

蛔虫駆虫効果判定に関する基礎的研究

(1) T.M. 反応

岡田 周子

東京大学伝染病研究所附属病院 (北本治教授指導)

(昭和 33 年 10 月 2 日受領)

緒言

各種の駆虫剤を臨床的に応用した場合の多数の報告をみると、同一薬品についても、その駆虫効果が区々であるのが現状である。サントニンの駆虫効果の一つをとつてみても、たとえば虫卵陰転率で Lamson (1936) は 92% (*in vitro*)、赤木 (1949) は 76%、守屋 (1956)、松林 (1950) は 50% といっている。

したがって、われわれは、駆虫剤に関するかぎり、必ずしも使用量およびその効果について正確な知見をもつていとはいいたい。

駆虫効果の差異の原因には、対象、感染濃度、使用量の差異が関与していることはすでに知られている事実である。しかし、原因はそれだけではない。とくに使用者による差異を考慮するならば、駆虫効果判定方法が問題になる。このことに関しては、すでに小宮 (1954, 1956) の報告があり、とくにその中で検便上の見掛けの陰転が指摘されている。見掛けの陰転は、検便方法の精粗にも関係があるが、寄生虫の産卵の停止あるいは著減などによつて起るものが考えられ、この点を考慮して小宮は見掛けの陰転率の実態を追求した。

私も駆虫剤の効果判定に関する基礎的研究を行うに当つて、見掛けの陰転をいかにして防ぐかを考えた。臨床的に検便のみで寄生虫残存の有無をしらべたのでは、どうしても見掛けの陰転を予防することはできない。そこで、他の方法を選ぶとすると、森下 (1955, 1957) の T.M 反応が理論的に適当と思われた。この方法は、蛔虫の新陳代謝産物を人尿中から捕捉して、これを抗原とし、豚蛔虫体またはその体腔液で免疫した家兎血清を抗体とし、この両者の間の沈降反応によつて、蛔虫寄生の有無を診断する方法で、沈降反応陽性を T.M. 反応(+)とした。これはすでに学会で認められているが、これを利用する際、

誤差を生じないために T.M. 反応の信頼性と限界を知る必要があると考え、二、三の研究を試み、ここに報告する。

実験方法ならびに実験対象

森下の原法にしたがい、豚蛔虫体腔液を用いて免疫した家兎血清を抗体として T.M. 反応を行った。

I. 抗体の作製

1) 新鮮な成熟雌豚蛔虫から体腔液をとり、85号フィルターでザイツ濾過し、体腔液原液に対して、容積比 $1/10^4$ の割合にマーズオンを加えたものを抗原とし、次の二つの方法で家兎を免疫した。

a) 2 cc 宛、4 日目ごとに 3 回静注

b) 2 cc 宛、隔日に 4 回静注

免疫終了後、10 日目に豚蛔虫体腔液に対し 50,000 倍までの力価を有することを重層法で確かめ、14 日目に全採血により抗血清を得て、抗血清に対して、容積比 $1/10^4$ の割合にマーズオンを加え、4°C の氷室に保存した。

2) 抗血清の力価測定

豚蛔虫体腔液免疫家兎血清 (以下抗血清という) の力価は、豚蛔虫体腔液 (以下体腔液抗原という) に対する重層法による沈降反応によつて測定した。

II. 糞便からの抗原の作製

森下の方法にしたがい糞便 2~5 g をとり、それに 2 倍量の生理的食塩水 (pH 7.0) を加えて、攪拌し、室温 (23°C 以下) に 2 時間放置する。つぎに、遠心分離 (5,000 回/分) 10 分間でその上清をとり、2% 塩酸で pH 3.5 とし、これを水浴を用いて 100°C で 1 時間加熱する。その後東洋濾紙 No. 5 で濾過し、濾液を 2% 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 にしたものを、遠心分離 (3,000 回/分) 5 分間でその上清をとる。これを T.M 反応用抗原とする。

