

# *Trypanosoma gambiense* の免疫学的変異に関する研究

## (1) Screening method の再検討

福喜多重光

大阪大学微生物病研究所寄生虫原虫学部  
(部長 森下 薫教授 指導 猪木正三教授)

(昭和33年10月25日受領)

特別掲載

### 緒言

*Trypanosoma* 原虫が宿主体内で抗原型変異を起すという珍しい事実を初めて認めたのは Franke(1905)である。その後本現象は Ehrlich (1909), Neuman (1911), Fulton & Lourie (1946) 其の他により追試確認せられ、原虫免疫学領域に興味ある問題を提供した。其の間の消息は猪木ら (1952) の論文に詳しく記載されているが、何れも Franke の実験程度にとどまり、たゞ治療後に現われる再発が常に抗原変異株である事及び再発株には種々の抗原型が存在する事が新発見として加えられたに過ぎなかつた。

猪木およびその協同者は1946年頃から原株より再発変異株が発生する機序を遺伝学的な立場から究明することが或は本疾患の再発を完全に阻止し得る所謂理想的治療剤発見への新しい道を拓くものであるかも知れないとの大きな期待をもつて、抗原性変異の解析に着手した。即ち、Ehrlich 法, screening method, *in vitro* 法其の他を併用し慎重な検討を続け、本原虫の抗原型変異は対応する抗体の直接作用によつて定方向性且又誘発的に起されるものであるとの所謂適応説に有力な根拠を与えた。それ以来10年この線に沿つて研究が進められているが、いよいよ適応説に有利な資料が加えられつつある。

抗原変異に関する猪木等のこの一連の研究において、原虫の抗原型判定や抗原構成を知る有力な方法の一つとして所謂 screening method がある。本法は1953年猪

木が Ehrlich の交叉感染防禦試験を基礎として考案したもので、この方法は分離原虫の抗原型判定のみならず原虫集団の型決定および混在する種々の型原虫の分離にかなりの信頼度を以つて使用されることは勿論、2つの異なる抗原が各原虫に同時に含まれる原虫集団がそれとも2種の抗原型の原虫の混在かという事も凝塊反応では不明であるがこの screening method によつて判然とすると猪木が説明している。

著者は原虫接種以前に注射された人血清が感染を或期間阻害するとの猪木ら(1952)の報告に着目し、screening method については治療に使用した人血清の再接種原虫に対する影響および初感染原虫からの再発を否定する条件を得て初めて有効に施行し得るものとの考えから、本法の再検討を試みようとした。なほ治療効果を定量的且又正確に示し得る意味から猪木が米国で初めて使用して好結果を得た健康人乾燥血漿(以下Pと略記)に就いてその効果および治療後の再発状況につき詳しく観察し screening method における被判定株接種の適正期間を定め、この期間内において各株の異同を再検討した。

### 実験材料及び実験方法

使用した *Trypanosoma gambiense* (TGI 株) は1946年より当研究室においてマウス累代により保存せられ既報の研究に用いて来た株である。本実験の O, R<sub>1.2-n</sub> の記号は原株をOとし、Oより得た再発変異株をR<sub>1.2-n</sub>(Rに附記された数字は変異株の抗原型を示す)としたものをそのまま用いた。これ等の原株および再発株はマウスに継代してもその抗原型の変異を来す事なく、通常永続的に一定に保たれる事は既に知られている。

本原虫の感染程度は猪木ら(1949)の報告に従い感染マウスの尾端からの血液塗抹ギーズ染色標本を720倍

SHIGEMITSU FUKUKITA: Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense*  
(1) Further considerations of the screening method (Department of Parasitology, Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

本研究は文部省科学研究費によつて行われた。附記して謝意を表する (猪木正三)

