

日本住血吸虫感染ウサギにおけるニリダゾール 治療後の補体結合, 卵沈降反応の経過

松田 肇 田中 寛 佐々 学

東京大学医科学研究所寄生虫研究部

(昭和47年4月3日 受領)

はしがき

住血吸虫症の免疫学的診断は古くから研究され(Yoshimoto, 1910), 特に補体結合反応(CF)に関しては多くの業績が知られている. Kagan & Pellegrino (1961)は過去の研究経過を集録し, また Kagan (1968)は多数の検体を試験して, いずれも50%溶血法によるCF反応の診断的価値の高いことを認めている. 一方 Oliver-Gonzalez (1954)によつて始められた卵沈降反応(COP)もその後の研究により診断的価値の高いことが知られてきた(Kagan, 1968).

しかしながら治療後におけるこれら免疫反応の変化については結果は一定しておらず, 治療後にCF反応の低下がみられたという Fairley (1935)の結果から, 免疫学的反応は治療判定に利用する価値はないという Sadun *et al.* (1963)の結果まで報告されている. またこれとは別に人肺吸虫症ではビチオノール治療後にCF反応が陰転することが認められている(Yokogawa *et al.* 1962).

従来, 住血吸虫症の治療実験にはスチブナールやスチボフェンが用いられており, これら薬剤の治療効果は必ずしも十分でなく, 不完全な治療後における免疫学的研究によつて, その治療判定の価値を決定することは出来ない.

近年開発されたニリダゾールは駆虫効果のみを考えれば, 従来の薬剤よりはるかに優れ, 実験動物では完全治療が可能になった. 本研究では, 日本住血吸虫感染ウサギを用い, ニリダゾール治療後のCF反応, COP反応の変化を観察し, これら免疫学的検査が一定条件のもとで, 治療判定法として利用出来ることを認めた.

方 法

1. 感染と治療

体重3kg前後のウサギを用い, 日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* のセルカリア400から800を皮下接種して感染させた. 感染後, 週1回採血し, CF反応値を調べ, 抗体価が十分高くなつた7~12週後にニリダゾールの投薬を行った.

ニリダゾールは食塩水に懸濁し, ゴム製カテーテルを用いて直接胃に注入した. 投与量は1日1回80mg/kgで, 8日間投与した. 治療後は初めは2週毎に採血し, 次第に採血間隔を延ばした.

2. 補体結合反応

血清: 被験血清は数週間分をためて, 同時に検査を行った. 血清は生理的食塩水で10倍に希釈し, 65°C 20分加温して非働化と脱抗補体作用を同時に行なつた. 血清希釈はゼラチンを加えたペロナール緩衝液で1:10から1:2,560迄2倍希釈を行なつた.

抗原: 感染マウスの門脈から採集した日本住血吸虫成虫を-20°Cに保存して抗原材料とした. 抗原作製は Chaffee *et al.* (1954)の方法によつた. 虫体を凍結乾燥し, エーテル中でガラスホモジナイザーで磨細し, 脱脂を同時に行ない, 遠沈してエーテルを捨て, 沈渣を乾燥し, 重曹加ペロナール緩衝液(VBS)中で磨細した後, 一晚冷蔵庫内で抽出し, 上清を分離して抗原とした. 虫体の乾燥重量の1,000倍量のVBSに抽出し, これを1:1,000の抗原として-20°Cに保存した. 力価測定の結果, 最適な抗原希釈は1:12,000であつた.

反応術式: 試験管内で全量1mlによる50%溶血法を用い, 術式はほぼLBCF法(Casey, 1965)によつたが, 血球濃度をMayer (1961)の原法に準じたので, 各所にその為の変更を加えた. 緬羊血球濃度は分光光度計を用い 10^9 コ/mlに調整した. 溶血素(東芝化学)は50%溶血法の平坦法を用い, 最低必要濃度を求め, 血球感作にはその1.5~2倍の濃度の溶血素の等量を用いた. 補体

