et al.*, 1960). In our studies Liver-

pool strain of *Ae. aegypti* also turned out to be useful as a laboratory vector of Che-ju strain of *B. malayi* (unpublished data).

It is indicated that *Ae. togoi* takes up more microfilariae than would be expected by the present findings that the mean number of larvae per mosquito is greater than the expected number of microfilarial intake estimated from the quantity of ingested blood and the concentration of microfilariae at the time of feeding. Similar observations were reported by Wharton (1957) in the microfilarial intake of *Mansonia (Mansonioides) longipalpis*. The difference in the numbers seems to stem partly from possible discharge of microfilaria-free or microfilaria-scanty droplets during feeding of *Ae. togoi*, although it is unknown to what extent the discharge of droplets is implicated in the underestimation of the quantity of ingested blood.

Malayan strains of periodic and sub-periodic forms of *B. malayi* were transmitted experimentally from man to domestic cats (Edeson and Wharton, 1957; Wharton *et al.*, 1958), and from experimentally infected cats to cats (Edeson and Wharton, 1958; Wharton *et al.*, 1958; Ramachandran *et al.*, 1960; Laing *et al.*, 1961). The periodic form from Malaya was reported not to develop well in cats with long prepatent periods (95–175 days) and low microfilaria counts in the peripheral blood, in contrast to the sub-periodic form from Malaya which was readily transmitted with short prepatent periods and high microfilaremia (Wilson *et al.*, 1958; Laing *et al.*, 1961). The prepatent periods of Che-ju strain are 91–131 days, almost equal to those of the periodic form from Malaya, in the experimental transmission to domestic cats. The microfilaria counts in the peripheral blood, however, gradually increase in one third to two thirds of cats successfully infected with Che-ju strain. Although the inoculated numbers of infective larvae are larger in our experiments than in the previous authors', the high microfilaremia indicates that domestic cats are relatively "good" hosts for Che-ju strain.

As to the periodic form from Malaya, it was reported that the marked nocturnal periodicity was maintained in cats after transmission (Edeson, 1959; Laing *et al.*, 1961). In contrast to those of Malayan strain, the microfilariae of Che-ju strain exhibit a sub-periodic tendency in the cat, although Che-ju strain is characterized by a marked nocturnal periodicity of microfilariae in human carriers. The sub-periodic tendency might be caused by the physiology of cats, which are mainly nocturnal. To confirm it, "the apparently sub-periodic Che-ju strain in cats" would have to be transmitted to the monkeys with a strictly diurnal activity-cycle.

It is interesting to note that the microfilaria counts of Cat 2 are higher at night and lower in the daytime in Japanese standard time shortly after the transportation to California by air, and that the higher counts are found at night and the lower in the morning in U.S. Pacific standard time 18 weeks afterwards. It may indicate that some little or a certain fixed time must elapse before *B. malayi* and/or the cat become adapted to the local time.

Developing or adult worms were found in the cats inoculated with Malayan strains in the high percentage of 72, although mature worms were recovered small in numbers (Edeson and Buckley, 1959). In the present studies on Che-ju strain adult worms have been recovered from only 2 cats out of 8 in which microfilariae were detected earlier or at necropsy. The reasons why the rate of adult worm

detection is low remain to be explained. The localization of recovered adult worms in the perirenal adipose tissue may suggest the migration of the larvae to the internal lymph vessels, which put a difficulty in detecting the worms at necropsy.

The presence of natural infection of *B. malayi* in forest animals and the domestic cat was reported in Malaya, where the dusky leaf-monkey was supposed to be an important reservoir of the sub-periodic form (Edeson, 1959; Laing, 1959; Laing *et al.*, 1960; Wilson, 1961). Also a zoonosis of the sub-periodic form was reported in the Phillipines (Roseboom and Cabrera, 1965). However, the periodic form is thought to be more specialized and more host-specific (*i.e.* rare in vertebrate hosts other than man) than the sub-periodic form, whose wide range of hosts indicates a less-developed, younger stage in the evolution of parasites (Laing *et al.*, 1960). In Che-ju Island the domestic cats, which are few because of the folk custom of not keeping cat, are negative for microfilariae: The natural infection of *B. malayi* is not detected in the dogs either (unpublished data). Very few monkeys, if any, are kept by the islanders. Thus, there seems to be no substantial evidence to suggest that any mammal other than man may form a reservoir of the periodic form infection in the island. Further studies on wild animals are necessary to conclude that only man is the definitive host of the Che-ju strain of *B. malayi*.

REFERENCES

- 1) Aoki, Y., Nakajima, Y. and Katamine, D. (1976): Studies on Malayan filariasis in Che-ju Is., Korea. 3 Microfilarial surface architecture of *Brugia malayi* (Che-ju strain) in comparison with that of *Brugia pahangi*, Jap. J. Trop. Med. Hyg., 4(2), 129-137
- 2) Edeson, J. F. B. (1959): Studies on filariasis in Malaya: The periodicity of the microfilariae of *Brugia malayi* and *B. pahangi* in animals, Ann. Trop. Med. Parasit., 53(4), 381-387
- 3) Edeson, J. F. B. and Buckley, J. J. C. (1959): Studies on filariasis in Malaya: On the migration and rate of growth of *Wuchereria malayi* in experimentally infected cats, Ann. Trop. Med. Parasit., 53(1), 113-119
- 4) Edeson, J. F. B. and Wharton, R. H. (1957): The transmission of *Wuchereria malayi* from man to the domestic cat, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 51(4), 366-370
- 5) Edeson, J. F. B. and Wharton, R. H. (1958): The experimental transmission of *Wuchereria malayi* from man to various animals in Malaya, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 52(1), 25-38
- 6) Era, E. (1959): Experimental studies on the periodicity of microfilariae, Endem. Dis. Bull. Nagasaki Univ., 1(3), 252-277 (In Japanese with English summary)
- 7) Katamine, D. (1972): Mechanism of microfilarial periodicity (turnus), in Progress of Medical Parasitology in Japan, IV, 395-420, Meguro Parasitological Museum, Tokyo
- 8) Katamine, D., Sato, A., Tada, I. and Aoki, Y. (1973): Studies on Malayan filariasis in Che-ju Is., Korea. 1 Epidemiology of Malayan filariasis in some endemic areas as revealed by the skin test, Jap. J. Trop. Med. Hyg., 1(3, 4), 189-196
- 9) Kim, D. C., Lee, O. Y. and Lee, K. W. (1973): Epidemiological studies of filariasis malayi in inland Korea, Yonsei Rep. Trop. Med., 4(1), 181
- 10) Laing, A. B. G. (1959): The dusky leaf monkey (*Presbytis obscurus*) as a natural host of *Wuchereria malayi* in Malaya, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 53(2), 213-214
- 11) Laing, A. B. G., Edeson, J. F. B. and Wharton, R. H. (1960): Studies on filariasis in Malaya: The vertebrate hosts of *Brugia malayi* and *B. pahangi*, Ann. Trop. Med. Parasit., 54(1), 92-99
- 12) Laing, A. B. G., Edeson, J. F. B. and Wharton, R. H. (1961): Studies on filariasis in Malaya:

- Further experiments on the transmission of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*, Ann. Trop. Med. Parasit., 55(1), 86-92
- 13) Ramachandran, C. P., Edeson, J. F. B. and Kershaw, W. E. (1960): *Aedes aegypti* as an experimental vector of *Brugia malayi*, Ann. Trop. Med. Parasit., 54(3), 371-375
- 14) Roseboom, L. E. and Cabrera, B. D. (1965): Filariasis caused by *Brugia malayi* in the Republic of the Philippines, Amer. J. Epid., 81(2), 200-215
- 15) Wada, Y., Katamine, D. and Oh, M. Y. (1973): Studies on Malayan filariasis in Che-ju Island, Korea. 2 Vector mosquitoes of Malayan filariasis, Jap. J. Trop. Med. Hyg., 1(3, 4), 197-210
- 16) Wharton, R. H. (1957): Studies on filariasis in Malaya: Observations on the development of *Wuchereria malayi* in *Mansonia (Mansonioides) longipalpis*, Ann. Trop. Med. Parasit., 51(3), 278-296
- 17) Wharton, R. H., Edeson, J. F. B. and Laing, A. B. G. (1958): Laboratory transmission of *Wuchereria malayi* by mosquito bites, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 52(3), 288
- 18) Wilson, T. (1961): Filariasis in Malaya—A general review, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 55(2), 107-129
- 19) Wilson, T., Edeson, J. F. B., Wharton, R. H., Reid, J. A., Turner, L. H. and Laing, A. B. G. (1958): The occurrence of two forms of *Wuchereria malayi* in man, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 52(5), 480-481

韓国濟州島のマレー糸状虫に関する研究

4 *Brugia malayi* (Che-ju strain) のネコへの感染実験

中島 康雄・青木 克己・坂本 信・末永 敏・片峰 大助

濟州島糸状虫浸淫地のマイクロフィラリア (mf.) 陽性者の住居で採集した、自然感染 *Aedes togoi* より得た感染幼虫を、鼠脛部皮下に注射して、3頭のイエネコに Che-ju strain の *B. malayi* を感染させることに成功した。その感染ネコを、恒温室内で累代飼育中の *Ae. togoi* (Nagasaki strain) に吸血させて得た感染幼虫を接種し、9頭のネコに第2代の感染を成立させた。*Ae. togoi* を用い2頭の、*Ae. aegypti* (Liverpool strain) を用い4頭のネコに、皮下接種により第3代の感染を成立させた。接種後 mf. を末梢血に検出するまでに91~131日を要した。末梢血中の mf. 数は感染の成立したネコの1/3~2/3では、次第に増加した。従ってネコは Che-ju strain の *B. malayi* の比較的好適な宿主と考えられる。Che-ju strain の mf. はヒトでは periodic type であるが、ネコでは夜間出現性が顕著でなく、昼間にもかなり末梢血中に認められ、sub-periodic の傾向を示した。生前或は剖検時 mf. が検出された8頭のうち、2頭の腎周囲脂肪組織より成虫が回収された。成虫の局在部位は、接種された虫体の体内部リンパ管への移動を示唆し、その為、剖検時成虫の検出が困難となると思われる。累代飼育中の *Ae. togoi* の *B. malayi* 感染幼虫による感染率は69.3%で、感染蚊1個当たりの平均保有感染幼虫数は、5.8隻であった。従って *Ae. togoi* は *B. malayi* の laboratory vector として用い得る。*Armigeres subalbatus* は *B. malayi* に感受性を示さなかったが、近似種の *B. pahangi* は両種の蚊にて感染幼虫まで発育した。

直腸生検を中心とした日本住血吸虫症の研究

1 疫学的研究

加茂 悦爾¹・葉袋 勝²・石崎 達³

昭和51年11月1日 受付

山梨県における日本住血吸虫（以後日虫と略す）症は近年その急性型をみず、色々な点でその慢性型が問題である。事実この15年ほど、特に昭和40年代に入り急性日虫症は極めて稀であるとされている。山梨県立衛生研究所で行う集団検診で保卵者が発見されても、無症状の者が多い。これは昭和32年より山梨県の強力な宮入員の撲滅対策や農村の都市化、工業化、農業の機械化または稲作地帯の果樹園化などに伴い、貝の生息地域が昭和35年当時にくらべて約6割となり（山梨県, 1974）、感染貝や感染犬が著しく減少したことが（久津見, 1971）、急性型日虫症のみられなくなった事の原因である。

肝硬変症による吐下血（井内ら, 1972）や肝性昏睡ないしその前駆症（井内, 1970）がしばしば経験され、てんかん発作を示す脳型日虫症（有泉, 1956）も時にみられ、直腸癌（宮川, 小宮山, 1962）や胆石、胆嚢炎、難治性の活動型慢性肝炎（井内ら, 1969）などの諸種の消化器系疾患や、

自律神経失調症などの背景に日虫症が関連している場合が多い。

そして検便による虫卵の検出が極めて難しい現在、その確定診断は皮内反応とそれに基づく直腸生検によるのが最適である。

皮内反応は従来定性的意味を主として行われて来たが、これに定量的意義を加えた閾値検査（石崎ら, 1968）を著者らは臨床的に応用した。そして同時に施行した直腸生検との相関関係を検討し、慢性日虫症の診断法と治療対策の確立をはかる事が今回の研究目的である。

対象と方法

対象：昭和42年10月より昭和48年までの巨摩共立病院の外来および入院患者のうち、日虫症の流行地農村地区ないしその隣接地帯の住民で日虫感染の可能性のあるものについて、無作為に皮内反応の閾値検査と直腸生検の両者を施行した217名

TABLE 1 The number of patients studied from 1967 to 1973

Year	Male	Female	Total
1967	3	0	3
1968	18	14	32
1969	26	14	40
1970	22	17	39
1971	14	19	33
1972	17	20	37
1973	17	16	33
Total	117	100	217

1 山梨県中巨摩郡檜形町, 巨摩共立病院内科 2 山梨県立衛生研究所地方病科

3 独協医科大学アレルギー内科, 前国立予防衛生研究所寄生虫部

TABLE 2 The age distribution of patients studied

Age	Male	Female	Total
15-19	9 (9)	3 (3)	12 (12)
20-29	5 (3)	1 (1)	6 (4)
30-39	36 (36)	19 (16)	55 (52)
40-49	22 (19)	25 (20)	47 (39)
50-59	18 (18)	34 (31)	52 (49)
60-69	23 (20)	10 (8)	33 (28)
70-79	4 (4)	8 (7)	12 (11)
Total	117 (109)	100 (86)	217 (195)

(): Number of positive patients in the skin test

である。毎年約30~40名を経験し男117名、女100名であった (TABLE 1)。その年齢分布は TABLE 2 に示す如く、主な対象は30歳から60歳未満で男女別はほぼ同数であった。

全対象217名のうち、有病地住民が151例 (70%) で、非有病地住民が66例 (30%) であった。また職業別にこれをみると、純農家115例 (53%)、兼業農家44例 (20%)、非農家54例 (25%)、無職・不明4例 (2%) で、約7割が農業に関係した者

であった。

皮内反応: 抗原は Melcher (1943) の方法による日虫虫体の acid soluble protein fraction でその基準液の有効蛋白量は 30 mcg/ml であった。皮内反応閾値はこの基準液 (2⁰) より2倍希釈系列 (2¹⁻¹¹) を作成し、その 0.02ml を前腕の皮内に注射し、15分後に判定してその陽性限界を決定した。判定法は石崎の法 (1964) に従って、発赤の平均直径 20 mm 以上、膨疹の平均直径 9 mm 以

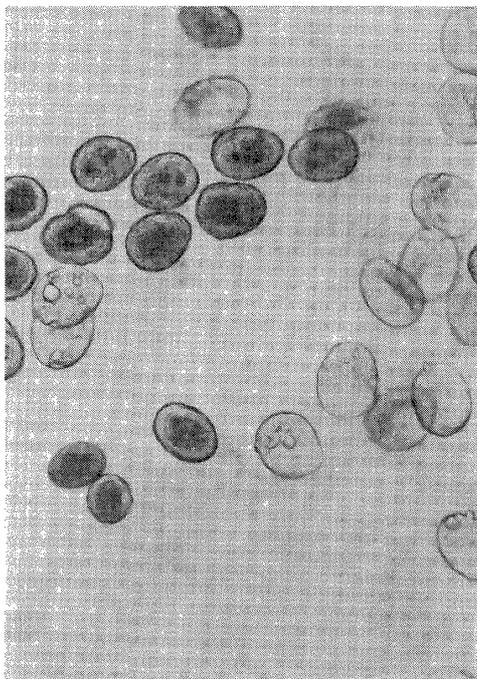


Photo. 1 The *S. japonicum* eggs in the raw rectal biopsy specimen, $\times 100$.

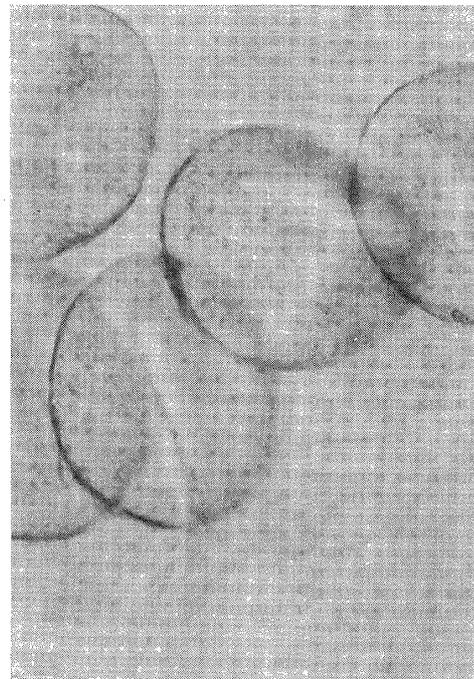


Photo. 2 Relatively fresh eggs in the same specimen. Transparent, yellowish and thin shells, $\times 400$.

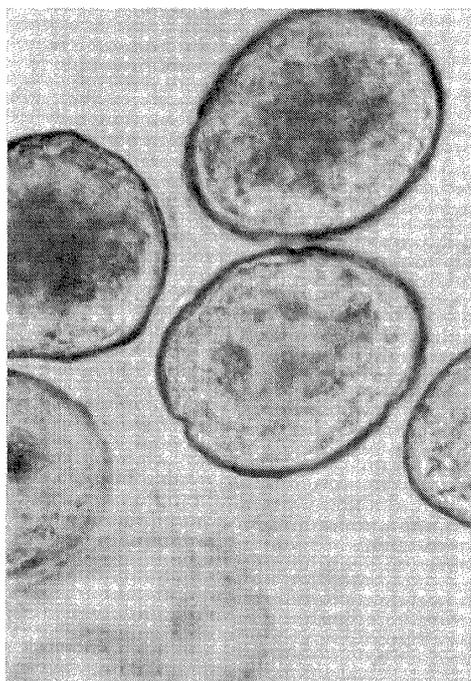


Photo. 3 Old eggs in the same specimen. Dark, granulated or calcified black eggs, $\times 400$.