なお、最終に得られる T.M. 反応用抗原が混濁していることがあり、これはさらに、遠心分離 (10,000 回/分) または、ザイツ濾過して透明になるものがあつたが、それでもまだ混濁のとれないものは、沈降反応抗原として使用できないのでこれを除いた。

KANEKO OKADA: Fundamental studies on the result of anthelmintic effect of ascaris (1) T.M. Reaction (Department of Clinical Research, Institute for Infectious Disease, University of Tokyo)

Ⅲ. 沈降反応手技

重層法による沈降反応は、直径 0.5mm の沈降反応用小試験管に、抗血清約 0.2cc を入れ、その上に同量の抗原を重層し、室温 (15°C ~ 23°C) で 3 時間放置した後その判定を行つた。

Ⅳ 実験対象および虫卵検査法

都内某町々民および八王子市某病院入院患者、浦和市某病院と伝研附属病院の入院患者および外来患者から集めた糞便 437 例につき、虫卵検査と T. M. 反応を併せ行つた。

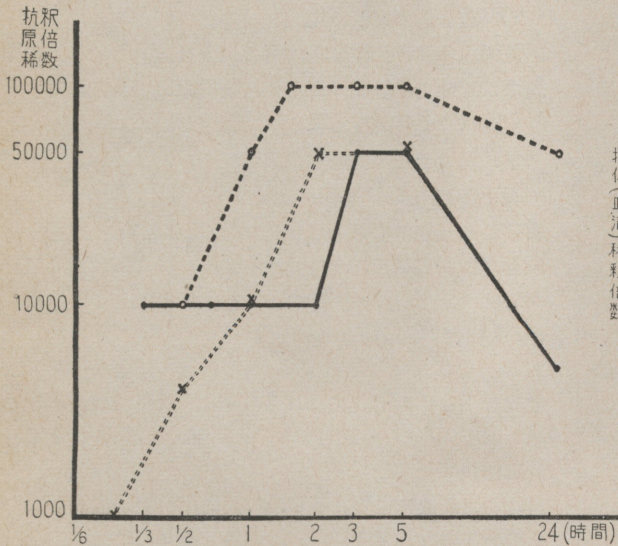
虫卵検査は直接塗抹 3 枚法で行い、判定は厚生省検査指針に基いて行つた。

実験成績

I. T. M. 反応の基本的な研究は森下ら(1956, 1957) によつて行われているが、私も二、三の実験を試みた。

a) 体腔液抗原と抗血清の沈降反応の時間的推移

体腔液抗原の各稀釈液を抗血清に重層し、室温放置 (15°C ~ 23°C) により沈降反応の時間的推移を見たところ、第 1 図 A のようになり、抗体の作製の項 1), の a), b) の方法のいずれも、2.5 時間 ~ 5 時間の間に最低 50,000 倍稀釈の抗原に対しても反応することが確かめられた。これらの抗血清は混合して以後の実験に供した。また、



第 1 図 A 体腔液免疫家兎血清の体腔液抗原に対する沈降反応における時間的推移
 ●—● 4 日目毎 3 回注, pH 7.8, 16°C 抗原 pH 7.4
 ○····○ 隔日 4 回注, pH 4.6, 18°C 抗原 pH 7.4
 ×====× 隔日 4 回注, pH 9.6, 23°C 抗原 pH 7.4

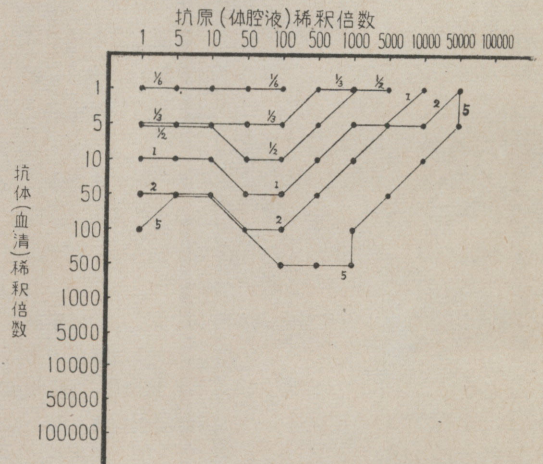
体腔液各稀釈液と抗血清各稀釈液間の重層法による沈降反応を 5 時間までしらべると第 1 図 B のような反応の場を示した。同時に体腔液と非免疫家兎血清との間にも重層法による沈降反応を試みたが、沈降反応はおこらず、抗血清との間にのみ特有の沈降反応が現われた。

