

ミクロフィラリアの集虫診断法の研究

2. 諸種薬物を用いた溶血集虫法について

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

人畜糸状虫症に於けるミクロフィラリア (以下 mf と略称) の集虫法として、さきに薬物を用いないで、特に凍結操作による溶血集虫法について検討を加えた。そこでさらに、水をはじめとして、メタノール、ホルマリン、サポニン及び逆性石鹼などの溶血剤を用いた集虫法の得失に検討を加えた。

諸種溶血剤の集虫法に於ける得失

水、メタノール、10%ホルマリン、サポニン、逆性石鹼などについて、先ず溶血性の検討及び mf の運動性に及ぼす影響をしらべた。使用した血液は糸状虫感染犬から、3.8%クエン酸ソーダで凝血を阻止した全血液。あるいは血球浮游液で、浮游液は全血液に8倍量の0.9%食塩水を加えて、毎分1000回転、10分間遠心沈澱し、上清を除去したものである。

1. 水

a. 溶血性の検討

上記血球浮游液 0.5 cc に対し、0.5 cc, 4.5 cc, 9.5 cc, 19.5 cc の水を加えて攪拌し、それぞれ2倍、10倍、20倍、40倍稀釈を行い溶血度を観察した。

判定：室温 (22°C) で約10分~20分後の観察では、2倍稀釈で血球間に mf の1部分を認めうる程度 (+), 10倍稀釈では mf に附着する血球殆どなく (H), 20~40倍稀釈では、殆ど完全した溶血した (H)。以上の成績から、血球浮游液を水で溶血するには、少くとも10倍稀釈が必要であり、少量血液からの溶血集虫には適するが、大量血液からの集虫には不適であり、集虫率の低下を免れないと推定された。

MIKITARO WAKASUGI: Studies on the concentrating method for diagnosis of microfilariae. 2. (Department of Parasitology, Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo.)

b. mf の運動性

上記2倍稀釈液では、室温2時間後、運動性100% (以下何れも50隻中の運動 mf 数を百分率に直したもので) で3時間後98%, 24時間後0%となつた。故に充分溶血させるために、大量の水を使用すると mf の運動性は急激に減少し、場合によつては実験材料としての価値は少くなる。2~10倍稀釈では凍結法の24時間後生存65.6%に比し、早期死滅 (24時間後0%) を免れないが、少量血液からの集虫には、10倍稀釈が簡単でしかも実用性あるものと推定された。

2. メタノール

a. 溶血性の検討

20%メタノール水及び2%メタノール水の両者を血球浮游液 0.5 cc に対し、それぞれ0.5 cc, 4.5 cc, 9.5 cc, 19.5 cc づつ加えて浮游液の2倍、10倍、20倍、40倍稀釈について夫々10~20分後の溶血性を比較したところ、20%と2%の間ではあまり顕著な差はなかつた。また2倍稀釈ではいづれも溶血が不充分で水を用いた場合と大差なく、20倍、40倍では完全溶血して水の場合と同様であり、ただ10倍稀釈のところではメタノールの方が水よりやや溶血度が高かつた。

b. mf の運動性

20%メタノール水で2倍に血液稀釈すると22°C、10~20分後の観察では mf 30隻中10隻の約33%が運動していたが10倍、20倍、40倍にすると何れも、50隻中運動するものを認めなかつた。これに比し2%メタノールでは、2倍稀釈で mf 50隻中50隻、10倍稀釈では42隻、20倍で2隻と急激に運動性低下し、40倍では0隻であつたが、20%メタノールよりは運動性がよく保たれた。

以上からメタノール水の溶血性は水に比し優つているが毒性の点からも、溶血性の面からも20%メタノール水10倍稀釈以下が実用性あるものと思われた。

3. ホルマリン

James Knott (1939) 等のホルマリン溶血が報告されているが、メタノールと同様の溶血操作では、10%ホルマリンの場合、10倍稀釈で灰色泥状の沈澱物を多量に生じ、更に mf は完全に死滅するため、検出上困難をききはじめ実用性に乏しいものと考えた。

4. サポニン

サポニンは小宗化学製のものを使用した。これを蒸溜水で倍稀釈法で20%から0.002%までの5段階に稀釈し、夫々の溶血作用を血球浮游液及び全血液について比較した。なお溶血度の判定基準としてメタノール同様、mf と血球との関係から下記の6度に分類した。肉眼的には溶血を認めるも約5mm³をスライドグラスにとると顕微鏡的にはmfを直接は認め得ぬものを(-)、mfの1部分を認めうるものを(+), mfの $\frac{2}{3}$ 以上を認めうる程度(++), mfに数箇の血球が附着する程度(++), mfに附着する血球のないもの(###), 血球全くなきもの(###)とした。

a. 溶血性の検討

全血液に対する溶血作用

第1表に示すごとく10%サポニンでは20°C 30分から24時間にわたつての観察で、とくに時間的影響少く、溶血度は###であつた。1%でも同様の成績を示したが、0.1%では急激に溶血度が減じ、mfの $\frac{1}{3}$ は血球に邪魔され(++)観察に不便であつた。また30分後から16時間後でも溶血度は変化なく、24時間で幾分進行した(++), 0.01%, 0.001%ではともにmfの1部分を辛うじて認めうる程度で(+)時間的にも変化を認めなかつた(第1表)。