上またはその両者を以って陽性とした。

直腸生検：肛門鏡と額帯鏡および生検用鉗子を使用した。患者体位は膝胸位（田尻ら，1964）で、肛門より数 cm の直腸粘膜を粟粒大切除し、2枚のスライドガラスで圧挫して直ちに検鏡した。1

回の切除で虫卵が発見できない場合は、さらに2回、3回と別の部位を切除したが、3回までとした（Photo. 1）。

虫卵の新旧判定：生標本の顕微鏡所見によった。検鏡下比較的新しい虫卵は明るい淡黄色を呈し卵殻はうすいが（Photo. 2），陳旧変性卵は顆粒状を呈し、内容は不平等に暗く見え、卵殻は厚く、石灰化したものは黒く見える（Photo. 3）。1症例あたりの虫卵数は1ないし3切片で認められた虫卵の総計である。

Circumoval precipitin (COP) テスト：Oliver-González の原法（1954）にほぼ準じて行った。

検便：MIFC法（Blagg *et al.*, 1955）により1患者につき連続5日間施行した。

成 績

虫卵の検出率と皮内反応の比較：TABLE 3 に示したように検便の場合は総数 153 例中、皮内反応陽性のときの虫卵陽性は7例（5%）のみで、虫卵陰性が133例（87%）であった。反応陰性の13例（9%）はすべて虫卵陰性であった。

一方直腸生検の場合は総数 217 例中、皮内反応陽性の場合の虫卵陽性は112例（52%），虫卵陰性83例（38%）で、皮内反応陰性の場合の虫卵陽性が5例（2%）あり、虫卵も陰性が当然ながら17

TABLE 3 The interrelation between the skin test and rectal biopsy or the stool examination

Skin test	Stool examination			Rectal biopsy		
	Ova +	-	Total	+	-	Total
+	7* (4.6)	133 (86.9)	140 (91.5)	112* (51.6)	83 (38.3)	195 (89.9)
-	0 (0)	13 (8.5)	13 (8.5)	5 (2.3)	17 (7.8)	22 (10.1)
Total	7 (4.6)	146 (95.4)	153 (100)	117 (53.9)	100 (46.1)	217 (100)

(): %, * $p < 0.001$

TABLE 4 Correlation of egg findings with skin test

Correlation	Stool examination	Rectal biopsy
correlated	13	59
unrelated	87	41
Total	100	100

例(8%)あった。すなわち皮内反応陽性の場合の検便虫卵陽性は7/140(5%)であったのに対し、生検虫卵陽性は112/195(57%)であり、生検による虫卵検出率は検便にくらべて著しく高かった(χ^2 テストで $p < 0.001$)。

皮内反応と生検または検便による虫卵検出の一致度はTABLE 4に示したように、生検の場合が(112+17)/217、すなわち59で、検便は(7+13)/153すなわち13に過ぎず、不一致度は、生検の場合41、検便87であった。

COPと虫卵検出率、皮内反応との比較:COP施行例は39例で少数であったが、これと検便、皮内反応閾値、生検との関連を検討した。なおCOP陽性の場合の虫卵周囲の沈降物は小さいものが大部分であった。

まず検便とCOPの相関をみるとTABLE 5のように、COP(-)の場合の検便虫卵の陰性は93%(29/31)で、虫卵陽性は7%(2/31)であった。COPテスト(+)の場合の虫卵陰性は87%(7/8)で、両者とも陽性は13%(1/8)であった。

検便虫卵陽性者3例のうちCOP(+)は1例(33%)で、COP(-)が2例(67%)であった。

次にCOP検査を実施した52例(検便しない13例を含む)についてCOP陽性率と皮内反応閾値との関係を見ると、Fig. 1の如くである。皮内反応閾値の 2^0 は基準液を示す。右に行くに従って倍々と高希釈倍率閾値になる。皮内反応(-)のときはCOP陽性は0で、高希釈倍率閾値になるに従いCOPの陽性率が増加し、特に 2^4 よりCOPの陽性率が急増した。そして 2^{0-3} と 2^{4-7} のCOP陽性率間に5%以下の危険率で有意差があった(1/23:6/22)。

直腸生検とCOP陽性率をみると、まず虫卵数別に検討して、Fig. 2の左図のように、虫卵数0より、100以下の場合、100以上の場合と虫卵数が多くなるに従いCOP陽性率も高くなる傾向を示した。また右図のように、これを虫卵の新旧別にみると、全部陳旧卵の症例ではCOP陽性率は13%(4/32)と低いが、新虫卵を含む症例ではCOP陽性率は40%(4/10)と高かった(χ^2 テス

TABLE 5 Correlation of egg positivity with COP test

COP test	Eggs by stool examination		
	-	+	Total
-	29 (93.5)	2 (6.5)	31 (100)
+	7 (87.5)	1 (12.5)	8 (100)
Total	36 (92.3)	3 (7.7)	39 (100)

(): %

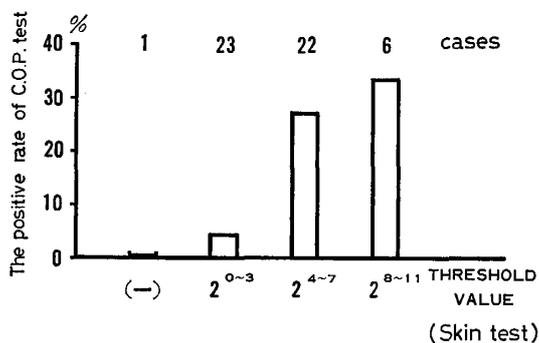


Fig. 1 The positive rates of COP test among the groups of different threshold values of the skin test.

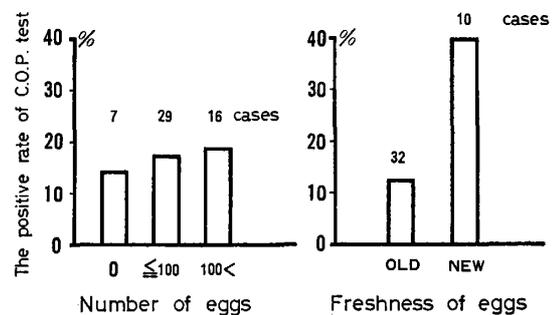


Fig. 2 The positive rates of COP test among the groups of different number or freshness of eggs by rectal biopsy.

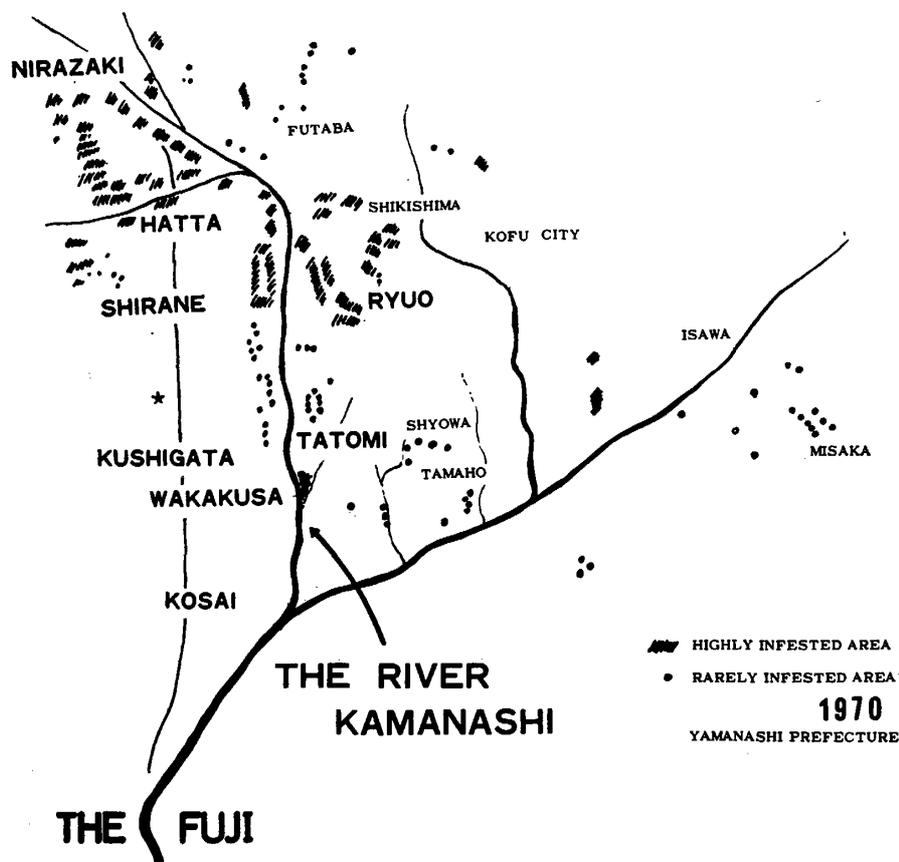


Fig. 3 Distribution of the snails in Kofu basin.

トで $p < 0.05$).

地区別の検討：富士川の三大支流であり甲府盆地を灌漑している釜無川、荒川および笛吹川沿いの稲作地帯には、昭和20年代まではそのほぼ全域にわたり宮入貝が分布していたが（山梨県，1974），漸次その生息地域が縮小し現在その大部分が釜無川流域に限局し、荒川、笛吹川流域では散発的にその生息地域があるのみとなった（Fig. 3）。巨摩共立病院はこの釜無川の西側の櫛形町と白根町の境界の非有病地帯にあるが、周辺の有病地帯も診療圏に含まれている。この釜無川をさらに宮入貝の採取数の多少により3地区に分けた。櫛形・白根をI；甲西・増穂・田富・昭和をII；韭崎・竜王・八田・若草をIIIとした（Fig. 4）。貝の採取数はIが最少で、IIIが最も多く、IIが中間であった。今回の研究対象は集団検診ではなかったので、この3地区から無作為に受診したと考えられる。3地区以外の患者は除外したので総数は

195例である。

3地区と皮内反応閾値の関連をみると、閾値が 2^{0-2} の群はI, IIがほぼ同率で、IIIに少なく、 2^{3-5} の群とこの3地区間には一定の関係はなかったが、 2^{6-11} の群はI, II, IIIの順に15% (9/62), 19% (10/53), 29% (23/80)と順次高率になっていた。I-III間には χ^2 検査で5%以下の危険率で有意差があった（Fig. 5）。

次にこの3地区と直腸生検による虫卵の陽性率をみると、I, II, IIIの順に陽性率が、44% (30/69), 47% (32/68), 69% (55/80)と順次高くなっていった。そしてI-III間およびII-III間に χ^2 テストで1%以下の危険率で有意差があった（Fig. 6）。

これを虫卵数と虫卵の新旧の観点からみると、まずFig. 7の左側の図のようにI, II地区では直腸生検で虫卵陰性が目立ち、虫卵数100以上の出現率は低い。これに反してIII地区では虫卵陰性

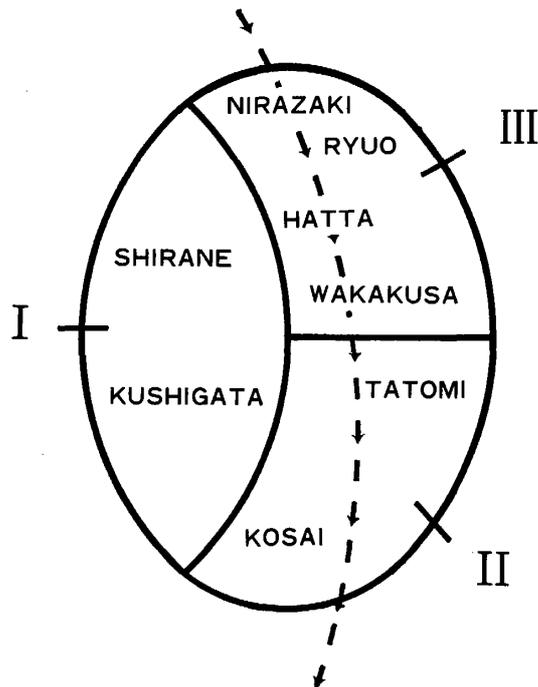


Fig. 4 A schematic atlas of three districts around the River Kamanashi.

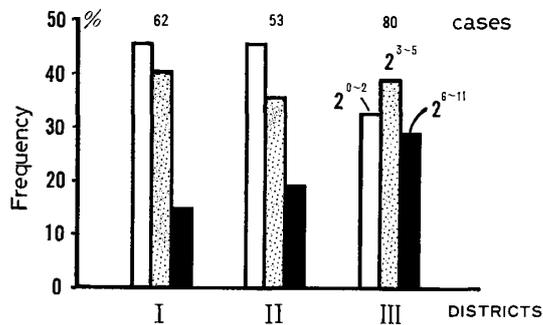


Fig. 5 Distribution rates of different threshold values of the skin test among the groups of the three districts.

者が著しく減少して虫卵陽性者が増加し、内容的にも虫卵数増加の傾向を示している。また右側の図のように新鮮卵の出現率を3地区で比較すると、I, II 地区では新鮮卵の出現が低く、III 地区では明らかに増加している。そして虫卵数 100 以上の場合につき I, III 間では χ^2 テストで 1% 以下の危険率で有意差を示した。また新鮮卵出現率についても I, III 間で同様のテストで 5% 以下の危険率で有意差を認めた。

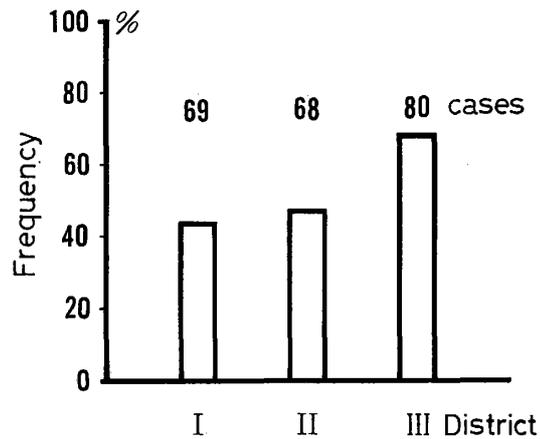


Fig. 6 Positive rates of eggs by rectal biopsy among the three districts.

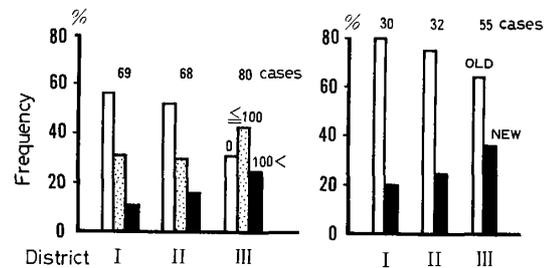


Fig. 7 Distribution rates of different number or freshness of eggs by rectal biopsy among the groups of the three districts.

検便による虫卵陽性者の分析：対象 217 例のうち検便による虫卵陽性者は 7 例（3%）のみであった。TABLE 6 に示すように年齢は各年齢層に分布していた。この 7 例の皮内反応の閾値は 2^{6-11} が 4 例（57%）、 2^{0-2} が 2 例（29%）と、高希釈倍率閾値の症例が多く、低閾値の症例が少なかった。直腸生検による虫卵数については 600 以上のものはなかった。なお直腸生検による虫卵の新旧では、一部ないし約半数の新虫卵を含むものが 5 例あったが、大部分または全部が新鮮な虫卵であった症例はなかった。

考 察

山梨県の調査によると有病地中学生の皮内反応陽性率は昭和 34-35 年は 42%（1,110/2,642）であったが、昭和 47 年は 4%（54/1,323）に激減し

TABLE 6 An analysis of the egg-positive cases in stool examination

a) Age	10-	20-	30-	40-	50-	60-
Number of cases	2	0	1	1	1	2
b) Threshold value of the skin test	2 ⁰⁻²		2 ³⁻⁵		2 ⁶⁻⁸	2 ⁹⁻¹¹
Number of cases	2		1		2	2
c) Number of eggs by rectal biopsy	below 100		200		500	over 600
Number of cases	5		1		1	0
d) Property of eggs by rectal biopsy	all old	partly fresh	half fresh	almost fresh		all fresh
Number of cases	2	4	1	0		0

た。また検便による虫卵陽性率も昭和34-35年が13% (116/921)であったが昭和47年には0% (0/54)となった(山梨県, 1974)。さらに感染犬の調査でも釜無川西岸の町村で昭和29年が28% (48/174), 昭和46年0% (0/60)となった(久津見, 1971)。このように検便による虫卵検出の困難になってきた状況下, 本研究でも皮内反応陽性者の検便による虫卵陽性者は5%であるのに対し直腸生検による虫卵陽性者は52%であった。また皮内反応と検便の一致度は13であるにくらべ, 生検は59であった。また検便の不一致度は約87で, 検便による虫卵検出の困難性がわかる。つまり直腸生検による慢性日虫症の診断の重要性が示される。

松田ら(1976)はフィリピンのレイテ島でMIFC法による検便虫卵陽性者94例中, COP反応が100%陽性であったと報告しているが, 本研究ではCOPテスト陰性例が67%であった事は感染の程度が全く違うことに基づくと思われた。

釜無川のやや上流地帯は宮人員の分布が多く, その地区の対象は皮内反応の希釈倍率による陽性閾値も高く生検結果も質量共にこれと符号し, 疫学的に重要な資料を提供している。このような研究報告は内外文献には見当たらない。

検便による虫卵陽性者の分析で, それらの年齢が若年より老年まで各年齢層に一様に分布していた事実は, 直腸生検により若年層に新しい虫卵が多かった事実と一致しないように見える。しかしこれは検便虫卵陽性者が少なかったためと考えら

れた。検便虫卵陽性者の皮内反応が希釈倍率で高閾値であることはすでに石崎ら(1964)が報告しているが本研究でもその事実が確かめられた。また生検虫卵数が100以下という少ない症例に検便の虫卵陽性者が多かったが, これは新しい感染と関連して検討すべきであろう。検便虫卵陽性者では成虫の産卵活動が活発であると考えられるが, 直腸生検でみたところ大部分または全部が新鮮卵の症例はなかった。これは日虫卵の組織内の石灰化が, 産卵後第60日で始まり(織田, 1959), 日虫卵の組織内の寿命が3週間しかない(Vogel, 1942)などの事実が関係しているものと思われる。

一番問題となるのは虫卵の新旧の鑑別である。この点については第2報で詳述するので簡単に述べておく。動物実験でみられるように, 明らかに生きている卵はミラシジウムがその繊毛を動かして運動し, あるいは火炎細胞の存在でその判定は容易である。しかし本研究ではこのような生卵は1例も見られず, 研究方法の項で述べた如く比較的新しい卵, 比較的古い卵という鑑別しかできなかった。明らかに古い卵は石灰化しているので問題はないが, その境界は難しいわけである。Vogel(1942)やPrata(1957)の動物実験に基づく組織内虫卵の発育に関する詳しい顕微鏡的観察所見は本研究には余り利用できなかった。

小 括

昭和42年より48年までの間に巨摩共立病院で診

療を受けた患者のうち、有病地の農耕従事者または有病地隣接地域で日虫症の感染機会が推定された患者について、皮内反応閾値検査と直腸生検の両者を施行し得た217名を分析した。

皮内反応は Melcher 抗原を使用し、有効蛋白量 30 mcg/ml の基準液 (2^0) より 2 倍希釈系列 (2^{1-11}) を作成して施行した。直腸生検による虫卵の新旧の判定は生標本による顕微鏡所見によった。そして下記のごとき結果を得た。

1) 慢性日虫症の場合、皮内反応陽性者の直腸生検はその虫卵検出率が検便 (MIFC 法) にくらべ著しく高かった ($112/195:7/140$, $p<0.001$)。

2) COP 陽性率は皮内反応高希釈倍率閾値 (2^{4-7}) の症例に低閾値 (2^{0-3}) の症例に比べ高かった ($6/22:1/23$, $p<0.05$)。また COP 陽性率は直腸生検で虫卵数100以上の群に、虫卵数100以下の群に比べ高い傾向を示した。そして COP 陽性率は新虫卵を含む群に古い虫卵を含む群より

高かった ($4/10:4/32$, $p<0.05$)。

3) 釜無川流域を宮入員の分布の多少により 3 地区に分けると、貝の多い上流地帯では皮内反応で高希釈倍率閾値を示す患者が多く、また、直腸生検で虫卵数が多い症例が多く、しかも新虫卵を含む者が多かった。

