

## 犬糸状虫抗原による皮内反応の基礎的研究

### (1) 陽性判定規準の設定と抗原濃度および 注射液量に対する人体側の反応

石 崎 達 久津見 晴 彦 熊 田 三 由

国立予防衛生研究所寄生虫部

村 中 正 治 宮 本 昭 正 牧 野 莊 平

東京大学医学部物療内科

永 井 隆 吉

佼成病院皮膚科

(昭和 38 年 11 月 1 日受領)

#### まえがき

犬糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) 抗原は古くから人間のフィラリア症診断の目的に使用されており、その抗原性や類属反応の面も、その応用や判定の点に関しても詳細な検討が行なわれてきている (Taliaferro & Hoffman, 1930; Fairley, 1931; Lippelt & Mohr, 1938; King, 1944; Bocizevich *et al.*, 1944, 1947; 岡部ら, 1954; Beye *et al.*, 1956; 山本, 1959; Danaraj & Schacher, 1959). 著者らは犬糸状虫粗抗原を使用する皮内反応の研究を行ない、過去においてはフィラリア症が流行していたが現在は消滅したと思われる地区、及び現在なお流行が続いている地区で集団的な皮内反応による検診を行なった (石崎ら, 1960, 1963). 現在まで行なわれている研究の殆んどが実施例数の少数であるためにその解析が不十分なことを考慮し、著者らは各地区における住民の集団的皮内反応を多数例について実施し、その結果からこれがフィラリア症診断に際し使用できるものと判断した。今回は陽性判定基準と抗原濃度及び注射液量による人体側の反応について検討した。

この研究は日本寄生虫予防会主催の研究班に参加し、現在流行地である愛媛県下の二三の地区で集団検診を実施した際に行なった。

#### 対象と方法

1) 対象 昭和 36 年 11 月に愛媛県西宇和郡三崎町名取部落、与修部落において集団検診を行なった、対象人員は名取では男 176 名、女 356 名、与修では男 113 名、女 138 名で総計 783 名である。被検者は未就学児童を除く全員であるが、16~25 歳の青年層は都会への出稼ぎのために大部分受診していない、これら対象の詳細は別報の通りである (石崎ら, 1963).

2) 抗原 犬糸状虫成虫を凍結乾燥により粉末化し、エーテル脱脂 8 時間後に 50 倍量の D.P. 液 (葡萄糖 45 g, 重炭酸ナトリウム 2 g, 石炭酸 5 g, 蒸留水を加えて 1 l; Unger, 1933) を加えて 24 時間冷抽出したものを更に 48 時間流水で透析し、ゼイツ濾過器で濾過したものを生理的食塩水で稀釈した (鳥居薬品に依頼して作製)。抗原液の濃度は 10,000 倍 (総窒素量は 5.53  $\gamma$ /ml) と 100,000 倍の 2 種類とした。

3) 注射方法 注射液量は 0.02 ml と 0.05 ml の 2 種類である。注射部位は前腕屈側皮内であるが、部位による反応の差異を考慮し、対象によつて注射局所の影響がないように考慮した。

4) 判定 注射してから 15~20 分後の膨疹と紅量の平均直径 (面積を表わしうる互に直角な 2 直径の平均値) を計測した。偽足のある場合は面積の点で十分考慮して直径の大きさを決めた。

本研究は米国 Public Health Service 資金による日本寄生虫予防会主催の「フィラリア症駆除の実験的研究」班に参加して行なったものである。

成績及び考按

1. 皮内反応直径頻度分布

犬糸状虫抗原 10,000 倍液 0.02 ml 注射の場合、横軸に直径、縦軸に頻度をとつて膨疹、紅暈別に作図すると Fig. 1 の如くである。地区別に分布を作ると膨疹 9 mm、