(油浸装置)の拡大で検鏡し次の如く分類した。

- 50視野に1個も認めぬもの
- + 1視野に1個或は2個認めるもの
- ++ 1視野に1個から10個程度認めるもの
- +++ 1視野に11個から50個程度認めるもの
- ++++ 1視野に50個以上認めるもの

原虫接種には感染マウスの尾端から得た血液を検鏡(720倍)で1視野1個程度を示すように *Natrium citrate saline glucose* 水で稀釈し、その0.03~0.05ccを平均15gの健常マウスの腹腔内に接種した。この場合感染マウスは接種2日後に卍程度の感染を示すのが常であった。

治療には日本薬局法健康人乾燥血漿即ちプラスマ(成分:全蛋白質83.55%,非蛋白性窒素化合物2.16%,脂肪および類脂体0.82%,含水炭素1.11%,クエン酸ナトリウム6.75%,その他塩類4.61%)を用い、その治療効果および治癒後の再発状況をしらべた。

完全治癒(再発を完全に阻止する)の条件を知る目的で P. 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4ccの各量を感染程度卍以上のマウスの腹腔内にそれぞれ注射し、以後20日間に亘り連日又は隔日に尾端血液を検鏡し、治癒とその後に出現する再発の状態を観察した。

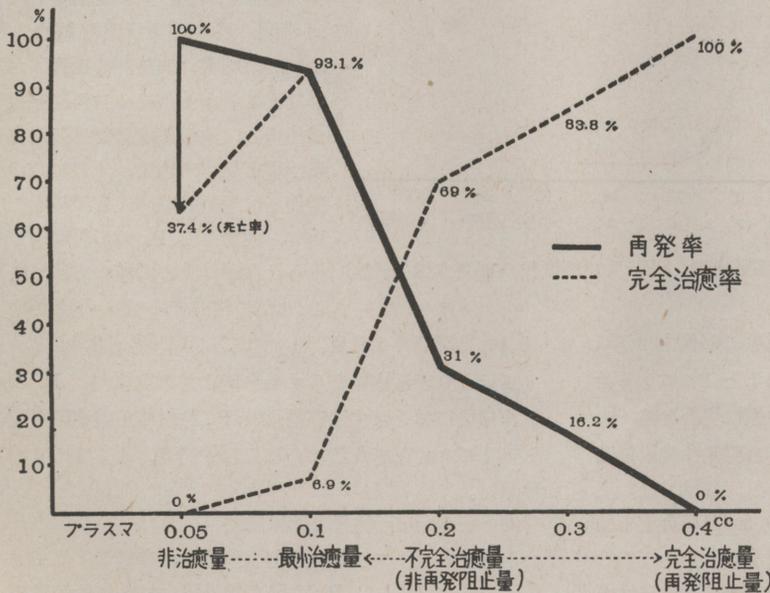
治癒効果についてはその程度により無効(治癒効果を示さず原虫は増殖してマウスが斃死するもの)、有効(P.

注射により翌日感染マウスの尾端血液より原虫が去り一見治癒した形となるが数日乃至10数日で再発を来すもの)、完全(20日以上観察しても再発をみとめぬもの)と3つの程度を分類した。再発日は治癒マウスにおいて変異(再発)原虫が始めて顕微鏡下に発見される日を以て判定した。screening method を施行する場合は、既知の抗原原虫を接種感染せしめたマウスを治療してから抗原型を判定しようとする抗原型未知の原虫を接種するのであるが、治療に用いた P. の影響が全く消失する時期を見て判定すべき原虫を接種しなければ正確な成績が得られない。従つて所謂 P. の残存効果を明かにしておく必要がある。そこで、上記各量の P. を夫々若干匹の健常マウスに予め注射した後、日毎に各群から任意に選び出したマウスに原虫を接種し、正常感染を示す時期、即ち、接種後対照と同様に2日で卍程度の感染を示す P. 接種後の期間を観察し、P. による治療後 screening を行うべき適正期間を求めた。

