

糸状虫免疫に関する基礎的研究

(1) イヌ糸状虫による感作モルモットに対する
Arthus 現象について

小山 二 三 人

日本獣医畜産大学寄生虫学教室 (指導 清水重矢教授)

(昭和34年8月20日受領)

特別掲載

まえがき

寄生虫免疫領域における Arthus 現象については宮川 (1950), 池田 (1952), 小宮山 (1954), 山本 (1956) らが回虫抗原について, 森下・小林ら (1953) は鉤虫で, 松本ら (1953) は縮小糸虫についてそれぞれ本現象を報告している。

D. immitis の免疫学的な研究については, Taliaferro がヒトのフィラリア症の診断に皮内反応抗原として用いてから, 多くの研究者によって, 皮内反応, 沈降反応あるいは補体結合反応などの免疫学的検索が行われた。これらのうちで, 皮膚反応については, Oliver Gonzalez が *Wuchereria bancrofti* に感染したヒトに対して, *D. immitis* 抗原による皮内反応を実施し90%以上に陽性反応をみとめ, また McFalzean は感作した動物に *D. immitis* 抗原による皮内反応をおこない特異性反応の出現をみとめている。

そこで私は, これらの免疫反応を検討するために重要と思われるイヌ糸状虫の抗原性について Arthus 現象を示標として実験をおこない, 若干の解析をこころみたので報告する。

実験方法

(1) 感作抗原と感作方法について

イヌ糸状虫の寄生しているイヌの心臓から虫体を採取して, 食塩水でよく洗滌し Homogenizer によって磨碎し真空度 10^{-3} Hgmm 以下で凍結乾燥をおこない, この

FUMITO KOYAMA: Fundamental studies on the immunity of the *Filaria* (1) Arthus phenomenon in guinea pigs sensitized with canine filaria (Dept. Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College)

虫体物質を食塩水で抽出して感作抗原および惹起抗原として用いた。

感作抗原は生理的食塩水 (1: 100) で磨碎抽出したものを実験に供した。感作量は 0.5ml あて 2日間隔で 3回, 各感作群別に皮下, 皮内および腹腔え注射し, Adjuvant 法による感作群は Freund (1942) の方法によって流動パラフィン・脱水ラノリン (7: 1) を用い 1ml 中に虫体末 10mg を添加して作製し, 3日間隔で 2回, 筋肉内に注射して感作をおこなった。実験に用いたモルモットは体重 250~ 300g の雄を選んで使用した。

(2) 惹起注射について

感作が終了してから約 3週間経過して, 惹起注射をおこなった。惹起抗原は凍結乾燥処理をおこなった虫体を, 生理的食塩水 (1: 100) 抽出液を用い, pH 7.0に調整し Chamberland L₂ で濾過をし, 出来る限り無菌的に処理をおこなった。

感作モルモットは背部を剪毛し, さらにエパクリームで脱毛した局処に 0.1ml の抗原を皮内に注射した。

(3) 観察方法

Arthus 現象の観察は緒方の法によって時間的に観察した。すなわち, (I) 水腫から発赤を示すもの, (II) 充血を伴っているもの, (III) 出血のあるもの, (IV) 壊死を伴うものの判定規準によって, 注射直後から72時間経過まで時間的に観察をおこなった。

なお, 皮膚反応の腫脹程度を感作群別に比較する目的で, 腫脹面積を円および楕円の求積公式によって算出した。また, 反応および局処の組織学的検索には, 反応の時期を初期, 中期および壊死に移行する後期の 3期にわけておこなった。