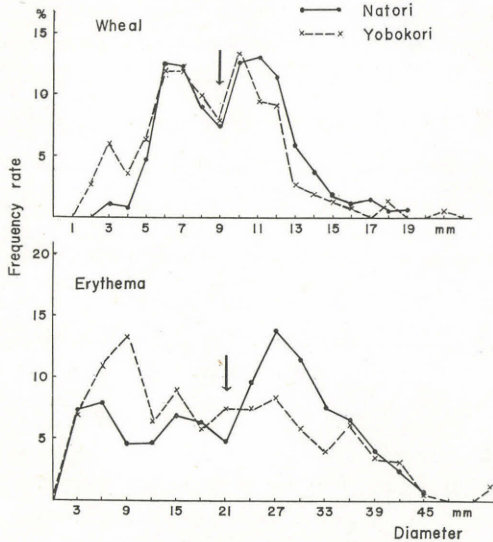


Fig. 1. Frequency distribution of size of skin reaction due to *Dirofilaria* antigen (1 : 10,000) in different districts (474 cases in Natori and 255 cases in Yobokori)

紅暈はほぼ 20 mm (3 mm 間隔で集計のため) に谷間を有する 2 峰性を示し、この谷間は名取、与修地区で同一である。このような 2 峰性及び谷間の位置は、著者らが行なつた鉤虫抗原その他多種抗原における皮内反応の場合と全く同様である (石崎ら, 1961, 1963b)

そこでこの谷間を境界としてこれより直径の大きな部分を陽性とし、その陽性率を求めると名取では膨疹によると 52.4%、紅暈によると 61.2%、与修では 40.0%、47.6% であつた。夜間検査によるマイクロフィラリア陽性率は名取で 6.9%、与修で 2.4% なので、皮内反応陽性率は概ねマイクロフィラリア陽性率に比例する。

2. 性別、年齢別の皮内反応分布

名取地区の皮内反応分布を性別にみると、Fig. 2 のように陽性と陰性の境界は膨疹 9 mm、紅暈 20 mm であり、上述の陽性判定基準に一致している。この場合の陽性率は膨疹では男 48.6%、女 47.2%、紅暈では男 51.1%、女 51.3% であつて殆んど差を認めない。次に年齢

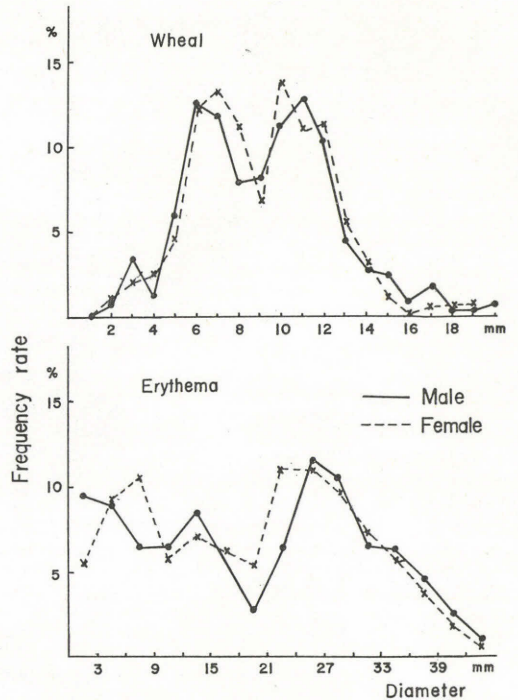


Fig. 2. Frequency distribution of size of skin reaction due to *Dirofilaria* antigen (1 : 10,000) in both sexes (282 cases in male and 488 cases in female)

別に 7~10 歳、11~15 歳、21~40 歳、41~60 歳、61 歳以上の 5 群に分けて皮内反応分布を比較した (16~20 歳は受診者少数のため省略)。Fig. 3 に膨疹、Fig. 4 に紅暈の比較を示した。各群での例数はかなり少なく、測定誤差の影響で多少その値は変化するが、膨疹 9 mm、紅暈 20 mm を陽性判定限界と考えてよいと思われる。

以上上のような考慮の結果、この判定基準に基づき年齢別の分布の型を検討したところ、年少者 (7~10 歳) では陽性反応の最頻度は 11 mm 付近にあり、直径 13 mm を越えるものは少ないが、年齢の増加につれて反応の大きく出るものが増加している。6 歳以上では約半数が 13 mm 以上で最大値は 19 mm を示した。これらの関係は紅暈についても同様である。フィラリア症の感染の様式から考えると感染の機会が年齢に正比例して増加するであろうから、繰返して感作をうけたことがこのような分布を示す原因となつているものと思われる。

