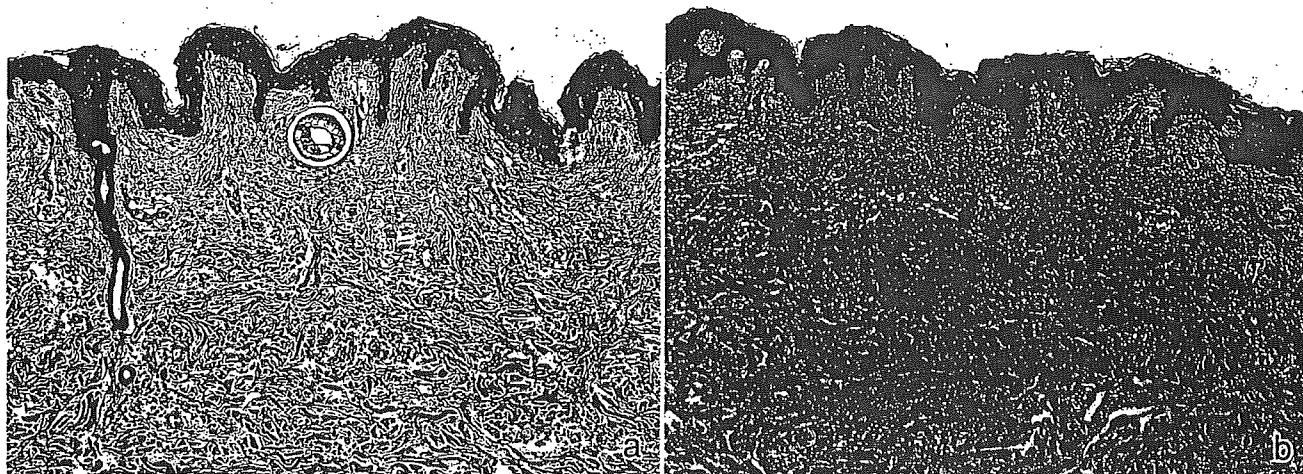
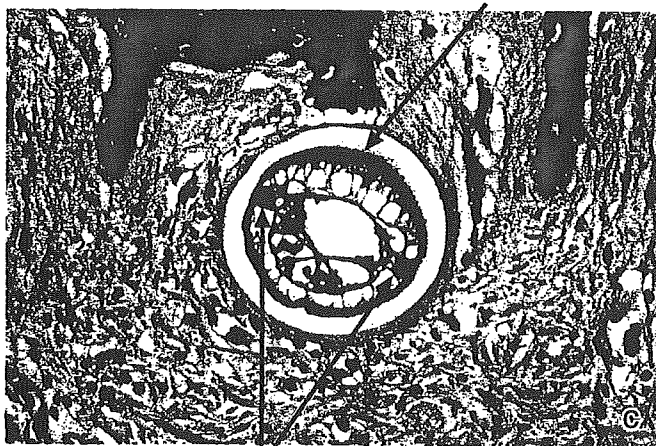




図1 臨床像：右側腹から背部にかけての小水疱を伴う線状爬行疹（矢印が生検部）



角皮



側索

図2 爬行疹先端部の病理組織像

- a：表皮直下に虫体の断面像が認められる。
- b：浸潤硬結を触れる紅斑部；虫体の通過部位を中心に，好酸球，リンパ球からなる炎症細胞が稠密に浸潤する。
- c：虫体断面像（強拡大）；角皮の表面に突起がなく，左右非対称の側索が消化管に接して突出する。

り、数日にわたって大量に摂食していた。また、前日にはマグロ、カツオの刺身を食べているが淡水魚は摂食していない。

**生検時現症** 右側腹部から背部にかけ、長さ約10 cmの釣り針状に蛇行する鮮紅色の線状皮疹を認める。線状疹の幅は約2 mmで硬く浸潤を触れ、その表層には線状に配列する小水疱を形成し、周囲には幅2~3 cmの浮腫性紅斑を伴っている(図1)。先端部では、肉眼で確認できる紅斑よりもさらに1 cm程前方まで軽度の浸潤硬結を触知した。

**初診時検査所見** 白血球数10690/mm<sup>3</sup>、好酸球27.3%、CRP 2.18 mg/dlと上昇を認めた。他には異常なし。

**病理組織学的所見** creeping diseaseと考へ、線状皮疹の浸潤を触れる先端部を中心に長径4.5 cmの紡錘形に皮下まで切除した。皮疹先端よりやや先の部分に相当する表皮直下に虫体横断面が認められた(図2-a)。虫体周囲と真皮から皮下脂肪織までの血管周囲に好酸球、リンパ球からなる炎症細胞が浸潤する。浸潤硬結を触れる紅斑部では好酸球を多数混じた稠密な炎症細胞浸潤が認められ、特に虫体の通過部位と思われる部位には好酸球の集積が著明である(図2-b)。虫体の直径は99 μmで、角皮の表面に突起がなく、左右非対称の側索が消化管に接して突出しているなどの所見より、旋尾線虫幼虫タイプXと同定した(図2-c)。

**免疫血清学的所見** タイプX幼虫の薄切片を抗原とした酵素抗体法による血中抗体検査では、患者血清(6月4日採取)200倍希釈まで陽性であった。

**経過** 虫体摘出後、ステロイド軟膏の外用により約1週間で皮疹は消退した。

### Ⅲ. 考 案

旋尾線虫幼虫は線虫類に属する寄生虫だがその成虫は確定されておらず、終宿主も不明である。人体への侵襲にはcreeping disease(皮膚爬行疹型)と腸閉塞型がある。本幼虫は形態学的に13種に分類されているが、タイプXが最も腸管への侵入性が高く、上記2病型の原因となることが多い<sup>1)</sup>。タイプX幼虫は体長0.5~1 cm、体幅80~100 μmで、ハタハタ、タラ、ホッケ、ホタルイカ、スルメイ

カなどの腸管に寄生しており、中でも内臓を取り出さないで生食されるホタルイカが原因となることが多い<sup>2)</sup>。本症の発症時期はホタルイカ漁解禁時期の3~8月に集中している。ちなみにホタルイカにはアニサキスの寄生は確認されていない。

これまで本邦における本幼虫によるcreeping diseaseの報告は調べた限り51例あり、次のような特徴が見出された。①潜伏期は数日~2週間前後である。②好発部位は体幹で、中でも腹部が最好発部位である。③臨床症状は痒疹を伴う紅斑から始まり、次に線状皮疹が出現する。移動性の線状皮疹が出現すれば診断は比較的容易であり、ホタルイカの摂食を確認すれば確定される。しかし、痒疹性紅斑のみの場合や、小水疱を形成するものの線状皮疹が明らかでない場合は初期診断が難しく、接触皮膚炎、帯状疱疹、虫刺症などとの鑑別が問題となる<sup>3)</sup>。自験例では初診時、マグニ咬傷に伴う慢性遊走性紅斑に類似していた。④本幼虫による爬行疹は、顎口虫症やマンソン孤虫症による爬行疹に比べ、1)線状疹が細く、鋭い印象がある、2)表層に小水疱を形成することが多い、3)移動が速い、などの特徴がある。これは虫体の体幅が1 mm以下と細いことや、表皮や真皮上層など皮膚の浅層部の爬行が多いためと考えられている。また、移動速度は1日2~7 cm、中には2時間で22 mm移動した例もある<sup>4)</sup>。したがって、虫体はすでに線状紅斑よりも先の部位に移動していることが多いので、切除する場合にはこの点を十分に考慮する必要がある。自験例では、爬行疹先端部付近を丹念に触診することで虫体の存在部位を推定することができた。病理組織学的に虫体周囲の炎症反応は虫体の通過部位のそれに比べ軽度であった。これも虫体の移動速度の速さを裏付ける所見と考えられた。

