

糸状虫免疫に関する基礎的研究

2. 成虫およびマイクロフィラリア抗原による Arthus 現象について

小山 二三人

日本獣医畜産大学医動物学教室 (指導 清水重矢教授)

(昭和35年11月25日受領)

さきに私は、イヌ糸状虫の虫体物質によつて感作処置をほどこしたモルモットに Arthus 現象をみとめこれを報告した。今回は前報の Adjuvant 法によつて感作をおこなつたウサギにイヌ糸状虫の成虫およびマイクロフィラリア(以下 Mf と略記)を抗原として糸状虫免疫とくに皮膚反応に関する基礎的な実験をこころみ、さらに両抗原の性状や硫酸分画物の抗原性についても検索をおこなつた。

イヌ糸状虫の皮膚反応については、古く Taliaferro (1930) によつて始まりその後、多くの業績が報告されている。そしてこれらはイヌ糸状虫に抗原材料を求め糸状虫症患者の診断に供された。

Taliaferro はイヌ糸状虫の食塩水による、0.5%浸出液を抗原として、これの 0.025 ml を皮内に注射して局所の腫脹が直径10mm を超えるとき、あるいは偽足を生ずる場合を陽性反応として患者に皮内反応をおこなつた。それによると Mf 陽性のパンクロフト糸状虫患者23名に用いて21名に陽性反応がみられ、また感染者と思われる56名中46名に陽性反応を、そして非感染者19名は陰性を示し、その診断的価値あることを報告している。

その後、Wright *et al.* (1944), Bozicevich *et al.* (1944), Zarrow (1946), McFadzean (1953), Prelin Beye (1956), 一の瀬 (1942), 山本 (1956) ともイヌ糸状虫抗原を用いてパンクロフト糸状虫患者に皮内反応をおこないその特異性反応による診断的価値をみとめているが、感作動物に対する実験的な所見についての報告はきわめて少ない。私は感作処置をほどこした動物について皮内反応をおこない、この解析をおこなつたので、その成績のあらましを報告する。

実験材料及び方法

1. 感作動物と感作法

実験に供したウサギは体重 3.5 kg 前後の雄を選び前報の Adjuvant 法によつて感作をおこなつた。

2. 成虫および Mf の分画抗原

前報の惹起抗原に準じてつくり、これを粗抗原とした。

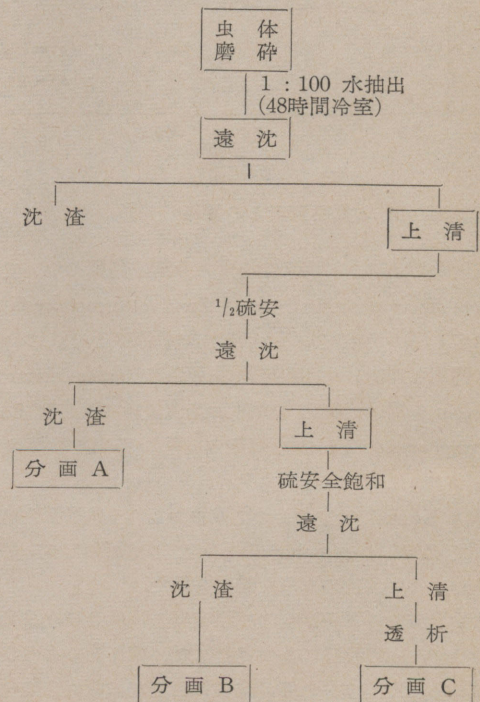
3. 成虫および Mf の分画抗原

成虫と Mf の乾燥虫体を食塩水 (1 : 1,000) で磨碎しこれを冷室で 48時間抽出し、3,500 rpm 15 分間遠心処理をおこない、さらに上清を硫酸飽和によつて得た沈澱と上清を透析し、第1表の法によつて分画抗原 A, B および C を作つた。