3. 注射液量と陽性率

同一人の同一前腕に 10,000 倍液の 0.02 ml、0.05 ml

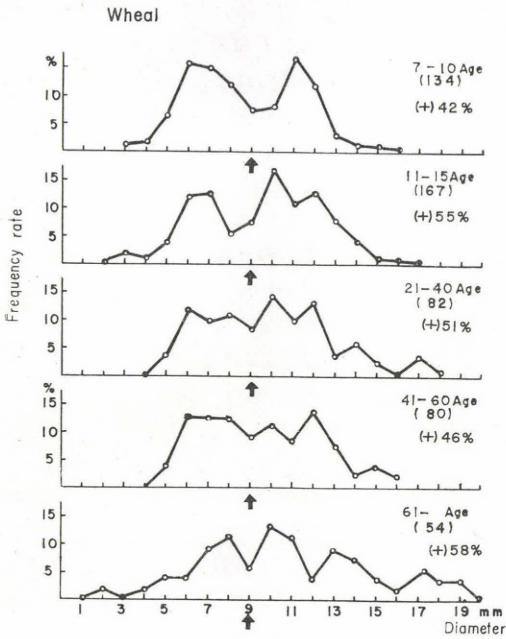


Fig. 3. Frequency distribution of wheal-size of skin reaction due to *Dirofilaria* antigen (1 : 10,000) in different age groups

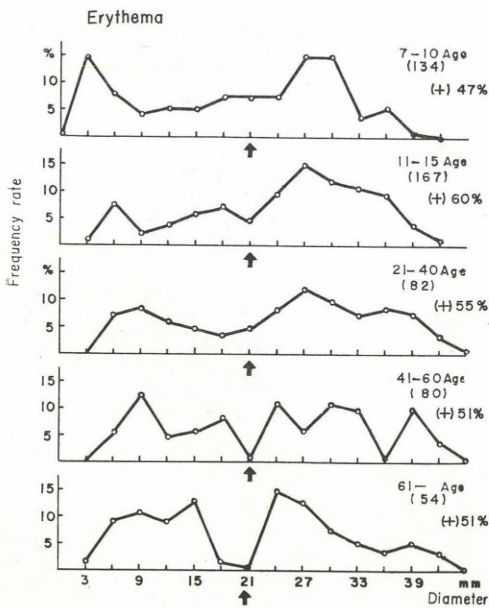


Fig. 4. Frequency distribution of erythema-size of skin reaction due to *Dirofilaria* antigen (1 : 10,000) in different age groups

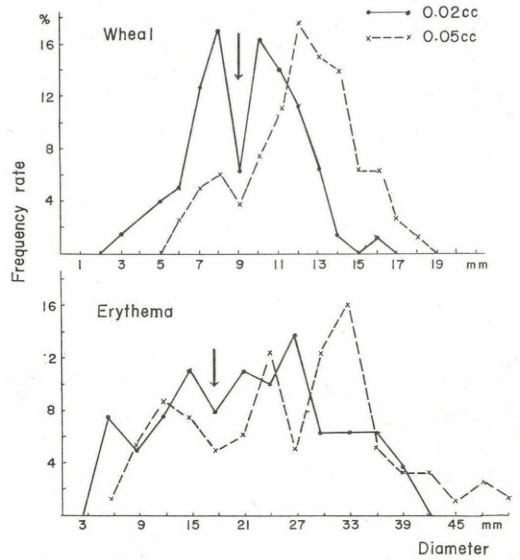


Fig. 5. Frequency distribution of size reaction in different quantities of injecting solution (1 : 10,000)

を同時に注射して15~20分後の反応直径を計測した。この膨疹、紅暈別分布が Fig. 5 である。即ち陽性判定基準は注射量に無関係に膨疹 9 mm, 紅暈 20 mm である。しかしその陽性率は若干のちがいであり、膨疹については 0.02 ml では 54.3%, 0.05 ml では 82.5%, 紅暈については 0.02 ml では 57.4%, 0.05 ml では 63.7% であつて、注射量の影響は膨疹において著明に認められた。以上の結果から膨疹と紅暈による陽性率が比較的近似している 0.02 ml が注射量として適当であると思われた。