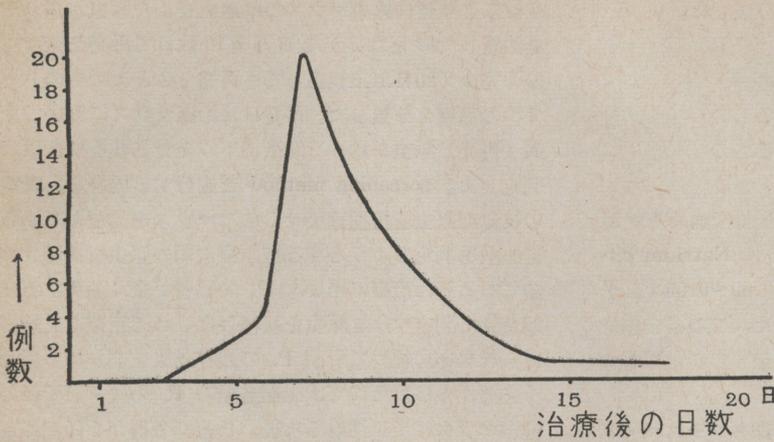
### 実験成績

1. 人血漿(P.)による治癒量測定と再発状況の観察  
 本原虫感染マウス164例に P. の各量を腹腔内に注射し、治癒および再発状況をしらべた結果、0.05cc注射で16例中6例は何等治癒傾向を示さず P 注射後も原虫が増殖を示して死亡、他の10例は一時的な治癒後再発が見られた。従つて0.05ccの少量では感染マウスを治癒せしめるに不充分である。これに反し、0.1cc注射では実験した58例の総てに治癒が見られ、その内54例(93.1%)は治癒後再発を示し、他の4例は完全治癒を来した。更に増量した0.2ccでは29例中たゞ9例に(31%)再発、他は完全治癒した。0.3ccでは43例中7例(16.2%)再発、他は完全治癒し、0.4ccでは24例とも観察期間中再発を見ず、完全治癒をしたものと思われた。

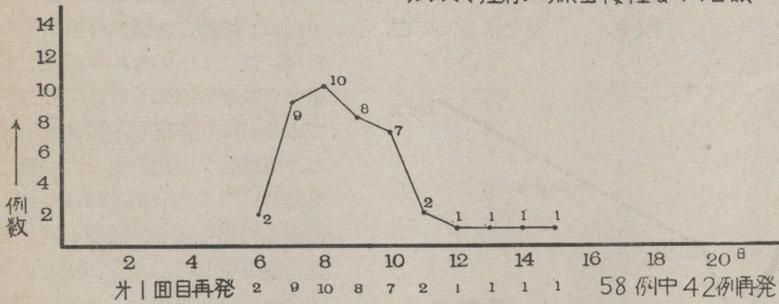
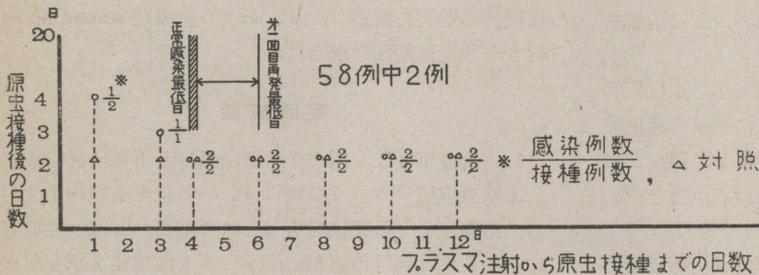
以上の結果から、0.05ccを非治癒量、0.1ccを最小治癒量、0.4ccおよびそれ以上を完全治癒量(再発阻止量)、0.1~0.3ccの間を不完全治癒量(非再発阻止量)と呼ぶことにした(第1図参照)。



第1図 プラスマによる再発率及び完全治癒率



第2図 プラズマ治療後の再発曲線



第3図 プラズマ 0.1cc 注射後の感染成績(上段)及び治療後の再発曲線(下段)