第 1 表 皮下感作群の反応成績

時間	1		2		3		4	
	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照
0	0.5024 (0.8×0.8)	0.4396 (0.8×0.7)	0.4396 (0.7×0.8)	0.4946 (0.7×0.9)	0.5652 (0.9×0.8)	0.4396 (0.8×0.7)	0.4396 (0.8×0.7)	0.3847 (0.7×0.7)
10分	1.0362 (1.2×1.1)	0.5652 (0.8×0.9)	1.0205 (1.3×1.0)	0.8635 (1.0×1.1)	1.1226 (1.1×1.3)	0.6359 (0.9×0.9)	1.4287 (1.3×1.4)	1.0362 (1.1×1.2)
60分	0.7850 (1.0×1.0)	0.7065 (1.0×0.9)	1.6485 (1.5×1.4)	0.9499 (1.1×1.1)	1.5687 (1.7×1.7)	0	2.0018 (1.5×1.7)	1.5687 (1.7×1.7)
8時	0.1570 (0.5×0.4)	0	0.1963 (0.5×0.5)	0	0.7850 (1.0×1.0)	0	1.0205 (1.0×1.3)	0
24時	0.0314 (0.2×0.2)	0	0.0314 (0.2×0.2)	0	0.0314 (0.2×0.2)	0	0.4396 (0.8×0.7)	0
48時	0	0	0.0314 (0.2×0.2)	0	0	0	0.3847 (0.7×0.7)	0
72時	0	0	0	0	0	0	0.1278 (0.5×0.3)	0

上段は腫脹面積cm², 下段は腫脹径 (mm) を示す。

第 2 表 皮内感作群の反応成績

時間	6		7		8		9	
	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照
0	0.5652 (0.8×0.9)	0.3847 (0.7×0.7)	0.6359 (0.9×0.9)	0.4396 (0.8×0.7)	0.3847 (0.7×0.7)	0.3768 (0.6×0.8)	0.4396 (0.7×0.8)	0.4396 (0.8×0.7)
10分	1.1304 (1.2×1.2)	0.3768 (0.6×0.8)	1.4130 (1.2×1.5)	0.5024 (0.8×0.8)	1.4130 (1.5×1.2)	0.5024 (0.8×0.8)	1.7663 (1.5×1.5)	0.7850 (1.0×1.0)
60分	2.0018 (1.5×1.7)	0	2.1352 (1.7×1.6)	0.7850 (1.0×1.0)	1.3345 (1.0×1.7)	0	1.8683 (1.7×1.4)	1.2246 (1.2×1.3)
8時	0.4946 (0.7×0.9)	0	0.1963 (0.5×0.5)	0	0.9420 (1.0×1.2)	0	0.4946 (0.7×0.9)	0
24時	0.1963 (0.5×0.5)	0	0.0471 (0.2×0.3)	0	0.7850 (1.0×1.0)	0	0	0
48時	0	0	0.0314 (0.2×0.2)	0	0.1963 (0.5×0.5)	0	0	0
72時	0	0	0	0	0.0471 (0.2×0.3)	0	0	0

上段は腫脹面積, 下段は腫脹径を示す。

実験成績

I. 各感作群の皮膚反応

(1) 皮下感作群の反応成績

実験に供したモルモットは、感作抗原の初回注射によって異常反応をみとめなかつたものを選び、後肢大腿部外側の皮下に感作抗原を 0.5ml ずつ 2 日間隔で 3 回注射した。感作終了後、惹起注射までの約 21 日間に斃死例はみとめなかつた。

惹起注射は脱毛したモルモットの背部対側に、抗原および滅菌食塩水を対照として注射して時間的に観察し第 1 表のごとき成績を得た。

いずれも注射後 2 時間ぐらいまでは腫脹面積の変化が著明であつたが、それ以後は次第に腫脹も縮小し、充血、硬結などの所見がみられた。

対照は 1 時間前後でいずれも腫脹が消失し、何らの異常反応はみとめなかつた。皮下感作群においては、他の感作群に比較して反応面積も小さく、全般的に弱い傾向をしめしていた。