4. 皮内反応の術式と観察

前報とおなじ方法でおこなつた。すなわちエパクリームによつて脱毛した局所の皮内に抗原 0.1 ml を注射し

第1表 成虫および Mf の抗原分画法



反応の測定を腫脹の長径と短径との平均値とセロファン紙に横写した実測値とをもつてこれを表わした。

5. 抗原の性状

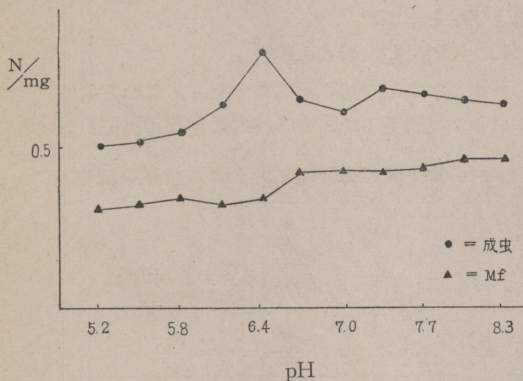
両抗原の性状について比較するため抽出液の pH の変化による抗原窒素量をマイクロ・キエルダー法によつて測定し、次に Zone electrophoresis による泳動像の解析を Kunkel の法によつておこなつた。

実験成績

実験 I 成虫および Mf 抗原の性状

(1) 磷酸緩衝液による抗原窒素の変化

両抗原の虫体物質を pH 5.2~8.3 に調整した磷酸緩衝液を用い冷室で 24 時間抽出し、3,500 rpm 15 分間遠心し、上清の窒素量をマイクロ・キエルダー法によつて測定し第 1 図のような結果を得た。これらの測定値は成虫および Mf とともに抽出液の pH の変化とほぼおなじような傾向を示した。

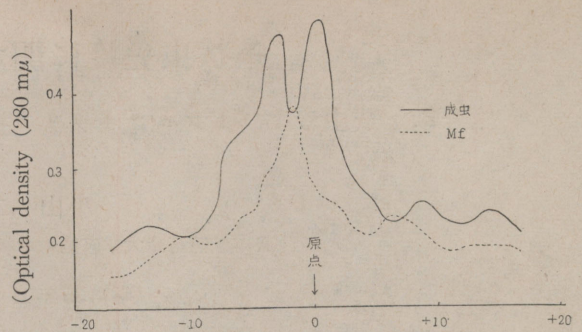


第 1 図 pH と抗原窒素との関係

電気泳動法による抗原性物質の分画、精製については Paper electrophoresis および Zone electrophoresis などが広く用いられている。寄生虫抗原のそれについては、岡田 (1959) は回虫抗原の分画に Paper electrophoresis を用い、高山 (1958)、米山 (1959) らは Zone electrophoresis によつて寄生虫抗原の分画をおこなつている。

私は Kunkel の法によつて成虫および Mf 抗原を材料として Zone electrophoresis による泳動像について比較をおこない、次のような結果を得た。

泳動後における分画物の抗原窒素の定量は日立分光光度計、280m μ の吸収によつておこない第 2 図のような成績が得られた。すなわち、成虫においては原点の陰極側



第 2 図 両抗原の Zone electrophoresis による泳動像 Holder 1.5×3×40 cm Veronal buffer pH 8.6, 9 mA, 250 V, 17 hrs.

に二つの峯が出現し、Mf にはこれが一つの峯でここに両抗原の差異がみとめられるほかは類似した泳動像がみられた。

実験 II 粗抗原による皮内反応

寄生虫の免疫、とくに抗原性物質の検索については、回虫をはじめとして多くの寄生虫の虫体物質を材料としておこなわれているが、バンクロフト糸状虫のそれについては、いまだ報告をみない。これは本虫の採取がきわめて困難であるためと思われる。

私は、この点についてイヌ糸状虫を用いて分画した虫体物質について抗原性を Arthus 現象によつて検索をおこなつた。

すなはち成虫と Mf の虫体物質をおなじ操作によつて食塩水で抽出 (1 : 1,000) した抗原をつくり、これを感作処置をほどこした 5 頭のウサギの皮内に注射して両抗原の反応を観察した。反応の出現状況については、注射直後から局所は急速に腫脹し約 10 分経過して両抗原の反応に差がみられた。