なお本実験において、治療マウス総数 164例中80例に再発が見られたが、その再発状況をみると P. による治療マウスの再発曲線は人血清による治療の場合と略々一致し、7日目を頂点とする第2図の如き再発曲線総括図として示された(第2図参照)。しかし、各量に就いて見た P. による治療後の再発状況は 0.1ccの場合第1回目最低再発日(治療から最も早く出現する再発までの日数)は6日目、0.2ccでは7日目、0.3ccでは11日目であった。勿論、0.4ccでは完全治療を示し再発は全く見

られなかつた(第3, 4, 5, 6 図参照)。

実際の screening method では第1回目再発最低日 が重要である。何故ならば screening するため接種された原虫が末梢血液(マウスの尾端)に現られる迄に最初の感染から由来する再発原虫が出現すると、両者が混じてその判定が不可能となるからである。従つてここでは少くとも第1回目再発最低日までの期間に screening を行はなければならないことになる。特に 0.3ccにおいては量的関係からか再発少く、而も治療後11日目に始めて第1回目再発をみた(第3, 4, 5, 6 図参照)。

2. 人血漿のマウス体内残存効果の検討

P. がマウス体内でどの程度残存し原虫の感染に影響をおよぼすかを観察するために、13匹の健常マウスにそれぞれ P. 0.1cc 宛注射し、24時間毎に連日若干匹のマウスを任意に選び原虫を接種し、20日間に亘り感染状況を観察した。その結果、24時間後接種においては2例中1例は4日目に原虫が出現し、他の1例は20日間原虫の出現を見ず不感染、4日目の接種例では対照と略同じ感染経過を示し、注射した P. の影響は全く見られなかつた。同様の方法で P. 0.2cc の注射後の感染成績では

0.1ccと同じく4日目、0.3ccでは5日目、0.4ccでは6日目より正常感染を示すようになった。従つて P. の原虫感染におよぼす残存効果は P. 注射後正常感染を起し得る日までと考えることにした(第3, 4, 5, 6 図参照)。

3. screening 施行の適正期間

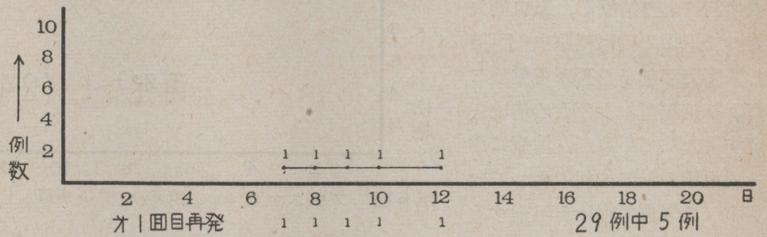
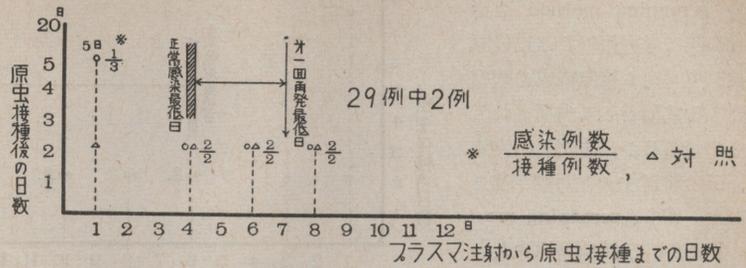
治療後のマウスが異なる抗原型の原虫接種により正常感染を来す期間は、P. の残存効果消失日より最低再発日までの期間であつて、その期間は治療に使用した P.