(2) 皮内感作群の皮膚反応

感作抗原を皮内に注射して感作する方法は、抗原の吸収がおそく生体の抗体産生が強いので細菌学領域では広く用いられている。

感作抗原 0.5ml を 1 日間隔で 3 回皮内へ注射して感

第3表 腹腔感作群の反応成績

No.	11		12		13		14	
	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照
0	死		0.4396 (0.7×0.8)	0.8470 (0.7×0.7)	0.5652 (0.8×0.9)	0.5024 (0.8×0.8)	0.3847 (0.7×0.7)	0.3847 (0.7×0.7)
10分			1.1304 (1.2×1.2)	0.7850 (1.0×1.0)	1.1840 (1.5×1.6)	0.6280 (1.0×0.8)	0.7756 (0.9×1.1)	1.0205 (1.0×1.3)
60分	亡		1.7584 (1.4×1.6)	0	1.7663 (1.5×1.5)	1.0362 (1.2×1.1)	2.5356 (1.7×1.9)	1.7584 (1.4×1.6)
8時			1.1304 (1.2×1.2)	0	1.4287 (1.3×1.4)	0.3847 (0.7×0.7)	0.7065 (1.0×0.9)	0
24時			0.7850 (1.0×1.0)	0	0.7280 (1.0×1.8)	0	0.1963 (0.5×0.5)	0
48時			0.3140 (0.8×0.5)	0	0.2355 (0.5×0.6)	0	0.0471 (0.3×0.2)	0
72時			0.1963 (0.5×0.5)	0	0.0942 (0.3×0.4)	0	0	0

上段は腫脹面積、下段は腫脹径を示す。

第4表 Adjuvant 感作群による反応成績

No.	1		2		3		4	
	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照	抗原	対照
0	0.5024 (0.8×0.8)	0.4396 (0.8×0.7)	0.4896 (0.7×0.8)	0.4946 (0.7×0.9)	0.5652 (0.9×0.8)	0.4396 (0.8×0.7)	0.4396 (0.8×0.7)	0.3847 (0.7×0.7)
10分	1.0362 (1.2×1.1)	0.5652 (0.8×0.9)	1.0205 (1.3×1.0)	0.8635 (1.0×1.1)	1.1226 (1.1×1.3)	0.6359 (0.9×0.9)	1.4287 (1.3×1.4)	1.0362 (1.1×1.2)
60分	0.7850 (1.0×1.0)	0.7065 (1.0×0.9)	1.6485 (1.5×1.4)	0.9499 (1.1×1.1)	1.5687 (1.7×1.7)	0	2.0018 (1.5×1.7)	1.5687 (1.7×1.7)
8時	0.1570 (0.5×0.4)	0	0.1963 (0.5×0.5)	0	0.7850 (1.0×1.0)	0	1.0205 (1.0×1.3)	0
24時	0.0314 (0.2×0.2)	0	0.0314 (0.2×0.2)	0	0.0314 (0.2×0.2)	0	0.4396 (0.8×0.7)	0
48時	0	0	0.0314 (0.2×0.2)	0	0	0	0.3847 (0.7×0.7)	0
72時	0	0	0	0	0	0	0.1278 (0.5×0.3)	0

上段は腫脹面積、下段は腫脹径を示す。

作をおこなった。感作終了後から惹起注射までの期間に斃死したものはなかったが、感作した局処が惹起注射の前に Arthus 現象様の皮膚反応を出現したものがあつた (No. 8)。

本群では局処の発赤、硬結や壊死が著明に出現し、腫脹面積も他の感作群に比較して強い傾向を示し、その成績は第2表に示すとおりである。

(3) 腹腔内感作群の皮膚反応

この感作方法は、きわめて普通に行われている方法で、イヌ糸状虫の感作抗原を 0.5ml、2日間隔で3回実施した。

感作処置によつて4例中1例 (No. 11) に異常な反応がみとめられた。すなわち、第3回目の感作直後にアナフィラキシー様の症状を出現して8分後に斃死した。成績は第3表に示すとおりである。