体内での移行経路については未だ解明されていないが、経口摂取された幼虫は腸壁を突き破り、腹腔から皮膚に侵入すると考えられている。摂取半日から数日後に腹痛、悪心などの消化器症状を伴うことがあるが程度は軽く一過性である。これに対し、腸閉塞型では上記と同時期に急性腹症として発症する。しかし腸壁に侵入して腸壁に炎症を持続させる幼虫と、貫通して皮膚に到達する幼

表1 旋尾線虫幼虫による creeping disease 20例 (1997~2003年) のまとめ

1. 消化器症状合併例	9/20例 (45%)
2. 9%以上の好酸球上昇	9/13例 (69%) (7例:記載なし)
3. 虫体摘出例	12/20例 (60%)
4. 虫体の存在部位	
表皮内	1例
真皮上層	4例
真皮中層	3例
真皮下層~皮下	3例
記載なし	1例
5. 線状の小水疱形成	11/20例 (55%)

虫が同じ種類かどうかはわかっていない。これまで腸閉塞型の中で皮膚症状を伴っていたのは1例のみである<sup>5)</sup>。

自験例を含め1997年以後に報告された皮膚爬行疹型20例について解析したところ、9例(45%)が消化器症状を伴っていた。9%以上の好酸球上昇を認めたのは記載のあった13例中9例(69%)であった。また、この9例のうち7例に消化器症状が認められている(表1)。皮膚爬行疹型では好酸球は正常か軽度上昇のことが多いが<sup>6)</sup>、腸閉塞型では高率かつ著明に好酸球が上昇する傾向がある。青山らは10例の腸閉塞型において、全例で好酸球が8%以上であり、その半数は20%以上を示したと報告している<sup>5)</sup>。自験例は白血球、好酸球とも上昇し、消化器症状もかなり強かった。皮膚爬行疹型でも炎症反応が強い場合は白血球増多や好酸球増多を呈するものと考えられる。

本症の診断はホタルイカの生食歴、線状爬行疹、虫体の摘出により確定されるが、虫体が検出されない場合はタイプX幼虫の薄切片を抗原とした酵素抗体法が有用である<sup>7)</sup>。

治療は虫体の摘出だが、これまでの報告では切除範囲は様々である。大滝らは先端から正常部を含め3~4cmの切除が望ましいとしている<sup>2)</sup>。虫体摘出率は60%だったが(表1)、皮膚の浅い部位を移動する割には少ないという印象がある。これはやはり移動が速いためと考えられる。自験例では虫体が存在したのは線状皮膚疹の先端よりもさらに先で、視診上は正常皮膚であったが浸潤を触知した。蛇行して後戻りした症例も報告されてい

るが、その際も虫体存在部位は強く浸潤を触れたとの記載があり<sup>2)</sup>、先端周囲を広範囲に丹念に触診することが有用と思われる。また、皮下組織に虫体が存在することもあるため、先端周囲を大きく皮下脂肪層まで切除することが必要である。本症に有用な駆虫剤は今のところ存在しないが、摘出されなくても虫体は数週間で死滅するようである。

旋尾線虫幼虫は十分な加熱や冷凍で死滅することが確認されており、自験例は未冷凍のホタルイカを購入したと思われる。これまでホタルイカの沖漬けが原因となった報告は自験例以外に1例あるが<sup>8)</sup>、自家製か否かの記載はなかった。市販されている沖漬けはすべて冷凍処理してある。

1994年に生ホタルイカの危険性がマスコミで大々的に取り上げられてからは出荷自粛が相次いだ。その後、ホタルイカの産地である富山県を中心に生食用は急速冷凍して出荷されるようになり、本症の報告は一時減少したが最近再び報告が増加している。理由として、ホタルイカの取扱業者が日本海沿岸各地に増加し、未冷凍の生ホタルイカが今なお市場に出回っていること、生食による危険が一般に広く知られていないことなどが考えられる。

1997年と2000年に当時の厚生省は、生食用ホタルイカは冷凍済みならその旨を、未冷凍なら内臓除去する旨をラベル表示するよう、各都道府県に対し通達した。しかし、法的に罰則が科せられていないため、そのような表示のない商品が多数市場に出回っている。今後も行政による指導と一般消費者への注意の喚起が望まれる。

本論文の要旨は日皮学会第153回信州地方会において発表した。

(2004年9月24日受理)

#### 文 献

- 1) Hasegawa H: Acta Med Biol, 26: 79-116, 1978
- 2) 大滝倫子, 赤尾信明: 臨床病理, 108: 258-263, 1998
- 3) 中野敏明ほか: 皮膚病診療, 21: 35-38, 1999
- 4) 藤平圭子ほか: 皮膚臨床, 34: 354-355, 1992
- 5) 青山 庄ほか: 日消誌, 93: 312-321, 1996
- 6) 松永 剛ほか: 炭農医誌, 14: 30-32, 2001
- 7) 杉山 広ほか: Clin Parasitol, 13: 98-101, 2002
- 8) 諏訪部寿子ほか: 西口皮膚, 61: 67-69, 1999

# 眼トキソカラ症の診断におけるトキソカラチェックの有用性

鈴木 崇\*<sup>1</sup> 上甲武志\*<sup>1</sup> 陳 光明\*<sup>1</sup> 大橋裕一\*<sup>1</sup> 赤尾信明\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup> 愛媛大学医学部眼科学教室 \*<sup>2</sup> 東京医科歯科大学医学部国際環境寄生虫病学

## Utility of ToxocaraCHECK in Diagnosis of Ocular Toxocariasis

Takashi Suzuki<sup>1</sup>, Takeshi Joukou<sup>1</sup>, Koumei Chin<sup>1</sup>, Yuichi Ohashi<sup>1</sup> and Nobuaki Akao<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine, <sup>2</sup> Department of Medical Zoology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical & Dental University

眼トキソカラ症は人畜共通感染症の一つで比較的診断が困難な疾患である。今回眼トキソカラ症が臨床的に疑われた3症例の血清および硝子体液に対して、トキソカラチェック・ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (イヌ回虫幼虫排泄物抗原を使用) と multiple-dot ELISA を施行し、その有用性を比較検討した。トキソカラチェック・ELISA では3例ともに血清および硝子体液においてイヌ回虫幼虫排泄物抗体が疑陽性もしくは陽性を示したが、multiple-dot ELISA では2例においてイヌ回虫成虫抗体が陰性であった。イヌ回虫幼虫排泄物抗体を簡便に検出するトキソカラチェックは眼トキソカラ症の迅速診断に有用であった。

Ocular toxocariasis is a zoonosis whose diagnosis is difficult. In 3 cases diagnosed as ocular toxocariasis, we performed ToxocaraCHECK and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the excretory-secretory (ES) antigen of *Toxocara* larva and multiple-dot ELISA with the antigen of *Toxocara canis* against serums and vitreous fluids. Results of ToxocaraCHECK and ELISA were positive in all cases, whereas the results of multiple-dot ELISA were negative in two cases. The immunology tests using ES antigen of *Toxocara* larva are useful for diagnosing ocular toxocariasis, ToxocaraCHECK being especially efficient for rapid diagnosis.

[Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 22(2): 263~266, 2005]

**Key words** : 眼トキソカラ症, トキソカラチェック, multiple-dot ELISA, ocular toxocariasis, ToxocaraCHECK, multiple-dot ELISA.

### はじめに

近年のグルメブームによる生肉の摂取やペットブームによる仔イヌとの接触などにより、眼トキソカラ症が増加している<sup>1,2)</sup>。眼トキソカラ症の確定診断には病理学的に幼虫を証明することが必要であるが、実際には不可能なことが多い。したがって、腫瘍性病変や硝子体索状物形成などの特徴的な眼所見と血清における陽性反応から本症を疑い、最終的に眼内液に対する免疫学的検査にて診断することとなる<sup>3)</sup>。しかし、これらの免疫学的検査は大学の寄生虫学教室などの限られた機関でしか実施できない点が大きな問題であった。

近年、トキソカラの抗体を簡便に検出できるトキソカラチェックが開発され<sup>4)</sup>、その有用性が眼科領域においても報告

されている<sup>5)</sup>。一方、外注検査においても寄生虫抗体のスクリーニング検査としての multiple-dot ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)<sup>6)</sup> が、利用可能な検査として期待されている。しかしながら、両者では検出する抗体が異なっており、診断への有用性については不明である。そこで、筆者らは眼トキソカラ症が疑われた3例から得られた血清もしくは硝子体液を対して multiple-dot ELISA およびトキソカラチェックを行い、対照として実施した ELISA との相同性を検討したので報告する。

### I 対象および症例

対象は、2000年4月から2001年5月の間に、愛媛大学眼

〔別刷請求先〕 鈴木 崇 : 〒791-0295 愛媛県東温市志津川 愛媛大学医学部眼科学教室

Reprint requests : Takashi Suzuki, M.D., Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine, Shitsukawa, Toon-shi, Ehime 791-0295, JAPAN

科外来において眼トキソカラ症を疑われた3例3眼である。男性2例2眼，女性1例1眼で，年齢は44～52歳（平均48歳）であった。

以下，各症例について簡単に解説する。

〔症例1〕 52歳，男性。

主訴：左眼の霧視および充血。

生活歴：ウシの生肝臓の摂取歴あり。

現病歴：左眼の霧視および充血を自覚し来院した。

初診時眼科所見：矯正視力は右眼（1.5），左眼（1.2）であった。右眼に特に異常所見は認められなかった。左眼には前房と硝子体中に軽度炎症細胞を認め，眼底周辺部（耳側上方赤道部）の網膜表層に隆起する白色腫瘤を大小数個認めた（図1）。

全身検査所見：白血球は正常範囲内であったが，好酸球は20.8%と増加していた。IgE（免疫グロブリンE）は4,173 mg/dlと著明に上昇していた。

〔症例2〕 48歳，女性。

生活歴：ウシの生肝臓の摂取歴あり。

現病歴：左眼霧視を自覚し来院した。

初診時所見：矯正視力は右眼（1.5），左眼（1.2）であった。右眼に特に異常所見は認められなかった。左眼には前房と硝子体中に軽度炎症細胞を認め，眼底周辺部（耳側）にはテント状の硝子体索状物を認めた（図2）。

全身検査所見：異常は認めなかった。

〔症例3〕 44歳，男性。

生活歴：ウシの生肝臓の摂取歴あり。

現病歴：平成3年より右眼の原因不明の中間部ぶどう膜炎に対して近医にて治療（ステロイド全身・局所）を受け，再発と軽快をくり返していた。平成13年1月再度右眼のぶどう膜炎を認め，治療開始するも4月には硝子体混濁の増強と

黄斑上膜の形成を認めたため，手術目的にて来院。

初診時所見：矯正視力は右眼（0.5）であった。前房・硝子体中に炎症細胞を認め，下方網膜周辺部の広範囲に snow-bank 形成，黄斑部に黄斑上膜を認めた。

全身検査所見：異常は認めなかった。

## II 方 法

各症例から採取された血清・硝子体液を用いて，下記の免疫学的検査を施行した。

### <各種免疫学的検査の原理と方法>

#### 1. トキソカラチェック

トキソカラチェックは，イヌ回虫幼虫排泄物抗原の抗原抗体反応を利用したイヌ回虫幼虫排泄物抗体の検出法である。ニトロセルロース膜にイヌ回虫幼虫排泄物抗原を吸着させてあり，被検血清中の抗体が抗原と結合し，抗原と結合した抗体が protein A と結合すれば赤いスポットとして肉眼視できる。検体を10倍と50倍に希釈し，それぞれキットに滴下するが，50倍希釈で反応がある場合は陽性，50倍希釈で反応がなく，10倍希釈で反応がある場合は疑陽性，両方とも反応がない場合は陰性と判定する。

#### 2. ELISA

酵素により抗体を標識し，酵素反応の結果生ずる色調の変化を分光光度計にて測定し，抗原に結合した抗体量を測定する。今回は，抗原としてイヌ回虫幼虫排泄物抗原を用い，特異抗体を検出した。

#### 3. Multiple-dot ELISA（寄生虫抗体スクリーニング検査）

12種類の寄生虫（ウエステルマン肺吸虫，宮崎肺吸虫，肝蛭・肝吸虫，マンソン孤虫，有鉤囊虫，イヌフィラリア，イヌ回虫成虫，ブタ回虫成虫，アニサキス，顎口虫，糞線虫）