の量によつて異なる事は既述の予備実験の成績から明らかである。しかし実際にマウス体内で原虫が抗原変異を来してのちに尾端血液の検鏡により再発原虫を検出し得るまでは、中林の報告によると約 2 日間の増殖期間が必要であると考へられている。従つて P. の各量についての第 1 回目再発予想日は実際最低再発日の約 2 日前と想定しなければならない。この想定に従えば、0.1cc では治療後 4 日目、0.2cc では 5 日目、0.3cc では 9 日目、0.4cc は完全治癒して予想日はない。

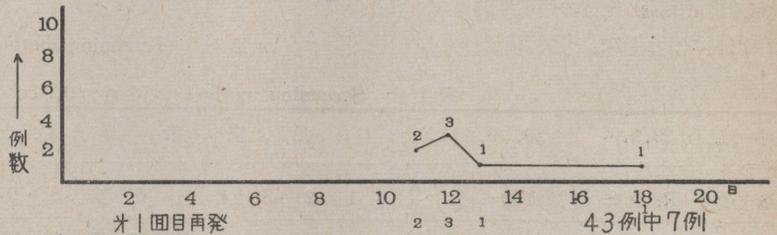
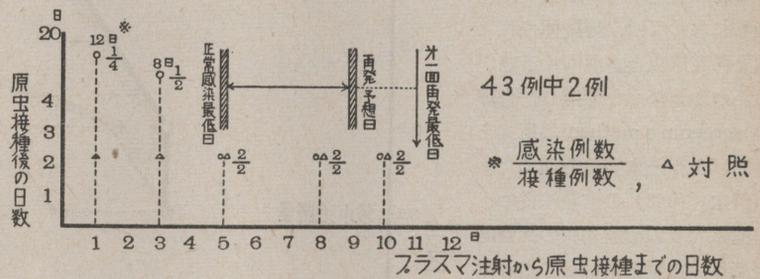
以上の予想日と P. の残存効果消失日、即ち、0.1cc、0.2cc で 4 日、0.3cc で 5 日、0.4cc で 6 日以後の 2 つの間が screening を行う適正期間となるが、0.1cc では正常感染最低日と再発予想日とは同じで、0.2cc では 4 日より 5 日までであるからこの短期間に screening を行う事は実際不可能である。これに反し、0.3cc では正常感染最低日 5 日より再発予想日 9 日までの期間および 0.4cc の正常感染最低日 6 日以後が P. の影響および再発を事実上否定しうる screening の適正期間と考へられる。而かも 0.3cc および 0.4cc の P. で治療した場合は適正期間が長く screening の実施が容易である (第 7 図)。

以上の成績を基として、P. の治療量 0.3cc と 0.4cc を使用した 2 つの場合について、原株 O 感染マウスの治療後に異型原虫 R<sub>3</sub> を screen して P. の残存効果を確認した結果、P. 0.3cc では既述の予備実験の成績と同じく 5 日以後正常感染を示した (第 1 表参照)。

P. 0.4cc では 6 日目の screen で感染し、対照とほぼ同程度の原虫増殖を見た。従つて P. の残存効果は 6 日



第 4 図 プラズマ 0.2cc 注射後の感染成績 (上段) 及び治療後の再発曲線 (下段)



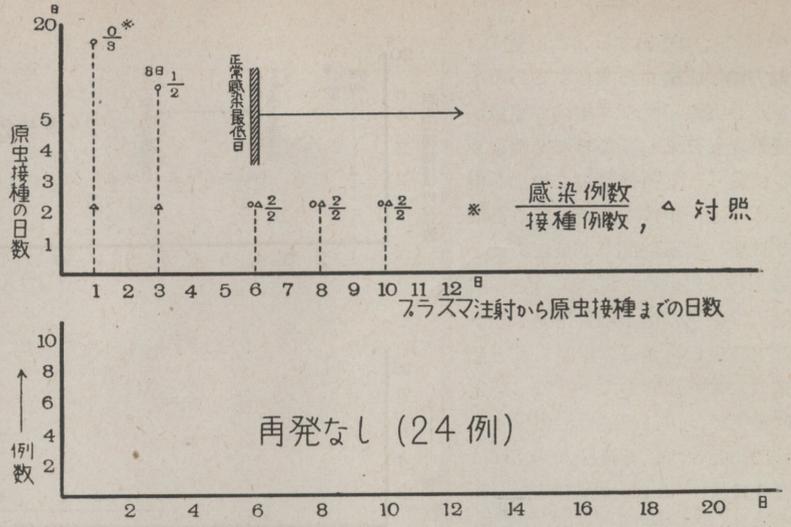
第 5 図 プラズマ 0.3cc 注射後の感染成績 (上段) 及び治療後の再発曲線 (下段)