(4) Adjuvant 法による感作群の皮膚反応

私は、感作抗原の吸収を緩徐にし、生体の抗体産生を高め、なお注射回数を少なくする目的で Freund (1942) の方法に準じて Adjuvant を作製して感作をおこなつた。

Adjuvant は流動パラフィン・脱水ラノリン (7:1) の 1ml 中に虫体末 10mg を添加して調製した。この

第 5 表 各感作群の反応平均 (腫脹面積)

時間	皮下感作		皮内感作		腹腔感作		Adjuvant	
	平均	対照	平均	対照	平均	対照	平均	対照
0	0.4867	0.4396	0.5064	0.4102	0.4573	0.5297	0.4691	0.4259
10分	1.1520	0.7827	1.4307	0.5417	1.1830	0.9886	1.0832	0.6928
60分	1.1510	0.8063	1.8350	0.5024	1.9567	0.6987	1.9135	0.3513
8時	1.5397	0.5805	0.5319	0	0.9734	0	0.7752	0
24時	0.1335	0	0.2057	0	0.4730	0	0.4730	0
48時	0.0962	0	0.0569	0	0.1727	0	0.3224	0
72時	0.0320	0	0.0118	0	0.0844	0	0.1026	0

第 6 表 緒方の法による各感作群の判定成績

感作群 No.	時間	30 分		60 分		6 時		10 時		24 時		48 時	
		A.	C.	A.	C.	A.	C.	A.	C.	A.	C.	A.	C.
皮下感作群	1	—	—	I	—	I	—	I	—	I	—	—	—
	2	I	—	I	—	II	—	I	—	I	—	I	—
	3	I	—	I	—	I	—	II	—	II	—	II	—
	4	—	—	I	—	III	—	II	—	III	—	III	—
皮内感作群	6	I	—	I	—	II	—	III	—	III	—	III	—
	7	I	I	II	—	II	—	III	—	III	—	IV	—
	8	I	—	II	—	I	—	II	—	II	—	IV	—
	9	I	—	I	—	I	—	II	—	II	—	II	—
腹腔感作群	12	I	—	II	—	II	—	II	—	III	—	III	—
	13	I	—	II	—	II	—	III	—	III	—	IV	—
	14	—	—	I	—	II	—	II	—	IV	—	IV	—
Adjuvant 群	16	I	—	I	—	II	—	II	—	IV	—	IV	—
	17	I	—	I	—	II	—	II	—	III	—	III	—
	18	I	—	II	—	II	—	III	—	IV	—	IV	—
	19	I	—	I	—	II	—	II	—	III	—	III	—

A = 抗原, C = 対照の食塩水の反応

Adjuvant 0.5ml を 3 日間隔で 2 回, 後肢の大腿部外側の筋肉内へ注射して感作をおこなった。

感作処置による異常反応はみとめられず, 第 4 表のような良好な成績を得た。

さきにおこなった皮内および腹腔内感作群は, いずれも感作処置によって異常反応の出現したものもあつたが, Adjuvant 群はそのようなこともなく望ましい実験成績が得られた。

(5) 感作群別の反応のまとめ

以上のように, 各感作群によって反応の発現する態度に差異がみられた。すなわち, 反応の強弱は抗体量による影響もあり, 感作方法によって, 抗体産生の程度があると思われるが, これらを一括すると第 5 表のような結

果が得られた。

皮膚反応の腫脹面積は, 皮内, 腹腔および Adjuvant 感作群は著明な差はみとめられなかつたが, 皮下感作群においてやや弱い傾向を示したが, いずれの感作群においても Arthus 現象の成立をみとめた。

II. 反応局処の所見

感作モルモットに対する反応局処の腫脹については, さきに記載したように, 腫脹面積によって比較をおこない, 反応程度の判定については緒方の法によって観察した。

すなわち, I は軽度の発赤, II は発赤, III は出血, IV は壊死である。局処の判定成績については各感作群とも惹起注射による反応の程度と同じ傾向を示し, 皮膚反応