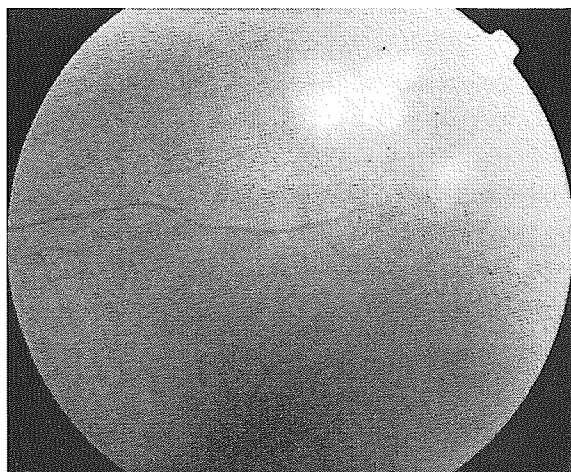


図1 症例1の初診時眼底写真  
網膜周辺部に白色腫瘤を数個認める。

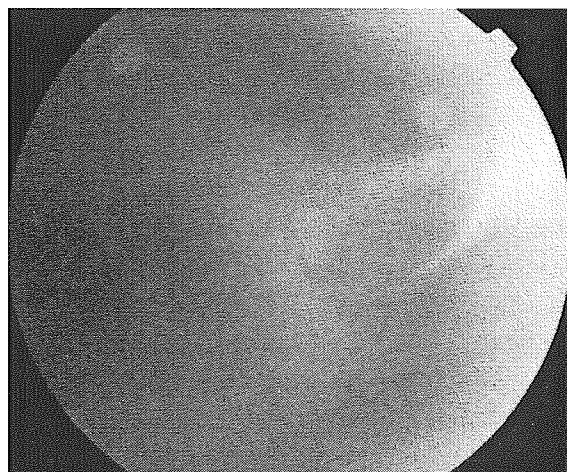


図2 症例2の初診時眼底写真  
網膜周辺部に硝子体索状物を認める。

表 1 各症例の血清に対する免疫学的検査の結果

免疫学的検査	トキソカラチェック	ELISA	Multiple-dot ELISA	
			イヌ回虫成虫抗体	他の寄生虫抗体
症例 1	陽 性	強陽性	陰 性	ブタ回虫成虫抗体陽性
症例 2	疑陽性	陽 性	陰 性	イヌ糸状虫, ブタ回虫成虫, アニサキス, 糞線虫, 肝蛭の各抗体疑陽性
症例 3	疑陽性	陽 性	未施行	未施行

について、抗原をニトロセルロース膜に吸着させ、抗体を検出するスクリーニング検査である（外注にて依頼可能）。

### III 結 果

各症例の血清・硝子体に対する免疫学的検査の結果を表 1, 2 に示す。

血清に対するトキソカラチェックにおいて症例 1 は陽性、症例 2, 3 では疑陽性を示し、ELISA においては 3 例とも陽性であった。一方、血清に対する multiple-dot ELISA では施行できた 2 症例ともにイヌ回虫成虫抗体は陰性で、他の寄生虫抗体において陽性または疑陽性を呈した。

硝子体液に対するトキソカラチェックおよび ELISA は 3 例とも陽性であった。

### IV 考 察

眼トキソカラ症は幼虫移行症の一つで、仔イヌが排泄した虫卵を摂取した場合や幼虫を含む生肉（肝臓）を食した場合にヒトへ感染する。経口摂取された虫卵や幼虫は第 2 期幼虫まで成育した後、消化管壁を破って血管内に侵入し、血行性に種々の組織に移行する。欧米では、小児に好発するぶどう膜炎の一つとして注目されていたが、わが国での報告例はそれほど多くなかった。しかし、近年のグルメブームやペットブームにより、わが国の報告例は次第に増加しているようである<sup>1,2)</sup>。しかしながら、診断は、白色腫瘍や硝子体索状物などの特徴的所見に依存することがほとんどであり、また、特徴的な所見を欠く場合には見過ごされてしまう可能性も高い。

客観的な診断としては病理学的に組織中に幼虫を発見するのが理想的であるが、実際にはきわめて困難であり、補助診断として血清、確定診断として眼内液（前房水・硝子体液）に対する免疫学的検査を行うこととなる<sup>3)</sup>。しかしながら、ELISA や二重寒天ゲル法などの特殊な免疫学的検査は専門機関への依頼が必要であり、結果が得られるまでに時間を要するという難点があった。

近年、迅速検査として開発された<sup>4)</sup> トキソカラチェックは、イヌ回虫幼虫排泄物抗体を検出する検査法で、特異性が高いうえ、手技も簡便で、反応時間は 5 分ときわめて短い。

表 2 各症例の硝子体液に対する免疫学的検査の結果

免疫学的検査	トキソカラチェック	ELISA
症例 1	陽 性	強陽性
症例 2	陽 性	陽 性
症例 3	陽 性	陽 性

また、12 種類の寄生虫感染症のスクリーニング検査として開発された multiple-dot ELISA は、外注にて依頼できるため利用しやすい<sup>6)</sup> が、イヌ回虫成虫抗体を標的とする点が疑問である。

今回の検討によると、ELISA によってトキソカラ症と診断された 3 症例について、トキソカラチェックは高い相関を示した。すなわち、症例 1 においては血清、硝子体液の両方で陽性であり、また、症例 2, 3 においても血清では疑陽性、硝子体では陽性を呈した。血清においては ELISA よりも陽性率が落ちるものの、硝子体液においては ELISA の結果とよく相関しており、本症の診断に非常に有用と思われる。

一方、イヌ回虫成虫に対する抗体検出を目的とした multiple-dot ELISA では、前述の 3 症例の血清では、全例で陰性であり、逆に、他の寄生虫に対する抗体が陽性を示していた。このことは、眼トキソカラ症ではイヌ回虫成虫抗体の上昇はなく、他の寄生虫に対する抗体と交差反応を起こす可能性を示唆している。実際、酒井らは、ブタ回虫抗原により RAST (radioallergosorbent test) 検査が本症の診断に有用であった<sup>7)</sup> と報告している。硝子体液についての検討は行っていないため断言はできないが、multiple-dot ELISA は眼トキソカラ症の診断にはさほど有用ではない可能性が高い。

今回の検討から、眼トキソカラ症の診断にはイヌ回虫幼虫排泄物抗体の検出が有用で、特にトキソカラチェックは迅速検査として優れていると思われた。今後はさらに症例を増加させ、イヌ回虫成虫抗体、イヌ回虫幼虫抗体、イヌ回虫幼虫排泄物抗体などの各種抗体の陽性率を比較し、最適な診断法について検討していく必要がある。

### 文 献

- 1) 土方 聡, 藤田浩司, 酒井潤一ほか: 眼トキソカラ症 23 症

- 例の検討. 臨眼 49 : 1211-1214, 1995
- 2) 吉田雅美, 浅井宏志, 白尾 裕ほか: 眼トキソカラ症の35症例. 臨眼 51 : 1455-1459, 1997
  - 3) 横井克俊, 坂井潤一, 白井正彦ほか: 眼トキソカラ症の診断における特異抗体価測定の評価. 臨眼 53 : 269-272, 1999
  - 4) Akao N, Chu AE, Tsukidate S et al : A rapid and sensitive screening kit for the detection of anti-*Toxocara* larval ES antibodies. *Parasitology Internatinal* 46 : 189-195, 1997
  - 5) 田口千香子, 杉田 直, 棚成都子ほか: 眼トキソカラ症における*Toxocara*CHEKの有用性. 臨眼 54 : 841-845, 2000
  - 6) 名和行文, 西村和子, 松本尚志: 抗寄生虫IgG抗体検査の実際. *Medical Technology* 29 : 1191-1196, 2001
  - 7) 酒井理恵子, 川島秀俊, 田邊和子ほか: 眼トキソカラ症4例でのヒト蛔虫RAST検査の有用性. 臨眼 52 : 1389-1394, 1998