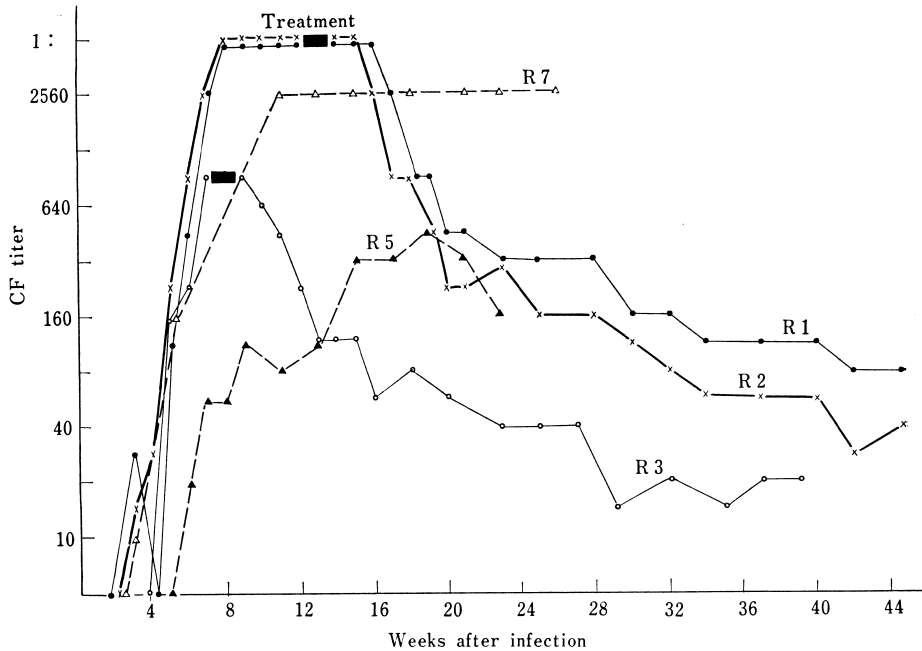


Fig. 1 Progressive change of complement fixation reactions in rabbits infected with *S. japonicum* before and after treatment with niridazole
R 1, 2, 3: rabbits treated with niridazole at a dose of 80mg/kg daily for 8 days. R 5, 7: Untreated rabbits

(東芝化学)の力価測定には、小試験管に希釈補体を0.2, 0.25, 0.3, 0.4ml をとり、各々に感作血球0.4ml を加え、全量を3ml として溶血反応を行い、各管の溶血度を分光光度計で読んで、両対数グラフを用いた回帰線法により $1\ C'H_{50}$ の補体の含まれる液量を求めて算出した。

血清の抗体価測定には小試験管で連続2倍希釈を行なつて各管に0.2ml ずつをのこし、最適濃度の抗原0.2ml を各管に加え、3単位を含む補体0.4ml (濃度は $1.5\ C'H_{50}/ml$)を加えて1晩冷蔵庫中で反応を促進させた。翌朝各管に0.2ml の感作血球を加え、 $37^{\circ}C$ 1時間保温し、溶血反応後遠沈して上清の溶血度を測定した。予め異なつた溶血度の標準液を作製し、試験管の溶血度はこれと肉眼的に比較した。溶血度40~60%を起こした血清希釈を反応終末点として抗体力価とした。終末点が2管の間にある場合は2管の希釈の中間を終末点と判定した。

3. 卵沈降反応

反応に用いた虫卵は横川ら(1967)の方法により、感染マウスの腸管からトリプシン消化によつて分離した。虫卵は反応の都度作製し、感染ウサギの血清を $56^{\circ}C$ 30分で非働化した標準抗体を用いて卵の抗原性を検定してから、反応に用いた。

虫卵懸濁液は20cmm 中に成熟卵約200コが入る様に調整し、ガラススライド上に20cmm の虫卵液と被検血清原液20cmm を混和し、 $24 \times 36\text{mm}$ のカバーガラスで覆つてワセリンで周囲を封じ、湿室中で $37^{\circ}C$ 、48時間保温後に虫卵の反応を観察した。

沈降反応の強度は横川ら(1967)の方法で分類し、反応なしを0とし、陽性反応は強度により1, 2, 3とし、成熟卵50コを観察して血清の抗体価を判定した。

血清の反応強度は陽性虫卵の百分率と卵の平均沈降度で示した。平均沈降度は虫卵の反応強度(0~3)を加算して平均値を求め、全卵が強度3の反応を呈した時、値が100になる様に $100/3$ を乗じた。

治癒判定法: 治療後30~32週を経た全ての兎を剖検し、全組織中の成虫の有無を検査して治療効果の判定を行なつた。

結 果

ニリダゾール治療を行つたウサギの中、長期観察が行なえたのは感染後45週迄のものが2匹と39週迄の1匹と計3匹であつた。非治療群は長期生存が困難で感染後2週と23週迄の2匹が観察出来たのみであつた。