第7表 反応局所の組織学的所見

群	No.	時間	反応	組織学的所見
皮下感作群	4	24	I	浮腫, 出血は少なく, 細胞浸潤はみとめられない
		72	II	浮腫, 出血あり細胞浸潤あり
皮内感作群	8	48	II	浮腫, 出血あり, 細胞浸潤をみとめる
		72	IV	壊死
腹腔感作群	13	24	II	浮腫は少くないが, やや細胞浸潤をみとめる
		48	III	血管周囲の細胞浸潤著明
		72	IV	壊死
蕁麻疹	17	24	III	出血, 細胞浸潤あり
		48	IV	壊死
対照	24	I		浮腫, 出血はほとんどみとめない

(H.E 染色による観察所見)

の腫脹が強く発現した Adjuvant 感作群が反応局所の所見もまた強かつた。

対照の生理的食塩水は全例とも注射後から約1時間ぐらいて消失し, いずれも組織障害はみとめられなかつた。判定成績は第6表のような結果を得た。

III. 組織学的検索

イヌ糸状虫の免疫, とくに Arthus 現象について検討をおこなうために, 皮膚反応や反応所見を検索をおこなつたが, アレルギーの立場から Arthus 現象の反応局所の病理組織学的な変化についても検索する必要がある。

Arthus 現象時の局所における組織像については Frölich や Gerlach (1923) が詳細に観察し血管壁の弛緩, 血漿滲出, 細胞滲出, 出血などをあげている。その後, 多くの研究者によつて, ほぼ同様の所見がみとめられている。

私は, 反応局所の病理組織学的検索をおこない第7表のごとき成績をえた。

総括および考察

イヌ糸状虫の凍結乾燥虫体末の生理的食塩水抽出液(1:100)を感作抗原として, モルモットの皮下, 皮内, 腹腔および Adjuvant 法によつて感作をおこない, 3週間後に惹起注射を施して, 各感作群とも全例に Arthus 現象の成立をみとめた。

感作方法が異なると反応の出現に差異がみとめられ

た。すなわち, 反応局所の腫脹面積や病理組織学的変化の程度などに強弱の差異がみられ, 各感作法で腹腔および Adjuvant 法による感作群の反応が比較的高度であることがみとめられた。

Arthus 現象の強さは, 感作による生体の抗体価に比例することが, 緒方ら(1941)によつて報告されているが, 感作法が異なると生体に産生される抗体の量的な差異が生じ, その結果反応にも強弱の差がみとめられるものと考えられる。

Freund の方法に準じて, 流動パラフィン・脱水ラノリンによる Adjuvant を作製し実験をおこない, 感作方法として望ましい結果が得られた。

山本(1956)は回虫体腔液による Arthus 現象について, 感作の前処置がなされていないモルモットが, 初回注射にアナフィラキシーあるいは Arthus 現象様反応を出現することがあり, モルモットは本実験には適していないことが報告されているが, イヌ糸状虫については, 各感作法とも初回注射による異常反応の出現はみとめられず, 従つてこの点については, 何らの考慮をせずに実験をおこなつた。

さきに私は, 阿久沢ら(1958)とイヌ糸状虫体抗原をイヌの皮内に注射して, 即時性の特異的な反応が出現することを報告したが, 皮膚反応が遅発性の Arthus 現象型あるいは, 即時性反応で組織障害を残さないものについては, おなじ抗原を用いても, 感作モルモットの場合には遅発性の Arthus 現象を出現し, ヒトの場合は即時性反応がみとめ, これらの反応型は抗原濃度あるいは感作による抗体量などが重要な因子と推定される。