以後は消失するものと考えて差支ない (第 2 表参照)。

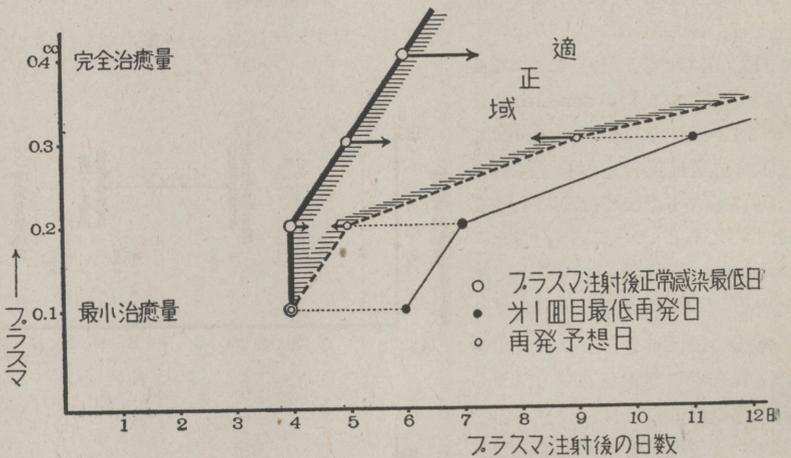
総括及び考按

*Trypanosoma gambiense* の抗原型変異に関する研究において猪木等は種々の方法により再発変異株の発生機序を遺伝学的な方向から解析を進めて来た。ここで取扱つ

た所謂 screening method は猪木が1953年に考案報告し、以後原虫の抗原型同定や抗原構成の観察に有力なる武器として利用されて来たものであるが、未だその実施上二、三の検討すべき問題が残されていた。即ち、screening method とは既知の抗原型原虫をマウスに接種感染せしめてから之れを人血清により治療し、原虫消失を待つて未知の抗原型原虫を再接種し、感染が起るか否かを見ることにより抗原型およびその構成を判定する方法であるが、治療に用いた人血清の量の如何によつては判定すべき原虫の感染を阻止する可能性があり、また治療された最初の感染に由来する再発を否定し得る時期に判定すべき原虫の接種が行われなくては、再接種された原虫と再発原虫とが混同する慮がある。かかる諸点を考慮し、合理的な screening method の術式を作りあげようと本実験を進めた。先づ猪木(1953)の推賞に従い、人血清の代りに治療効果の比較的一定せる人血漿を用いその残存効果と原虫再発を否定し得る screening (判定接種) 施行の適正期間を決定しようとした。実験成績が



第6図 プラスマ0.4cc注射後の感染成績(上段)及び治療後の再発曲線(下段)



第7図 Screening method の適正条件

第1表 Screening method (プラスマ0.3cc)

実験 マウス 番号	29.9.9 R <sub>3</sub> 原虫	29.9.11. 原虫数	プラス マ 量	治療後日数										備考	
				日1	2	3	4	5	6	7	8	9	日10		
1	→	++	0.3cc					↓	-	-	-	-	-		→R <sub>3</sub> 原虫接種
2	→	+++	0.3"					↓	-	-	-	-	-		↓O原虫接種
対照								↓		+++	×				×死亡
3	→	++	0.3"					↓	-	++					原虫接種量 0.037cc (720倍拡大1視野1匹)
4	→	++	0.3"					↓	-	++					
対照								↓	-	++					
5	→	+	0.3"					↓	-	+					
6	→	++	0.3"					↓	-	+	++				
対照								↓	-	+					
7	→	++	0.3"								↓	-	++		
8	→	+++	0.3"								↓	-	++		
対照											↓	-	++		