以上の事実により、皮内反応の閾値検査と直腸生検は慢性日虫症の疫学と治療対策に価値があるといえる。

謝 辞

COP テストについて御指導をたまわった前山梨県立衛生研究所地方病科長 (現旭川医科大学、寄生虫学教室教授) 久津見晴彦博士および宮入員の生息実態調査地図を提供して下さった山梨県予防課課長石川敏行先生に対して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 有泉 信 (1956): 日本住血吸虫症と関係ある三つの脳疾患 — 脳日本住血吸虫症・肝脳疾患・症候性精神病一, 日本医事新報, 1693号, 21-26
- 2) Blagg, W., Schloegel, E. L., Mansour, N. S. and Khalaf, G. I. (1955): A new concentration technic for the demonstration of Protozoa and Helminth eggs in feces, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 4 (1), 23-28
- 3) 石崎 達, 飯島利彦, 伊藤洋一 (1964): 日本住血吸虫病の診断法の研究, (2) 日本住血吸虫抗原皮内反応の判定規準と診断的価値, *寄生虫誌*, 13 (5), 387-396
- 4) 石崎 達, 飯島利彦, 伊藤洋一 (1968): 日本住血吸虫抗原皮内反応及びその陽性限界閾値 (希釈法) の意義, *寄生虫誌*, 17 (1), 60-66
- 5) 井内正彦, 中山良子, 西沢一好, 石和 衛 (1969): 肝疾患の統計的観察 — 当院における四年間の成績一, 日本医事新報, 2369号, 25-26
- 6) 井内正彦, 中山良子, 西沢一好, 石和 衛, 木谷健一 (1970): 異常行動型肝性脳症を示した慢性日本住血吸虫症25例の臨床的観察, *内科*, 26 (4), 727-733
- 7) 井内正彦, 平賀良彦, 早川操子, 飯尾正宏, 千葉一夫, 山田英夫 (1972): 当院における上部消化管出血, ことに慢性日本住血吸虫症の食道静脈瘤からの出血についての検討, *内科*, 29(5), 959-962
- 8) 久津見晴彦, 中山 茂, 三木阿い子, 薬袋 勝, 梶原徳昭 (1971): 山梨県における日本住血吸虫症の疫学的研究 (1) 感染貝数と患者ならびに感染犬の地区別発生率との関係, 山梨県立衛生研究所年報, 第15号, 63-67
- 9) 松田 肇, Noseñas, J. S., Perez, D. T., Go, U. P., 田中 寛 (1976): レイテ島における日本住血吸虫症の診断に関する免疫反応の比較, *寄生虫誌*, 25, 増刊号, 85

- 10) Melcher, L. R. (1943): An antigenic analysis of *Trichinella spiralis*, J. Infect. Dis., 73 (1), 31-40
- 11) 宮川勝馬, 小宮山和己 (1962): 外科的対象となった消化器日本住血吸虫症の諸相 —とくに直腸癌発生因子としての卵子の意義—, 外科, 24 (14), 1492-1498
- 12) 織田卓五郎 (1959): 日本住血吸虫症における組織内虫卵の運命及び組織変化に関する研究, 久留米医誌, 22 (1), 185-216
- 13) Oliver-González, J. (1954): Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*, J. Infect. Dis., 95, 86-91
- 14) Prata, A. (1957): Biópsia retal na esquistossomose mansoni; Bases e aplicações no diagnóstico e tratamento, 1-197, Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, (abstracted in Warren, K. S.; Schistosomiasis, the evolution of a medical literature, 557-567, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London, 1973)
- 15) 田尻稻穂, 小張一峰, 津田一彦, 津田靖彦, 津田英彦, 横山 宏 (1964): 日本住血吸虫症の直腸粘膜生検による診断, 日本医事新報, 2082号, 26-31
- 16) Vogel, H. (1942): Ueber Entwicklung, Lebensdauer und Tod der Eier von *Bilharzia japonica* im Wirtsgewebe, I. und II. Dauer der Entwicklung, Dtsch. Tropenmed. Z., 46 (3), 57-69
- 17) Vogel, H. (1942): Ueber Entwicklung, Lebensdauer und Tod der Eier von *Bilharzia japonica* im Wirtsgewebe (Fortsetzung und Schluss), III. Lebensdauer der Eier im Gewebe, Dtsch. Tropenmed. Z., 46 (4), 81-91
- 18) 山梨県 (1974): 山梨県における地方病の実態, 7-13, 甲府

STUDIES ON SCHISTOSOMIASIS JAPONICA WITH PARTICULAR REFERENCE TO RECTAL BIOPSY

1 Epidemiological investigation, specially referred to the skin test and COP test

ETSUJI KAMO¹, MASARU MINAI² AND TATSUSHI ISHIZAKI³

Acute schistosomiasis japonica has become a rare disease in the past fifteen years in Kofu basin because of the marked decrease of *Oncomelania nosophora*, however, our attention is drawn to the chronic type of disease which has many clinical problems.

The purpose of this study is to clarify epidemiological status of schistosomiasis at present by means of rectal biopsy, the threshold value of the skin test and COP test.

In the period from 1967 to 1973, the 217 patients of Koma-Kyoritsu Hospital were examined by rectal biopsy, the skin test with Melcher's antigen and COP test under the suspicion of chronic schistosomiasis. For determining the threshold value of the skin test, twofold dilution series of the antigen solution were prepared, and microscopic examination was made on the raw specimen obtained by rectal biopsy to see whether the eggs were fresh or old.

The results were as follows:

- 1) The egg positivity of rectal biopsy specimen was significantly higher than that of stool specimen tested with MIFC method.
- 2) The COP positivity increased in parallel to the increase of the threshold value of the skin test in diluting grade. Among the patients of rectal biopsy, the COP positivity seemed to be higher in the case with 100 or more eggs. It was also significantly higher in the case being detected fresh eggs in the mucosal specimen.
- 3) The area irrigated by the River Kamanashi was divided into three districts, I, II and III, according to the collected numbers of the snails, which increased in number in order of $I < II < III$.
 - a. The incidence of cases with low dilution threshold value of the skin test decreased in order of $I = II > III$, while cases with high dilution threshold value increased in order of $I < II < III$.
 - b. The incidence of the egg-positive cases by rectal biopsy increased in order of $I < II < III$.
 - c. The incidence of the patients with eggs over 100 by rectal biopsy increased in order of $I < II < III$.
 - d. The incidence of the patients with only old eggs by rectal biopsy decreased in order of $I > II > III$, while that of the patients being detected fresh eggs increased in order of $I < II < III$.

Thus, results of rectal biopsy and the threshold value of the skin test corresponded with the distribution of the snails both quantitatively and qualitatively.

As mentioned above, the rectal biopsy and the threshold value of the skin test are the important diagnostic parameters, and they are also important for epidemiological analysis of chronic schistosomiasis in such a situation of infection in Japan, where the eggs in feces used to be discovered with difficulty.

1 Division of Internal Medicine, Koma-Kyoritsu Hospital; Kushigata-cho, Yamanashi Prefecture, 400-03, Japan. 2 Yamanashi Prefectural Hygiene Laboratory. 3 Department of Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine; formerly, Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo.

組織内マラリア原虫の新しい染色法

岩本 宏文¹・山本 利雄²

昭和51年8月4日 受付

緒 言

組織内マラリア原虫染色法については従来より諸家等による多くの方法が知られている(文献1, 3, 5, 6)。我々は最近、熱帯熱マラリア原虫症(脳性マラリア)の剖検を経験し、組織内マラリア原虫の為の種々の染色法を試みたが十分に満足できる方法を見い出せなかった。それで我々はマラリア色素除去法と、常に従来より一段と鮮明に染め上がる方法を考案し、各種染色法と比較検討したので報告する。

方 法

我々の組織内マラリア原虫染色法は以下の順序で行った。

- 1) 型の如く脱パラフィン、水洗(必要があれば脱昇汞操作とか、マラリア色素除去操作を続けて行う)。
- 2) 0.25%過マンガン酸カリ水溶液にて15分間
- 3) 流水水洗5分間
- 4) 2%蓚酸水5分間
- 5) 流水水洗5分間
- 6) 2%鉄明礬水2~3分間
- 7) 蒸留水水洗1分間ずつ3回
- 8) 下記のギムザ液にて一晚(使用時調製)

(ギムザ原液(メルク)	5ml
M/15 燐酸緩衝液 pH 7.2	100ml
- 9) 蒸留水水洗(約2秒間)
- 10) 0.5%酢酸水にて切片全体が赤くなる迄(約10~20秒間)浸す
- 11) 蒸留水水洗(約2秒間)

12) メタノール、イソプロパノール等量液1回、イソプロパノールを2回通して脱水、分別

13) キシロール透徹、HSR封入

従来の方法としては佐野氏 Giemsa 法(6)、佐野氏 Pappenheim 重染色法(6)、Thomas 法(4)、Mallory's PMB 法(5)、Price 法(2)、Wolbach 法(1)、Bayley 法(1)、そして Drury 法(1)を実施した。

マラリア色素除去法は必要に応じて上記の操作1)と2)の間で実施した。すなわち80%エタノール100ml、1%水酸化カリウム1ml、ピリジン10滴の混合液に1時間浸した。なお従来より知られているマラリア色素除去法としては Verocay 法、Kardasewitsch 法(3)、Luna's I 法、Luna's II 法、Luna's III 法、Luna's IV 法(4)、および Barrett 法(1)を実施した。

結 果

各種のマラリア原虫染色法では、マラリア原虫と組織成分の細胞核は青色に、赤血球は赤色から赤紫色に染まった(Fig. 2, 3, 4)。そして、いずれの染色法についても10%緩衝ホルマリン、ツェンカーホルマリンなどで固定をした組織では比較的虫体が強く鮮明に染まり、エタノール、カルノア等では弱く染まった。更にマラリア色素除去法であるが、我々の方法と Luna's IV 法が他の方法に較べて完全に色素が除去され良好であった。

考 察

我々の方法と従来より知られている諸家のギムザ染色法との比較を、それぞれの染色結果を主体

TABLE 1 Comparison of various staining methods for plasmodia in tissue sections

Method	Result of plasmodia	Differentiation and dehydration	Staining time	Staining steps	Decolorization	Constancy of the staining results
Sano's Giemsa	good	difficult	2-12 hrs	a few	slow	poor
Sano's Pappenheim-Giemsa	good, sometimes excellent	difficult	90 min	middle	quick	poor
Thomas'	good	easy	30 min	middle	quick	excellent
Mallory's PMB	good	easy	40 min	middle	quick	excellent
Price's	good	easy	over night	middle	moderate	good
Wolbach's	good-excellent	easy	over night	middle	moderate	good
Bayley's	good-excellent	easy	30 min	middle	quick	good
Drury's	good	middle	over night	a few	moderate	good
Our new method	always excellent	easy	over night	many	slow	excellent

として Table 1 に示す。

Table 1 からわかるように、我々の方法は染色色調の安定性、つまり一定の染め上がりの期待できる事がすぐれている。その理由としては分別に用いる有機溶媒をエタノールからイソプロパノールに替えたためと思われる。また、染め上がりについて虫体と周囲組織細胞とのコントラストが比較的鮮明な事も我々の方法の特徴と言える。その理由としては過マンガン酸カリにて酸化、そして鉄明礬の処理により組織の好塩基性を高めた事によると考えられる。ギムザ液の pH を 7.2 にしたのは虫体を鮮明に染め上げるためであるが、実際には pH 6.8 から 7.4 の範囲のものでも鏡検上大きな差はなかった。

マラリア色素除去については、従来より行われている方法を繰り返し行ったが多くの方法では完全な色素除去はできなかった。そのうち最も良好な結果が得られたのは Luna が特に推奨する Luna's IV 法であった。Luna's IV 法および我々の方法によるマラリア色素除去の後に我々の染色法を実施したものでは、虫体の鮮明度についてみれば我々の方法が勝っていると思われた (Fig. 5, 6)。我々のマラリア色素除去液の成分で、エタノールはスライドガラスからの切片の剝離を防止し、水酸化カリウムとピリジン (2) は共にマラリ

ア色素を溶出させるのであらうと思われる。

組織内マラリア原虫染色のための固定液は、虫体の鮮明度合いに重点をおけば 10% 緩衝ホルマリンとツェンカーホルマリンが種々の染色法にても良好な結果が得られた。我々の用いたその他の固定液では、虫体の青色が薄く鏡検には好ましくなかった。この原因は固定液のそれぞれの固定機序の相違によるものと思われる。

結 語

- 1) 組織内マラリア原虫染色法とマラリア色素除去法を考案し報告した。
- 2) 本染色法の特徴は過マンガン酸カリ、鉄明礬等を使う前処理とメタノールそしてイソプロパノールを用いての分別にある。
- 3) 本染色法は従来の方法に比較して染め上がり鮮明でしかも安定している。
- 4) マラリア色素除去のためにピリジンを用いたが、従来の方法に比較して色素除去がより完全であった。
- 5) 組織内マラリア原虫染色のための固定液としては 10% 緩衝ホルマリンおよびツェンカーホルマリンが好適であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり御校閲を頂いた天理医学研究所病理市島国雄博士, 山辺博彦博士ならびに天

理よろづ相談所病院臨床病理部長高橋浩博士に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Drury, R. A. B. (1967): Carleton's histological technique 4th ed., 315-316, 362, Oxford
- 2) 今泉 正 (1962): 組織化学および細胞化学, 391-393, 白水社
- 3) 小林忠義 (1970): 病理組織標本の作り方 第3版, 192-193, 医学書院
- 4) Luna, L. G. (1968): Manual of histologic staining methods of the A. F. I. P. 3rd ed., 127-129, McGraw-Hill
- 5) Preece, A. (1972): A manual for histologic technicians 3rd ed., 252-254, Little Brown
- 6) 佐野 豊 (1970): 組織学研究法, 305, 南山堂

A NEW METHOD FOR DEMONSTRATION OF PLASMODIA IN TISSUE SECTION

HIROFUMI IWAMOTO¹ AND TOSHIO YAMAMOTO²

Received for Publication 4 August 1976

A new improved method to demonstrate plasmodia in tissue section is presented and discussed.

Sections are treated with 0.25% potassium permanganate, 2% oxalic acid and 2% iron alum before the application of Giemsa solution buffered at pH 7.2. Differentiation is carried out in 0.5% acetic acid and then in methanol and isopropanol. From our experience this method provides advantages over other methods such as Sano's Giemsa stain, Sano's Pappenheim double stain, Thomas' method, Mallory's PMB method, Price's method, Wolbach's method, Bayley's method and Drury's method, since plasmodia in the tissue can more clearly be demonstrated and more constant results can be obtained.

Ten-percent buffered formalin and Zenker's formalin solution are better fixatives than Bouin's, Carnoy's and ethanol for this purpose.

A new method for the removal of malarial pigment using pyridine is also presented.

1 Department of Clinical Pathology, 2 Department of Overseas Medical Service, Tenri Hospital.

Plasmodia in human cerebral vessels

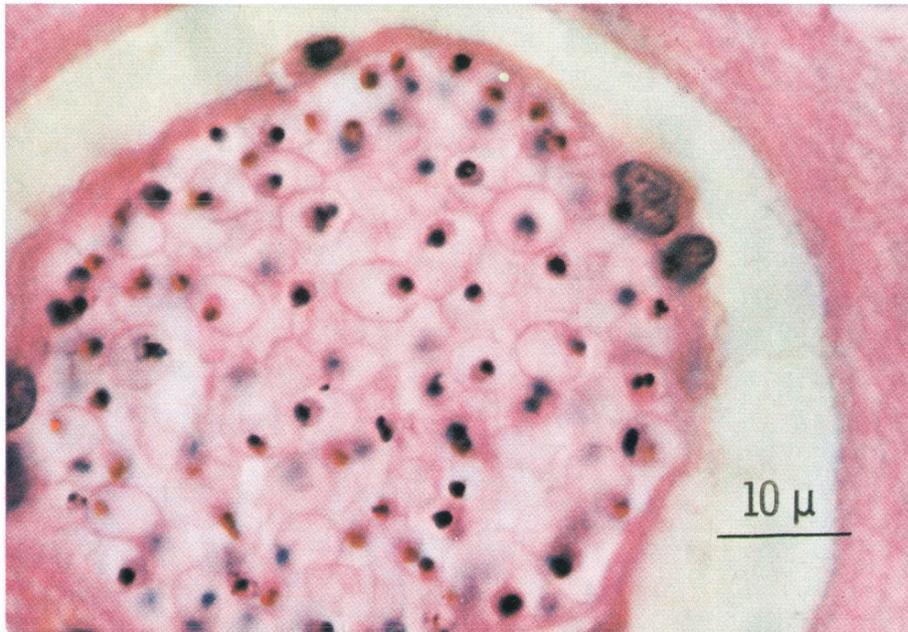


Fig. 1 HE stain, 10% buffered formalin fixation.

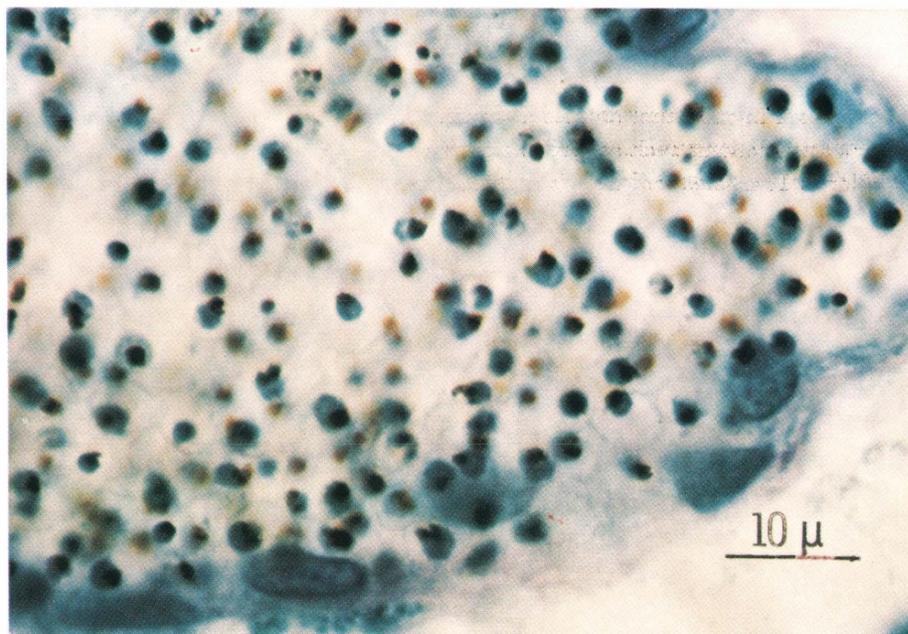


Fig. 2 Authors' method for demonstrating plasmodia, 10% buffered formalin fixation.

