

# マイクロフィラリアの集虫診断法の研究

## (1) ミクロフィラリアの凍結集虫法について

若 杉 幹 太 郎

東京大学伝染病研究所寄生虫研究部 (主任 佐々学助教授)

(昭和 31 年 12 月 25 日 受領)

### 緒 言

人畜糸状虫症において、臨床的検索または疫学的調査を行うにあたり、少数のマイクロフィラリア (以下 mf と略称) をも確実に検出することは重要であり、免疫学的にも純粋に近いマイクロフィラリアを生鮮な状態で集めることが望まれる。その為流血中の mf の検出法、集虫法の試みもこれまで 2, 3 あげられている。溝上 (1913), 松下 (1929) の検出法、鶴見・武田 (1939) の肺穿刺法、James knott (1939) 大浜 (1940) によるホルマリン溶血法、管沼 (1921) の醋酸メチレンブラウ集虫法、近くは石井 (1941), 管沼 (1950), 久米 (1950) 等の報告がなされた。しかしこれ等は全く溶血せずに検出したり、ホルマリン、醋酸、その他の薬物で溶血集中しているが未だ充分良好な成績をえたとは言いがたい。即ちこれまでフィラリア症の精密診断の目的で広汎に実用しうる集虫法は知られておらず、またこの目的で実施された研究も不十分であると考えたので、筆者はまづ犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* を材料としてその基礎的な検討を行った。さきに、佐々 (1944) はマラリア原虫に凍結集虫法の優れていることを発表しているが、これを糸状虫に試みた実験はないので、まず凍結集虫法を試みたところ、その集虫成績が良好であるのみならず、mf が生きてまゝ集められることを知り、さらに塗抹法と集虫法との mf 検出数及び検出率の比較検討をして、興味ある結果を得たのでここに報告する。

### マイクロフィラリアの凍結集虫法について

#### 1. 方法

a. 採血 3.8%クエン酸ソーダを採血量の 1/10 量使用 (若しくは 15%中性酢酸カリで筒内を洗滌) して凝血を防ぎ 1~5 cc 採血。

Mikitaro Wakasugi: Studies on the concentrating method for diagnosis of microfilariae. 1. (Department of Parasitology, Institute for Infectious Diseases University of Tokyo)

b. 洗滌 0.9%食塩水 7~8 倍量を加えてピペットで数回攪拌。

c. 遠心沈澱 毎分 1000 回転 10 分間上清を除去。

d. 溶血 寒剤 (細碎水 1 + 食塩 1/10)。又はメタノール中にドライアイスを投入したものの中に約 10 分間以上入れ、血液表面中央が火山状に突出するまで完全に凍結させ、これを約 37°C の微温湯又は室温で完全に融解し、約 10~20 倍量の 0.9% 食塩水を加えてピペットで攪拌する。

e. 遠心沈澱 毎分 1000 回転、10 分間上清をピペットで静かに除去し、白血球粥を含む沈澱を、ザーリー氏血色素測定用メランジュールまたは毛細管ピペットでスライドグラスにとる。

f. 沈澱の鏡検 沈澱をピペットでスライドグラスにとり、弱拡大で鏡検すると、陽性例では活潑に運動する mf を認める。必要によりこれを生体染色し、あるいは乾燥後メタノール固定し、ギムザ染色を行ってその種類を鑑別する。

#### 2. 実施方法の検討

##### a. 採血法の検討

採血にあたり溶血を防ぐ方法として 15% 中性酢酸カリで注射筒内を洗う方法と、3.8%クエン酸ソーダを採血量の 1/10 の割合に混入する方法とを比較した。その結果両者共凝血を防ぐ点ではほぼ同等であつたが、mf に与える毒性は後者が強かつた。即ち両者により各 5 cc を採血し、スピッツグラスに 1 cc ずつ分注して、うち 3 本を 0.9% 食塩水 7~8 倍量加えて洗滌遠心沈澱し、他の 2 本はそのまま洗滌せずに凍結した。その結果洗滌したものでは、両者共約 30 分後に殆ど 100% 活潑な運動を示したが、洗滌しないものでは凍結融解後クエン酸ソーダで 100% 運動しているのに比し酢酸カリでは 76% (300 隻中 238 隻) であつた。又一 50°C 24 時間凍結後融解したものでは、前者 22.0% (300 隻中 66 隻)、後者 0% (300 隻中なし) で、このため採血にはどちらかといえば毒性