4. 皮内反応に及ぼす稀積度の影響

名取地区の一部で稀積度を異にする抗原液 (10,000 倍と 100,000 倍) を同一人に注射し、それぞれの反応分布を作成すると Fig. 6 に示す結果となつた。10,000 倍液による反応分布は膨疹 9 mm, 紅暈 20 mm に陽性限界を認めたが、100,000 倍液では上記の陽性者の大部分が陽性限界以下に分布し、9 mm を越すものは 5% にすぎない。しかしこの分布に見られる第 2 峰をこの濃度における陽性者と判定するための基準はやはり 9 mm としてよいであろう。

一方紅暈における陽性判定基準はこの図から見ると 10 mm 付近に移動している。この結果は例数がやや少ないのと実験誤差も考慮して十分なる説明は今回は与え

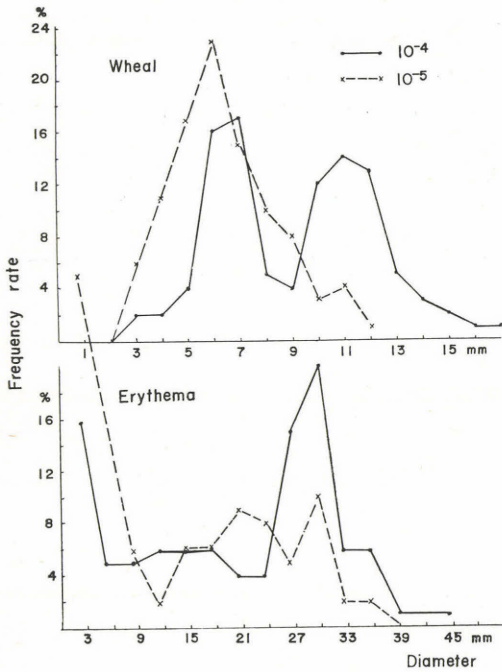


Fig. 6. Frequency distribution of size of skin reaction in different dilution of antigen

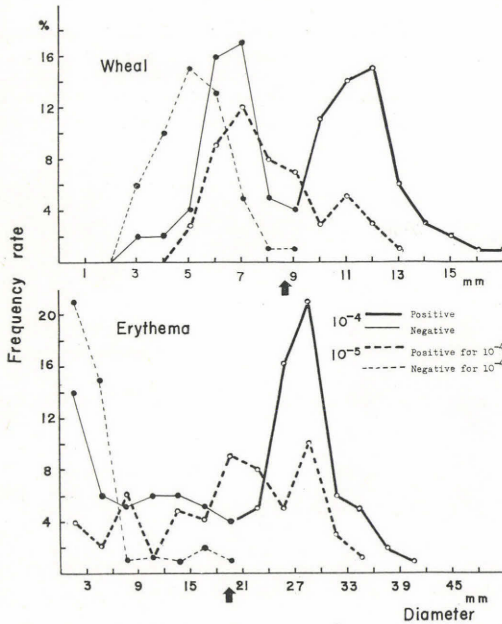


Fig. 7. Frequency distribution of size of skin reaction due to *Dirofilaria* antigen (1 : 100,000) in two groups ; one is positive and the other negative for the antigen diluted 1 : 10,000

られない。但し著者らが別の機会に行なつた日本住血吸虫抗原の100,000倍液による紅量の陽性判定基準は20mmであるという結果が得られたことを付記する(石崎ら, 1961b)

以上のような稀釈度を異にする皮内反応においてその陽性率が著しく変化する原因を次の点から検討してみた。Fig. 7において示すように、先のFig. 6の10,000倍液反応で陰性であつたもの、陽性であつたものが、それぞれ100,000倍液ではいかなる変化を示すかを見た。即ち10,000倍液での陰性者はすべて膨疹、紅量ともに生理的食塩水の反応分布に近似し、陽性に転ずるものはない。これに反し10,000倍液での陽性者は100,000倍液では膨疹についてみると大部分が陰性に転じ、その分布の型は先の陰性群に近似していき、一部が陽性群として残る。紅量でみると特徴のある第2峰は崩れて陰性側に分布してしまう。