第 2 表 Screening method (プラスマ 0.4 cc)

実験 マウス 番号	29.9.9		29.9.11.		治療後日数										備 考	
	R <sub>3</sub> 原虫	原虫数	原虫数	プラス マ 量	日	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
1	→	+		0.4cc						↓	—	—		×		→R <sub>3</sub> 原虫接種 ↓O原虫接種
2	→	++		0.4"						↓	—	—		—		
対 照										↓	—	+	0.4	—		
3	→	++		0.4"							↓	—	+	++	++	× 死 亡
4	→	+		0.4"							↓	—	+	++	++	
対 照											↓	—	++	++	×	
5	→	++		0.4"								↓		++	++	
6	→	++		0.4"								↓		++	++	
対 照												↓		++	++	
7	→	++		0.4"									↓	—	++	
8	→	++		0.4"									↓	—	++	
対 照													↓	—	++	

示す如く、治療に用いた人血漿の量が多ければ多いほどその残存効果も長く続き、再発が起る時期が遅延した。screening 施行の適正期間とは人血漿の残存効果の消失日と再発日との間であるが、その期間が相当の長さをもつていなければ screening の施行は実際上不可能となる。更に各マウスに注射する人血漿の量は 0.5cc 以上は過量である。以上の諸条件を検討して最初の感染を治療する人血漿の量は 0.3cc 乃至 0.4cc が最も好適であり、screening は 0.3cc 治療例では治療後 5 日目より 9 日まで、0.4cc 治療例では 6 日目以後に行うべきであるとの結論を得た。

この新しく確立された screening method の術式に従い若干の変異株を用いて実験を繰返し、その合理性を知ると共に、原虫の抗原構成と変異の関聯性に就いて可成興味ある成績を得ることが出来た。

結 論

*Trypanosoma gambiense* (TG I 株) の抗原型変異に関する研究において抗原型同定の有力手段である screening method の諸条件を検討しその施行適正期間を決定することが出来た。

1. 本原虫感染マウスに人血漿(プラスマ)を腹腔注射し治療を行った結果、0.05cc では治療が不確実であり(非治療量)、0.1cc より 0.3cc までの量では極期の感染マウスでも一旦治療する。但し再発を阻止する量ではない。0.4cc では完全に治療し再発が見られない。即ち

0.1cc は最小治療量、0.1cc~0.3 cc は不完全治療量(非再発阻止量)、0.4cc は完全治療量(再発阻止量)と考えられた。

2. 治療剤としてマウスに注射された人血漿が或る期間その残存効果を示し本原虫の感染を阻害する。而かも人血漿量が多い程その阻害期間は長い。

3. 治療剤人血漿の量を増加すればする程、第 1 回目最低再発日は遅れる。

4. screening method の適正期間は治療に用いた人血漿の残存効果消失日より第 1 回目最低再発予想日、即ち、第 1 回目最低再発日の 2 日前までである。この条件に沿ふ治療量は 0.3cc~0.4 cc で、適正期間は 0.3cc で治療後 5 日目より 9 日目まで、0.4cc では治療後 6 日目以後である。

稿を終るに当り御懇篤なる御校閲を賜わつた森下薫教授並びに御指導、御校閲を戴いた猪木正三教授に深謝しまた種々の有益な御助言をうけた中林助教授に感謝します。

本論文要旨は第 10 回日本寄生虫学会西日本支部、第 25 回日本遺伝学会及び文部省科学研究費による総合研究「適応の生理生態学的研究」の班会議(1955)において発表した。