b) 最適比について

以上の体腔液抗原と抗血清間における抗原抗体反応について、混合法による凝集反応によつて最適比をしらべたところ、第 1 表のようになり、32 : 5, 60 : 5, 80 : 5 の 3 ケ所に反応が最も早く現われた、このことから抗原は単一のものでないことが推察される。

c) 糞便処理抗原と同様の酸熱処理後の体腔液抗原と抗血清間の沈降反応

糞便から T. M. 反応用抗原を作製するときと同じ方法で体腔液を処理した場合に、体腔液の抗原性がどのように変化するかをしらべるため、体腔液を 2% 塩酸で pH 3.5 とし、これを水浴を用いて 100°C で 1 時間加熱した後、東洋濾紙 No. 5 で濾過し、さらに濾液を 2% 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 にしてその上清をとり、これと抗血清との間に、重層法による沈降反応を行い、同時に混合法による凝集反応により最適比をしらべた。酸熱処理体腔液抗原も第 3 表のように、抗血清原液と 100,000 倍稀釈液まで反応し、酸熱処理をしない体腔液原液抗原



第 1 図 B 蛔虫体腔液と体腔液免疫家兎血清間の沈降反応の場々の時間的推移
 線上の数字は時間を示す

第 1 表 蛔虫体腔液と体腔液免疫家兔血清間の最適比 (混合法)

時間	抗体 稀釈	抗原 稀釈	1	1/8	1/16	1/32	1/40	1/45	1/50	1/55	1/60	1/65	1/70	1/75	1/80	1/85	1/90	1/95	1/100	1/128	1/256	1/512	1/1,000	1/5,000	1/10,000	0.85% 生食	
5'	1/5					1																					
10'																											
15'																											
20'																											
30'																											
40'																											
50'																											
60'																											

第 2 表 酸熱処理蛔虫体腔液と体腔液免疫家兔血清間の最適比 (混合法)

時間	抗体 稀釈	抗原 稀釈	1	1/5	1/10	1/20	1/30	1/40	1/60	1/80	1/100	1/160	1/200	1/320	1/640	1/1,280	1/50,000	1/10,000	0.85% 生食	
10'	1/5																			
20'																				
30'																				
40'																				
50'																				
60'																				
90'																				
120'																				

第 3 表 酸熱処理蛔虫体腔液と、体腔液免疫家兔血清間の沈降反応 (重層法)

時間	抗体 液原	抗原稀 釈倍数	原液	100	1,000	10,000	100,000
30'			+	-	-	-	-
60'			+++	+++	+++	++	-
90'			+++	+++	+++	++	-
120'			+++	++	+++	++	+

における場合と力価に差は認められなかつた。最適比については第 2 表のようになり、30分で 5 : 160 の所に最初に凝集反応がおこつた。

II. T. M. 反応と虫卵との比較検討

糞便 437 例について T. M. 反応および虫卵検査成績を比較してみると、虫卵 (+) の糞便 207 例で、このうち T. M. 反応 (+) のもの 141 (76.1%)、T. M. 反応 (-) のもの 66 (23.9%) であつた。虫卵 (+) のものについては蛔虫寄生が明らかであるから、当然 T. M. 反応 (+) が予想されるが、T. M. 反応 (-) に現れたものがありとくに、この原因を追求してみた。