の少い点でクエン酸ソーダの方が推賞されるものと判定した。

#### b. 洗滌の検討

尿酸カリ採血では、特に mf の運動性を考慮すれば洗滌が望ましいが、必ずしも必要ではない。

#### c. 遠心操作の検討

採血後、血球成分及び mf と液体成分を分離するため遠心操作を行う。上記の目的を果すに十分な回転数と時間をしらべると、血液 1 cc 及び 5 cc を用いての結果は毎分 1000 回転 10 分間、1500 回転 5 分間で殆ど同様の成績を得、mf も完全に沈み、分離も充分行われた。1000 回転 5 分間では稍不足し、1500 回転 10 分間では 5 分間に比し幾分良好であるが大差はなかつた。mf に与える影響を考慮にいれ、他の遠心成績と比較して 1000 回転 10 分間を採用した。

#### d. 溶血法の検討

血液を急激に凍結し、再び融解するという物理的操作で血球を破壊するのが凍結溶血法である。

#### 溶血操作上注意すべき点

完全凍結、完全融解、このため  $-10^{\circ}\text{C}$  以下の低温が必要である。

1) 水-食塩法では、水を細碎して、食塩との接触面を広くすることにより比較的容易に、 $-13^{\circ}\text{C}$ ~ $-20^{\circ}\text{C}$  (理論値  $-22^{\circ}\text{C}$ ) の低温が得られる。

2) ドライアイス-メタノール法ではメタノール中にドライアイス投入する際にメタノールの飛沫が試験管内に入らぬ様に注意すること、このために綿栓をすることが望ましい。

3) 試験管を十分に寒剤中に入れること。

4) 十分に凍結させたならば、温度をあげて完全に船状の液体になるまで融解する。

#### 3. 凍結操作と mf の運動性

非凍結血液と凍結血液での mf の運動性を観察するため、室温 ( $8^{\circ}\text{C}$ ~ $18^{\circ}\text{C}$  平均  $13^{\circ}\text{C}$ ) 氷室 ( $0^{\circ}\text{C}$ ~ $8^{\circ}\text{C}$ , 平均  $4^{\circ}\text{C}$ )  $-50^{\circ}\text{C}$  の三者についてしらべた。(以下 50 隻中の運動 mf 数の百分率)

室温 14 日間 100% 15 日目 0%

氷室 16 日間 100% 18 日目 4% 20 日目 0%

$-50^{\circ}\text{C}$  5 時間~5 日間 100% 6 日目 0%

以上の実験から、非凍結室温保存血液が検査までの保存に適すると推定された。更に凍結融解後では室温 ( $22^{\circ}\text{C}$ ) 保存 24 時間でなほ 100% 生存の成績を示したが、48 時間では殆ど運動性なく、一度凍結したものは鏡検まで

そのまゝの状態では保存するか、融解して 24 時間以内に観察することが必要と思はれた。

#### 4. 染色性

本法により集虫した mf の染色所見を、生体染色及びギムザ染色について述べると、生体染色は、Azur II Neutralrot 染色を行つたが原血液中の mf に対して施した同一染色法に比して何ら劣ることなく、G 細胞群の青色から淡紫赤色、赤色への一連の変化を観察し得た。更に Giemsa 染色 (pH 6.2~6.4) では特に染色上の優劣を論ずることは出来ないが、メタノール溶血染色標本に比し、同様の良好な染色を示した。

#### 5. 凍結集虫法の特徴

a. 血液中に混ざる溶血性薬物その他の液体不要のため、大量血液からの集虫が可能となり集虫率を高めうる。

b. 溶血完全なため視野が明瞭である。

c. 溶血操作を行つたにも拘らず 100% 活潑に運動する mf を視野中に見出し、生体染色固定染色何れも意の儘であり染色性も良好である。

d. mf に対する薬物の影響がないため、免疫学的、生態学的研究材料の蒐集目的に適う。

#### 集虫法と濃塗法との比較

集虫法と通常の濃塗法との mf の検出率及び検出数の比較をするために、下記の如きモデルを設定して実験を行つた。即ち一定数の mf を保存する犬血液を、脱フィブリン馬血液で倍々稀釈し、それらを集虫法及び濃塗法で検査し、成績を検討した。