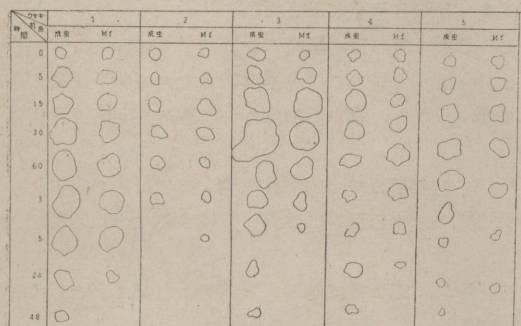
ウサギの個体間においてもその差がみとめられたが、Mf 抗原に比較して成虫抗原の反応が強い傾向を示した。3 時間後、両抗原の反応はもつとも強く出現し、それ以後は次第に縮小あるいは消退をみた。これら両者は反応の程度においては差がみとめられ、成虫の粗抗原が強い反応を示したが、反応の出現型は第 3、4 図および第 2 表にみられるようにきわめて相似した成績を示している。

イヌ糸状虫の成虫および Mf の虫体物質を材料とし、その生理食塩水抽出液を粗抗原として、感作ウサギに対する Arthus 現象をおこなつた。その成績については、両種抗原間において抗原性物質の量的関係によるのか、

第2表 成虫およびマイクロフィラリア粗抗原による皮内反応の成績

ウサギ No.	抗原	1		2		3		4		5		平均	
		成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf
分	0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.0	5.5	3.5	5.5	6.0	5.4	5.2	
	15	9.0	8.5	5.5	6.0	8.5	7.0	10.5	9.0	7.0	8.5	7.5	
	30	10.5	10.5	6.0	8.0	18.0	13.0	12.0	10.0	11.2	9.0	10.2	
	60	15.0	8.5	9.0	9.0	23.6	16.5	13.5	10.5	16.0	12.0	13.4	11.3
時	3	10.0	6.0	10.0	10.0	21.0	13.5	16.5	17.0	14.0	14.5	14.3	12.2
	5	14.0	5.5	10.0	11.0	20.5	10.0	12.0	6.0	10.5	8.0	13.4	8.1
	10	11.0	3.0	10.5	9.5	10.5	6.5	10.0	5.0	7.5	0	9.9	4.8
	24	7.0	2.5	12.0	0	8.5	5.0	6.0	0	0	0	6.5	1.5
	48	6.0	0	8.5	0	0	0	4.0	0	0	0	3.5	0

(腫脹部の長径と短径とを計測した数値を平均したものを示した.)



第3図 成虫および Mf 粗抗原注射による反応，セロファンによる反応局所を模しこれを縮図

あるいは感作抗原として成虫物質を用いたためか不明であるが、成虫粗抗原は Mf の粗抗原による反応に比較して強い反応がみとめられた。

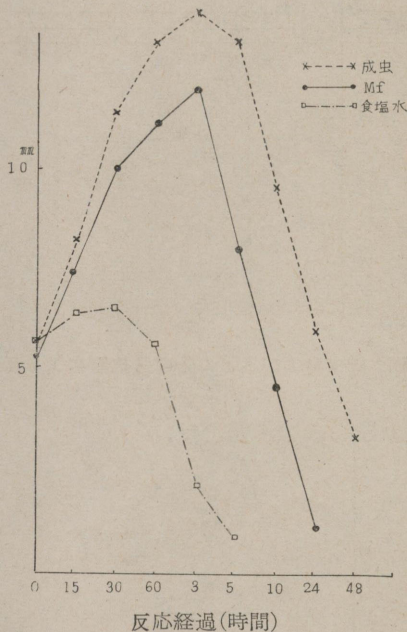
実験Ⅲ 硫安分画抗原による反応

寄生虫免疫を論ずる立場において、虫体物質を材料とした抗原の分画については蛋白質に抗原性を求め、あるいは多糖体に、または脂質に抗原性物質の存在を主張し、研究者によつてその見解を異にしている。

私は、イヌ糸状虫粗抗原を硫安分画法によつて分画した抗原を用いて感作ウサギに対する Arthus 現象をお中心として、成虫および Mf の抗原性について比較検索をおこなつた。