1) 虫卵 (+), T. M. 反応 (-) の原因的検討

a) 採便後室温 (23°C 以下) 放置期間の T. M. 反応に対

する影響

採便後、検査するまで放置した日数によつて、T. M. 反応の出かたの割合を調べると、第 2 図 A のようになり、日数の増加に伴つて T. M. 反応が (+) に出にくくなるのがわかつた。

なお、第 2 図 B のように虫卵数が多い糞便ほど T. M. 反応が (+) に現れる率が高いように見えるが、この差異は本質的に有意なものとは思えない。

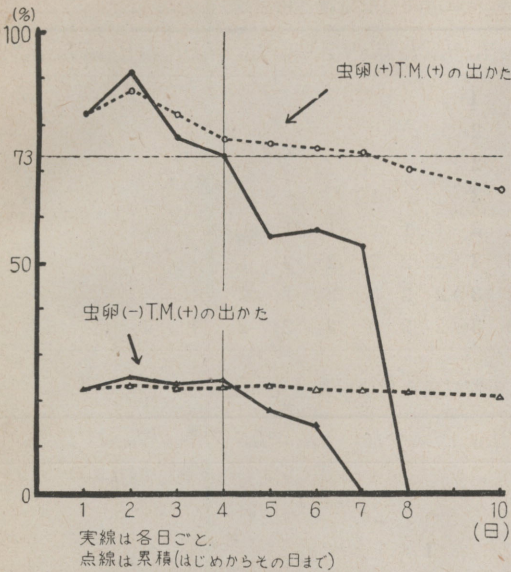
b) 採便後、氷室保存期間の T. M. 反応に対する影響

虫卵 (+) の糞便 7 例について、4°C の氷室に保存し連日 T. M. 反応を試みた結果は第 4 表のようであつた。すなわち、採便後 3 日目に T. M. 反応 (-) になつたもの 1 例、5 日目で抗原性が失われたもの 2 例であつた。

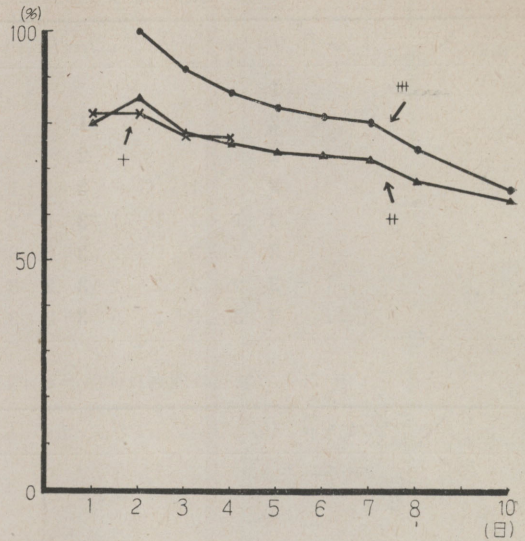
室温でも、氷室でも両者に差はなく、どちらも 5 日後は抗原性のいちじるしい低下が認められた。

c) 4 日以内保存糞便に対する T. M. 反応と虫卵との比較

上記実験にひきつづき、虫卵 (+) の糞便 163 例について、採便後 4 日以内に T. M. 反応を行つたところ、T. M. 反応 (+) 128 (78.5%)、T. M. 反応 (-) 35 (21.5%) という結果が得られた。



第2図A 採便後室温放置による期間とT.M. 反応の出かたとの関係



第2図B 虫卵数の多少と T.M. 反応との関係

第4表 採便後室温放置経過による T.M. 反応の推移

症例	経過日数	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日
1		+	+	-	-	-	-				
2		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3		+	+	+	+	+	±	-	-	-	
4		+	+	+	+	±	-	-	-		
5		+	+	+	+	-	-	-			
6		+	+	+	+	-	-	-			
7		+	+	+	+	+	+	-			