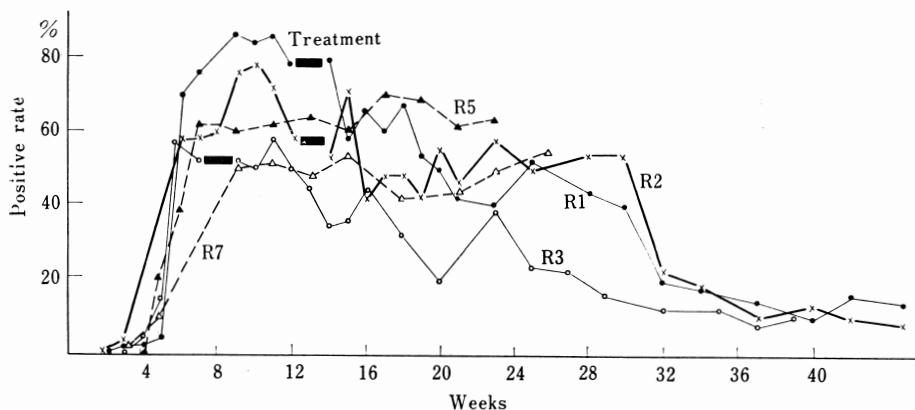


Fig. 2 Circumoval precipitation reactions shown by the positive rates in percentage in the same rabbits in Fig. 1

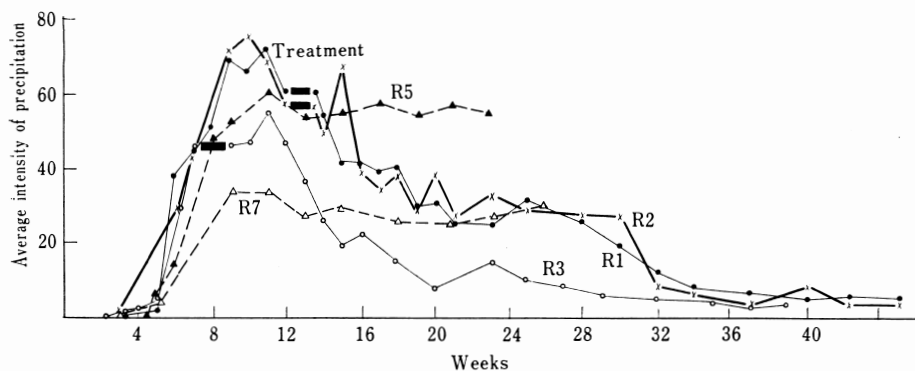


Fig. 3 Circumoval precipitation reactions shown by the average same rabbits of precipitation in the same rabbits in Fig. 1

補体結合反応：5匹のウサギの抗体価の経過を図1に示した。セルカリア接種後早いものでは2週に、おそくとも6週後には抗体価は1:10以上に上昇した。8週後に抗体価1:2560以上になった2匹は13週後に、他の1匹は抗体価1:960になった7週後に治療を開始した。

抗体価は治療終了後1~3週に最初の低下がみられ、初めの10週目位までは急激な低下がみられ、其後はゆるやかな低下がみられた。治療後10週間の3匹の低下は2倍希釈で各々、3.5管以上、3管以上、3.5管となったが、其後の20週間の下降は、2、2、1.5管とわずかであった。治療後30週の抗体価は1:80、1:40、1:20と低い陽性反応を示した。

非治療群にはこのような急激な抗体価の低下はみられず、この低下は治療による変化と判定された。治療後30~32週の全てのウサギの解剖の結果、成虫はどこからも検出されず、肝臓に肉眼的な病的所見はみられなかった。

卵沈降反応陽性率：COPの卵陽性率で測定した抗体価の変化を図2に示した。卵陽性率は最高50~80%を示し、非治療群の2匹では陽性率50~60%前後を変動し、下降することなく経過した。治療群は治療後、陽性率は次第に低下しているが、途中の変動幅が大きく、CF反応の様な急激な抗体価の変化や、一定した下降傾向はみられなかった。しかし治療後30週では10~15%と低い陽性率を示し治療前に比べれば著しい低下がみられた。

卵沈降反応平均沈降度：平均沈降度で表した抗体価の経過を図3に示した。5匹のウサギでの最高値は個体により35~75の間にあつた。非治療群は最高値に達してから殆んど変動なく、最後まで高い値を示した。治療群では治療後、平均沈降度はゆるやかに低下し、下降経過は卵陽性率の経過よりはるかに狭い変動をもつて滑らかに低下した。治療後初期の下降も卵陽性率より明瞭に認められ、10週後には平均沈降度は治療前の半分の値になり、