(1) 分画A抗原による反応

この分画は蛋白質の塩析法によるグロブリンに相当するものであるが、分画物の化学的検索が精細にできなかったためA分画と呼びその皮内反応抗原としての態度を検索した。



第4図 成虫および Mf 抗原による反応経過

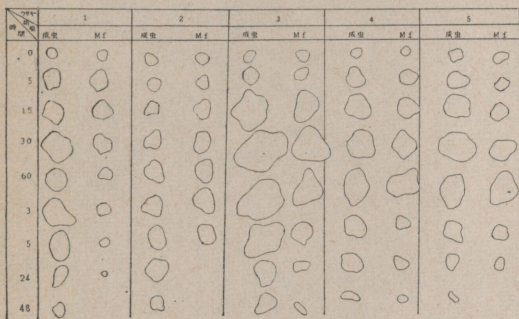
さきの成虫および Mf 粗抗原の反応にみられように成虫抗原注射による反応が強くあらわれるという傾向は、この分画抗原による結果についても、また同様であつた。すなわち、注射直後から腫脹が拡がり60分後に両抗原とも強い反応がみとめられ、第5、6図および第3表に示したような経過がみられた。

No. 2 のウサギは両抗原ともに反応が弱く、また反応の出現状況に個体差があるように思われるが、成虫抗原の反応が著明に出現したウサギは、Mf 抗原注射においてもまた強い反応を示した。

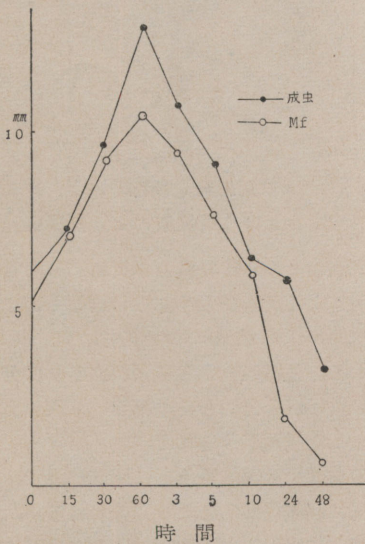
第3表 分画A抗原による皮内反応の成績

ウサギ No.	1	2		3		4		5		平均		
		成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	
0	6.5	5.5	6.0	5.0	7.0	5.0	6.0	5.0	5.0	6.0	6.1	5.3
15	10.0	8.0	4.5	5.5	8.0	8.5	7.5	6.5	7.0	7.0	7.4	7.1
30	10.0	10.0	6.5	9.0	14.5	13.0	10.0	6.0	8.0	7.5	9.8	9.1
60	15.0	11.0	7.0	9.0	23.5	15.0	9.5	8.0	11.0	10.0	14.0	10.6
3	14.5	12.0	9.0	15.5	11.5	11.5	8.0	10.5	10.5	7.0	10.7	9.3
5	16.0	12.0	6.0	4.0	9.0	8.5	5.5	8.0	9.0	5.5	9.1	7.6
10	14.0	12.5	0	3.0	10.0	4.0	6.5	6.5	4.0	4.0	6.5	6.0
24	10.5	5.5	0	0	7.0	0	8.5	4.0	4.0	0	5.7	1.9
48	6.6	5.0	0	0	5.5	0	5.5	0	3.0	0	3.2	1.0

(腫脹部の長径と短径とを計測した数値を平均したものを表した.)