血球浮游液に対する溶血作用

10%サポニンでは溶血性ききめて良好で、時間的影響を認めず、1%でも殆ど同様の成績であつた。0.1%では全血液に於ける場合と比較して溶血性よく(++), 時間とともに溶血も進行し24時間後には(###), 0.01%, 0.001%でも(++), 24時間後には前者(###), 後者(++), でなかつた(第2表)。

以上からサポニン溶血は全血液に対するよりは血球浮游液に対して有効と思われ両者ともに実用できるのは1%以上と判定した。

b. mfの運動性

サポニンは全血液乃至血球浮游液との混和30分後の観察では、全稀釈段階ですべてのmfに運動性が認められたが、24時間後10%, 1%では50隻中運動するもの全くなく、0.1%では全血液で50隻中50隻運動を示す

のに比し浮游液では13隻(26%), 0.01%では前者50隻(100%)に比し33隻(66%)と運動性が低下するのを認めた。

第1表 全血液に対するサポニンの溶血性とmfの運動性に及ぼす影響

時間	濃度(%)				
	10	1	0.1	0.01	0.001
30分	###(50)	###(50)	++(50)	+(50)	+(50)
4時間	###(49)	###(47)	++(50)	+(50)	+(50)
16時間	###(0)	###(15)	++(50)	+(50)	+(50)
24時間	###(0)	###(0)	++(50)	+(50)	+(50)

註 + 肉眼的にのみ溶血を認める
 ++ mfの1部分を認めうる
 +++ mfに数箇の附着血球がある
 ### 附着血球がない
 ### 血球を視野に認めない
 ()内の数字は50隻中の運動 mf 数

第2表 血球浮游液に対するサポニンの溶血性と、mfの運動性に及ぼす影響

時間	濃度(%)				
	10	1	0.1	0.01	0.001
30分	++(50)	###(50)	++(50)	++(50)	++(50)
4時間	###(50)	###(36)	++(30)	++(50)	++(50)
16時間	###(0)	###(0)	++(46)	++(42)	++(50)
24時間	###(0)	###(0)	###(13)	###(33)	++(50)

以上溶血性から実用的と考えられるのは、20°Cで10%~1%サポニンであり、運動性から30分~4時間以内での観察が必要と推定された。なお和光純薬製サポニンでの実験も殆ど同様の成績であつた。

5. 逆性石鹼

逆性石鹼は三共製ラザール粉末、武田製オスバン液、田辺製ミヨシの3者を使用し、サポニンと平行して実験を行つた。

a. 溶血性の検討

逆性石鹼の溶血性は3者共差異なく、何れも原体の1%稀釈の段階では陥状黒茶褐色の沈澱を生じ、0.1%では薄赤色の混濁を生じそれ以下の稀釈では透明赤色で顕微鏡的に、血球をかなり認め++、肉眼的には各稀釈段階に於ける溶血度の差異を推定出来た。サポニンでは同じ血球浮游液の溶血では何れもブドウ色透明となり、特に肉眼的には稀釈段階の差による色調の変化を示さず溶血性

第 3 表 異つた濃度における逆性石鹼及びサポニンの溶血性と mf 運動性に及ぼす影響

濃度		逆 性 石 鹼					サ ポ ニ ン				
		2%	2×10 ⁻¹	2×10 ⁻²	2×10 ⁻³	対照	2%	2×10 ⁻¹	2×10 ⁻²	2×10 ⁻³	対照
30 分		卅 0	卅 0	卅 50	卅 50	— 50	卅 50	卅 50	卅 50	卅 50	— 50
24 時間		卅 0	卅 0	卅 0	卅 0	— 50	卅 0	卅 0	卅 0	卅 0	— 50

数字は 50 隻中の運動 mf 数

の差異を認めなかつたのが異なる点である(第 3 表)。

b. mf の運動性

水, サポニンに比し, 完全溶血の際の死滅が早い。すなわち第 3 表の如く, 2%, 0.2% 共に 30 分後には運動性なく, 溶血性をたかめると短時間内の観察が必要となる。