まとめ

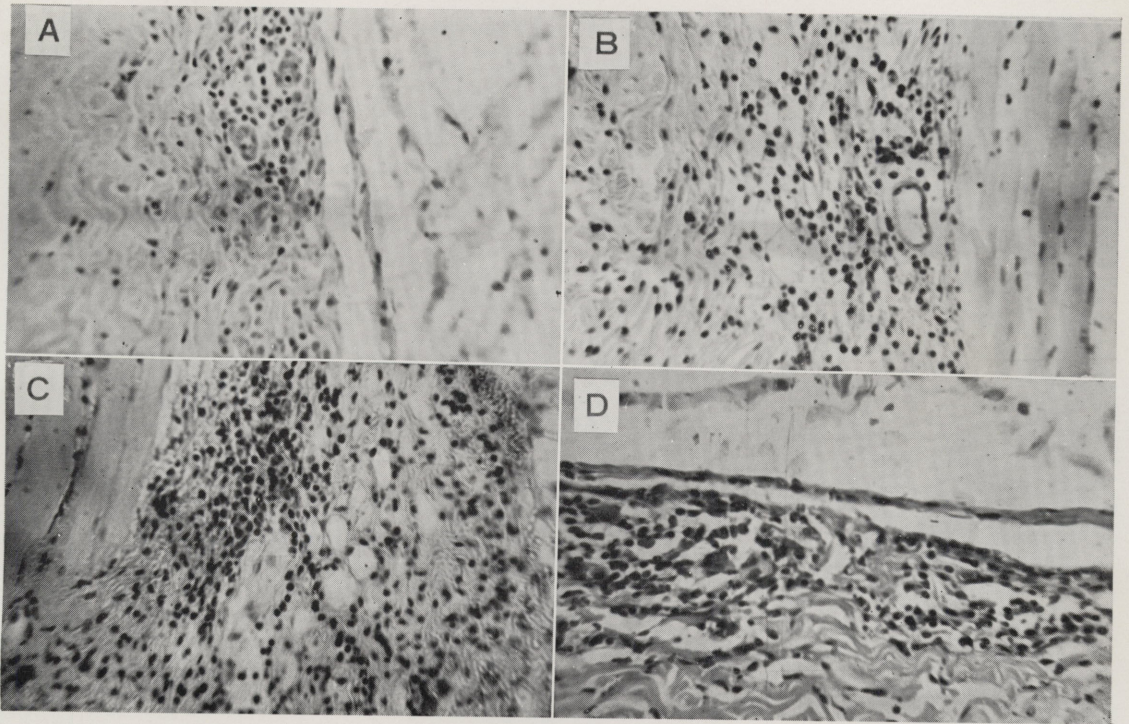
イヌ糸状虫の凍結乾燥虫体末を, 生理的食塩水(1:100)で抽出した抗原を種々な感作方法によつてモルモットを感作し, Arthus 現象を比較観察し, 次のような結果を得た。

1) 皮下, 皮内, 腹腔および Adjuvant 法による各感作群とも Arthus 現象の成立をみとめた。

2) Adjuvant 法による感作群は, 他の感作群に比較して感作処置による異常反応もなく, 局所における反応も著明に出現し望ましい感作方法と思われる。

終りに臨み, 終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜つた清水重矢教授に衷心より深謝いたします。

本論文の要旨は昭和33年, 日本寄生虫学会第27回総会において発表した。



写真説明

- (A) 皮下感作群 (No. 1) (10 時間)
皮下毛細血管周囲の浸潤と筋線維の軽度の膨化
- (B) 皮内感作群 (No. 6) (10 時間)
皮下毛細血管周囲の円形細胞浸潤および皮下織の浮腫、結合織の膨化
- (C) 腹腔感作群 (No. 12) (10 時間)
皮下毛細血管周囲性の細胞浸潤
- (D) Adjuvant 感作群 (No. 16) (10 時間)
皮下毛細血管周囲の円形細胞浸潤および皮下織の高度の浮腫