この35例について再検査を行った。

i) 35例中採便後気温30°C以上で2~3日放置されていたものが14例あったので、このものを気温23°Cより低い時に再検査したところいずれもT.M.反応(+)となった。

ii) 35例中、他の5例については、保存期間中にカビが繁殖していたので、そのための陰性と考へ、これを再検査してT.M.反応(+)の成績を得た。

iii) 残りの16例は抗原を2, 4, 8倍に稀釈して、T.M.反応を試みた結果、5例はそのいずれかに(+)となり、また逆に抗血清を2, 4, 8倍に稀釈して試みた結果、2例が(+)に現われた。

すなわち、虫卵(+), T.M.反応(-)の原因は、

T.M.反応実施までの糞便放置期間およびそのときの温度に影響され、放置期間は23°C以下ならば4日以内で、87.1%陽性になった。放置後4日以内で温度を23°C以下にすること、カビを生やさぬ様にすること、および、抗原乃至抗体の反応の場による影響などによりT.M.反応を(+)にすることができた。したがって、明かに虫卵(+)のもので、T.M.反応(-)に現れるものは136例中9例(6.5%)であった。

2) 虫卵(-), T.M.反応(-)の検討

虫卵(-), 199例中T.M.反応(-)のものは152例(76.3%)であった。

このうち任意の5例について、各3回虫卵とT.M.反応を検査したところ、3回ともT.M.反応(-)であった。

3) 虫卵(-), T.M.反応(+)の検討

虫卵(-)199例中T.M.反応(+)のものは47例(23.7%)であった。

虫卵(-), T.M.反応(+)47例について駆虫剤(サン

第5表 虫卵(-) T.M. 反応(+)のものに駆虫剤を投与した後の成績

例数	成績 駆虫前		駆虫後	
	虫卵	T.M. 反応	虫卵	T.M. 反応
18	-	+	-	-
2	-	+	+	+
3	-	+	-	+

第 6 表 蛔虫卵陽性者の駆虫剤投与後の虫卵と T.M. 反応の推移

症例	駆虫後経過日	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	20
1	虫卵	+	-①	-			-		-		-		-		-			-
	T.M.	+	+	+	+	-	-	-	-		-		-		-			-
2	虫卵	++	+①	-	-	-	-	-	-		-		-		-			-
	T.M.	+	+	+	-	±	-	-	-		-		-		-			-
3	虫卵	++①	+①		-	-	-		-						-			-
	T.M.	+	+		にどり	にどり	-	-										-
4	虫卵	++	+	-①	-	-	-		-		-		-		-	+		+
	T.M.	+	+	+	+	+	+		+		+		+		+	+		+
5	虫卵	+	-	-	-				-						+	+		+
	T.M.	+	+	+	+				+						+	+		+

第 1 例はサントニン 0.1×2, 他はサントニン 0.06×2, ①は排虫数

トニン 0.06×2) を投与し, そのうち 23 例について 3 週間後の後検便を実施した結果は第 5 表のようになった。すなわち後検便で虫卵 (-), TM 反応 (-) になったものは 18 例である。この 18 例中排虫を確認したものは 2 例であるが, 他も一応は蛔虫が寄生していたものと考えらることにした。

後検便で虫卵 (+), T.M. 反応 (+) になったものが 2 例あった。

後検便が駆虫前と同様に虫卵 (-), T.M. 反応 (+) であった 3 例については, 再度虫卵検査を行つたが虫卵は発見されなかつた。

4) 駆虫剤投与後の TM 反応の推移

駆虫剤投与後 T.M. 反応がどのように推移するかを調べるため, 虫卵 (+) T.M. 反応 (+) の患者 5 例について, 駆虫剤 (サントニン 0.06×2) 投与後 20 日間, 継続的に虫卵検査と T.M. 反応を行つたところ, 第 6 表のような結果を得た。第 1, 2, 3 例は 1~3 日目に排虫し, T.M. 反応はその後陰転して 20 日目の虫卵も陰性であった。第 4 例は 3 日目に排虫したが T.M. 反応は陰転せず, 14 日目に虫卵が再び認められるようになった。第 5 例は駆虫効果がなかつたものである。