30週後には5前後の値を示した。

卵陽性率と平均沈降度の経過を比較すると、治療後に卵の陽性率は急激な変化はなく、個々の卵の沈降反応の強度が著しく低下することが認められ、抗体価の変化を測定するには卵陽性率より、平均沈降度の方が適していると思われる。

以上の様にニリダゾールで十分な治療を行なったウサギではCF反応でもCOP反応でも抗体価は著しく低下し、これら免疫学的手段が治療判定に利用出来る可能性が認められた。

考 察

住血吸虫症の診断への補体結合反応の応用は古くから試みられ、次第にその価値が認められてきた。特にChaffee *et al.* (1954)が成虫のCoca抽出液を抗原として用いて以来、その応用が広げられ、特異性も高まった(Kagan & Pellegrino, 1961)。また50%溶血法が一般化され、反応の鋭敏度も上昇し、Kagan (1968)は5 C' H₅₀ 単位の補体を用いる方法が診断的価値が高いとしている。

一方住血吸虫症の治療後の抗体価の変化については古くから議論のある所である。Fairley (1935)はtartar emeticで4クール治療後に人のCF反応が陰転した事を記録している。其後の研究では明確な結果はなく、De Meillon & Hollingham (1958)は人の*S. haematobium*感染で、完全治療の29カ月後に陽性者は16人中4人と最低となり、40カ月後には10人中9人と増加した成績を出している。Schofield (1959)もマンスン住血吸虫人体感染でスチブナール治療の後、CF反応の変化を調べ、反応の変化は不定であったと報じている。Sadun *et al.* (1963)はマンスン住血吸虫症の人をスチボフェンで治療し、5カ月後でもCF、COP反応共に変化のないことを示し、これら免疫学的方法是治療判定に役立たない事を示した。これらに関連したYokogawa *et al.* (1962)の肺吸虫での成績では、入をbithionolで治療した場合、寄生虫学的検査で治癒と判定された者では、6カ月後に大半はCF反応が陰転し、1年後では全例が陰転した事を報じている。

COP反応についてはOliver-Gonzalez *et al.* (1955)は人マンスン住血吸虫症をスチボフェンで治療し、約6カ月後に反応の陰転を報じ、Rodriguez-Molina *et al.* (1959)はマウスをスチボフェンで長期治療を行なった場合、210日以後に反応の陰転を観察している。またRifaat *et al.* (1969)は人のマンスン、ビルハルツ住血吸

虫をニリダゾールで治療し、いずれも抗体価の著しい低下を認めている。またKojima (1970)は日本住血吸虫感染ハムスターをニリダゾールで十分に治療し、30週後にCOP反応は10%以下に低下するため、本反応は治療後の効果判定に用い得るであろうとしている。

この様な不一致の原因を考えると、2,3の問題がある様に思われる。まずこれらの治療実験の治療判定は寄生虫学的な検査にもとづいて行なわれているが、真に虫体の死亡を判定しているかどうかの問題である。特にスチボフェンは比較的毒性が低く、広く人の治療に使用され、治癒率も高いとされているが(Halawani & Dawood, 1953)、動物実験ではニリダゾールに比し効力は劣る(Tanaka *et al.* 印刷中)。これらを考慮して本研究ではニリダゾールで治療して、治療に疑問を生じない状況で免疫学的な研究を行なった。

また免疫反応で陽性、陰性を目標にするか、定量的測定によるその変化を目標にするかが一つの問題である。反応の陰転を目安にすればその時期は相当おくれるであろうが、定量的検査法で抗体価の急激な低下を知れば比較的早期に治癒の傾向を知りうる。その意味でCF反応、特に定量性の高い50%溶血法が優れている。COP反応は定量性の劣ることが指摘されていて(Kagan & Pellegrino, 1961)、本研究の結果でも卵の陽性率で見ると、経時的に値の変動が大きく、定量的とは考えにくかった。しかし沈降反応の強度を取入れて平均沈降度を用いれば、変動は少なく、定量性の意味が生じてきたものと考えられる。

本実験の治療を受けなかったウサギに急激な抗体価の低下がみられなかっただけでなく、ヒヒ、*Papio ursinus*、の*S. mansoni*感染で27カ月以上の経過観察でも急激な抗体価の変化はないことからして(田中ら, 1969)、治療後の抗体価の低下はニリダゾール治療による結果と考えられる。