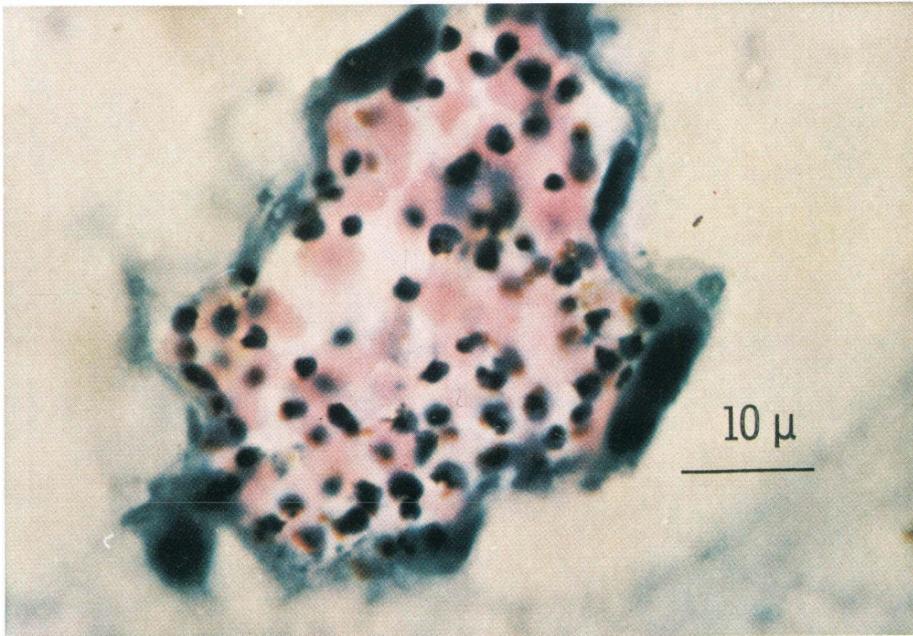


Fig. 3 Sano's Pappenheim double stain, 10% buffered formalin fixation.

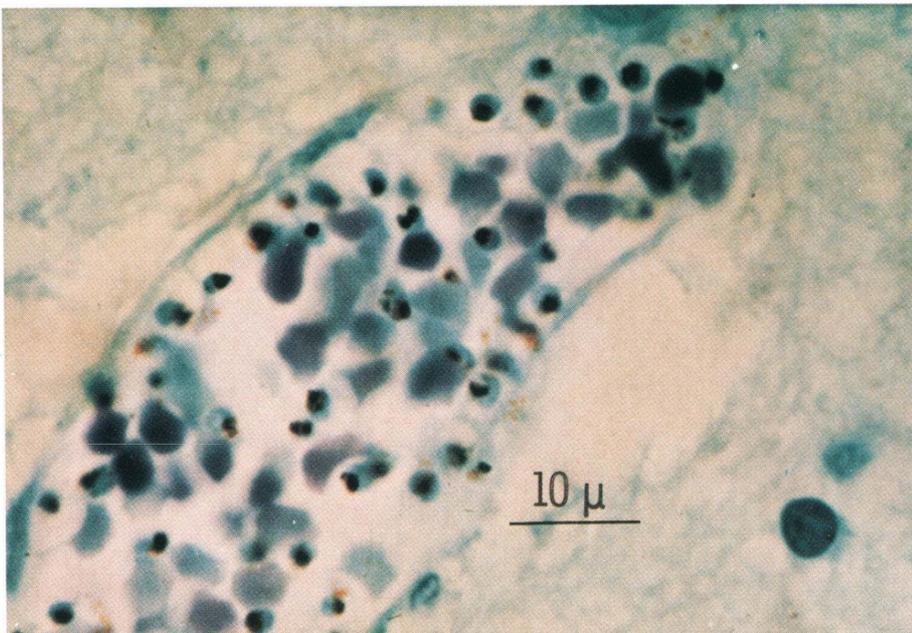


Fig. 4 Mallory's PMB method, 10% buffered formalin fixation.

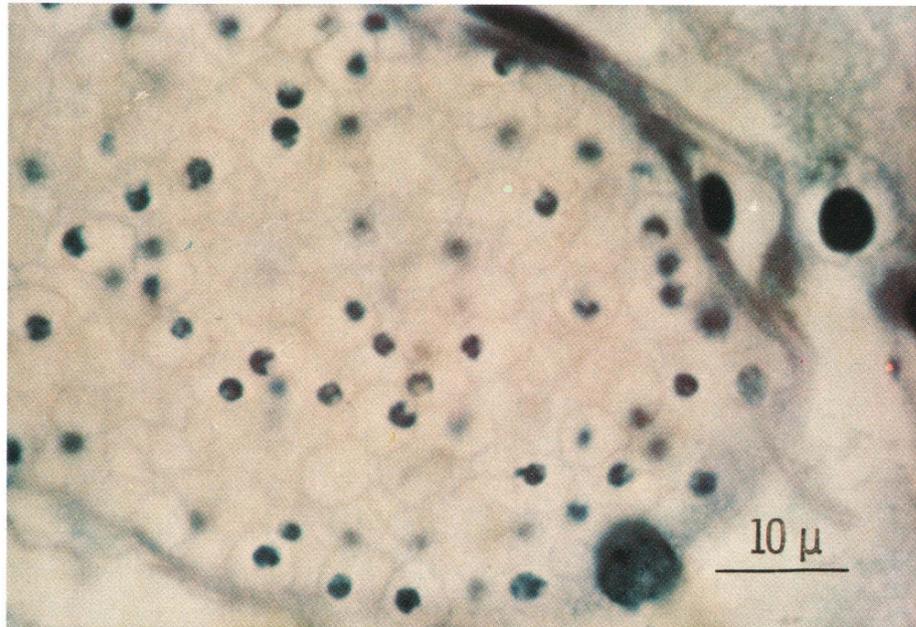


Fig. 5 Authors' method for demonstraiting plasmodia with authors' method for removal of malarial pigment, 10% buffered formalin fixation.

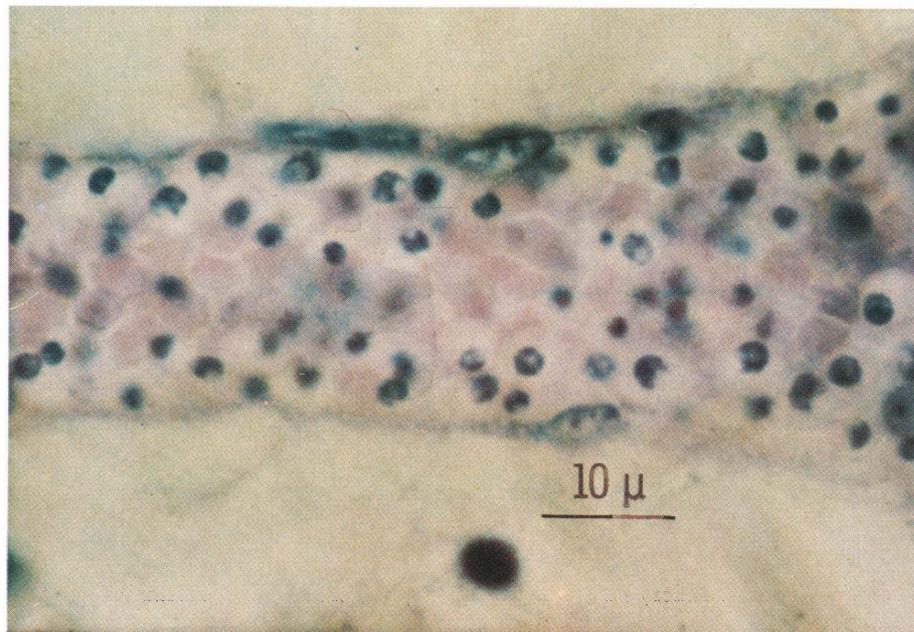


Fig. 6 Authors' method for demonstraiting plasmodia with Luna's IV method for removal of malarial pigment, 10% buffered formalin fixation.

国内二次感染と思われる脳性熱帯熱マラリアの一部検例

天野 博之¹・山本 利雄¹・左野 明¹
 高橋 泰生¹・蔵田駿一郎²・市島 国雄³
 山辺 博彦³

昭和51年11月10日 受付

はじめに

わが国のマラリアは、第2次世界大戦後帰還軍人等によって持ちこまれ多数の発症をみたが、戦後海外との交流がほとんど途絶えると共に減少の一途をたどり、ほとんど発症をみない稀な疾患となった。現在では、WHOにより、Area freed from malaria として指定された37カ国の1つになっている。しかるに高度経済成長に伴い海外渡航者が激増すると共に輸入マラリア症例は増加し、今日では、毎年ほぼ一定数のマラリア患者の届け出をみるに至った。しかも数年前より主として確定診断の時期が遅れたため死亡する例の報告すらみられる様になった。これらの事柄については、熱帯医学会を中心として、マラリアに関心をもつ専門家によって、ここ数年来、事ある毎に警鐘をならし続けられてきたところである。さらには、国内での感染例の報告もあり一旦消滅した土着マラリアの再頭すら問題になりそうである。かつ、マラリアを伝播する蚊が国内に存在することは認められており、輸入マラリアの土着化や流行の危険性は理論的に存在しているのである。

我々は、1973年に激症脳性熱帯熱マラリアのため死亡した1例を経験した。本症例の発症経過を詳細に検討した結果、本症例は看護婦であって、彼女が発症する以前に、アフリカ・タンザニアより帰国後発症した熱帯熱マラリア患者の看護に当たったことが明らかになった。その感染経路については、なお種々の論議のある所であるが、人工

接種の可能性がもっとも強いという一応の結論に達した。そこで本症例についての詳細を報告し、輸入マラリアの恐ろしさについて言及すると共に特に医療従事者にその取り扱いについての注意を喚起する次第である。

症 例

患者：下○田○子，21歳女，某医院看護婦
 (Fig. 1のCase 2)

主訴：発熱，意識障害

既往歴：幼少時熱性けいれん(+)，その他特記すべきものなし，輸血歴なく，海外渡航歴なし

家族歴：特記すべきものなし

発病より入院までの経過：1973年6月5日より2日間，彼女の勤務している医院に入院していたタンザニア帰りの輸入熱帯熱マラリア患者(Fig. 1のCase 1)の看護に従事した。この間に，注射・投薬等で患者に接したが，受傷の有無，患者血液の扱い等に関する詳細は判明していない。しかしこの患者は6月6日意識混濁を伴う重篤な状態に陥り，我々の病院に転院して来たが，その時付き添って来院するまで，彼女は，この患者の重点看護にあたっていた。なお，この患者の来院時の血液中には，417,000/cmmのマラリア原虫が発見されている。その後，元気に勤務していたが，同年6月20日頃より発熱を認め，23日悪心，嘔吐，39°C台の発熱発作と共に四肢けいれん，意識混濁を来たして，勤務先の医院に入院した。抗生物質，ステロイドホルモン等の治療を受けるも，発

1 天理よろづ相談所病院海外医療科，2 同内内分泌内科，3 天理医学研究所病理
 要旨は第15回日本熱帯医学会総会(大阪，1973)に発表

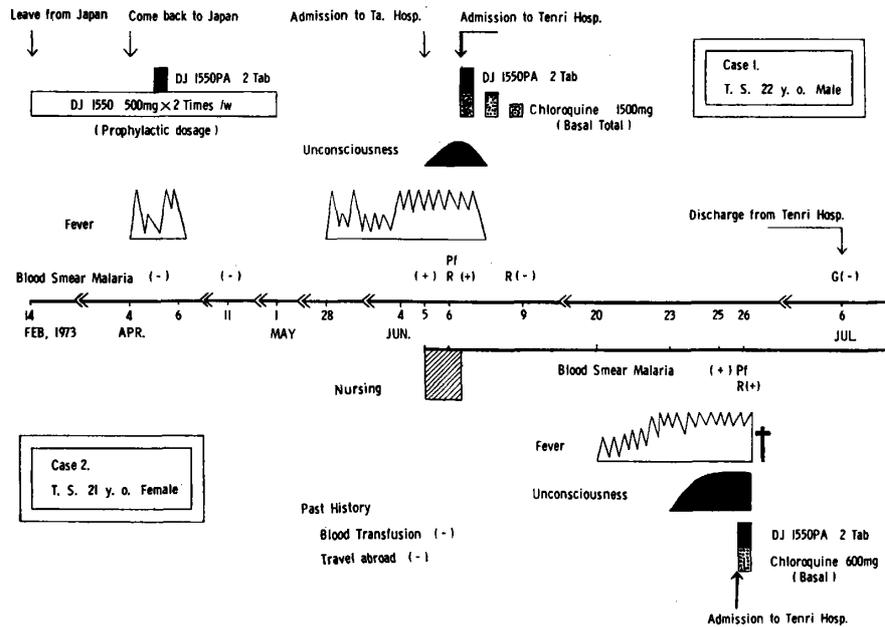


Fig. 1 Clinical course.
(T. S. 21 y. o. F.: Cerebral P. f. malaria)

熱，四肢けいれんは持続し，意識混濁は漸次その度を深めていった。25日になり，けいれんは消失したが，意識は昏睡状態となった。この日の血液標本よりマラリア原虫が発見され25日午後10時40分，当院に緊急転入院となった。

入院時所見及び経過：体格栄養とも中等度で体温 37.8 C，発汗著明であった。脈拍数 80/分で，リズム整，緊張良好であった。血圧は 116/66 mmHg であった。意識は昏睡状態で，応答は全くないが痛覚反射はかすかながら存在した。また，けいれんはなく，筋強剛なく，麻痺も認めなかった。皮膚はやや蒼白であったが，出血斑，黄疸，発疹を認めなかった。眼球結膜にも黄疸を認めていない。眼瞼結膜は貧血様であった。対光反射は両側ともやや遅鈍していたが，瞳孔不同，眼振，共同偏視は認められなかった。胸部理学的所見では，肺に聴打診上の異常を認めず，心臓の大きさは正常で，心雑音は聴取しなかった。肺肝境界は第5肋骨であった。腹部は表面平坦で，肝，腎，脾共に触知せず，静脈怒張，腹水，鼓腸を認めなかった。深部反射は，両側とも上肢は正常であったが，膝蓋腱反射，アキレス腱反射は低下してい

た。病的反射は左でバビンスキー反射陽性であった。項部強直，ケルニヒ徴候とも認めていない。入院時既に尿道カテーテル留置状態であった。

入院後直ちに，酸素吸入し，エアウェイにより気道確保し，午後10時50分，鼻注ゾンデより Chloroquine (base) 600mg 及び Sulformethoxine 1,000mg+Pyrimethamine 50mg を，溶解して投与した。約1時間後，突然心停止，続いて呼吸停止を来し，心マッサージにて，心蘇生したが，自発呼吸出現せず，陽陰圧調節呼吸下にて約2時間管理をつづけたが6月26日午前3時45分，再び心停止を来し死亡した。発病第7病目であった。

検査成績：入院後短期間に死の転帰をとったため，精査不十分であったが，行い得た検査結果は Table 1, 2 の如くである。末梢血標本で，マラリア原虫は，4,230/cmm で，全て環状体であった。

生殖母体を認めなかったが，環状体の形態，寄生赤血球の態度，そして症状より，熱帯熱マラリアと診断した。WBC は 14,300/cmm で，核の左方移動を示し，CRP 5.0mg/dl， α_1 -G 5.1% と，急性炎症の所見を示した。また，IgM の増加を認めた。黄疸指数は10以上で，LDH は 70.7Hill

TABLE 1 Laboratory findings (1)
(T. S. 21 y. o. F: Cerebral P. f. malaria)

RBC ($\times 10^4$ /cmm)	423	WBC (/cmm)	14,300
Hb (g/dl)	12.8	Differential counts (%)	
Ht (%)	38.5	Lym.	12
Reticulocyte (%)	3.1	Aty. Lym.	0.5
Plt (/100 OIF)	194	Mon.	10
Malarial parasites (/cmm)		N. Seg.	63
Ring form	4,230	N. Band	14
Gametocytes	(-)	N. Metamyel.	0.5
CRP (mg/dl)	5.0	IgG (mg/dl)	1,360
RA	(-)	IgA (mg/dl)	232
ASLO (Todd U)	140	IgM (mg/dl)	427.5

TABLE 2 Laboratory findings (2)
(T. S. 21 y. o. F: Cerebral P. f. malaria)

T. P. (g/dl)	6.8	GOT (Karmen U)	56
Alb. (g/dl)	3.8 (55.5%)	GPT (Karmen U)	35
Glb. (g/dl)	3.0 (44.5%)	CCF	++~+++
α_1 (%)	5.1	chE (Δ pH)	0.37
α_2 (%)	8.1	Alp (B. U.)	1.9
β (%)	10.1	Cholest. (mg/dl)	102
γ (%)	21.2	U-N (mg/dl)	30.6
A/G Ratio	1.07	NPN (mg/dl)	53
I. I.	10 \uparrow	LAP (T. T. U.)	36.5
Bilirubin (mg/dl)	2.1	LDH (Hill U/dl)	70.7
Direct B (%)	52	(Zymogram: Hemolysis pattern)	
S-Na (mEq/l)	131	(Post motem serum)	
K (mEq/l)	5.1	Haptoglobin (Ouchterloney)	1 \times (+) 2 \times (-)
Cl (mEq/l)	100		
CO ₂ (mEq/l)	28		
Ca (mEq/l)	3.9		

U/dl と増加し、その Zymogram で LDH 1, 2 の著増する溶血パターンを示した。

病理解剖所見 (死後 6 時間 25 分): 肉眼的所見では、脳は 1,520g で、高度のうっ血状態で、解剖時紫色、固定後は鉛色を呈した。脾腫 (330g) を認め、その断面で、泥状物を著明に認め、硬度は軟であった。肝は 1,375g でうっ血性腫大を示し、肺は高度のうっ血水腫を認め (左 420g, 右 495g)、黄色軽度混濁胸水が左に 20ml, 右に 10ml

貯留していた。腸間膜、気管周囲、気管分岐部、肺門、傍大動脈、臍頭部に小指頭大以下のリンパ節腫大を認めた。大脳、中脳、橋、小脳、脚部、肋膜、心外膜、気管、胃、腎盂および尿管粘膜、子宮内膜に小出血巣を認め、胃にはビランが存在したが、消化管内容は、タール様ではなかった。腎に、陳旧性梗塞数個を認めたが、実質変性を思わせる所見はなく、また円柱による尿管等の閉塞所見はなかった。その他の所見として、両側卵巣

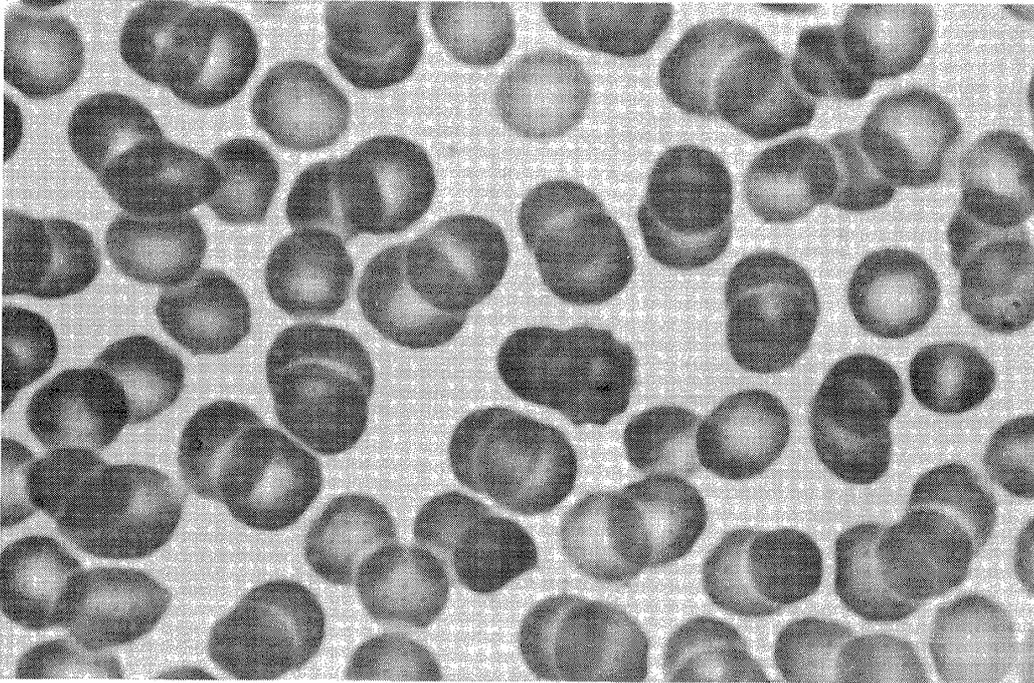


Fig. 2 Smear of peripheral blood (T. S. 21 y. o. F.: Cerebral P. f. malaria) showing red cells infected by rings of *P. falciparum*.