第5図 成虫およびMfの分画A抗原による反応



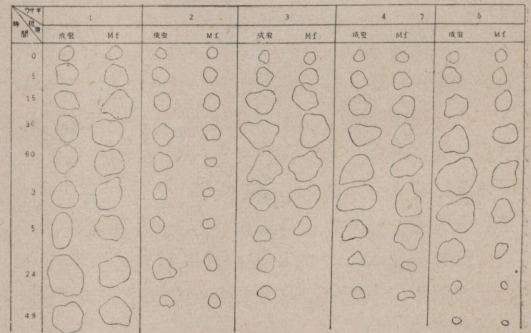
第6図 分画A抗原の反応経過

(2) 分画B抗原による反応

この分画は蛋白質の塩析においてアルビュミンに相当するが、抗原としてこの分画Bはきわめて強い反応がみられた。しかも、成虫、Mfともに著明な反応が出現した。

No. 2 をのぞいてはいずれも強い皮膚反応がみられ、両種抗原における反応の強弱を差別することは困難であった。

これらの反応所見は第7、8図および第4表に示すとおりである。



第7図 成虫およびMfの分画B抗原による反応

(3) 分画C抗原による成績

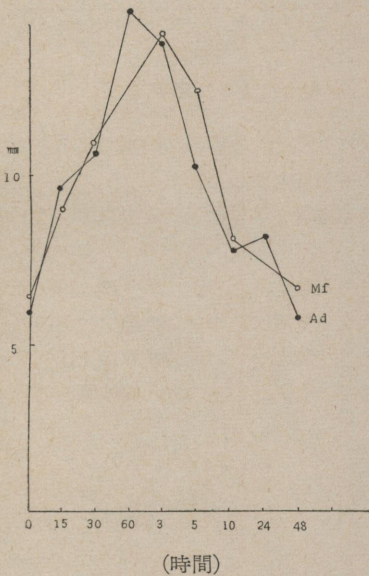
虫体物質を硫酸塩析法によつて沈澱させた上清を流水で透析して、これにアセトンを加えて得た沈澱を回収し分画Cとした。

この分画は Molische の反応がきわめて強く、他の分画AおよびB抗原に比較して抗原窒素量も少なく、多糖体の存在量が相当に多いものと考えられたのでこの分画

第4表 分画B抗原による皮内反応の成績

ウサギ No.	1		2		3		4		5		平均	
	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf	成虫	Mf
経過時間												
分	0	7.5	7.5	5.0	5.0	5.0	5.5	7.5	6.0	6.0	5.8	5.7
	15	10.5	12.5	7.5	6.5	8.0	9.0	8.5	9.0	8.0	9.7	8.9
	30	11.0	16.0	8.0	8.5	13.5	12.0	10.5	9.5	11.0	10.8	10.9
	60	11.5	16.0	10.5	7.0	16.5	17.0	14.5	11.0	15.0	11.0	15.6
時	3	13.5	15.5	6.5	4.0	10.5	15.5	16.0	16.0	21.0	14.1	13.0
	5	1.2	15.0	8.0	4.5	7.0	12.5	17.0	18.0	19.0	11.5	12.5
	10	1.4	14.5	7.5	3.5	8.5	0	12.5	13.0	9.5	6.5	7.9
	24	20.0	15.0	1.1	6.5	6.5	0	7.0	6.0	5.5	3.0	8.2
	48	16.0	15.5	0	7.0	6.5	0	6.5	5.5	0	5.8	5.6

(腫脹部の長径と短径とを計測した数値を平均したものを表した.)



第8図 分画B抗原の反応経過

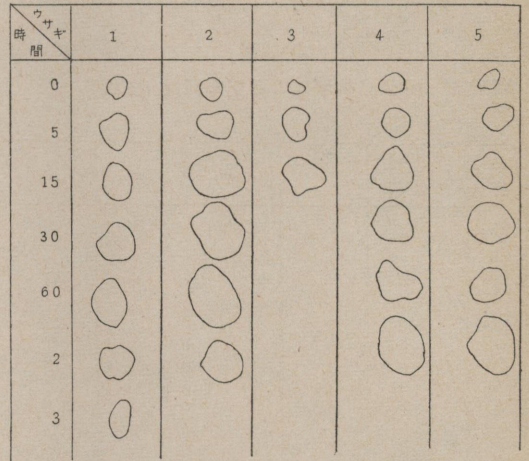
の皮内反応時における態度を追求し、第9、10図および第5表のような成績が得られた。

これらの成績を、さきの(1)および(2)の抗原によるそれと比べると反応が弱く、反応の消退もまた早いことが知られた。

(4) 生理的食塩水による反応

以上のA, B, Cの三分画抗原の反応所見に対する対照実験として生理的食塩水を、抗原とおなじ方法で皮内に注入しその反応をしらべ第11図および第5表のような結果が得られた。