\* \* \*

---

# THE HIGH PREVALENCE OF ASYMPTOMATIC *TOXOCARA* INFECTION AMONG SCHOOLCHILDREN IN MANADO, INDONESIA

Eiji Hayashi<sup>1</sup>, Josef Tuda<sup>2</sup>, Mihoko Imada<sup>2,3</sup>, Nobuaki Akao<sup>1</sup> and Koichiro Fujita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Section of Environmental Parasitology, Department of International Health Development, Division of Public Health, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Japan; <sup>2</sup>Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Sam Ratulangi University, Indonesia <sup>3</sup>Japan International Cooperation Agency

**Abstract.** We performed a serological survey of *Toxocara canis* infection in junior high school students from three districts in northern Sulawesi. Almost all of the 117 subjects from two rural districts near Manado allowed dogs in their houses, and there was an 84.6% prevalence of *T. canis* infection in this group. Fifty-three subjects (45.3%) had serum samples with a high titer of specific anti-*Toxocara* antibody. By contrast, 41 students tested in one urban district showed a 12.2% prevalence. To confirm the clinical symptoms of visceral larva migrans (VLM) and ocular larva migrans (OLM) caused by *Toxocara*, we administered a questionnaire survey, serological liver function tests, and an ophthalmoscopic examination in 34 subjects having high anti-*Toxocara* antibodies. One rural district showed a high prevalence; 58 out of 71 subjects (81.7%) had a high titer of anti-*Toxocara* antibodies according to a plate-ELISA test, although none showed clinical signs. Five of these subjects exhibited hypereosinophilia. These results indicated that *T. canis* infection in northern Sulawesi is latent in many more cases than previously estimated, and suggest that people living in environments polluted by *Toxocara* eggs become easily infected with *T. canis* and show a high prevalence of infection.

## INTRODUCTION

*Toxocara canis* and *T. cati* are ubiquitous gastrointestinal parasites in dogs and cats, respectively. Humans, especially young children, can be infected with these parasites following accidental ingestion of eggs containing infective-stage larvae. These parasites cause visceral larva migrans (VLM), which is characterized by fever, eosinophilia, hepatomegaly, cough, and wheezing. They also cause ocular larva migrans (OLM), which is characterized by a severe vision defect and neurologic larva migrans showing seizures and meningoencephalitis (Mok, 1968; Schantz and Glickman, 1978; Taylor *et al*, 1988). The definitive diagnosis of toxocariasis is based on the identification of larvae in tissue biopsies,

while a presumptive diagnosis may be based on clinical and laboratory findings and on the presence of significant anti-*Toxocara* antibody titer (Glickman *et al*, 1978). In developed countries, there have been numerous serological surveys on toxocariasis in young children, but few such studies have been done in developing countries. We assumed that this was partly due to a lack of suitable tools for easy on-site testing. While the introduction of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is based on the use of excretory-secretory (ES) antigen, has resulted in greatly increased specificity, it is still difficult to perform this test in developing countries. However, since toxocariasis remains a pressing public health problem in developing countries, serological epidemiological surveys are essential to provide detailed information regarding the prevalence of *T. canis* infection and its clinical features if the transmission of *T. canis* infection to humans is to be prevented.

Although these diseases can cause a severe vision defect or liver function disorder, there are few reports on the precise relationship be-

---

Correspondence: Eiji Hayashi, Section of Environmental Parasitology, Department of International Health Development, Division of Public Health, Graduate School, Tokyo Medical & Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan.  
Tel: +81-3-58035194; Fax: +81-3-56842849  
E-mail: eha.vip@tmd.ac.jp



tween the seropositive rate and the clinically symptomatic rate. The purpose of the present study was to evaluate the factors contributing to high serological prevalence of toxocariasis and to investigate the relationship between these pathogens and clinical symptoms. We performed a serological survey of junior high school students in two rural districts and in one urban district, and found a very high prevalence rate in the rural district, with most cases being of the covert type.

## MATERIALS AND METHODS

### Specific antibody detection

Serum specimens were obtained from 158 junior high school students, aged between 10 and 15 years, from three distinct geographical areas in northern Sulawesi, Indonesia. These areas consisted of an urban area of Manado city (district A); an agricultural village (district B), which is located 32 km southwest from Manado city; and a fishing village (district C), which is located 120 km west from Manado city. Serum samples were collected from 41 individuals from district A, 71 individuals from district B, and 46 individuals from district C. Informed consent was obtained before the blood drawing in all cases. The samples were tested in the field by Toxocara-CHECK, a rapid-test kit for *Toxocara* infection, to screen for the specific anti-*Toxocara* antibody (Akao *et al*, 1997; Dubinsky *et al*, 2000). Each sample was diluted 1:10 and 1:50 in a dilution buffer (0.5% BSA in PBS, pH 7.2) and tested simultaneously. According to the test kit instructions, samples having a positive result at a serum dilution of 1:10 and a negative result at 1:50 were considered to be weakly positive, those having a positive result at 1:50 were considered to be strongly positive, and those having a negative result even at 1:10 were considered to be non-significant for toxocariasis. In addition to the on-site examination, we carried out a plate-ELISA with 158 serum samples from the three districts using the larval excretory-secretory (ES) antigen of *T. canis*. We objectively assessed the measurement of the optical density (OD) of the results of the plate-ELISA and used this as an index value for comparison with

the three control samples: strongly positive, weakly positive, and negative results. We assigned an index value of 10 to the strongly positive control serum, 3 to the weakly positive control serum, and 1 to the negative control serum. Samples registering above 4 on the index value were considered to be positive.

### Questionnaire survey

All subjects were given a questionnaire about their lifestyle, water supply, eating habits, method of defecation, feeding of animals, and so forth. To evaluate the clinical symptoms caused by VML or OLM, questions about the condition of the skin rash and visual trouble were also included.

### Ophthalmoscopic examination

The ocular fundi of 34 subjects that had a high antibody titer were carefully observed using a portable ophthalmoscope (Hand-Held Fundus Camera GENESIS, Kowa Corporation, Japan) after the pupils were dilated with tropicamide (one drop for each eye; Mydrin-P, Santen Pharmaceutical, Japan). The images of the fundi were recorded photographically. No complications were reported after the examinations.

### Eosinophil counts and assessment of liver function

Eosinophil counts were performed using a thin smear stained with May-Grunwald-Giemsa staining for 34 students having a high antibody titer. To evaluate the liver functional disorder caused by VLM, we measured serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma-glutamyltranspeptidase (gamma-GTP) in 125 students from the three districts. An eosinophil rate of over 6% was considered to indicate hypereosinophilia; while an AST and ALT over 40 IU/l, and a gamma-GTP over 50 IU/l were considered to indicate a significant abnormality.

### Dot-ELISA for detecting the antibodies for pathogenic parasitic diseases

For 71 students in district B, we also conducted a screening test by dot-ELISA to detect pathogenic parasitic diseases such as those caused by *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Paragonimus miyazaki*, *Ascaris suum*,

*Dirofilaria immitis*, *Anisakis simplex*, and *Spirometra erinacei*. All but *A. simplex* and *S. erinacei* were derived from adult-stage antigens.