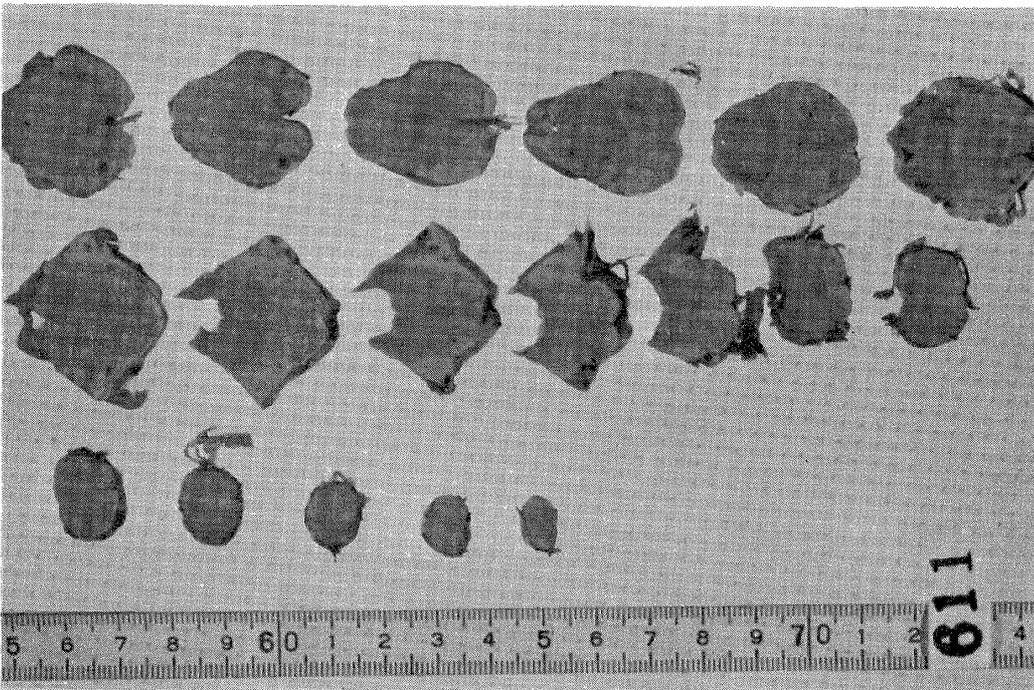


Fig. 3 Brain section (T. S. 21 y. o. F.: Cerebral P. f. malaria) showing some petechial foci.

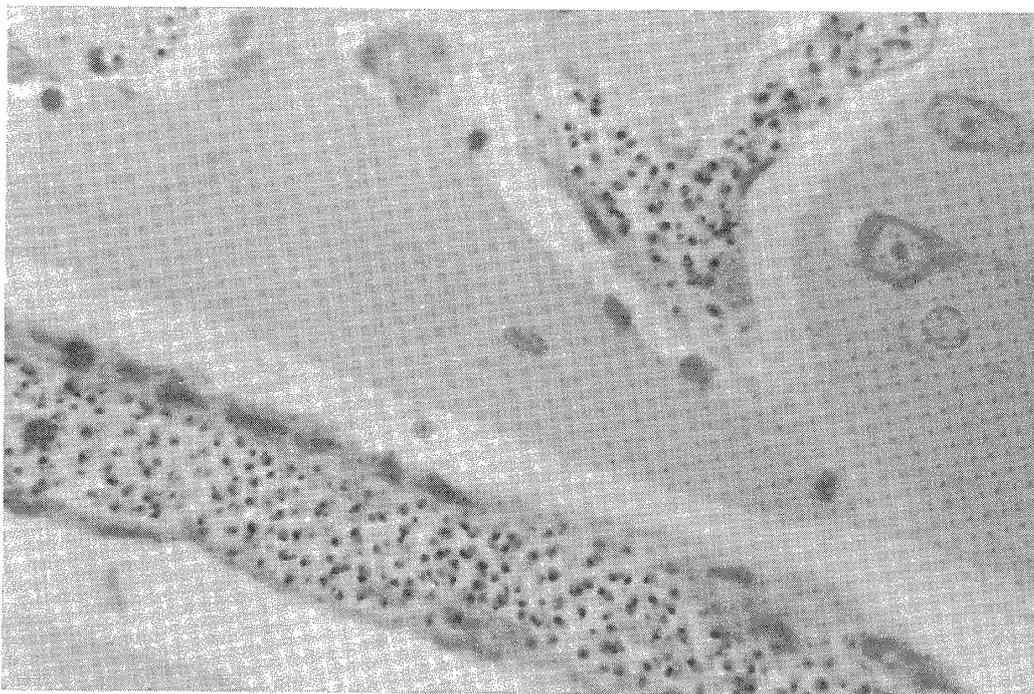


Fig. 4 Brain smear (Giemsa; $\times 400$) (T. S. 21 y. o. F.: Cerebral P. f. malaria) showing small vessels packed with parasitized red cells.

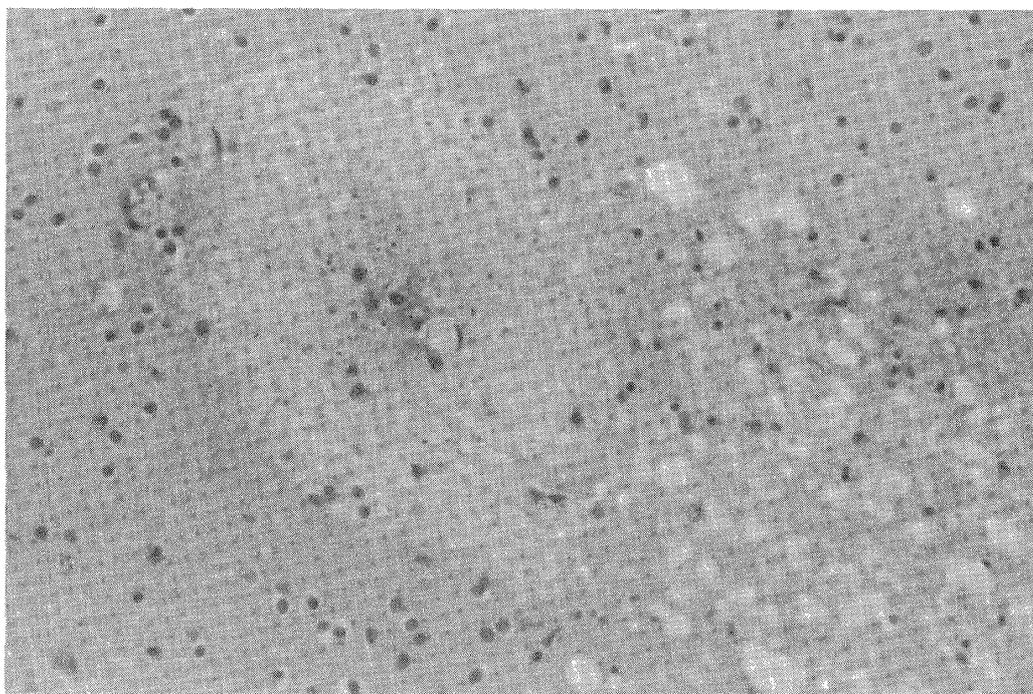


Fig. 5 Brain smear (H & E; $\times 200$) (T. S. 21 y. o. F.: Cerebral P. f. malaria) There is a focus of necrosis and infiltration of some glial cells surrounding a small vessel.

のう腫を認めた。

組織学的所見では、赤血球内マラリア原虫寄生を各臓器の血管内外に認め、特に脳、脊髄、脾、肝、肺、心、リンパ節に著明であった。マラリア色素沈着も全身臓器の細網細胞、組織球、間質結合織、血管内赤血球に認め、特に、脾、肝、リンパ節、心、肺、腎、卵巣、子宮、骨髄等に著明であった。また毛細血管周囲の軟化巣とマラリア原虫、その周囲に著明ではないが、グリア細胞の浸潤を認める所見が、大脳、中脳、橋、延髄に多数認められ、Dürck's granulomasの初期の像と考えられた。高度の形質細胞浸潤は、脾、リンパ節に著明で、血管内幼若血球が、肺、脾、リンパ節、心、子宮、膀胱に認められた。

考 案

最近の全国集計によるわが国マラリア発症の現状は、1972-1974年で、144例、うち熱帯熱マラリアは51例(35.4%)である(中林ら、1975)。またこのうち国内感染例と考えられるものは、1973年の熱帯熱マラリア例(当例)及び、1974年の三日熱マラリア例である。他に、1971年(大友ら、1973)、1976年に各1例の三日熱マラリアが国内感染例として知られている。1975年の全国集計では、マラリア感染68例、うち熱帯熱マラリア22例(32.4%)で、国内感染は知られていない(大友ら、1976)。1972-1974年例中の死亡例は6例で、全て熱帯熱マラリアであった(熱帯熱中10.2%の死亡率)。またこの間の厚生省届け出のマラリア数は、1972年23例(死亡5例)1973年42例(死亡6例)1974年33例(死亡1例)となっている。国内感染例の存在は、土着マラリアの問題、当例の問題点でもある二次感染の危険性の問題等をなげかけるが、マラリア例のほとんど全ては輸入マラリアで、しかも死亡例まで出ている点に留意しなければならない。最近のわが国マラリアの剖検例は、1968年1例(滝上、1968)1972年2例(大平ら、1972; 清水ら、1972)、そして当例であるが、全ての例が熱帯熱マラリアである。1968年例は、マラリア原虫は証明されなかったが全身臓器にマ

ラリア色素を証明している。清水らの1972年の1例は、脳剖検をなされていないため、急性肝腎不全、凝固障害による消化管出血死としているが、血管内マラリア栓塞の所見が全身に強いこと、脳炎様症状の存在より、脳性マラリアであったと推測出来る。即ち、当例を含めて4例とも、脳性マラリアであったと思われる。Bruce-Chwatt(1971)によれば、末梢血中の寄生赤血球数が5%以上の場合は重症であり、佐々ら(1967)では、脳性、異常高体温、消化器型、冷たいマラリア、黒水熱等の症候を予測しなければならないといわれており、死亡例の多くは脳性マラリアで、その報告も多い(Daroff *et al.*, 1967; Herzer and Gracpel, 1970)。また Shute and Maryon (1969)によると死亡者のほとんどは発症1週間以上も診断されなかった熱帯熱マラリアの初感染例であるという。当例は、発症からマラリア原虫発見まで6日間を要している。当例の末梢血寄生赤血球数は4,230/cmmであって、この数からのみでは重症度を物語れないことを意味すると共に、剖検所見で、非常に多くのマラリア原虫寄生を全身諸臓器内に認めている点、早期よりマラリア栓塞が進んだと考えられる。マラリアの剖検所見として、全身臓器、特に脳、肝、腎などの毛細血管内に一列にならんだマラリア原虫感染赤血球の栓塞状態とその周囲の組織の強い壊死が特徴であるが(文献6, 7, 12, 31)、当例では、これらに加えて、脳の所見で、壊死周囲に著明ではないもののグリア細胞の浸潤をみている。いわゆる Dürck's granulomasの初期の像と考えられるが、Winslow(1971)によると、この変化は通常12日以上経過しないと見られないという。また、Garnham(1966)は、同様の変化を、Malaria pseudo-granulomataと呼び、マラリア寄生赤血球による栓塞にひきつづき、その周囲に、いわゆる Ring hemorrhage を来たし、吸収壊死、周囲へのグリア細胞の浸潤へと進むと考えているが、より急性の経過をとる例に良くみられるとする報告もあると述べている。当例は発症後7病日目に死亡しているが、Garnhamの説により granulomas が出来るとすれば、発病の初期より、脳の栓塞、小出血が進行してい

たと推測される。

Smitskamp (1971) は、脳性マラリアにおいては、脳症状初期の治療が生死を決定し、副腎皮質ホルモン、ヘパリン大量投与による治療が有効である例を示している。当例は、残念ながら、我々の手になった時には、既に、末期の状態であった。

当例の最も重大な問題はその感染経路である。わが国の土着マラリアは昭和10年頃に、富山、石川、福井、滋賀、愛知に限局し(大鶴, 加茂, 1954), 戦後、外地帰還者による輸入マラリアの激増で混乱を来したが、1950年には、三日熱マラリア新感染者4名にまで減少した(大鶴, 1958)。戦後の熱帯熱マラリアの国内感染は、1流行及び

8例が知られており、いずれもハマダラカによる感染と推定されている(大鶴, 1958)。池田ジェームス(1972)によれば、天理市での蚊の調査で、蚊属8種、総種数33を数え、コガタアカイエカ、アカイエカ、セシロイエカ、シロハシイエカ、*Culex quinquefasciatus* (Say), シナハマダラカ、ミスジハボシカの順に多いという(Fig. 6)。また、天理市公害衛生課(1973)によると、同時期に、蚊とハエをなくす運動を行っており、ライトトラップ法による蚊の採集成績で、1973年6月10日頃に蚊の異常発生を記録し、当例の生活した周辺では、5月に1日平均220匹(平均気温21°C)6月に1日平均300匹(平均気温24°C)であった。

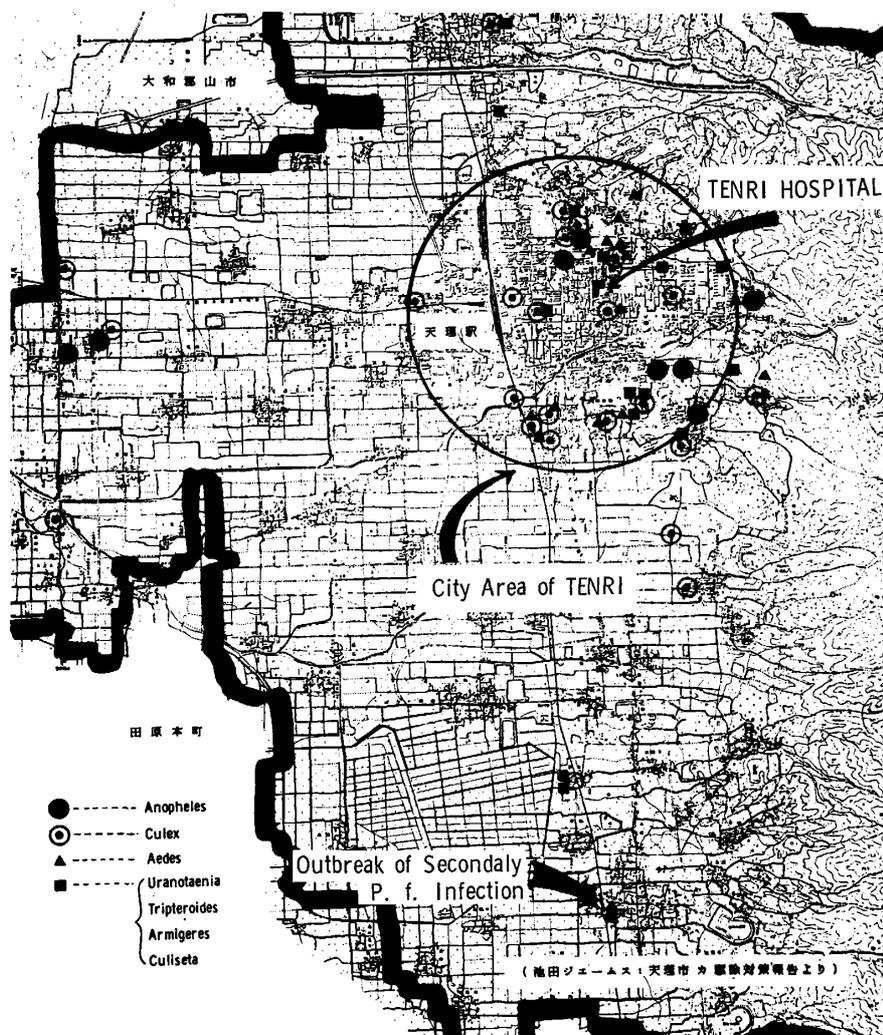


Fig. 6 Distribution of mosquitoes in Tenri, 1972 (from Reference 8).