すなわち、反応はいずれも注射後、1時間以内に消退



第9図 成虫の分画C抗原による反応

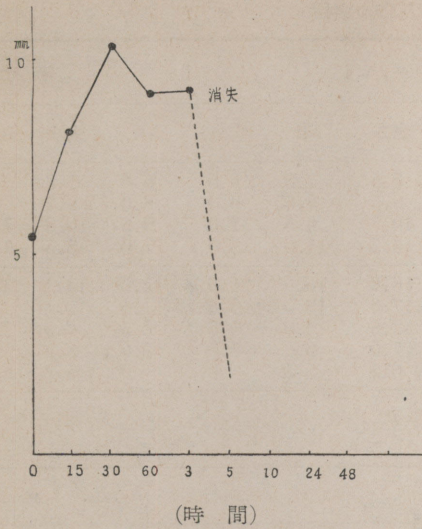
Mfは材料の少ないため実験はできなかつた

No. 3のウサギは実験中(30分後)測定を誤り中止

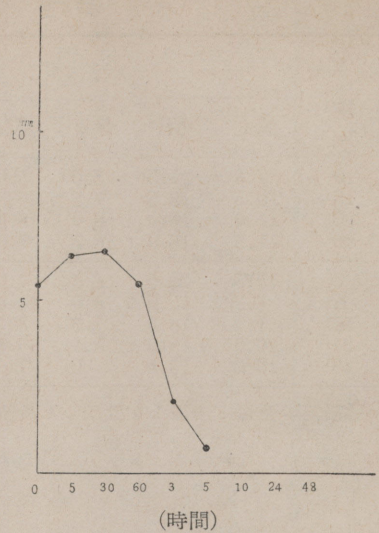
第5表 分画C抗原による皮内反応の成績

ウサギ No.	1	2	3	4	5	平均	
	経過時間						
分	0	5.0	6.0	6.0	6.0	4.5	5.5
	15	8.0	11.0	6.5	8.0	7.5	8.2
	30	8.0	14.0	9.0	12.0	9.0	10.4
	60	10.0	14.0	0	11.5	11.0	9.3
時	3	11.0	15.5	0	10.5	10.0	9.4
	5	10.0	0	0	0	0	0.1
	10	0	0	0	0	0	
	24	0	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	0	

(腫脹部の長径と短径とを計測した数値を平均したものを表した.)



第10図 分画C抗原による反応経過(成虫)



第12図 食塩水による反応経過

ウサギ 時間	1	2	3	4	5
0					
5					
15					
30					
60					

第11図 生理的食塩水の反応

第5表 対照(生理食塩水)の皮内反応成績

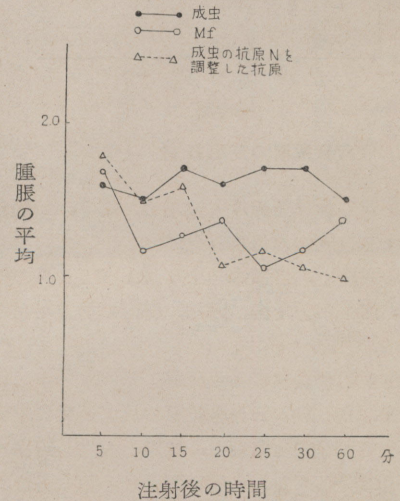
ウサギ No.	1	2	3	4	5	平均
経過時間						
分						
0	5.0	6.0	6.0	5.5	6.0	5.7
15	6.5	7.0	6.5	6.5	6.0	6.5
30	6.0	5.0	9.0	7.0	6.5	6.7
60	8.5	0	5.0	0	6.0	5.8
時						
3	8.0	0	3.0	0	0	2.2
5	4.0	0	0	0	0	0.8
10	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0

(腫脹部の長径と短径とを計測した数値を平均したものを表した。)

し他の抗原によるそれと容易に区別することができ、かつ組織障害を残さなかつた。

(5) 抗原窒素を等量にした成虫および Mf 抗原による皮内反応

これまでの実験であきらかなように、粗抗原および分画抗原とも成虫抗原にその反応の強いことがみられ、しかも抗原の性状において、成虫抗原は Mf 抗原に比べて抗原窒素を多く含んでいるので、両抗原の窒素量を等量