6. 各溶血法におけるマイクロフィラリア染色性の差異
水とメタノール法は殆ど同様の染色所見であつたが, ホルマリン法は沈澱物があつて, 塗抹の際, 染色液がこれに吸収されるためか染色性不良となり, また視野のコントラストも不良であつた。サポニン, 逆性石鹼ではギムザ染色(水 1 cc にギムザ原液 1 滴半の割合 pH 6.4, 40 分)をほどこすと全体として淡紫色に染まり, NR, EP, AP は認めうるが GZ は辛うじて推定出来る程度であつた。同一条件で行つたメタノール溶血に対しての染色では少々赤味を帯びた濃紫色で, NR, EP, EZ, AP もかなり明瞭に認め得, GZ も核を明瞭に判別出来, ギムザ染色ではメタノールの方が優れている様に思われた。サポニン, 逆性石鹼溶血では mf が生きているため, 凍結溶血法と生体染色の比較を試みた。Azur II Neutral Rot で染色(染色液 20 mm³+溶血液 20 mm³)すると凍結法では 10 分後 NR, EP, AP をみとめ 30 分後には紫色の GZ が明瞭であるに比し, サポニンでは 10 分でおお染色性を示さず, 30 分後に虫体が少々黄色を帯びた紫色にそまり, また被鞘が灰黄色を呈する程度の染色性で, 凍結法に比し劣つている様に思われた。

総 括

1. 凍結, 水, メタノール, ホルマリン, サポニン及び逆性石鹼の 6 種の溶血法を採用し, これ等の溶血度と, 検出上重要な mf 生存状態を検討した。
2. これらの薬剤の溶血性はそれぞれ一定の条件においてすべて良好であつた。しかし, いづれもマイクロフィ

ラリアに多少とも毒性があり, 溶血充分な濃度を用いるとその運動性が失われることを知つた。

3. 染色性は, 水, メタノール, 凍結法, いづれも良好の成績であつたが, ホルマリン法では甚だ不良であり, サポニン, 逆性石鹼法においてはやゝ良好と認められた。生体染色には凍結法がもつとも適していた。

4. 以上の各集虫法を比較した結果, 溶血性, 虫体の生存率, 染色性のすべてにおいて, 凍結集虫法が最もすぐれていると判定された。しかし野外に於ける集団検診などの目的には操作が簡易な点で, 水溶血法, メタノール法, サポニン法なども一定の考慮の下に行えばそれぞれ実用性のあることを知つた。

終りに本研究について終始御指導, 御鞭撻を賜つた佐々学助教授, また御援助を惜しまれなかつた林滋生博士はじめ寄生虫研究部の皆様に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) 石井進(1941): 馬の microfilaria の一検出法 応用獣医学雑誌, 14(14), 265, 中央 72 による.
- 2) 大浜信賢(1941): Filaria 仔虫の屋間検出, 台湾医学会誌, 40(1), 147, 40(5), 941, 中央 76 による.
- 3) 久米清治(1950): ミクロフィラリアの検出法, 日本獣医協会雑誌, 3, 291.
- 4) 佐々学(1944): マラリア原虫集虫法に関する研究, 海軍軍医会雑誌, 第一報, 33(1), 90~92, 第二報, 33(9), 984-986.
- 5) 厚生省衛生検査指針 (I): 細菌血清学的検査指針, (V-2), 寄生虫検査指針(改訂), 1955, 6-9.
- 6) 菅沼清次郎(1921): 人体ばんくろふとふいらりの仔虫産生に関する臨床的観察, 日内科誌, 9(2), 中央 19 による.
- 7) 永吉浩(1948): バンクロフト糸状虫症に対する諸種薬物の影響, 虫体外仔虫に対する薬物の影響, 鹿児島医学術報告, 第 4 号.
- 8) 松下良吉(1929): 人糸状虫の検出法について, 大阪医学会誌, 28(5), 1610.
- 9) 溝上定男(1913): ふいらり仔虫の検出法について, 陸軍軍医団誌, (4), 4.
- 10) James Knott(1939): A method for making Microfilarial Surveys on Day

Blood, Royal Society of Tropical. Med. Hyg., 33 (2).

Summary

Various methods of haemolysis in the microfilariae concentration technics were compared from the standpoints of the efficacy and of influence on microfilariae. As was reported in the previous paper, even a very small number of microfilariae contents in the blood could be diagnosed by centrifuging it after the red blood cells were haemolysed. It was proved that freezing and thawing, addition of water, 20 % methanol, 10 % formalin, saponin and invert soap (kathion soap) were all effective as the haemolysing agents

under certain conditions. However, most of the procedures except for freezing and thawing were toxic to microfilariae, and their motility was more or less hindered, thus giving disadvantage to their detection under a microscope. Formalin was found to produce a large amount of undesirable sediment and to give poor staining. Among the chemicals here used, saponin was proved to be least toxic to the microfilariae, and of the choice substance. Freezing and thawing method presented in the previous paper of the author was found to be the best in its haemolysing efficacy, non-toxicity to the motility of microfilariae and in their characters under vital or giemsa stainings.