大鶴 (1952) によるとシナハマダラカの1種, オオツルハマダラカは, 熱帯熱マラリアをも伝播するのではないかと考えられている。当例の感染経路を土着化した熱帯熱マラリアの, 蚊による伝播として理解することは, 理論的に完全には否定しきることが出来ないが, この推測は, 土着及び土着化マラリアの情報からして現実には, あまりにも突飛すぎると考えられる。渡航歴がない点より国外でのマラリアの初感染は否定出来るし, 輸血歴はなく, 輸血マラリアは否定出来る。但し, 看護婦という職業がら, 輸血液を扱うので, 偶発的な人工接種の可能性を完全に否定することは出来ない。わが国の輸血マラリアは酒井 (1935) 以来知られている所であるが (文献1, 11, 29, 33), 最近の全国集計 (中林ら, 1975; 大友ら, 1976) では知られていない。

当例は輸入マラリア患者の看護に2日間従事している。この患者を発端者として, 蚊よりの感染の可能性はどうであろうか。当例が発端者を看護したのは, 発端者の第9, 10病日であった。栗原 (1972) のいう蚊の伝播能力を, 当時発端者周辺の蚊が持っていたと仮定して, 佐藤ら (1975), Young (1961) によるマラリア原虫の蚊の体内での成熟期間, Garnham (1966), 佐々ら (1967), 佐藤ら (1975), Young (1961) のいう蚊より伝播されてからの赤外系, 赤内系における発症までの潜伏期間を考えるに, 発端者発症から, 当例発症までの期間は, 充分ではないとしても, 発症し得る期間と考えることが出来る。しかしながら, 最も重大な点で, この可能性は否定される。すなわち, 発端者の血液標本上, 第10病日のそれを詳しく検索しても生殖母体が発見されず, 第11病日になってはじめて発見されたということである。Young (1961), Winslow (1971), 佐藤ら (1975) によると生殖母体の出現は発症10日後であり, しかも感染可能になるのはさらに4日ほど後であるという。発端者における生殖母体の出現は, この説に一致しており, たとえこの間に, 蚊に吸血されても, 蚊の体内においてマラリア原虫が生育し二次感染をおこし得る危険性は無いと考えられる。また当例は熱帯熱マラリア例であるので, シナハ

マダラカのなかでも, オオツルハマダラカが問題となるが, 大鶴 (1952) によるとこの蚊の繁殖ピークは, 秋季ということであり, この点も, 蚊よりの伝播説の否定材料となる。加えて, 少なくとも1972年の天理市の調査では, 当例の近辺には, シナハマダラカさえ発見されていない。

今一つの二次感染の可能性は, 注射器等の取り扱いミスによる偶発的人工接種の問題である。不潔注射器による人工接種マラリアは, 覚醒剤常用者間のマラリアとして知られており, その熱帯熱マラリア例では, 古く Biggam (1929) のカイロの例があり, Most (1940) はニューヨークの例を詳細に報告している。大鶴 (1958) は, わが国では1951-1954年に9件144例が経験されているとしている。これらは, 三日熱マラリア例であった。静脈注射時に薬液注入後残留する血液の量は, 0.02~0.07mlで, 以前行われていたマラリア発熱療法の静脈内接種血液量のおよそ100分の1であり, 接種成立の可能性はかなり複雑で, 一般に低度で, その潜伏期は遷延傾向にあるという (大鶴, 加茂, 1954)。当例に関して, 発端者の第10病日の寄生赤血球数は, 417,000/cmm であって, この時, 当例が偶発的にこの血液を0.07ml接種されたとすれば, 単純計算上, 当例の潜伏期15日を経ると, 重症例になり得るほどのマラリア増殖をみることになる。当例の潜伏期15日は, 若林, 上原 (1956), 増田 (1960) による輸血マラリアにおける潜伏期 (8~20日), 皮下注射による接種マラリアの平均潜伏期13日に矛盾しないものである。以上により, 我々は, 当例の感染経路を, 発端者である輸入熱帯熱マラリア患者血液の偶発的人工接種による二次感染である可能性が極めて濃厚であると考ええる。

二次感染マラリアの問題は, マラリア根絶地域の国々にとって, 輸入マラリアの問題と共に, 最も警戒されているところである。WHO (1975a, b) によると1974年主要国の輸入マラリア例は, USA 316例, 英国660例, 西ドイツ100例, イタリア60例, スイス37例等となっており, また induced malaria としては, 全世界で240例が知られており, そのうち, USA 4例, フランス1例, イタリア

ア2例, スペイン1例等となっている。induced malariaのうち, 輸血によると記録されている例が23例あるが, 他の例の感染経路の詳細はわからない。USAにおいては, カルフォルニアで, 3例の三日熱マラリアの introduced case を報告している。同様の例は, 1952年にもカルフォルニア州ベラ湖周辺で発生しており (Brunetti *et al.*, 1954), この例を引いて, 栗原 (1973) は日本における二次感染の危険性を訴えている。輸入マラリアによる死者を出している現実に加え, 蚊の伝播能力の問題, 輸血の問題, そして当例のごとき, 医療従事者として非常に気を付けねばならぬ問題があり, 二次感染の問題の今後は, 決して楽観出来るものではない。現在, わが国では抗マラリア剤の入手は極めて困難であるから, 市中一般病院では治療出来にくい。発見が少しでも遅れば, 死の転帰をとる輸入マラリアを常に念頭におくと共に, 医療従事者は, 自らが当例のごとき人工接種マラリアの危険性にさらされていることを, 胆に銘ずる必要があると痛感する。

おわりに

1973年6月, 21歳の渡航歴, 輸血歴のない看護

婦が, 輸入熱帯熱マラリア患者を2日間看護し, 約2週間後にマラリアを発症した。当初感冒様症状であったが, 3日後嘔吐, 高熱, 四肢けいれん, 意識混濁を来し, 6日目に血液検査で, マラリア原虫を発見されたが, 意識昏睡状態にあって, Chloroquine, Sulformethoxine, Pyrimethamineの投与効果なく, 第7病日に死亡した。剖検にて, 全身諸臓器に, 赤血球内マラリア原虫寄生と, その栓塞及びマラリア色素沈着を認め, 特に脳の所見は, 脳性マラリアのそれであった。当時の患者周辺の天理市には *Anopheles* の存在が確認されたが, 当例が, 単発例であること, 発端者の当時の血液標本に生殖母体の出現がないことより, 蚊からの感染は考え難く, 職業がら, 発端者血液を偶発的直接的に人工接種することにより感染したと考えられた。

輸入マラリアよりの二次感染は, 戦後の一時期以来発症を見なかったが, 輸入マラリアの問題がクローズアップされている昨今, 当例のごとき二次感染の危険性をも考慮する必要があることを強調したい。

文 献

- 1) 阿部 煥, 花輪松夫 (1956): 保存血輸血によるマラリア発生例, 治療, 38 (6), 762-764
- 2) Biggam, A. G. (1929): Malignant malaria associated with the administration of heroin intravenously, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 23, 147-153
- 3) Bruce-Chwatt, L. T. (1971): Medical practice; Malaria, Brit. Med. J., 2, 91-93
- 4) Brunetti, R., Fritz, R. F. and Hollister, Jr., A. C. (1954): An outbreak of malaria in California 1952-1953, Am. J. Trop. Med. Hyg., 3, 779-788
- 5) Daroff, R. B., Deller, J. J., Kastl, A. J. and Blocker, Jr., W. W. B. (1967): Cerebral malaria, J. A. M. A., 202 (8), 679-682
- 6) Garnham, P. C. C. (1966): *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium reichenowi*, Malaria parasites and other haemosporidia, 357-430, Blackwell, Oxford
- 7) Herzer, H. and Gracpel, P. (1970): Zeitlicher Verlauf und disseminierte intravasale Gerinnung bei Akuter Malaria tropica in Anschluss an Afrikareisen, Schweiz. Med. Wschr., 100, 2020-2026
- 8) 池田ジェームス (1972): 奈良県天理市蚊駆除対策報告, 天理市公害衛生課提供
- 9) 栗原 毅, 中村 譲 (1972): 横浜市におけるシナハマダラカの余命と伝播の能力, 熱帯, 7(1), 65

- 10) 栗原 毅 (1973): 輸入マラリア患者からの二次感染, 熱帯, 8 (1), 6-8
- 11) 増田昭一 (1960): 保存血内におけるマラリア原虫の感染性に関する研究, 新潟医学会雑誌, 74 (2), 180-197
- 12) Miller, H. L. (1969): Distribution of mature trophozoites and shizonts of *Plasmodium falciparum* in organs of *Aotus trivirgatus*, the night monkey, Am. J. Trop. Med. Hyg., 18 (6), 860-865
- 13) Most, H. (1940): Malignant malaria among drug addicts, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 34 (2), 139-172
- 14) 中林敏夫, 大友弘士, 海老沢功, 石崎 達 (1975): 輸入マラリアの現状, 公衆衛生情報, 5(9), 1-4
- 15) 大平一郎, 荻原正雄, 松崎修二, 中谷 恒 (1972): 激症性熱帯熱脳型マラリアの 1 剖検例, 熱帯, 6 (3), 112-116
- 16) 大友弘士, 小山 力, 小早川隆敏, 塩之入洋 (1973): 三日熱マラリアの国内感染症例, 寄生虫学雑誌, 22 (Suppl.), 37
- 17) 大友弘士, 中林敏夫, 海老沢功, 石崎 達 (1976): 1975 年の国内マラリア発生状況, 公衆衛生情報, 6 (11), 40-45 (印刷中)
- 18) 大鶴正満 (1952): 戦後マラリアの流行学的研究, 日医新報, 1470, 33-36
- 19) 大鶴正満, 加茂 甫 (1954): 覚醒剤常用者の間に発生したマラリアに就て, 日医新報, 1555, 727-730
- 20) 大鶴正満 (1958): 戦後の輸入マラリアの推移, 医学の動向, 22, 107-138
- 21) 佐々 学, 海老沢功, 神田鍊蔵 (1967): マラリア, 熱帯病学, 177-201, 東京大学出版会, 東京
- 22) 佐藤八郎, 尾辻義人, 中島 哲 (1975): マラリア, 新内科学大系第55巻感染症 (IV), 176-196, 中山書店, 東京
- 23) 清水幹子, 滝川道子, 新井裕子, 坂口潤子, 小山千代, 三神美和, 梶田 昭, 白坂竜曠, 脇誠治 (1972): 激症熱帯熱マラリアの 1 剖検例, 熱帯, 7 (2), 105-110
- 24) Shute, P. G. and Maryon, M. (1969): Imported malaria in the United Kingdom, Brit. Med. J., 2, 781-785
- 25) Smitskamp, H. and Wolthuis, F. H. (1971): New concepts in treatment of malignant tertian malaria with cerebral involvement, Brit. Med. J., 1, 714-716
- 26) 滝上 正 (1968): 輸入マラリアの 3 症例について, 診断と治療, 56 (3), 516-520
- 27) 天理市公害衛生課 (1973): カとハエをなくす運動 1 年目の成果, 天理市広報「町から町へ」, 432
- 28) 若林利重, 上原武久 (1956): 保存血輸血によるマラリア感染例, 日医新報, 1695, 28-30
- 29) WHO (1975a): Semestrial follow-up of registration of malaria eradication, Wkly. Epidem. Rec., 47, 402-406
- 30) WHO (1975b): Countries reporting induced and imported cases by country of origin and by species of plasmodium, Wkly. Epidem. Rec., 48, 410-416
- 31) Winslow, D. J., Connor, D. H. and Sprinz, H. (1971): Malaria, Pathology of protozoal and helminthic diseases, 195-224, Williams & Wilkins, Baltimore
- 32) 山内 博, 長野武正 (1956): 保存血によるマラリア感染例, 臨床外科, 11 (13), 1001-1002

- 33) Young, M. D. (1961): Malaria, A manual of tropical medicine, 297-345, W. B. Saunders, Philadelphia and London

A FATAL CASE OF INDUCED CEREBRAL MALARIA DUE TO *PLASMODIUM FALCIPARUM*

HIROYUKI AMANO¹, TOSHIO YAMAMOTO¹, AKIRA SANO¹,
YASUO TAKAHASHI¹, SHUN-ICHIRO KURATA²,
KUNIO ICHIJIMA³ AND HIROHIKO YAMABE³

Received for Publication 10 November 1976

A 21-year-old nurse was admitted to Tenri Hospital on June 25, 1973 in comatous state. She had neither been to the malarial endemic area nor been transfused. However, three weeks before admission she had taken care of a patient with falciparum malaria as a nurse for two days. Six days before admission she had suffered from fever and headache. And three days before admission she had lapsed into coma.

The thin blood films revealed *Plasmodium falciparum* parasites. The parasite count was 4,230/cmm, erythrocyte count was 423×10^4 /cmm, and leucocyte count was 14,300/cmm.

She was administered 600 mg of chloroquine, 1,000 mg of sulformethoxine and 50 mg of pyrimethamine through a stomach tube, but she died 4 hours after her admission.

Necropsy findings were as follows: (a) Macroscopic findings; the brain was violet in color and splenomegaly, 330 g, was seen. Several small bleeding foci were seen in the gastrointestinal tracts and respiratory organs. (b) Microscopic findings; malarial parasites were revealed in the red blood cells of many organs, especially of the brain, spinal cord, spleen, liver, lungs and lymph nodes. Malarial pigments were demonstrated in the spleen, liver, lymph nodes, heart, lungs, kidneys, ovaries, uterus and bone marrow.

Possible infectious course of this case was discussed. It was presumable that the source of the infection was an imported falciparum malaria case and that she was accidentally, artificially and directly infected through nursing.

1 Department of Overseas Medical Services, 2 Department of Endocrinology, 3 Department of Pathology, Tenri Hospital.

IN VITRO DESTRUCTION OF *LEISHMANIA*
DONOVANI INFECTED CELLS BY
IMMUNE SERUM

SHUN SHINBO^{1,3}, TAKATOSHI KOBAYAKAWA¹, HIROSHI ISHIYAMA²
AND KAZUSHIGE MASUDA²

Received for Publication 12 July 1976

In man, visceral leishmaniasis is characterized by non-specific hyperglobulinemia, hepatosplenomegaly and absence of delayed hypersensitivity (Manson-Bahr, 1959). Though there is no quantitative correlation between the increase in immunoglobulin concentration and antibody titers (Da Cunha, Xavier and De Alencar, 1959), specific antibody titer has been successfully determined by many methods (Bray and Lainson, 1965; Bryceson, 1970; Rezai, Behforouz and Gottner, 1970).

It has been suggested that antibody may play some roles in the defense mechanism of the infection, but the whole sequence is still imperfectly understood. Jadin, Le Ray and Fammeree (1970) and Rezai, Behforouz and Gottner (1970) have reported the parasitocidal effect of the antibody against culture promastigotes, but as for the intracellular parasites, the former gave negative results and the latter provided no description.

In this communication, dramatic in vitro destruction of the cells infected with *Leishmania donovani* in the presence of complement when exposed to antisera from guinea pigs immunized with the antigen purified from culture promastigotes combined with Freund's complete adjuvant will be reported. By studying the cytotoxic activity of the sensitized splenic cells, the possibility of cell-mediated immunity will also be compared.

L. donovani used in this experiment was kindly supplied by Istituto Sperimentale di Sanita, Roma and the promastigotes were maintained in Tobie's media. The animals used were Hartley strain of guinea pigs weighing 250-300 g. Purification of antigen from cultured promastigotes was performed by the method of Blewett, Kadivar and Soulsby (1971).

Five hundred μ g protein of the antigen in 1 ml of physiological saline was emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant and injected into the foot pads of the animals twice at 3 weeks interval.

The cell suspensions of BHK 21 at the concentration of 2×10^5 /ml in 1 ml of Eagle's minimum essential medium containing 10% calf serum were made in Leigh-

1 Department of Parasitology, 2 Department of General Biologics Control, National Institute of Health, Tokyo, Japan. 3 Present address: Department of Surgery, Kamo Prefectural Hospital, Niigata Prefecture, Japan.

ton tubes, each having a cover slip (12×32 mm) therein. Those suspensions were allowed to settle and adhere to the cover slips for 2 hrs at 37 C. Subsequently, each tube was infected with 2×10^5 parasites/tube in 0.5 ml of the medium. The intracellular infection of the parasites was confirmed under light microscopy and also examined electronmicroscopically 48 hrs after infection.

Immune guinea pigs sera with antibody titer of 1:256 by direct agglutination test or normal ones were inactivated at 56 C for 30 min.

Forty-eight hours after parasite infection either 0.02 ml or 0.05 ml of the sera with or without newly added 1 μ l of guinea pig complement (Nankai Ltd.) per tube was introduced onto BHK 21 cells.

On the other hand, 7 to 10 days after the second sensitization, spleens were removed aseptically from sensitized or normal guinea pigs; teased in the medium and forced through four layers of gauze.

The free lymphoid cells were washed at least three times, counted and resuspended at a concentration of 2×10^7 /tube in 0.2 ml of the medium and then overlaid onto the infected BHK 21 cells with or without 1 μ l of complement. All cultures were incubated at 37 C for 24 hrs, then fixed and stained with Giemsa solution. The destruction of cells was assessed under light microscopy.

As shown in Table 1, in the presence of complement, the immune serum destroyed almost all of the infected cells, while the normal serum failed to destroy. In the absence of complement, no destruction was found either by the immune nor by the normal serum.

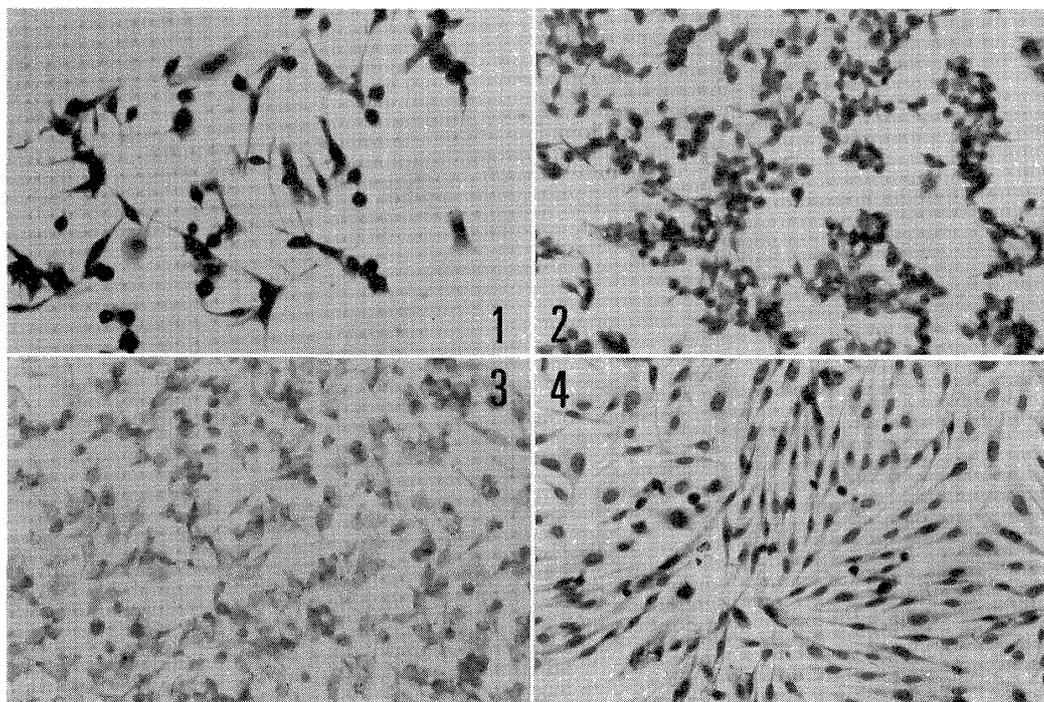


Fig. 1 Degrees in cell destruction observed microscopically.

1 (+++), 2 (++) , 3 (+), 4 (-)

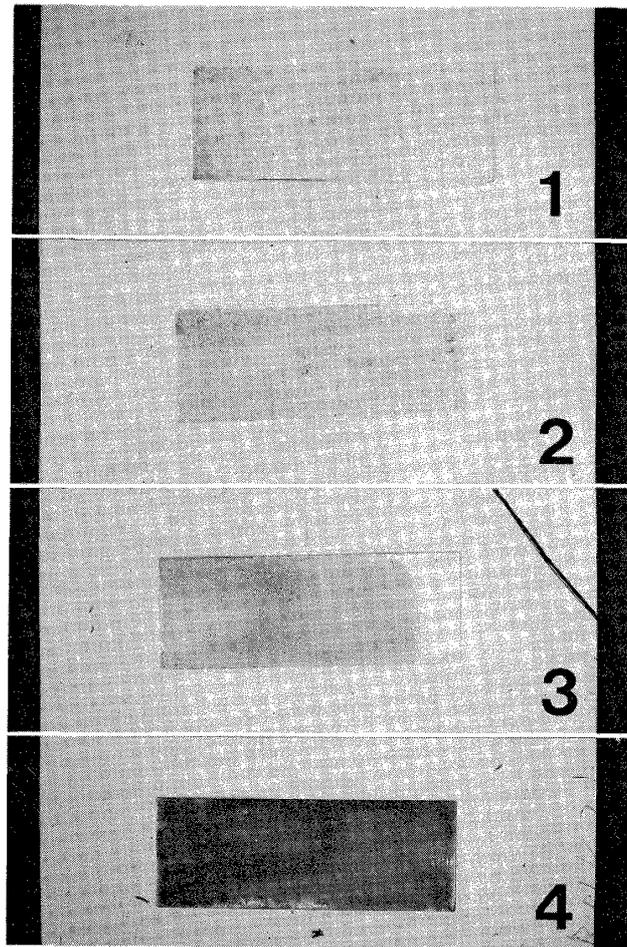


Fig. 2 Degrees in cell destruction seen from the whole picture of slide.
1 (+++), 2 (++), 3 (+), 4 (-)

TABLE 1 Intensity of target cell destruction

Effectors	Target cells		
	Infected BHK cells		Non-infected
	with C	without C	with C
immune splenic cells	+	-	-
normal splenic cells	+	-	-
0.02 ml of immune serum	++	-	-
0.05 ml of immune serum	+++	-	-
0.05 ml of normal serum	-	-	-
0.05 ml of anti-FCA serum	-	-	-

C: complement, FCA: Freund's complete adjuvant

On the other hand, both sensitized and normal splenic cells had a slight but not appreciable cytotoxic effect on infected cells, regardless of the presence of complement.