文 献

1) Ehrlich, P. (1909): Über Partialfunktionen der Zelle. Münch. Med. Woch. 56, 217-222. —

—2) Ehrlich, P., W. Roehl und R. Gulbausen. (1909) : Über serumfeste Trypanosomenstämme. Bemerkungen zu der Arbeit von Levaditi und Mutermilch, Ztschr. f. Immnitätf., 3, 296-299. —3) Franke, E. (1905) : Über Trypanosomentherapie. München. Med. Woch., 52, 2059-2060. —4) Browning, C. H. (1908) : Chemotherapie in *Trypanosoma* infection and experimental study. Jour. Path. Bact., 12, 166. —5) 猪木正三・北浦敏行・中林敏夫・黒河内寛 (1949) : *Trypanosoma gambiense* の免疫学的変異に関する研究, 第一報, マウスを以ての新しい研究方法と一新変異系に就て, 大阪大学医学雑誌, 1 (3), 29-38. —6) Inoki, S., Kitaura, T., Nakabayasi, T. and Kuroguchi, H. (1952) : Studies on the immunological variations in *Trypanosoma gambiense*. I. A new variation system and new experimental method. Med. J. Osaka Univ., 3 (2-3), 357-371. —7) Inoki, S. (1952) : A new experimental method and genetical interpretation on the antigenic variation in *Trypanosoma gambiense*. Med. J. Osaka Univ., 3 (1), 81-86. —8) Inoki, S., Kitaura, T., Kuroguchi, H., Osaki, H., & Nakabayasi, T. (1952) : Genetical studies on the antigenic variation in *Trypanosoma gambiense*. Jap. Jour. Genet. (遺伝学雑誌), 27 (3-4), 85-92. —9) 猪木正三 (1952) : 原虫の細胞質遺伝 (I) 抗原性変異の問題を中心に, 生物科学, 4, 9-15. —10) 猪木正三 (1952) : 原虫の細胞質遺伝 (II) 抗原性変異の問題を中心に, 生物科学, 4, 63-67. —11) 猪木正三 (1953) : 原虫 *Trypanosoma gambiense* の免疫学的変異, 生物の変異性, 岩波, 60-74. —12) 猪木正三 (1953) : 原虫の変異性, 細胞化学シンポジウム, I, 丸善, 133-148. —13) 中林敏夫 (1955) : *Trypa-*

*nosoma gambiense* のマウス体内における抗原変異機作について, 寄生虫学雑誌, 4 (4), 62-69. —14) Fulton, J. D. & Lourie, E. M. (1946) : The immunity of mice cured of *Trypanosoma* Infections. Ann. Trop. Med. Parasit., 40, 1-9. —15) Lourie, E. M. & O'connor, R. J. (1937) : A study of *Trypanosoma rhodesiense* relapse strains *in vitro*. Ann. Trop. Med. Parasit., 31, 319-340. —16) Neuman, R. (1911) : Zur Kenntnis der Immunität bei experimenteller Trypanosomeninfektion. Ztschr. Hyg. Infektionskr., 69, 109-134.

### Summary

The screening method (Inski 1953) has usefully been employed for studies on the antigenic variation in *Trypanosoma gambiense*, however this method still has a few points to be discussed. In this report, two problems were pointed out and fully examined. 1) How many days the human plasma injected into mice could keep its inhibiting action against the second screening inoculation? Because, the parasites to be screened should be inoculated after disappearance of such an action, 2) How the parasites appearing after the screening inoculation could be discriminated from the relapse ones derived from the first attack? Consequently, it was concluded that if 0.3 cc human plasma is used for the treatment, the parasites to be screened should be injected between the 5th and 9th day after plasma treatment, while if 0.4 cc was employed instead of 0.3 cc, any time after the 6th day is all right to conduct the screening.