そこでこの現象を更によく検討するために個人別の両稀釈液による反応の相関図を作つてみた(Fig. 8)。横軸

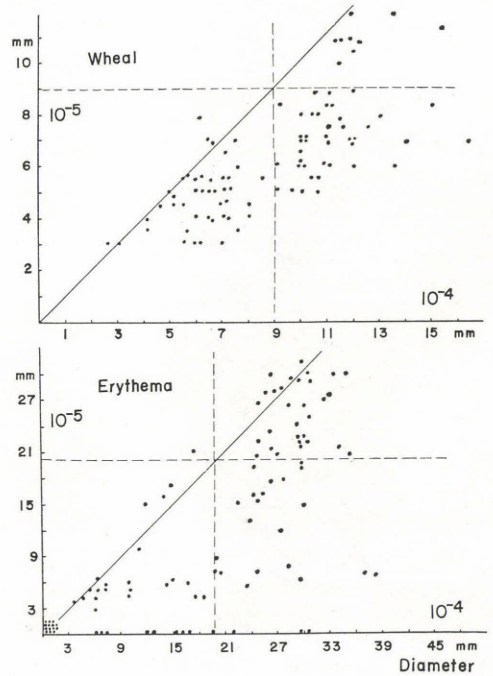


Fig. 8. Correlation of skin reaction between two dilutions of antigen in same individuals

に10,000倍、縦軸に100,000倍の稀釈度を取り、個人の反応の大きさを点で表わした。これによるとまず点が広範囲に散らばっているのが注目される。これは個人に

より10,000倍液では反応が大きく出るが100,000倍液では非常に小さく出る場合と、両者があまり変わらない場合の2種類があることを示す。殊に紅暈においては100,000倍液では全く反応が消失するもの、ほとんど変化のないものと、更にその中間の3種に分けられ、それらの区別は10,000倍液での反応の大きさは無関係に分散していることが分る。

以上の如き検討の結果から、2つの異なつた稀釈度における陽性反応は、抗原濃度の差によつて質的に全く別の現象が生じていることが明らかになつたものと思われる。

#### 5. ミクロフィラリア陽性者の皮内反応

夜間血液検査によるミクロフィラリア陽性者54名につき、10,000液0.02mlの皮内反応を行ない、その膨疹と紅暈の相関図を作つた (Fig. 9)。即ち膨疹9mm、

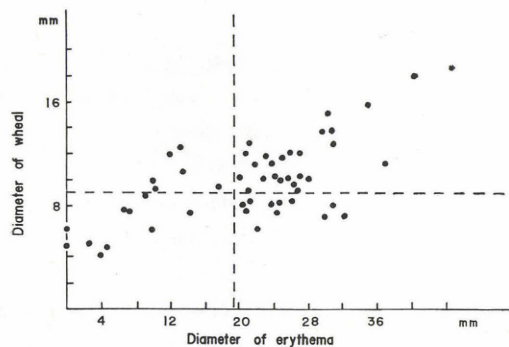


Fig. 9. Correlation of skin reaction between wheal and erythema in same individuals (54 cases of microfilaria carriers)

紅暈20mmに陽性判定基準を置くと、大部分はどちらかの判定基準で陽性となつてゐるが、10名は膨疹でも紅暈でも陰性の範囲にあつた。このような判定基準に従うならば今回のミクロフィラリア陽性者の皮内反応陽性率は81%ということになる。残りの19%は前述したように10,000倍液では陰性であるが濃い抗原液を使用すれば陽性に転ずる可能性があると考えられる。この点については同じ方法で調査した鉤虫皮内反応(石崎ら, 1960)日本住血吸虫皮内反応(石崎ら, 1962)ではそれぞれの保虫者について94%、100%の陽性率であつたから、今回の81%という結果はかなり低率と考えられる。これは恐らくこの抗原がヒトのパンクロフト糸状虫による抗原でなく、犬糸状虫抗原であるため、類属反応をみていることに起因するものと思われる。