Our results show that there exists some substance in antisera which acts cytotoxically on the infected cells and its activity is complement-dependent. Since the specific antibody was detected by agglutination test, this cytotoxic activity might be related to the antibody. However, the biological character of the substance including immunological specificity etc. has not yet been thoroughly studied in our work.

Schmunis and Herman (1970) found that sera from various normal animals had lytic and agglutinating activity against *L. donovani*.

Our results may be attributed to such non-specific factor(s) as was reported by them, although this interpretation would not be feasible for explaining our results that only the immune serum was cytotoxic to infected cells.

The author wish to thank Dr. Tatsushi Ishizaki, former Director of the Department of Parasitology and their appreciation is extended to Dr. Tsutomu Koyama for his invaluable advice.

REFERENCES

- 1) Blewett, T. M., Kadivar, D. M. and Soulsby, E. J. L. (1971): Cutaneous leishmaniasis in the guinea pig. Delayed-type hypersensitivity, lymphocyte stimulation, and inhibition of macrophage migration, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20, 546-551
- 2) Bray, R. S. and Lanson, R. (1965): The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 59, 535-544
- 3) Bryceson, A. D. M. (1970): Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. III. Immunological studies, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 64, 380-392
- 4) Da Cunha, R. V., Xavier, A. F. S. and De Alencar, J. E. (1959): Relation of gammaglobulin to complement-fixation in Kala-azar, *Riv. Brazil. Malariol. Doencas Trop.*, 11, 45-54
- 5) Jadin, J., Le Ray, D. and Fammeree, L. (1970): Diagnostic de la leishmaniose viscérale par la réaction de l'inhibition de la culture, *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 63, 334-341
- 6) Manson-Bahr, P. E. C. (1959): East African Kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 53, 123-135
- 7) Rezai, H. R., Behforouz, N. and Gottner, S. (1970): Studies on anti-leishmania activity of immune rabbit serum, *J. Parasitol.*, 56, 350-353
- 8) Schmunis, G. A. and Herman, R. (1970): Characteristics of so-called natural antibodies in various normal sera against culture forms of *Leishmania*, *J. Parasitol.*, 56, 889-896

短 報

抗血清添加による *Leishmania donovani* 感染培養細胞の破壊真保 俊^{1,3}・小早川隆敏¹・石山 紘²・増田 和茂²

Leishmania donovani の promastigote form を BHK 21 に感染させて標的細胞とし、これに同原虫と Freund's complete adjuvant を混ぜて感作したモルモットからの感作脾細胞及び抗血清を加え、*in vitro* 細胞障害性試験を行ったところ、抗血清に補体の存在下で著明な標的細胞破壊が認められたが、感作脾細胞及び Freund's complete adjuvant 単独免疫抗血清では細胞障害能はみられなかった。又、非感染 BHK21 を標的細胞とすると抗血清にも障害能はみられず、同原虫の防御免疫における、液性抗体の重要性を示唆する結果を得た。

1 国立予防衛生研究所寄生虫部 2 同一般検定部 3 現住所 新潟県加茂市県立加茂病院外科

九州熱帯医学シンポジウム第7回学術集会講演要旨

と き: 昭和51年1月15日(木)
と ころ: 久留米大学医学部図書館1階講義室
世話人: 筑波大学医学専門学群(久留米大学医学部客員)
山口誠哉

調査研究報告

- 1 日本人およびフィリピン人におけるコレラ抗毒抗体について
大友 信也, 村岡東洋治
- 2 肝バイオプシーにて確診しえたカラアザールの1例 —肝生検と関連して—
中富 昌夫, 石崎 驍, 原 耕平
山下 裕人, 板倉 英世
- 3 ケニアで経験したコレラ菌検出について
内藤 達郎
- 4 地域気候と人の新陳代謝
中村 正
- 5 ナウル, グアムの医療事情と糸状虫症
福島 英雄
- 6 フィリピンにおける医学研修を終えて
古賀 英俊, 福島 成幸
福田 幸一, 土橋 賢治

特別講演

- 1 二, 三の熱帯性皮膚疾患について
西本勝太郎
- 2 フィリピンの住血吸虫症の疫学と対策
安羅岡一男

調査研究報告

1 日本人およびフィリピン人におけるコレラ抗毒抗体について

大友 信也, 村岡東洋治
(化血研)

コレラ症の病因論においては、コレラ菌の産生する外毒素(コレラ毒素, コレラエンテロトキシン)が主因をなすことがほぼ明瞭となっている。他の多くの細菌毒素疾患における経験から、コレラ症の予防に抗毒抗体の役割りを期待する考えが台頭し、トキソイド免疫の実験が計画された。一連の動物実験の段階を経過して、1973-1975年にかけて野外試験を含めた日本およびフィリピン両国研究陣による協同研究が行われた。この研究目的はコレラトキソイド免疫後の抗毒抗体が如何にコレラ症(感染を含めて)の発症防御に効果的であるかにあり、そのため、使用トキソイドは精製されたもので、菌体成分を全く含まぬ性質が要求された。この基準に合致するコレラトキソイド Lot 11を使用して、ほぼ全試験が行われたが、この間に日本人およびフィリピン人における抗毒抗体の分布、トキソイドに対する応答にやや差を認めた。

材料と方法

Vibrio cholerae, Inaba 569B の半合成培地培養濾液を出発材料として分離精製されたコレラ毒素およびそれをグリシン存在下でホルマリン不活化したコレラトキソイド Lot 11 を使用した。このトキソイドは水酸化アルミニウムゲルに吸着した形で凍結乾燥しており、用に臨み食塩液で溶解して使用した。

抗毒抗体は感作赤血球凝集反応(PHA)によって測定した。ホルマリン固定ヒツジ血球に BDB 法で精製コレラ毒素を結合させ、凍結乾燥したものを抗原とし、マイクロプレート V を使用して測定した。感作血球は終始同一ロットのものを使用した。また測定時には常に抗毒抗体価既知の標準抗血清 E 1006-10A (7,700AU/ml) を使用し、これと被検血清、標準抗血清の凝集価の比から被検血清の AU/ml を換算した。

抗毒抗体被検血清はコレラトキソイド接種前後のボランティア血清であった。ボランティアは日本およびフィリピンでの志願者で、コレラ非流行地および流行地において募集した。非流行地ではトキソイドは4週間隔で2回接種したが、流行地では1回接種のみであった。被検血清は56C, 30分不活化し、未感作ヒツジ血球により非特異凝集素を吸収したのち抗毒抗体測定に供した。

成績と考察

トキソイド 50mcg を2回接種した日本人成人26人(a)の抗毒抗体価の平均は接種前0.62, 4週後30.7, 8週後51.7であり、同量2回接種の非流行地フィリピン人小児(12歳以下)16人(b)では順に1.93, 30.7, 79.6, 初回100mcg 2回目50mcg を与えた非流行地フィリピン人成人136人(c)で1.56, 92.6, 195となった。また100mcg 1回接種の流行地フィリピン人成人73人(d)では接種前の平均2.84, 4週後218を示した。以上の平均値および各群各時期における抗毒抗体価の分布をみると、これら異った地区の住民における正常(?)の抗毒抗体価およびコレラトキソイドに対する応答に若干の差がみられている。

まずトキソイド接種前の抗毒抗体の面では、4地区の住民はいずれもコレラトキソイドは過去接種された経験を持たないが、何れの群においても抗毒抗体価(平均値でみても)は0でなかった。コレラ毒素と共通抗原性を有するものには現在まで大腸菌エンテロトキシンが知られているのみである。従ってトキソイド接種前にみられた抗コレラ毒素抗体は、毒素原性大腸菌に由来するものか、コレラ感染(不顕性を含めて)によるものか、ないしは不明因子によるものであろう。通常使用されているコレラ菌体ワクチン接種によっては、抗毒抗体の産生は見られないのが通常である。しかしこの点は詳細かつ確実な裏付けに乏しいので、あるいは不明因子の中に含まれる原因となっているのかも知れない。4地区の間で比較すると(a)<(b)≐<(c)<(d)の順に接種前抗毒抗体が高くみられ、しかも(c)と(d)におけるコレラ菌体ワクチンの接種回数には余り差がないと考えられることから、(d)地区民に存在する最高の抗毒

抗体の由来は不顕性感染を充分示唆するものである。毒素原性大腸菌の疫学に関しては、これら4地区住民間において何らの成績も得られていないので考察の余地がないが、あるいはこの問題も差をもたらす一因かも知れない。

一方トキソイド接種後の抗毒抗体応答をみると各群の差が明瞭に現れている。(a)と(b)は後者が小児グループである点を除外すると同量のトキソイド接種群であり、両者を比較すると、ブースター後の抗体価は後者が高い。次に他の同量接種群(c)と(d)を比較すると(c)<(d)と、1回接種において著しい差が現れている。この2つの差は何れも接種前保有抗体レベルに比例していると思なされる。(d)群では2回目の接種が行われていないが、注目すべきことは1回接種のみで、他の2回接種群の何れよりも高い抗体価が示されている点である。これは、既存の抗体に依存した既往反応が含まれていることを充分想像させるものである。

結び

日本人、およびコレラ流行、非流行地のフィリピン人における、コレラトキソイド接種前後の抗コレラ毒抗体価の測定を行った。トキソイド接種前にも低値ながら抗毒抗体がみられたが、日本人よりフィリピン人、特に流行地住民に高くみられた。トキソイド接種による抗毒抗体の産生は、接種前抗体価の高さに比例して若干の差がみられ、流行地区住民で最も高い応答がみられた。

2 肝バイオプシーにて確診しえたカラアザールの1例

—肝生検と関連して—

中富 昌夫, 石崎 驍, 原 耕平

(長崎大・医・第二内科)

山下 裕人, 板倉 英世

(長崎大・熱帯医研・病理)

カラアザール(Kala-Azar)は *Leishmania donovani* (*L. d.*) を病原体とする慢性伝染病で、サシチョウバエ(sandfly)がその媒介をなす。分布はアフリカ、インド、中国、ロシアで、イタリア、フランス、スペインなどの地中海沿岸地方にも見

られる。わが国には存在しないが、太平洋戦争後の帰還者の中に多数の感染があり診療されている。Vectorのサシチョウバエがいないため病気の伝播は起こらない。カラアザールの臨床症状はparasiteが網内系特に肝、脾に巣くうための症状で、irregular fever of long duration, chronicity, enlargement of the spleen and often of the liver, emaciation, anemia, leucopenia and hyper-globulinemia などの特徴がある。

近年の海外旅行熱、商社員、海外青年協力隊その他の長期滞在はいわゆる熱帯病の輸入例をもたらしている現況である。

長崎大学では1966年以来、ケニア国に対するわが国の医療援助に協力して、医師、看護婦、検査技師の派遣をつづけてきたが、演者は1974年4月より約1年間内科医としてこのプロジェクトに参加することができた。ここでは在任中に経験したカラアザールの1例を中心に他疾病の現況、肝生検の成績などについて報告した。

主に勤務したナクール病院の第6病棟はベッド数36で、1974年1月より12月までの入院患者数は1,119名(月平均93名)、その平均入院日数は11日であった。

入院時の診断名によると伝染病・寄生虫疾患が第一位で、呼吸器疾患、消化器疾患がこれにつづいている。呼吸器疾患の約80%は肺炎、気管支炎であり、したがって全体の約38%が感染症であった。赤道直下とはいえナクール周辺の良い気候(平均気温18~20°C, 標高1,600~2,000m)のためか、いわゆる熱帯病は余りなく、ほとんどがわが国に見られる疾病であり、その頻度が現在のわが国のそれと著しく異なるものと考えられる。伝染病、寄生虫疾患、消化器疾患、新生物の中には、肝腫大の症例が多数見られ、必然的に肝生検を施行しなければならなかった。その結果によると肝癌、肝硬変の頻度が高い特徴がみられた。

演者の経験したカラアザールの1例は19歳トルカナ族の男で、約7カ月間の脾腫、腹痛とるいそうを主訴として精査のためナクール病院へ紹介され入院したものである。入院時の現症はるいそう著明、皮膚が比較的黒く、眼結膜は高度に貧血性

であった。胸部は異常なく、腹部は膨隆し、肝3横指、脾10横指以上触知された。いずれも硬く、表面平滑、圧痛はなかった。腹水および下肢の浮腫はなかった。入院11日目の肝生検標本に *L. d.* 体が証明され、カラアザールと確診できた。その前後に行った脾および骨髄穿刺では *L. d.* 体は検出されなかった。アンチモン製剤で治療を開始し2クールを終了したが、一般状態、肝脾腫にはほとんど改善なく65日目に退院させた。

カラアザールの確診には脾穿刺が最も有効で、症例の90%で *Leishmania* が発見できると報告され、ついで胸骨穿刺で80%、肝生検で約70%となっている。この症例の場合注意深い鏡検が行われていればあるいは脾、骨髄にも *L. d.* 体が発見されたのではないかと考えている。

3 ケニアで経験したコレラ菌検出について

内藤 達郎

(長崎大・熱帯医研・病原細菌)

1974年9月より1年間日本国際協力事業団の派遣専門家として、ケニア国リフトバレー州立病院臨床検査部の技術指導を行った際コレラの流行に遭遇した。

帰国時に WHO の駐在専門家より入手し得た資料によるコレラ発生状況は下記のものであった。コレラの発生とそれによる死亡が新聞誌上に公表されたのは12月14日であったが、10月28日より12月12日の間にキスム州立病院へ入院したコレラ患者40名の存在とそれらのうち8名よりコレラ菌が分離されていたことが判った。流行地はビクトリア湖に面した地区およびその隣接地区であり、初発より7月までの菌分離例はキスム1,967、南ニアンザ623、ケリチヨ-161、シアヤ126、ブジア30、ナンディ19、キシイ5、カカメガ4、計2,935であった。12月に首都ナイロビで1例、2月にモンバサとチカで各1例の菌分離があったが、いずれも流行地よりの移動者であり、これらの地方での感染例は認められていない。なお資料入手に際して、8月1-19日の間に6例の菌検出があった旨を聞かされたが、検出地名までの確認は行っていない。月別コレラ菌分離状況または入院患者数に

よると流行の極期は南ニアンザで1月、キスムで2月にあり、ケリチヨ-とシアヤでは3月であった。7月までにコレラとして入院した患者数は5,929に達し、うち菌陽性者1,326(22.4%)、死亡者130(2.2%)であり、また巡回調査によりコレラとみられた者11,000、死亡者737(6.7%)と記録されていた。前期入院例を含めての菌検索件数は16,575件で2,938件(17.7%)よりコレラ菌が分離され、患者又は疑似患者およびそれらへの接触者に対するテトラサイクリン投与は390,805人となっていた。

リフトバレー州ケリチヨ-地区では1月6日に始めて患者よりの菌検出があり、1月28日にケリチヨ-地区病院へフラン器その他を搬入して演者自身菌検査を実施するとともに検査技師への技術指導を開始した。その後4月14日に至るまで入院患者便178件、巡回調査に際して下痢患者または接触者より採取し、輸送培地へ入れて持ち帰った糞便スワップ2,369件について、TCBS平板直接塗抹とアルカリペプトン水による増菌後のTCBS平板塗抹を実施し、TCBS平板での蔗糖分解、クリグラー培地でのブドウ糖分解、ガス非産生とH₂S非産生、コレラ菌診断用免疫血清に対するスライド凝集により、それぞれ46件(25.8%)と62件(2.6%)でコレラ菌を分離した。この際アルカリペプトン水増菌後にのみ菌分離ができたのは患者検体3件、収集検体8件であった。なお本流行菌株がエルトルコレラ菌稲葉型であることは、在ナイロビのケニア国関係機関により確認されているとのことであった。

演者は上記分離株のうち99名から分離した168株(69名については直接塗抹と増菌後の分離株が重複)を持ち帰ったので、これらの性状試験を実施中であり、さらに保存に伴う性状変異の追及を企画している。

4 地域気候と人の新陳代謝

中村 正 (長崎大・医・衛生)

暑い所では基礎代謝(以下BMR)は低いのが一般である。しかし過去の研究報告は熱帯居住者のBMRは必ずしも低いという結果のみではない。

この問題に関連して演者の昔の経験を披露する。

日本では四季の季節気候の変化に応じて BMR は10%ほど変動し、夏には低い。これは日本各地でみられるが、しかし積雪地帯では、真冬に暖房のきいた屋内で働く者ではこの期には真夏のように BMR は低下する事を演者は体験した。白人では BMR の季節変動がないという説がこれまで多かったが、演者らは日本の気候下の白人には変動がある事を確かめ得た。日本の季節気候や生活習慣の下では BMR とその変化は白人も日本人も同じであり、民族的差異はないと考えられる。

沖縄の気候は亜熱帯であり、夏の温度は九州に比べ1°Cほどしか高くないが、冬は約10°C高い。演者らは沖縄現地で実験し、この地住民の BMR 水準はほとんど本土水準と変わらない事を確かめ、また九州におけるほぼ同程度の季節変動を呈する事を認めた。また兵庫医大の堀らが最近タイ国で測定したタイ人の成績は、演者がこれを集計してみた結果、日本人の BMR 基準値と同じ level にあった。また同国で働いている邦人の値はむしろ基準値を上回っていた。タイ人被験者は軍人であり、肉体活動や栄養摂取量が一般人より高かったとすれば、熱帯住人の BMR が必ずしも低いとは言えない。

要するに栄養・労働・居住環境 (microclimate) などの生活条件によって BMR の level は異なってくるので、熱帯居住の BMR が必ずしも低くないという事も充分考えられる事である。

5 ナウル、グアムの医療事情と糸状虫症

福島 英雄

(鹿児島大・医・熱帯医研)

昭和50年11月26日-12月9日ナウル島、12月15日-18日グアム島において熱帯病を中心とした調査を行った。

ナウル島は赤道直下 (東経166°55′, 南緯0°32′) の南太平洋に位置した長円形 (5.40×4.63km) の珊瑚礁からなる面積 21.2km² の小さな島で、人口 6,768名 {ナウル人3,471名 (51.3%), 近隣の太平洋諸島の人々 1,787名, 中国人 883名, コーカシャ人627名} からなり、ナウル人は Polinesians,

Micronesian, Melanesian の混血であるが、Polinesians の特徴が優れているという。

ナウルはドイツ、イギリス、オーストラリア、ニュージーランドなどの支配、管理から1968年1月31日独立し、ナウル共和国となった。産業は燐鉱石の採掘、輸出が主で、国民所得は1人当たり約4,000ドルで、世界一豊かな国で、義務教育は10年と長く、文盲率は5%と低い。交通機関は船と飛行機で、国際空港があり、日本(鹿児島)とは週2便ボーイング737が飛んでいる。

気候は熱帯性気候で雨季 (11月-2月) と乾季にわかれ、気温は年間を通じて昼間は27~32°Cで、夜間はやや低く、平均湿度は80%である。年間降雨量 (1954年-1968年) は平均 1,891.2mm で多いが、年により変動が著しい。