#### Stool examination

To evaluate the intestinal parasitic infection of the local area, stool samples were collected in district A. A total of 53 samples were collected from village residents of various ages who lived near a rice field and a lake. Samples were fixed with sodium acetate-acetic acid-formaldehyde (SAF) solution (sodium acetate 1.5 g, acetic acid 2.0 ml, formaldehyde 4.0 ml, distilled water 92.0 ml), and the eggs of helminths and the cysts of protozoa were detected using the formalin-ethyl acetate sedimentation technique.

## RESULTS

#### Toxocara-CHECK screening

In the on-site screening in district B, all samples diluted 1:10 were positive, and 11 (15.5%) showed strongly positive results. Thirty-seven out of 71 (52.1%) serum samples diluted 1:50 were positive ("weak positive" and "positive") according to the Toxocara-CHECK (Table 1). In the other districts, positive results were found in 5 out of 41 (12.2%) samples from district A and in 28 out of 46 (60.9%) samples from district C. The differences between the findings of the urban district (A) and of the two rural districts (B and C) were considered to be statistically significant according to a chi-square test.

#### Plate-ELISA for *T. canis* second stage larval ES antigen

Fifty-eight of 71 (81.7%) serum samples showed positive by plate-ELISA in district B, and 23 of these positive samples showed strongly positive results (Fig 1). The index values ranged from 1 to 21.

#### Questionnaire about life style

The findings from the questionnaire regarding the life styles of the subjects from the three districts are shown in Table 2. Of the 158 questionnaires distributed, 121 (76.6%) were returned with complete answers. Differences were found between the urban area (district A) and the rural areas (districts B and C) regarding the source of water supply for drinking and cooking, manage-

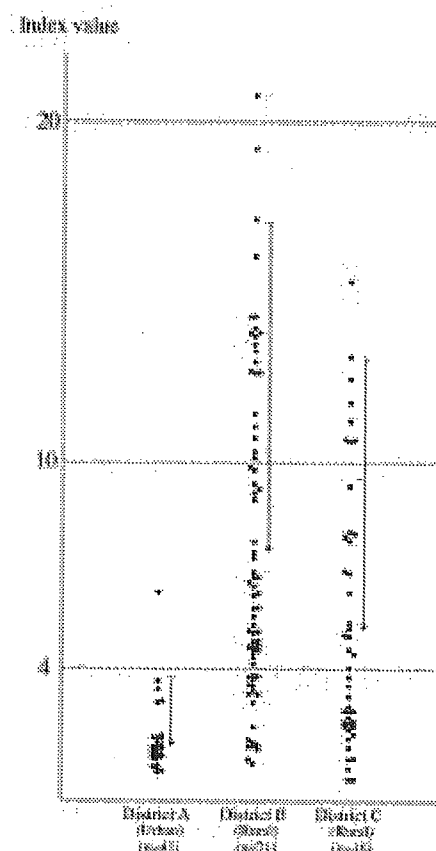


Fig 1—Distribution of index values of the samples collected from subjects from each district calculated by optical density (OD) measured by a plate-ELISA using a second stage larval excretory-secretory (ES) antigen of *T. canis*. The right side point represents the mean  $\pm 2$  SD.

ment after visiting toilets, and the mode of fecal disposal. No significant differences were found regarding hand washing before eating or in the feeding of animals at home.

Table 3 presents the questionnaire data regarding the rash condition and visual trouble among our subjects. Between 52.2% and 63.9% of students reported a past history of an appearance of a skin rash. The most common report was one of a red spot on the skin. Between 15.2% and 35.3% of students reported a past history of ophthalmic trouble, with the most common complaint being itchiness. Only one subject reported problems of the visual field.

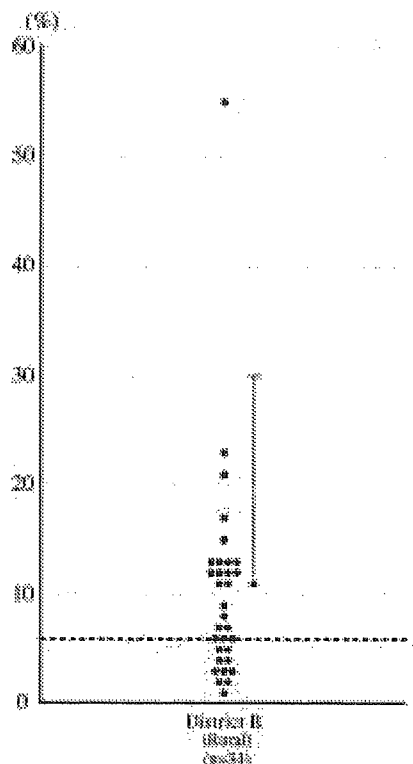


Fig 2—Distribution of the percentage of eosinophils in the total white blood cells among 34 subjects having a high antibody titer against the second stage larval ES antigen of *Toxocara* in district B. The eosinophil counts were performed by a thin-smear stained with May- Grunwald-Giemsa staining. The right side point represents the mean  $\pm 2$  SD.

Clinical evaluation

No hemorrhagic lesions or granulomatous lesions were detected in any of the 34 students examined by ophthalmoscopic examination (data not shown).

Our count of the eosinophil rate relative to the total white blood cell count in the peripheral venous blood showed that 24 of 34 subjects (70.6%) had hypereosinophilia, with five of these showing extremely high levels (Fig 2).

No significant abnormality of serum transaminase (AST, ALT) or gamma-GPT was detected in district B or district C (Fig 3). In one case, a moderate abnormality was detected, although this case was negative for *Toxocara* antibody.

Dot-ELISA detection of other important pathogenic parasitic diseases

Table 4 shows the prevalence of each parasite. Table 5 shows the relationship, in five subjects, between an extremely high eosinophil rate ( $>14\%$  eosinophil count) and the results of the dot-ELISA screening. One subject who had a 55% hypereosinophilia rate showed positive for both *A. suum* and *F. hepatica* antigen.

Stool examination

Table 6 shows the results of the stool examinations of the general public. In Indonesia, a mass treatment of elementary school students

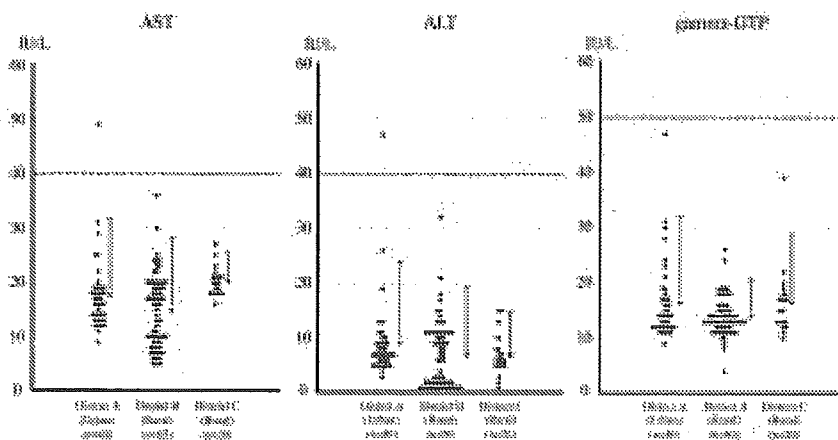


Fig 3—Distribution of the value of serum aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), and gamma-glutamyl/transpeptidase (gamma-GTP) among the subjects from three districts. The right side point represents the mean  $\pm 2$  S.D..