治療後の抗体価に変化がみられなかった報告では、用いた薬剤の効力か、検査方法の定量性か、その両者に原因があつたものと考えられる。

本研究で用いたCF反応では、抗原量、抗体量が少なく、技術的にも容易で、本研究に必要な鋭敏度と安定性が得られたので、Yokogawa *et al.* (1962)が用いた肺吸虫のCF反応法(辻, 1964)およびその元となるStein & Dong (1950)の鋭敏な方法は利用しなかった。

またCF反応をマイクロタイター法で試みたが、50%溶血法を応用することは困難であつたので、Kolmer法で3単位の補体を用いて行なった。その結果、各血清抗

体価は試験管法に比べ、1, 2 管常に低値を示したので、この方法も用いなかった。

ま と め

ウサギに日本住血吸虫のセルカリア400~800を皮下接種により感染させ、ニリダゾールを1日80mg/kg 8日間経口投与で治療し、治療前後の補体結合反応 (CF)、卵沈降反応 (COP) の変化を観察した。CF 反応は試験管を用いた50%溶血法で補体3C'H₅₀を用い、総液量1mlの方法を用いた。COP 反応はスライドガラス上で37°C, 48時間の保温で判定した。卵の陽性率と沈降の強さを示す平均沈降度で抗体の力価を表した。各卵の反応の強度は横川ら(1967)の方法により0~3に分類し、その平均値に100/3を乗じて最高値を100とした。

5匹のウサギは感染後6週迄にCF 価1:10以上の陽性となり、1匹は感染後7週でCF 価1:960の時、2匹は12週後、1:2560以上に達した時に治療を行なった。治療後10週目迄は2倍希釈で3管以上の急激な抗体価の低下がみられ、以後CF 価の低下はゆるやかで、30週後にも1:40前後の値を示した。

COP の卵陽性率は最高50~85%を示し、治療後は大きく変動しながら、次第に低下し、30週後には10~15%を示した。COP の平均沈降度は最高値35~75に達し、治療後はわずかな変動を示しながら滑らかに下降し、10週後には値を半減し、30週後には5前後を示した。

治療を受けなかった2匹ではこれらの変化はみられず、定量的な方法で抗体価の変化を観察すれば、CF、COP 反応は治療の判定に応用出来るものと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Casey, H. (1965) : Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Microtest. Public Health Monograph No. 74, Washington, D. C. Govt. Print. Office
- 2) Chaffee, E. F., Bauman, P. M. & Shapilo, J. J. (1954) : Diagnosis of schistosomiasis by complement-fixation. Am. J. Trop. Med. Hyg., 3, 905-913.
- 3) Fairley, N. H. (1935) : *Bilharzia* complement fixation reaction circulating antibody after treatment. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 29, 356-357.
- 4) Halawani, A. E. & Dawood, M. M. (1953) : Evaluation of the treatment of bilharziasis with Fuadin, stibophen and Anthiomaline with special reference to the apparent cure-

- rates and relapse-rates. J. Egypt. Med. Ass., 36, 339-356.
- 5) Kagan, I. G. (1968) : Serologic diagnosis of schistosomiasis. Bull. N. Y. Acad. Med., 2nd series, 44, 262-277.
- 6) Kagan, I. G. & Pellegrino, J. (1961) : A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. Bull. Wld Hlth Org., 25, 611-674.
- 7) Kojima, S. (1970) : Histopathological and immunological studies on the experimental schistosomiasis japonica, with special reference to the chemotherapeutic effects on the involving tissues. Jap. J. Parasit., 19, 54-75.
- 8) Mayer, M. M. (1961) : Complement and complement fixation, in Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry, 2nd ed. 905 pp. Charles C Thomas, Springfield, Illinois.
- 9) Meillon, B. de & Hollingham, E. A. (1958) : Observations on the *Bilharzia* complement-fixation test in school children after successful treatment. Bull. Wld Hlth Org., 18, 1108-1109.
- 10) Oliver-Gonzalez, J. (1954) : Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. J. Inf. Dis., 95, 86-91.
- 11) Oliver-Gonzalez, J., Ramos, F. L. & Coker, C. M. (1955) : Serological reactions against egg antigens as an aid in the evaluation of therapy in schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 4, 908-912.
- 12) Rifaat, M. A., Ismail, I. El Mahallawy, M. N. (1969) : A comparative study of some immunological tests for schistosomiasis before and after treatment. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 63, 338-342.
- 13) Rodriguez-Molina, R., Lichtenberg, F., Oliver-Gonzalez, J. & Rivera de Sala, A. (1959) : Studies on immunity to *Schistosoma mansoni* 2. The circumoval precipitin reaction to *S. mansoni* in mice treated with stibophen. Am. J. Trop. Med. Hyg., 8, 565-569.
- 14) Sadun, E. H., Anderson, R. I., de Witt, W. B. & Jachowski, L. A. (1963) : Serologic reactions to *Schistosoma mansoni* 2. Quantitative studies in human patients treated with stibophen. Am. J. Hyg., 77, 146-149.
- 15) Schofield, F. D. (1959) : The schistosomal complement-fixation test Pt. 1. the diagnostic value, Pt. 2. value as a test of cure. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 53, 64-74.
- 16) Stein, G. J. & Dong Van Ngu (1950) : A quantitative complement fixation test: Titration of luetic sera by the unit of 50 per