人口を16歳以下の幼少年期、16-60歳の青年期、60歳以上の老年期の3つの時期にわけると、16歳以下と60歳以上は徐々に増加し、他の先進国と同様、老年層が増し、平均寿命 (男女とも60歳、最高年齢86歳) が伸びているものと思われる。人口増加は著明で、1966年は1948年の2.02倍となっている。

主食は米で、日本製の電気釜を使用している。副食は肉類 (鶏肉、牛肉、豚肉、羊肉の順に摂取)、野菜であり、ついで魚肉 (生のまま食べることもある) をとり、鶏卵も食べている。

ナウル人は長身で、肥満した人が多く、摂取カロリーは不明であるが、血清コレステロールは正常範囲であり、食餌摂取回数が多い人 (6~7回) も沢山いるという。

病院は Nauru General Hospital (国立, N.G.H. と略) と Nauru Phosphate Corporation Hospital (燐鉱石会社付属病院, N.P.C.H. と略) の2つがあり、保健所はなく、医師は9名 (N.G.H. に6名, N.P.C.H. に3名, うちナウル人5名) で、専門は外科医が1名、他の8名は全科医で、別に歯科医2名がいる。看護婦は11名 (N.G.H. 6名, N.P.C.H. 5名)、助産婦は4名で、保健婦はいない。

病床は N.G.H. に56病床, N.P.C.H. に150病床あり、N.G.H. の一日の入院患者は平均30名、歯科受診者は月200名である。1病床当たり人口22

名、医師1人当たり人口600名となり、日本より数の上では優っているが、医療レベルは低い様に見受けられた。

医療機器はかなり整備され、医療品はオーストラリアから輸入されている。医療費、税金は必要ないという。

死因としては心疾患、糖尿病が多い。癌は少なく、胃潰瘍、高血圧が多い。蛇咬症、海蛇咬症はなく、感染症では、赤痢（細菌性、アメーバ性）、 Dengue熱、癩などがみられるが、マラリアはなく、回虫症は多く、鉤虫症は稀で、糸状虫症も認められた。糸状虫症は熱発作が多く（80名）、陰嚢水腫、象皮病はあるが、乳糜尿はないという。糸状虫仔虫の検索（午後2—3時30分の間）を行った10名中1名に糸状虫仔虫（0.06mlの血液中1隻）が認められた。これは47歳の男性で、無症状である。詳細は今後の検討にまつべきであるが、*Wuchereria bancrofti* var *pacifica* と考えられる。診察した象皮病患者は47歳の男子で、母はナウル人、父はマーシャル出身であり、以前から外傷時に悪寒、発熱、患肢への赤い斑点が出現していた。22歳から右下腿、その後、大腿部に、39歳からは左下腿に象皮病が起り、左鼠径部のリンパ節の腫脹疼痛があったという。最初に母が、ついで本人、その後、父、弟も象皮病に罹患している。リンパ節腫脹、陰嚢水腫および乳糜尿はなく、右下腿は各足趾先まで疣贅形成を伴った象皮病で著明な腫脹は大腿部まで達し、左下腿の下半部が軽度の腫脹を呈しているが、圧痕はみとめられず、足背部は浮腫状の腫脹を呈し、血中に糸状虫仔虫はみとめられなかった。癩、結核、乳児死亡率も著減している。

グアム島は人口約10万人でアメリカの自治属領であるが、海洋性気候で、気温26.2℃、年間降雨量は2,249mm、雨季は6-11月、台風常襲地帯であるが、蛇咬症、海蛇咬症はみとめられない。

6 フィリピンにおける医学研修を終えて

古賀 英俊、福島 成幸
 福田 幸一、土橋 賢治
 （長崎大・医・熱医研会）

熱帯医学に興味をもつ学生によって構成される

長崎大学医学部熱帯医学研究会は、昭和48年以来、夏期活動の一環として東南アジアにおいて医学研修及び調査活動を行ってきた。昭和50年度は国際医療団の援助をはじめとして、多くの方々の御好意により、7月28日から8月21日までの25日間にわたり、フィリピンでの医学研修を実施することができた。今回は長崎大学熱帯医学研究所疫学部門の塚本助教授をリーダーとして、医学部専門課程3年の4名が参加した。

今回の第一の目的は、熱帯地方に特有な感染症の研修であったため、感染症を専門に取り扱い、またマニラ市内はもとより、その近郊からも患者が治療を受けに来ている国立 San Lazaro 病院が最も適当であると考えた。

同病院では7月30日から8月9日まで、コレラをはじめとして多くの感染症について毎朝病室実習を受け、また午後は講義にも参加することができた。

実習内容を全てあげることはできないが、ポリオの呼吸麻痺の治療に絶大な威力を発揮した鉄の肺、髄膜炎の子供に無麻酔で行われる腰椎穿刺、後弓反張を起こしている典型的な破傷風の患者、そして著明な脱水状態を呈しているコレラの患者に行われる輸液療法の実際など、貴重な経験を得ることができた。

現地医学生との交流も活発であり、毎日行われた講義の前後を利用して、教育制度から日常生活まで幅広い話し合いを持つとともに、Santo Tomas 大学や Far Eastern 大学の訪問など積極的な交流にも努めた。

San Lazaro 病院での実習と並行して、フィリピン政府マラリア防圧局（Malaria Eradication Service, MES）でも実習を受け、パラワン島でのマラリアの調査に備えた。

ここでは各種マラリア原虫の鑑別法を学ぶとともに、採血方法・染色方法について実習を受け、マラリアに対する理解を深めることができた。

8月11日にはマニラの南西600kmにあるパラワン島に飛び、パラワン州の県庁訪問、県立総合病院の実態見学等を行った後、今回の第二の目的であるイワヒグ刑務所モンテブレ支所でのマラリ

アの調査を行った。

調査対象は男性の囚人315名であり、当地のMESの協力のもとに、8月13日から16日までの4日間にわたり、採血・標本作製・検鏡を行ったが、全員陰性であった。当時周辺地域ではマラリアの流行が唱えられていながら、今回なぜ全員陰性であったのかその理由はよくわからない。

San Lazaro 病院や MES の方々の暖かい好意と配慮のもとに、短い期間ではあったが十分な効果をあげることができたことを感謝しながら、8月21日帰国の途についた。

特別講演

1 二、三の熱帯性皮膚疾患について

西本勝太郎

(長崎大・医・皮膚科)

一般に、いわゆる熱帯性真菌性皮膚疾患とされている「癬風」(Pityriasis versicolor) および「黒色真菌症」(Chromomycosis) について、わが国における発生の状況、臨床上的特殊性などを紹介した。

1) 癬風はこれまで、皮膚の角質層への *Malassezia furfur* の寄生によって生ずる病変とされ、またこの菌の培養は非常に困難であるとされてきた。

臨床的には、ほとんど炎症のない、境界明確な大小の斑をつくるが、ごく初期には毛孔一致性の、わずかにもり上った丘疹としてみられることがあり、この菌の感染が毛孔に初発することを示している。色調は、白色人種では紅色～淡黄褐色、黄色人種では、はじめ淡褐色のちに脱色素斑となり、さらに濃色の人種でははじめから脱色素斑が目立つが、いずれも表面に微細な少量の落屑をつける。菌は鱗屑中に豊富にみられるのが常である。

わが国においては、気候的な条件から、初夏、若い人に発症することが多く、また治療もさほど困難ではないが、高温多湿の熱帯地方においては、幼児より老人にいたる全年齢層に発症し、所によっては人口の大半がこれに罹患しており、当然治療も困難である。

最近この癬風に関して新しい知見が2、3えられた。その1つは原因菌の培養である。

癬風病巣よりの真菌の培養は、1951年、Gordonにより報告されたが、彼らの分離した菌 *Pityrosporum orbiculare* と、それまで病巣における鱗屑内の形態から *M. furfur* といわれてきた菌が同一であると認められだしたのは、やっと最近のことである。現在 *Pityrosporum* 属の真菌は、皮膚の常在菌の1つであると考えられている。

現在わが国で *Pityrosporum orbiculare* の分離にもっとも広く用いられているものは、種々の基礎培地の上に植物性油を重層するもので、これらの方法の普及により *Pityrosporum* 属真菌に関する新しい知見がつぎつぎと知られるようになり、またこの菌による新しい病型が見出されるようになってきた。

その1つがここに紹介する *Pityrosporum* 毛嚢炎で、病気はいずれも毛嚢一致性の紅色小丘疹であり、小さな膿疱を生ずることもあるが、概して炎症は少なく、自覚症もあまりない。組織学的には毛嚢中心の急性の炎症像で、中にイースト型の菌要素を含み、また培養で *Pityrosporum* をえる。

ほとんどの病変が既存の皮膚疾患にステロイドを外用したあとに生じる、一種の、常在菌による opportunistic infection であるが、単なる高温多湿といった環境因子や、種々の免疫異常をともなう基礎疾患との関連が認められないことから、著者は発症因子の1つとしてこの菌の lipophilic な性格と、軟膏によるカバーやステロイドそのものとの合致を考えている。

2) 黒色真菌症は、元来中央～南アメリカの低緯度地帯に多いとされていた、一群の黒色真菌による皮膚の感染症で、疣状、乳頭状の増殖性潰瘍を作ることから、一名疣状皮膚炎とも言われてきた。症例数や対人口比などからみると前記の諸地域に多いことは勿論であるが、近年のわが国における症例数の増加は著しく、すでに報告例も130を越えており、またその内容には諸外国での報告と幾分異なった点もみられる。今回はこれらの特色につき、自験例を中心に紹介した。

まずもっとも典型的な黒色真菌症は、多く外傷により菌の接種を受けて後、数年してはっきりした疣状皮膚炎の症状をとり始める。それゆえ、症例の多くは戸外労働に従事する男性で、露出部、とくに下肢に多いのに反し、わが国の統計においては小児例、女子例の比率が高く、しかも好発部位も下肢にかぎらず顔面の単発型などがしばしばみられている。さらに特徴的なことは、わが国において内臓転移例の比率が高いことで、これは単に医師の興味や検索手技その他の要因よりは、人種的な感受性の差を考えたい程である。

わが国における内臓転移例は、著者の集計によれば約20例であり、罹患臓器としては所属リンパ節、胸腹部リンパ節、咽喉頭、肝、肺、腎、脳などが含まれる。内臓転移例の予後は非常に悪く、略全例が急速に死の転帰をとっており、皮膚に局限した小病巣が単純な切除のみによって容易に治癒しているのとは対照的である。

黒色真菌症は、形態的に、また生物学的性状において良く似た一群の黒色の真菌によって起こされる。これらの真菌の有性世代はまだ十分に解明されていないため、分類は form species によって行われている。これらに含まれる種のうち、全世界にわたってもっとも多く分離されているものは *Phialophora pedrosoi* と呼ばれる菌で、その他の種の分離は少ないが、それでも地域によって幾分の特殊性がみられている。

わが国においても、*Phialophora pedrosoi* の分離がもっとも多く、その他 *P. dermatitidis*, *P. verrucosa* がみられている。

さきのべたように、わが国では内臓転移例が多くみられるが、菌種による臨床症状の差異も興味をもたれる所である。はじめわが国においては *P. dermatitidis* による脳転移例が数例みられ、あるいはこれがわが国における菌の分布と、その内臓侵襲性を反映するものと考えられたこともあるが、その後の *P. pedrosoi* による内臓侵襲例の増加により、この傾向は薄められつつあるようにみえる。

しかしながら *P. pedrosoi* によって起こされた黒色真菌症全症例数のなかで、内臓転移を生じた

例数は諸外国に比して圧倒的に高く、これらの症例の予後が非常に悪いことから、今後皮膚病巣の早期発見と、比較的広範な皮膚病巣や初期の転移例の治療法が重要な問題となるものと思う。

2 フィリピンの住血吸虫症の疫学と対策

安羅岡一男

(筑波大・基礎医学・医生物)

フィリピンにおける住血吸虫症の病原体は日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* で、その中間宿主である水陸両棲の小巻貝 *Oncomelania quadrasi* によって媒介される。その流行地は広範囲にわたり、北緯14°のミンドロ島からルソン島の南部、サマール、レイテ、ボホール、そして北緯6°のミンダナオまでの諸島にわたり、その面積は162,851ヘクタールにおよぶと推定される。この地域の住民3,374,951人のうち、529,072人(15.7%)が本症に感染していると推定され、国民の保健上からも重要な疾患の1つとされている。患者の大部分は農民とその家族に限られ、農業国であるこの国にとって重大な社会経済的な問題でもある。本症による死亡と病害による man-day の消失、ならびに治療に要する費用は、家畜の感染による損失額を除いても年間1億ペソ(約45億円)に達するといわれる。

フィリピンの気候は熱帯性であることはいうまでもないが、季節的な風向と山脈の走行によって雨季の状況が異なり、①雨季(6月—10月)と乾季の区別が明瞭な地域、②乾季がなく、11月—2月に強い雨季がある地域、③2月—4月に乾季があり、明瞭な雨季がない地域、および④乾季はなく、またとくに強い雨季もない地域、の4型に分けられる。本症の流行地はこのうちの②と④の地域に限られており、これは媒介貝の *O. quadrasi* が乾季には生存し得ないことを示している。

本症は学令以前の6歳以下においてすでに数%の感染がみられ、年齢とともに感染率は上昇し、20—24歳の年齢群で最高となる。青年期以上では性別による感染率の差がみられ、女性より男性に高い傾向を示す。職業別の感染率は農民に最も高く、淡水漁業者、労務者がこれに次いでいる。

媒介貝の *O. quadrasi* は日本のミヤイリガイ *O. nosophora* にくらべて小型で、殻長の最長は雄が 5mm, 雌が 6mm である。低湿地, 沼沢地, 小河溝, 道路傍溝, 灌漑溝などに生息し, 水陸両棲であるが孵化後の最初の約 2 週間は完全に水棲である。平均寿命は雄貝が 125 日, 雌貝が 155 日といわれている。

本症の治療には現在のところ Stibophen や Nidazole が用いられている。ともにいちじるしい副作用があり, それを軽減するために前者は 1 クールを 40ml という常用量の半量で行い, 後者は 25mg/kg が有効量とされているにもかかわらず, 15mg/kg 28 日連用という方法をとっている。しかしこれではたして治療が望めるかどうか疑問である。

本症対策の行政機構として保健省の下に National Schistosomiasis Control Commission (NSCC) があり, 対策計画を立案し, 政府の他の関係行政機関との協力をはかり, 計画を実行する。またこの Commission は各種の国際機関との連絡機関である。NSCC の実務機関としてレイテ島のパロには Schistosomiasis Control and Research Project (SCRIP) がある。これは事実上この国における唯一の住血吸虫症の調査, 研究とコントロール対策を実施する機関で, 庶務, 寄生虫疫学, 貝学, 環境工学の 4 部門から成り, 約 50 名のスタッフによって運営されている。SCRIP の傘下には 6 つの Regional Schistosomiasis Advisory Team (RSAT) がレイテ, ミンドロ, ソルソゴン, サマール, ダバオデルノルテ, ラナオデルノルテの 6 地区に配置されている。各チームは医師, 衛生工学技師, 貝専門技師, 土木製図技師, 機械技師, 実験助手, 自動車運転手の各 1 名, 計 6~7 名によって構成され, NSCC と SCRIP の技術的行政的指導の下に, 検便, 治療, 殺貝, 環境衛生の向上, 衛生教育などを行っている。現在, 住血吸虫症の対策には次のような方策が立案されている。

1. 感染者の検出とその治療
2. 環境衛生の向上
 - a. 便所の普及運動
 - b. 安全な水の供給

- c. 人道橋 (foot bridge) の設置
 - d. 家畜の繋留
3. 媒介貝のコントロール
 - a. 湿地帯の排水
 - b. 土埋
 - c. 近代的な農耕
 - d. 殺貝剤の散布
 4. 衛生教育

これらの各方策は他の医療衛生プロジェクトとよく連繋させ, また農務省, 各種公的機関, 教育省, 学校, 灌漑計画などの関連政府機関と緊密な連絡のもとに実施されなければならないが, 現状ではそれが円滑に進められているとは言い難い。しかも 1 年間の住血吸虫症対策予算は約 85 万ペソ (約 3,500 万円) であるが, その大半は人件費に費やされ, わずかにその 10~15% (約 400 万円) が治療剤や殺貝剤の購入に当てられているに過ぎない。この国の本症患者数は約 53 万人であるから, 患者の 1 人当たりの予算額は 8 円足らずというわけである。土木工事に予算はまったく計上されていない。したがって上記のコントロール方策もスローガンだけで, とても広大な流行地をカバーすることは不可能である。

そこで政府は各国際機関に援助を要請し, それに対して USAID/FFP が 1965-68 年に, UNFAO/WFP が 1975-76 年にそれぞれ各種の食料品 (小麦粉, 大豆油, 大豆, 粉乳, 肉, 魚, チーズの缶詰, 粉卵, 乾燥果実など) を NSCC に供与している。SCRIP および RSAT はこれらを流行地の住民に与え, その人力によって媒介貝の棲息地に排水溝を掘り, 冠水地帯を干拓して本症のコントロールをはかると同時に, また水田としての耕地を得るという一石二鳥をねらっている。

わが国の国際協力事業団 (JICA) は 1972 年より本症の研究対策を開始し, 2 名の日本人専門家を SCRIP に常駐させて調査研究の技術指導を行うとともに, 1975 年までに約 5,000 万円程度の調査研究に必要な機材 (顕微鏡, 真空凍結乾燥器, ブルドーザー, 車輛など) を供与している。今日まで免疫血清学的診断法, 植物性殺貝剤の開発などについて注目すべき研究が行われる一方, レイテ島

のダガミ、マタゴブ、カイバアンの3地区においてパイロットスケールコントロールが推進され、また SCRIP における COP 反応用抗原の作製など、その成果はしだいに国際的な注目を集めつつある。

JAPANESE JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE

Vol. 4 No. 3, 4

December, 1976

CONTENTS

Original article

- NAKAJIMA, Y., AOKI, Y., SAKAMOTO, M., SUENAGA, O. AND KATAMINE, D.
Studies on Malayan Filariasis in Che-ju Is., Korea
4 Experimental Transmission of *Brugia malayi* (Che-ju strain) to Domestic Cats..... 163-177
- KAMO, E., MINAI, M. AND ISHIZAKI, T.
Studies on Schistosomiasis Japonica with Particular Reference to Rectal Biopsy
1 Epidemiological Investigation, Specially Referred to the Skin Test and
COP Test (in Japanese)..... 179-188
- IWAMOTO, H. AND YAMAMOTO, T.
A New Method for Demonstration of Plasmodia in Tissue Section (in Japanese)..... 189-194
- AMANO, H., YAMAMOTO, T., SANO, A., TAKAHASHI, Y., KURATA, S.,
ICHIJIMA, K. AND YAMABE, H.
A Fatal Case of Induced Cerebral Malaria due to *Plasmodium falciparum*
(in Japanese) 195-205
- Note**
- SHINBO, S., KOBAYAKAWA, T., ISHIYAMA, H. AND MASUDA, K.
In Vitro Destruction of *Leishmania donovani* Infected Cells by Immune Serum 207-211

Published by

JAPANESE SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE

c/o Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

12-4 Sakamoto-machi, Nagasaki, 852, Japan