Table 1  
Result of the screening of specific anti-*Toxocara* antibody by Toxocara-CHECK.

	District A (urban) (n = 41)		District B (rural) (n = 71)		District C (rural) (n = 46)	
	1:10	1:50	1:10	1:50	1:10	1:50
Strong positive	1 (2.4%)	0 (0%)	11 (15.5%)	0 (0%)	13 (28.3%)	0 (0%)
Positive	4 (9.8%)	1 (2.4%)	26 (36.6%)	12 (16.9%)	15 (32.6%)	16 (34.8%)
Weak positive	0 (0%)	0 (0%)	34 (47.9%)	25 (35.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Negative	36 (87.8%)	40 (97.6%)	0 (0%)	34 (47.9%)	18 (39.1%)	30 (65.2%)

Each sample was diluted 1:10 and 1:50 in dilution buffer (0.5% BSA in PBS, pH 7.2).

Table 2  
Percentage of the answer of questionnaire about the junior high school students' life style in the 3 districts.

	District A (urban) (n = 39)	District B (rural) (n = 36)	District C (rural) (n = 46)
Source of water supply for drinking and cooking			
Public water supply	61.5%	0%	6.5%
Well	38.5%	100%	93.5%
Management after visiting the Toilet			
With paper	87.2%	0%	0%
With hand and water	12.8%	100%	100%
Mode of fecal disposal			
River	0%	13.9%	17.4%
Pit latrine	43.5%	47.2%	47.8%
Pour flush	56.5%	38.9%	34.8%
Washing hands before eating			
Yes	97.3%	100%	97.8%
No	2.6%	0%	2.2%
Habit of eating raw vegetables			
Yes	38.5%	45.7%	8.7%
No	61.5%	54.3%	91.3%
Way of eating			
With hands	20.5%	35.3%	15.2%
With spoon and fork	79.5%	64.7%	84.8%
Animals at home			
Yes	64.1%	97.1%	100%
No	35.9%	2.9%	0%
Bathing in the pond or river			
Yes	10.3%	27.3%	45.7%
No	89.7%	72.7%	54.3%

Totally 158 were distributed, and 121 (76.6%) were returned.

is made before the age of 6, in compliance with a governmental public health program, which may account for our findings: in district B, no cysts of *Entameba histolytica*, or eggs of either Trematoda or Cestoda were detected.

## DISCUSSION

Toxocariasis is a multisystemic disease of parasitic zoonosis that occurs predominantly in young children, and it is a significant public health problem in both developed and developing countries. Until recently, toxocariasis was a relatively neglected disease in tropical regions; however, overcrowding and cohabitation of the peri-domestic environment by dogs and cats has markedly reinforced the transmission cycle of this disease in many regions. Since people feed dogs freely in rural areas, eggs have been deposited extensively in the soil. Thus, disease exposure in such areas seems inevitable.

Epidemiological surveys in industrialized countries of the northern hemisphere have revealed that the seroprevalence of helminthiasis ranges between 2.5 and 5% in urban adults (Glickman and Schantz, 1981; Glickman *et al*, 1985; Cauchie *et al*, 1990). In Europe, however, a higher rate has been reported among rural populations, ranging from 17% among Swedish farmers (Ljungstrom and Van Knapen, 1989) to over 40% in Irish children (Holland *et al*, 1995). A case-control study of Irish children reported that 27% of those who had fever, headache, and so forth, along with a high anti-*Toxocara* antibody titer still had normal blood eosinophil counts (Taylor *et al*, 1988). The existence of chil-

Table 3

Percentage of the answer of questionnaire about the condition of the rash and visual trouble among jounir high school students in 3 districts.

	District A (urban) (n = 39)	District B (rural) (n = 36)	District C (rural) (n = 46)
Do you have ever developed rash?			
Yes	22 (56.4%)	23 (63.9%)	24 (52.2%)
Which is the part of rash?			
Hands or wrist	14	18	5
Forearm	1	2	2
Arm	1	1	0
Head or neck	1	1	1
Body	1	5	7
Thigh	0	0	11
Leg	3	4	3
Ankle or foot	4	2	1
What type of rash?			
Itchiness	12	17	21
Painful	0	0	0
Swelling	2	3	1
Blisters	0	0	0
Discharge / wheeping	1	3	12
Crusting	0	1	1
Red spots	8	7	2
Do you have ever developed the visual trouble?			
Yes	23 (20.5%)	28 (35.3%)	8 (15.2%)
What kind of trouble?			
Muscae volitantes	1	7	1
Pain of eyes	3	0	1
Paropsia	4	7	1
Visual field loss	1	0	0
Photophobia	2	15	6
Lacrimation	2	3	2
Feeling of foreign body	3	4	1
Congestion	1	3	1
Itchiness	10	12	3
Blurred vision	3	3	1

dren having high antibody titers but no specific clinical findings led to the concept of "covert toxocariasis."

In the present study, which was performed in a tropical country, we observed a higher seroprevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a rural area of Manado (81.7%) than would have been predicted from the literature. We selected the *Toxocara*-CHECK kit for our primary survey due to its speed and ease of use. This screen-

Table 4

Result of dot-ELISA screening for detecting the antibodies for pathogenic parasitic diseases.

Antigens	Number of positive, n = 71 (%)
<i>Entamoeba histolytica</i>	4 (5.6)
<i>Spirometra erinacei</i>	0 (0)
<i>Fasciola hepatica</i>	2 (2.8)
<i>Paragonimus miyazakii</i>	0 (0)
<i>Ascaris suum</i>	29 (40.8)
<i>Anisakis simplex</i>	5 (7.0)
<i>Dirofilaria immitis</i>	2 (2.8)

ing method revealed a high prevalence, and confirmed that the prevalence could be easily assessed. We concluded that the kit was useful for an initial survey in areas with a high rate of environmental contamination with *Toxocara* eggs.

We found a significant difference in seroprevalence between the two rural districts and the urban district, based on our questionnaire findings, this difference may be attributable to differences in the behaviors of feeding animals and in the management of wastes between urban and rural areas. Our findings further suggest that improvements in sanitation would markedly reduce these infections. While hand washing prior to eating was reported in both areas, it did not appear to be adequate to prevent infection in many cases.

In the present study, we found no clinically symptomatic case attributable to *Toxocara* infection, except for one case in which there were problems with the visual field. Of course, self-reports by children regarding symptoms of *Toxocara* infection may be unreliable. Bass *et al* (1987) suggested that longer periods, in excess of seven years, would be necessary to entirely discount the possibility of latent ocular disease, and they found that treatment with thiabendazole did not affect the course of the infection in a controlled year-long evaluation based on eosinophil counts and specific *T. canis* antibody titers. We observed a high prevalence in subjects aged between 10 and 15 years, suggesting that

Table 5

Number of students of each range of percentage of blood eosinophil counts out of total white blood cells, shown with index value to *T. canis* by plate-ELISA and result of dot-ELISA screening for 7 parasitic diseases.