- cent hemolysis. *J. Immunology*, 65, 17-37.
- 17) 田中寛・松田肇・佐々学(1969) : 住血吸虫の動物感染における補体結合反応の経過. *寄生虫誌*, 18, 661.
- 18) Tanaka, H., Matsuda, H. & Sasa, M. (in press) Screening of drugs in *Schistosoma japonicum* infections in mice. *Researches on Filariasis and Schistosomiasis*, Vol. 2 : (Yokogawa, M. ed. by) University of Tokyo Press, Tokyo
- 19) 辻 守康(1964) : 肺吸虫症の補体結合反応, その術式について. *臨床検査*, 8 : 697-702.
- 20) Yokogawa, M., Tsuji, M. & Okura, T. (1962) : Studies on the complement fixation test for paragonimiasis as the method of criterion of cure. *Japan. J. Parasit.*, 11, 117-127.
- 21) 横川宗雄・佐野基人・荒木国興(1967) : 日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究(3) Circumoval precipitation test (COPT)に関する研究. *寄生虫誌*, 16, 77-84.
- 22) Yoshimoto, M. (1910) : Über die Komplement Bindungsreaktion bei der *Schistosomum* Krankheit in Japan. *Z. Immun.-Forsch.*, 5, 438-445.

Abstract

COMPLEMENT FIXATION AND CIRCUMOVAL PRECIPITATION REACTIONS IN RABBITS INFECTED WITH *SCHISTOSOMA JAPONICUM* AFTER THE TREATMENT WITH NIRIDAZOLE

HAJIME MATSUDA, HIROSHI TANAKA AND MANABU SASA

(Department of Parasitology, the Institute of Medical Science, the University of Tokyo)

Changes of complement fixation (CF) and circumoval precipitation (COP) reactions were observed in rabbits infected with 400 to 800 cercariae of *Schistosoma japonicum* and treated with niridazole at a dose of 80 mg/kg daily for 8 days. The technique of CF test was the method using the endpoint of reaction with 50% hemolysis in test tubes, each of which contained a total volume of 1 ml reagents. For COP test, egg suspension was mixed with an equal volume of undiluted test serum on a glass slide and covered with a cover slip. The slide was kept in a moist chamber and stored in an incubator at 37°C for 48 hours. The serum reactions are presented by 2 values: one is the positive rate of eggs in percentage and the other is the average intensity of precipitation. For this purpose the strength of precipitation was classified into 4 types, 0-3, according to Yokogawa *et al.* (1967).

CF reactions in 5 rabbits turned to positive no longer than 6 weeks after infection. The treatment was given to 3 rabbits when the reaction of 1 rabbit reached 1:960, 7 weeks after infection and those of the rest 2 showed higher than 1:2560, 12 weeks after infection. The titers in CF reaction of the treated rabbits fell rapidly 3 tube dilutions or more in serial 2-fold dilutions in the first 10 weeks then slowly down to about 1:40, 30 weeks after treatment.

Serum reactions measured by the positive rate of COP reached 50 to 85% at highest and fell gradually after treatment with large fluctuation to 10-15%, 30 weeks after treatment. Average intensity of precipitation increased up to 35-75 after the infection and reduced slowly after treatment with small fluctuations to about 5, 30 weeks after treatment. Untreated 2 rabbits did not show any reduction of both serum reactions. These results indicate that CF and COP reactions are valuable for the tests of cure when quantitative techniques are used.