文 献

1) 阿久沢実・小山二三人・小栗菊夫 (1958) : 犬フィラリア症の皮内反応について, 日本獣医師会誌, 11 (1), 32-35. — 2) 池田稔正 (1952) : 回虫抽出物のアレルギー性並びに抗原性に関する実験的研究, 第 3 編, 回虫物質による Arthus 現象, 医学研究, 22 (1), 66-74. — 3) 伊藤実ら (1958) : アレルギー, 金原出版, 東京. — 4) J. Freund, & K. McDermott (1942) : Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49, 548-553. — 5) J. Oliver Gonzalez (1953) : Intradermal Reactions to Schistosome and Filaria Antigens in Patients before and after Treatment of the Parasitic Infections. J. Trop. Med. Hyg. 2 (1), 79-84. — 6) 小宮山隆三 (1954) : 回虫物質による腸, 肺及び皮膚のアレルギー性反応の研究, III, 回虫乳剤経口感作による皮膚及び腸壁の Arthus 現象について, 寄生虫学雑誌, 3 (4), 270-277. — 7) 宮川逸郎 (1950) : 回虫性アレルギーに関する研究, 総合医学, 7 (15), 728-732. — 8) 緒方富雄 (1940) : Arthus 現象を規定する因子について, 日本病理学会誌, 30, 386-389. — 9) 山本好明 (1956) : 回虫体腔液による Arthus 現象について, 1, モルモットを用いた実験的研究, 寄生虫学雑誌, 5 (1), 78-83. — 10) 山本好明 (1956) : 回虫体腔液による Arthus 現象について, 3, 抗原性及び特異性に関する研究, 寄生虫学雑誌, 5 (3), 350-357.

Summary

The freeze-dried body of *Dirofilaria immitis* was subjected to extraction with physiological saline, the extraction rate being 1:100. With this extract as sensitization antigen, sensitization was performed on guinea pigs by the subcutaneous, intradermal, and

intraperitoneal routes and the adjuvant method.

The Arthus phenomenon was compared among the experimental groups under the different sensitization methods, by using a 1:1,000 extract of the sensitization antigen as inducing antigen. As a result, it was clarified that the adjuvant method was the most desirable one for sensitization.

寄贈文献目録(16) つづき

635. 鈴木禾甫(1959) : 螢光顕微鏡法による繊毛虫の研究, 慈恵医大誌, 74(11), 2616~2627.
636. 亀谷了(1957) : 太平洋の孤島青ヶ島の寄生虫分布, 医学と生物学, 42(1), 14~16.
637. 亀谷了・石浜光(1953) : 戦後の満州における日中ソ三民族の寄生虫保有率と終戦前のそれとの比較, 第1編 戦後の満州における日中ソ三民族の寄生虫保有率, 同上, 26(1), 27~29.
638. 亀谷了・石浜光(1953) : 同 第2編, 終戦前後の寄生虫保有率の比較, 同上, 26(3), 109~111.
639. 亀谷了(1955) : 再びハエ幼虫症と思われる一例, 同上, 34(6), 276~277.
640. 亀谷了・金子志郎(1951) : 縮小糸虫の4例, 同上 21(3), 119~120.
641. 亀谷了・金子志郎(1950) : 腸蠅幼虫症の一例, 同上, 16(5), 307~308.
642. 亀谷了(1952) : 赤痢アメーバの分裂状態の観察, 同上, 24(6), 246~247.
643. 亀谷了・野々部春登・石浜光(1954) : ジアルジアに関する研究1, 同上, 32(5), 250~251.
644. 亀谷了・野々部春登・丹羽一成・坂部長正・沖山文雄(1955) : 糸虫毒の剔出腸管に対する作用, 同上 35(2), 60~63.
645. 亀谷了・亀谷四郎(1949) : 東京都の一地区に於ける寄生虫に就て, 東京医事新誌, 66(6), 267~269.
646. 千葉大学医学部公衆衛生学教室阿南分室(1958) : 調査研究報告, 昭和33年度(1), 81頁 自家出版.