Eosinophils count (%)	No. of students n=34 (%)	Index value to <i>T.canis</i> by plate-ELISA <sup>a</sup>	Result of dot-ELISA screening
1-5	10 (29.4)	4 to 14	
6-14	19 (55.9)	4 to 14	
15-19	2 (5.9)	6, 13	
20-29	2 (5.9)	9, 14	<i>A. suum</i> +
55	1 (2.9)	17	<i>A. suum</i> + , <i>F.h</i> +

<sup>a</sup>Index value is defined 1 to 2 as negative, 3 as weak positive, more than 4 as positive, more than 10 as strong positive.

Table 6

Number of positive samples of intestinal parasites eggs or cyst by stool examination among village people in district B.

	Number of positive samples in District. B (n = 53)
Hookworm	22 (41.5%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2 (3.8%)
<i>Trichuris trichuria</i>	6 (11.3%)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1 (1.9%)
<i>Entamoeba coli</i>	15 (28.3%)
<i>Endolimax nana</i>	7 (13.2%)
<i>Iodamoeba buetschlii</i>	1 (1.9%)
<i>Blastocystis hominis</i>	9 (17%)
<i>Giardia lamblia</i>	1 (1.9%)

the junior high school students we studied may have been infected repeatedly, and may have remained infected for several years. These data also suggest that *T. canis* infection is asymptomatic, being a "covert type," in most cases.

The antibody titers we observed indicated the possibility of a past infection, a covert infection, or a cross-reaction. Many previous studies have shown that antibodies persist for long periods of time due to repeated antigen stimulation resulting from the persistence of live larvae in tissues (Beaver, 1969) or from periodic reinfection (Glickman and Shantz, 1981). Lynch *et al* (1988) reported the existence of significant

cross-reactivity of non-homologous parasites with *Toxocara* in regions of endemic helminthiasis. In the present study, we performed dot-ELISA screening to detect the antibodies for other parasitic diseases, and detected *Ascaris suum* infection in 29 out of 71 cases (40.8%). Of these, four cases showed no cross-reactivity with *Toxocara*. Further studies are needed to differentiate these parasites by detecting their antibodies.

Magnaival *et al* (1997) suggested that the migration of *T. canis* larvae in the human brain does not frequently induce a recognizable neurological syndrome but is correlated with several risk factors, including exposure to dogs, a situation possibly responsible for repeated low-dose infections.

Gonzalez *et al* (2000) reported that high resolution ultrasonography revealed hypoechoic areas in the liver in 50% of their cases. Their patients had a mean age of 2 years and 9 months, presented with anemia, long-standing fever, and eosinophilic leukocytosis, and had been diagnosed as having toxocariasis based on a high titer of *Toxocara* antibodies according to an ELISA. Kaushik *et al* (1997) also reported granulomatous hepatitis caused by *Toxocara canis* that showed clinical improvement without specific therapy in all cases. Considering these reports and the present study, hepatitis caused by *T. canis* may occur in infants and may improve within a few years. Liver functional disorder may not persist in its active stage for a long

period of time, in spite of repeated infection, or it may emerge just after infection for a short period of time.

While many cases appear to be asymptomatic, there may be some background factors for the symptomatic cases, such as a compromised immune system. In mice, the levels of both IL-12 and tumor necrosis factor alpha were significantly lower in the infected group as compared with the controls (Kuroda *et al*, 2001). Although Akao *et al* (2000) and Hayashi *et al* (2003) reported an animal model for ocular toxocariasis, further studies are required to better evaluate the mechanism of toxocariasis. While it is useful to assess the pathogenesis of this disease using such animal models, a more complete understanding will be reached when they are combined with careful population studies.

#### REFERENCES

- Akao N, Chu AE, Tsukidate S, Fujita K. A rapid and sensitive screening kit for the detection of anti-*Toxocara* larval ES antibodies. *Parasitol Int* 1997; 46: 189-95.
- Akao N, Takayanagi HT, Suzuki R, Tsukidate S, Fujita K. Ocular larva migrance caused by *Toxocara cati* in Mongolian gerbils and a comparison of ophthalmologic findings with those produced by *T. canis*. *J Parasitol* 2000; 86: 1133-5.
- Bass JL, Mehta KA, Glickman LT, Blocker R, Eppes BM. Asymptomatic toxocariasis in children. A prospective study and treatment trial. *Clin Pediatr* 1987; 26: 441-6.
- Beaver PC. The nature of visceral larva migrans. *J Parasitol* 1969; 55: 3-12.
- Cauchie V, Chaillet P, Bigaignon G, Tomasi J, Vervoort T. Comparative studies of *Toxocara* infections in Belgium and in other countries [in French]. *Acta Clin Belgica* 1990; 45: 227-39.
- Dubinsky P, Akao N, Reiterova K, Konakova G. Comparison of the sensitive screening kit with two ELISA sets for detection of anti-*Toxocara* antibodies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31: 394-8.
- Glickman L, Schantz P, Dombroske R, Cypess R. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 492-8.
- Glickman L. and Schantz P. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev* 1981; 3: 230-50.
- Glickman L, Magnaval J, Brochier B. Seroprevalence of visceral larva migrans in the Midi-Pyrenees region. *Presse Med* 1985; 14: 1094 (in French).
- Gonzalez MT, Ibanez O, Balcarce N, Nanfita G, Kozubsky L, Radman N, Donatone J, Fynn A, Drut R, Cueto RE. Toxocariasis with liver involvement. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2000; 30: 187-90 (in Spanish).
- Hayashi E, Akao N, Fujita K. Evidence for the involvement of the optic nerve as a migration route for larvae in ocular toxocariasis of Mongolian gerbils. *J Helminthol* 2003; 77: 311-5.
- Holland C, O'Lorcain, P, Taylor M, Kelly A. Seroepidemiology of toxocariasis in school children. *Parasitology* 1995; 110: 535-45.
- Kaushik SP, Hurwitz M, McDonald C, Pavli P. *Toxocara canis* infection and granulomatous hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1223-5.
- Kuroda E, Yoshida Y, En Shan B, Yamashita U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha production in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunol* 2001; 23: 305-11.
- Ljungstrom I, Van Knapen F. An epidemiological and serological study of *Toxocara* infection in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 87-93.
- Lynch NR, Wilkes LK, Hodgen AN, Turner KJ. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunol* 1988; 10: 323-7.
- Magnaval JF, Galindo V, Glickman LT, Clanet M. Human *Toxocara* infection of the central nervous system and neurological disorders: a case-control study. *Parasitology* 1997; 115: 537-43.
- Mok C. Visceral larva migrans. *Clin Pediatr* 1968; 7: 565-73.
- Schantz P, Glickman L. *Toxocara* visceral larva migrans. *N Engl J Med* 1978; 298: 436-9.
- Taylor M, Keane C, O'Connor P, Mulvihill E, Holland C. The expanded spectrum of Toxocaral disease. *Lancet* 1988; 1: 692-4.