考 按

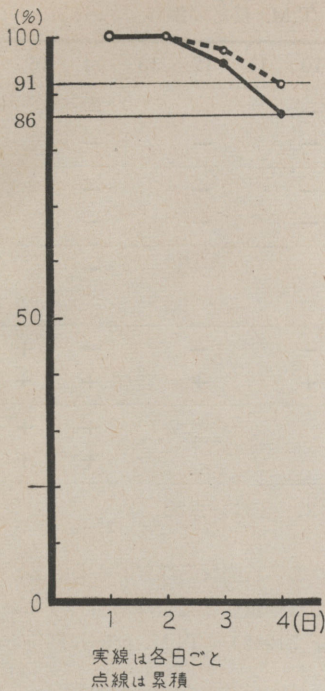
蛔虫寄生の中で, 雄蛔虫あるいは産卵能力のない幼弱蛔虫の寄生している場合, また駆虫剤の影響で産卵停止または著減している場合は, 当然糞便の虫卵検査では発見し得ない範囲である。いまこれを実際的方法で診断

しようとするのに皮膚反応などがある。しかしこれらの方法が現在では蛔虫症の場合に適當ではないとされているから (森下: 1958), T.M. 反応に期待をかけるわけである。

上述した私の実験成績から, T.M. 反応における糞便処理にはかなりの問題があり, 糞便中の抗原が体腔液抗原稀釈液にしてどの辺に当るかがつかみ難く, このために抗原または抗血清を稀釈する必要が起つてくる場合があること, 糞便保存に対する気温の影響, カビの繁殖で抗原が破壊されること, 採便後時間の経過につれて抗原性が失われるため保存性のないことがわかつたが, 一度酸熱処理を加えた抗原ではこれらの影響が少いことから, ただ外界の温度だけの影響でなく, 糞便に含まれる各種の細菌その他の酵素作用によつて抗原性が失われるものと考えられた。そしてこれらの原因を全く受けないものについて虫卵 (+), T.M. 反応 (+) の出かたをみると第 3 図のようになり, 採便後 1, 2 日目で 100%, 4 日目で 86%, 1 日目から 4 日目の全累積では 91% となり, 蛔虫寄生とかなり一致した成績を示すものと考えられる。

虫卵 (+) で TM 反応 (-) と出るものには, 技術的なまづさによるもののがかなりあり, その点注意する必要があると考えられるが, なお原因不明なもの 6.5% あった。

虫卵 (-), T.M. 反応 (+) となるもので, 第 5 表に示される 23 例中 4 例で蛔虫寄生が確認できたこと (排虫を認めた 2 例, 後検便で虫卵 (+) となつた 2 例), また,



第3図 蛔虫卵陽性者の採便後4日目までに於ける T.M. 反応の出かた

第6表の虫卵(+)のものに駆虫剤を与え虫卵と T.M. 反応をみた場合の5例で、完全駆虫された3例は排便後 T.M. 反応も陰性化しており、また、T.M. 反応が陰性化しないものでは、ある時期に至ると虫卵が再び現れてくるということでも、T.M. 反応は蛔虫の存在と一致すると考えることができる。

虫卵(一)、T.M. 反応(+)23例中、不明な例があるがこれらは駆虫効果がなかつたか、または、偽反応を示したか明らかでない。この点に関してなお検索を要すると思われる。しかし、上記の成績から T.M. 反応が(+)に出る場合は、虫卵が(一)であつても蛔虫がいると考えることも妥当であると考えられる。

結論

糞便採取から時間を経過するほど T.M. 反応の抗原性が失われるから、おそくとも4日以内にしらべなければならぬ。このことを前提にして、

- 1) 虫卵陽性便に T.M. 反応は1, 2日目に100%, 4日目で91%に陽性となつた。
- 2) 虫卵(+), T.M. 反応(一)で原因の明らかでない