#### 1. 原材料及び稀釈法

犬糸状虫感染犬から採取した約 5 cc の血液を原血液として、その約 2 cc を脱フィブリン馬血液で倍々稀釈し、512 倍迄での 10 段階とした。各段階の血液を 2 等分し、1 方の 1 cc ずつを夫々 10 本のスピッツグラスに入れて集虫法を行い、他方を 20 cm 直接塗抹に用いた。

#### 2. 検査操作

濃塗法は上記材料を 20 cm のザーリー氏血色素測定用メランジュールで各稀釈段階の血液から 20 cm の血液濃塗標本 30 枚づつをつくり、20% メタノール溶血メタノール固定後ギムザ染色を行つて鏡検した。塗抹血液の一部剥離したものを除外して第 2 表の結果を得た。集虫法は上記スピッツグラスの材料に前記凍結法を行つた。

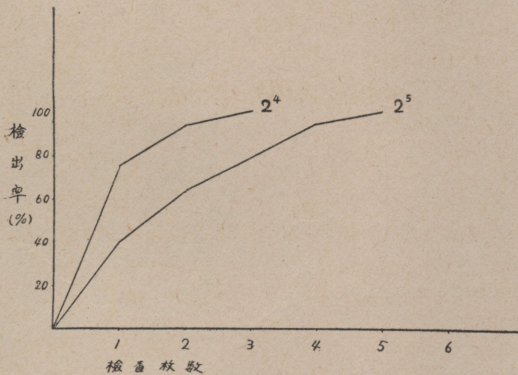
#### 3. 考察

本凍結集虫法による成績では、原血液 1 cc 中に 2554 隻を算した。稀釈がすゝむにつれて漸減 512 倍稀釈では 1

第 1 表 塗抹法と凍結集虫法に於ける  
mf 検出状況の比較

稀釈度	塗 抹 法		集虫法	
	検査スライ ド枚数	mf 陽性 スライド 数 (%)	20cmm中 平均mf数	1cc中 全mf数
2 <sup>0</sup>	10	10' (100%)	61.9±4.09	2554
2 <sup>1</sup>	10	10 (100%)	25.8±4.32	1171
2 <sup>2</sup>	30	30 (100%)	8.7±1.22	345
2 <sup>3</sup>	30	30 (100%)	7.9±0.37	210
2 <sup>4</sup>	20	15 (75%)	1.45±0.23	101
2 <sup>5</sup>	20	8 (40%)	0.45±0.13	22
2 <sup>6</sup>	20	0 (0%)	0	21
2 <sup>7</sup>	20	0 (0%)	0	7
2 <sup>8</sup>	20	0 (0%)	0	7
2 <sup>9</sup>	20	0 (0%)	0	6

第 1 図 検査枚数と検出率



1cc中 mf 6 隻であった。検出 mf 数と稀釈倍数の対数との間には直線関係が成立するが、この直線から検出限界を求めると1379倍稀釈まで検出可能である。したがって1cc中平均 1.3 隻の血液でも検出できたわけである。他方濃塗法では同じく1cc中平均45.7隻までしか陽性とならなかった。20cmm 約30枚の塗抹検査に比し、本法が約42倍の検出力を示すことがわかる。また第 4 表に示すごとく、20cmm 塗抹法による検出率と検査枚数との関係をしらべたところ、上記血液の16倍稀釈(1cc中平均mf数95.5隻)の濃塗では1枚法75%、2枚法95%、3枚法で100%の検出率を示したが、32倍稀釈(1cc中平均mf数45.7隻)の段階では1枚法94%、2枚法63%、3枚法78%、4枚法94%、5枚法で漸く100%が検出され

た。従つて従来広く用いられている60cmm の塗抹検査では、100%検出出来るのは1cc中平均 mf 数 100隻程度のものまでに過ぎぬことが判明した。

総 括

1. ミクロフィラリア集虫の目的で、凍結集虫法を糸状虫感染犬血液について行い、併せてその方法を検討した。

2. この方法は溶血に際して薬物を使用せず、大量血液からの集虫が可能で、しかも凍結を行つてもミクロフィラリアはよく生存し、鏡検時活潑に運動するミクロフィラリアを観察出来ることを見出した。その集虫率も良好で、染色性に何ら悪影響を与えないことがわかつた。