第13図 抗原窒素を等量にした成虫および Mf 抗原による反応

に調整したものについて、皮内反応をおこなった結果、第13図に示すような成績が得られない。

この実験の結果から窒素の量的関係が反応の発現、とくにその強弱に影響しているものと推定される。

以上のように、イヌ糸状虫の成虫および Mf の虫体物質を材料として硫安分画をおこない、これらの抗原性を感作ウサギに対する Arthus 現象によつて検討した。分画抗原の反応の程度を成虫および Mf についてみると成虫の分画抗度が強い反応を示し、さらに両抗原の A、B および C 抗原のそれについては、A、B 分画すなわち、蛋白分画と思われる抗原は C 分画に比較して強い反応を示した。次ぎに多糖体分画と思われる成虫抗原の C 分画は、いずれも短時間に反応が消退し、Arthus 現象の成立はみとめられなかった。

これらの事実により糸状虫における抗原性物質の存在は硫安塩析によつて沈澱する分画、いわゆる蛋白分画にあるものと推定される。

総括および考察

前回はイヌ糸状虫の虫体物質によつて感作処置をほどこしたウサギについて Arthus 現象の成立をみとめ、これを報告した。今回は成虫および Mf の抗原性について比較検討をこころみた。

パンクロフト糸状虫の抗原性物質について従来の研究においては、成虫の採取が困難のためにその Mf あるいはイヌ糸状虫を材料としている。一、瀬、高山らはパンクロフト糸状虫の Mf の抗原性は成虫に比べて微弱ではあるがこれをみとめている。片峰らは、その報告において Mf の電溶処置で作った抗原を糸状虫症患者に皮内反応をこころみ、その診断的な価値をみとめている。

私は、イヌ糸状虫の成虫および Mf に抗原材料を求め、Arthus 現象によつてその抗原性を検索し両抗原に本現象の成立をみとめ、しかもその反応の程度は成虫が Mf に比べて強いことを知った。さらに硫安分画法によつて作った分画抗原についてもおなじような反応がみとめられ、またその反応の度合いも粗抗原とおなじように各分画に著明な反応がみられた。

両抗原の性状についていくつかの検索をこころみたが大きな差異はみられなかった。すなわち、皮内反応の出現状況、両抗原の抽出液の pH の変化による抗原窒素などについてきわめて類似した傾向を示し、また Zone electrophoresis による泳動像については両抗原の原点附近に異なつた像が出現することをみとめた。

寄生虫の発育の各時期による抗原性の変化について、

清水らは回虫卵の卵物質を用いこれを実験し、抗原性物質の質的な変化でなく量的な関係が抗原性の見かけの上の差異をあらわすことを報告している。このような点については住血吸虫の抗原としてミラキジウムを用い、マンソン裂頭条虫においてはマンソン孤虫を抗原とし、免疫学的検索をこころみ、同一の種においては成虫と幼虫とに本質的な差のないことが報告されている。

私は糸状虫類の成虫と Mf との関係においてもまた、生物学的には発育の時間的な差異のみであつて本質的に異なるものでないことをあきらかにした。

虫体分画物の抗原性については成虫および Mf の分画抗原とも窒素量の多い分画 A と B に反応が著明にみとめられた。この成績によつて蛋白分画に抗原性の存在を決定することは早急であるが抗原の窒素量と抗原性との関係については、その反応の度合いを決定する因子となりうるものと考えられる。

私のおこなつたこれらの成績から成虫と Mf 抗原の抗原性については、その質的な変化によらず抗原性物質の量的関係で反応の度合いが決まるものと思われる。よつて、Mf を抗原材料として皮内反応をおこなうことは、成虫抗原との本質的な差を考慮する必要のないことを指摘したい。

まとめ

イヌ糸状虫の成虫および Mf の虫体物質を材料として感作ウサギに対する Arthus 現象について実験をおこない次のような結果を得た。

1. 成虫および Mf 両抗原とも Arthus 現象の成立をみとめ、しかもその反応の度合いは成虫抗原が強い傾向を示した。
2. 両抗原の性状については抗原窒素量や、Zone electrophoresis および反応の出現状況などからきわめて類似しているものと思われる。
3. イヌ糸状虫抗原による Arthus 現象に参与する活性分質は、いわゆる蛋白質分画にあると考えられる。
4. Mf 抗原と成虫抗原とは Arthus 現象の発現に対して、本質的な差はみとめられなかった。また両抗原による反応の度合いは、抗原性物質の質的な差異によるものではなく、その量的な関係によると思われる。