いものが6.5%あつた。

3) 虫卵(一) T.M. 反応(+)のものでは、駆虫により、虫体の排出、虫卵の証明、T.M. 反応の陰転をみたものが87%で、原因の不明なものは13%であつた。

4) 駆虫剤投与後の T.M. 反応は、蛔虫存在の有無に関係し、完全排虫された場合はその後 T.M. 反応も陰性化する。

以上のことから T.M. 反応は蛔虫症の診断に用いて、かなり高い信頼性をもつものと考えられる。

終りに、終始この研究を御指導下さいました、北本教授、石崎博士、高山博士に深甚の謝意を表します。

参考文献

- 1) Lamson, P. D. & Brown, H. W. (1936): Methods of testing the anthelmintic properties of Ascaricides, *Am. J. Hyg.*, XXIII, 85.
- 2) 赤木勝雄 (1949): 駆虫剤の作用と使用法, *治療*, 31 (11), 663.
- 3) 守屋尚二 (1956): ビペラジン誘導体の抗蠕虫作用, *大阪大学医学雑誌*, 8 (1), 95.
- 4) 松林久吉 (1950): 蛔虫と鉤虫の駆除薬に就て, *臨床内科小児科*, 5 (2), 67.
- 5) 小宮義孝・他 (1954): 直接塗抹標本における蛔・鉤虫卵検出率と駆虫剤駆虫効果検査における見かけの陰転 (1), *寄生虫学雑誌*, 3 (3), 216.
- 6) 小宮義孝・他 (1956): 直接塗抹標本における蛔・鉤虫卵検出率と駆虫剤駆虫効果検査における見かけの陰転 (2), *寄生虫学雑誌*, 3 (4), 260.
- 7) 小宮義孝・他 (1956): 直接塗抹標本における蛔・鉤虫卵検出率と駆虫剤駆虫効果検査における見かけの陰転 (3), *寄生虫学雑誌*, 5 (1), 73.
- 8) 森下哲夫 (1955): 新しい蛔虫症の診断法について, *日本医事新報*, 1646, 16.
- 9) 森下哲夫 (1957): T.M. 法による寄生虫症の診断, *臨床の日本*, 3 (10).
- 10) 馬淵正樹 (1956): T.M. 法による蛔虫免疫の研究 (1), *岐阜医科大学紀要*, 3 (5) 341.
- 11) 馬淵正樹 (1956): T.M. 法による蛔虫免疫の研究 (2), *岐阜医科大学紀要*, 3 (6), 445.
- 12) 馬淵正樹 (1957): T.M. 法による蛔虫免疫の研究 (3), *岐阜医科大学紀要*, 5 (1), 73.
- 13) 森下哲夫・他 (1956): 蛔虫人体感染時の T.M. 反応の消長, *岐阜医科大学紀要*, 4 (3), 197.
- 14) 石原敏 (1956): 蛔虫抗原に関する研究 (1), *岐阜医科大学紀要*, 4 (1), 59.
- 15) 石原敏 (1956): 蛔虫抗原に関する研究, 1, *岐阜医科大学紀要*, 4 (3), 211.
- 16) 森下薫 (1953): 蛔虫及蛔虫症,

Summary

In order to exclude a deceptive negative change of ascarid eggs in stool which generally occurs

in cases of assaying anthelmintic activities of drugs, an experiment was carried and based on a immunological reaction taken place between the antigen originated from ascarid and its rabbit antiserum and compared with routine parasitological examination of feels.

For the first step, reliable limit of this immunological reaction based on the principle originally reported by Dr. T. Morishita was tested on 437 samples and obtained following results :

- 1) The antigen should be extracted from the samples within 4 days, otherwise antigenicity would be remarkably decreased.
- 2) Egg positive samples extracted within 4 days revealed 91% positive (and 9% negative) in T. M. Reaction.
- 3) Some 23.7 % of the egg negative sample showed positive T. M. Reaction, however, obtained parasitologically positive results in 87% of it through successive laboratory examination on stool.