3. 凍結集虫法と20cmm 濃塗法との検出率、検出限界の比較を行つた結果、集虫法では1cc中平均mf数1.3隻迄検出可能であつたのに比し塗抹では45.7隻までしか検出出来ず、約42倍の検出力であつた。また1cc中平均45.7隻のmfを保有する血液では塗抹5枚検査が必要であり従来広く用いられている60cmmの検査で100%検出出来るのは1cc中平均mf数約100隻程度のものに過ぎぬことが判明した。即ち、集虫法を実施すれば従来の濃塗標本に比しはるかに少数のミクロフィラリアをも検出し得ることを知つた。

なお、本研究は主として犬糸状虫について行つたが、人のバンクロフト糸状虫及び牛の指状糸状虫についても凍結集虫法を実施すれば生きたミクロフィラリアを集めることを確かめた。

文献は第 2 報参照

Summary

A new method of purifying or concentrating microfilariae in the blood is presented. The technic of this "Freezing method" is as follows: take 3-5cc of blood into a syringe with sodium citrate solution to prevent the coagulation; centrifuge and remove the plasma; freeze the sediment with dry ice or with the mixture of ice and sodium chloride for about 10 minutes; dissolve the heamolysed sediment with 5cc of water or physiological saline; centrifuge it again for a few minutes, and examine for sediment with microscope.

In the experiments with *Dirofilaria immitis* of dogs, the freezing method was proved to yield satisfactory results in collecting and concentrating microfilariae alive and actively moving, and to be of practical value in diagnosis or in basic

biological studies. The efficiency of the freezing concentration method in detecting microfilariae in the blood was studied comparing with that of the routine thick-smear method using 20 cubic milimeter of blood. In the former method, positive results could be obtained up to the microfilariae content of 1.3 per cc of blood, whereas in the latter method the detection could be expected only when the blood contained more

than 45.7 microfilariae per cc, the former being about 42 times more efficient under this condition.

Similar results were obtained in cases of human blood with microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and of cattle blood with that of *Setaria cervi*. The technic was found to be of practical advantage as the microfilariae could be concentrated in actively moving status.

(卷末会記参照)

### VII International Congress for Microbiology 1958 Tentative Programme

#### Sections A: MICROBIAL PHYSIOLOGY AND GENETICS

Symposiums I: The influence of civilization on microbial ecology

- Focal topics: 1 Virulence as a physiological problem  
2 Permeability problems  
3 The quantitative study of growth and cell division  
4 Transformation, transduction and recombination

#### Sections B: MICROBIAL CHEMISTRY

Symposiums II: Role of protein in nucleic acid synthesis and role of nucleic acid in protein synthesis

- Focal topics: 5 Bacterial photosynthesis  
6 Bacterial toxins  
7 Chemical aspects on microbial structure  
8 Bacterial biosynthesis and metabolic errors

#### Sections C: IMMUNOLOGY

Symposiums III: Tissue specific antibodies

- Focal topics: 9 Diffusion methods in immunological research  
10 Natural resistance  
11 The mechanism of antigen-antibody reactions  
12 cell culture as an aid in immunology

#### Sections D: VIROLOGY

Symposiums IV: Latent and masked virus infections

- Focal topics: 13 Virus synthesis and reproduction  
14 Biology of virus transmission  
15 Variation in viruses  
16 Inactivation of viruses

#### Sections E: HUMAN AND VETERINARY BACTERIOLOGY

Symposiums V: Germ-free animals

- Focal topics: 17 Influence of irradiation on the host-parasite relation  
18 Screening diagnostic methods  
19 Problems related to the therapeutic use of growth inhibitors  
20 Staphylococcal infections

#### Sections F: INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

Symposiums VI: Continuous culture methods and their application

- Focal topics: 21 Production of microbial cells and viruses  
22 Production of extracellular substances  
23 Microbes as tools in synthetic chemistry  
24 Microbiological engineering with special reference to scaling up