終りに臨み、終始ご懇篤な指導とご校閲を賜つた清水重矢教授に衷心より深謝すると共に、実験について、ご援助をいただいた阿久沢実講師に感謝いたします。

本論文の要旨は昭和34年、日本寄生虫学会第28回総会において発表した。

文 献

- 1) Beye, H. K. Mille, R. Thooris, G. Z. & Tapu, J. (1956) : Preliminary report on the use of the antigen of *Dirofilaria immitis* as an epidemiologic tool and as a therapeutic agent in *Wuchereria bancrofti* infections in French Ocean. Amer. J. Hyg., 64(1), 23-29.
- 2) Bozicevich, J. & Hutter, A. M. (1944) : Intradermal and serological test with *Dirofilaria immitis* antigen in carks of human filariasis. Amer. J. Trop. Med., 24(3), 203-208.
- 3) Culbertson, J. (1941) : Immunity against animal parasites. New York.
- 4) 伊藤実ら (1958) : アレルギー, 金原出版, 東京.
- 5) 一ノ瀬健吾 (1942) : Bancroft 糸状虫症に関する研究, 2 「フィラリア」皮膚反応, 長崎医学会雑誌, 21(10), 903-922.
- 6) 片峰大助・吉田卯太郎 (1952) : 「フィラリア」の抗原性の研究, 其の一, 皮膚反応, 長崎医学会雑誌 27(4), 226-231.
- 7) 小山二三人 (1959) : 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, 寄生虫学雑誌, 8, (6), 178-184.
- 8) 森下哲夫 (1957) : 寄生虫病の診断, 金原出版, 東京.
- 9) McFadzean, J. (1953) : Immunity in filariasis of experimental animals. J. Trop. Med. Hyg., 2(1), 85-94.
- 10) 野田昇 (1953) : 鉤虫症の皮内反応, 大阪市立医科大学誌, 2(3), 202-213.
- 11) 清水重矢・阿久沢実 (1958) : 蛔虫卵の抗原性に関する研究, 2, 単細胞期および仔虫期蛔虫卵による Arthus 原象について, 寄生虫学雑誌, 7, (3), 62.
- 12) 清水重矢・阿久沢実 (1959) : *Dirofilaria immitis* 抗原の研究, 1, Column chromatography による分画抗原の皮内反応について, 医学と生物学, 51(5), 207-209.
- 13) Taliaferro, W. H. & Hoffman, W. A. (1930) : Skin reactions to *D. immitis* in persons. J. Prev. Med., 4, 261-280.
- 14) 吉川春寿 (1947) : 臨床医化学, 1, 実験編, 東京.
- 15) 山本孝 (1957) : Filaria 症の免疫学的研究, 第2報, 皮内反応について, 日本衛生学雑誌, 14(5), 695-698.

BASIC STUDIES ON IMMUNIZATION AGAINST FILARIAE
(2) PHENOMENON OF ARTHUS CAUSED BY ADULT-WORM AND
MICROFILARIAL ANTIGENS

FUMITO KOYAMA

(*Department of Medical Zoology, Nippon College of Veterinary Medicine, Tokyo*)

Canine filariae, or *Dirofilaria immitis*, have been used in basic experiments performed for the clarification of biological characters of *Filaria* (*Wuchereria bancrofti*). Furthermore, the antigen derived from the body of canine filariae has been applied to the clinical diagnosis of filariasis.

Taking such state of affairs into consideration, the author studied the antigenicity of the adult worm and microfilaria of the canine filaria by using the phenomenon of Arthus as criterion.

The results obtained are summarized as follows.

1) Both antigens, of adult-worm and microfilarial origins, were capable of making the phenomenon of Arthus develop. There was a tendency that the degree of reaction in the phenomenon of Arthus was higher when adult-worm antigen was used than when microfilarial antigen was employed.

2) It seems that both antigens are quite similar to each other in character and property when they are compared with regard to nitrogen of antigen, results of zone electrophoresis, and conditions under which intracutaneous reaction occurs.

3) No essential difference is observed between adult-worm and microfilarial antigens in the capacity of producing the phenomenon of Arthus.

4) The degree of reaction caused by both antigens seems to be dependent upon the quantitative relationship of antigenic substance, irrespective of the difference in the quality of such substance between these antigens.