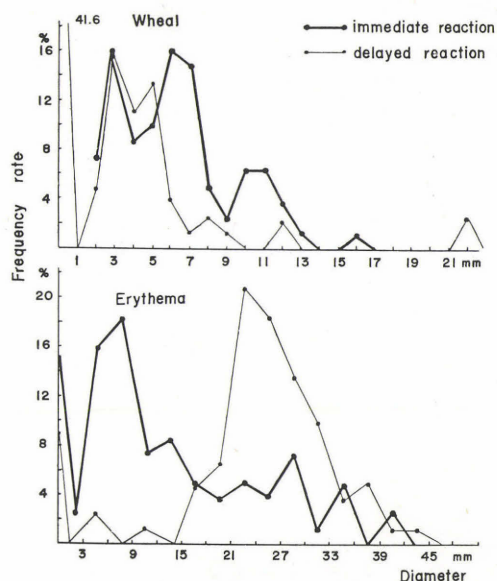


Fig. 10. Frequency distribution of size of immediate (15 min.) and delayed (24 hrs.) reaction due to *Dirofilaria* antigen (1 : 10,000) in same population

#### 6. 即時反応と遅延反応

10,000倍液0.02mlによる皮内反応を行なつたものうち82名について24時間後の反応を計測し、またその一部については48時間にも調査した。Fig. 10に示すように15~20分後の即時反応による膨疹に対しては24時間後の硬結を、紅暈に対しては紅斑を対応させた。即時反応の膨疹、紅暈は遅延反応の硬結、紅斑とは組織学的に性質が異なるが、両者は注射した部位を中心に発生したものであつてその原因が同一であるから対応しうものと考ええる。この図をみると24時間後の硬結は直径9mm以下のものが95%を占め、最頻値は3~5mmであつた。ツベルクリンの場合には硬結を特異反応として取扱ひ、これを陽性判定基準に使用しているが、今回は判定時間も異なるし、抗原も異なるのでツベルクリン反応の基準を引用することは出来ない。今回はこのような現象が得られたことを報告するのにとどめる。

紅斑についてみると、即時反応で陰性であつたものも含めて殆んど全員に紅斑が認められ、最頻値は21~27mmで最大値は43mmに及んだ。

次に即時反応の大きさと遅延反応の大きさの相関を求めてみたのが Fig. 11 である。これをみると膨疹と硬結の間には相関が認められないが、紅暈20mm以上の陽

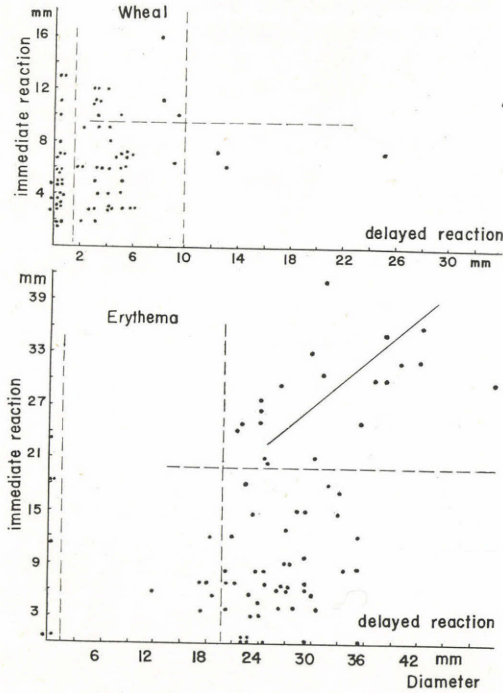


Fig. 11. Correlation of skin reaction between immediate and delayed types

性群にのみ紅量と紅斑の間に正相関が認められるようである。これは紅量又は紅斑が局所の血管神経のいわゆるaxonreflexに関係をもつものであるという点で同じ性質をもつためと考えられる。

#### 7. 全体についての考察

パンクロフト糸状虫(*Wuchereria bancrofti*)によるフィラリア症患者に対して犬糸状虫(*Dirofilaria immitis*)抗原で皮内反応を行なうことは種々の問題点を残すけれども、既にフィラリア症感染とかなりの関係が認められており(既出文献)、我々の成績でも集団として感染率を問題にする場合価値があるようである。

この場合陽性判定限界は犬糸状虫抗原でもすでに石崎(1962)の報告のように年齢、性別に関係なく一定であり更に抗原濃度を稀釈していくと陽性判定限界は変わらないが、陽性反応を呈したものの一部が陰性化する現象がみられる。同時に稀釈に無関係にあまり反応の大きさも変わらずに陽性反応を呈する者もみられた。これは皮内反応の表現性が皮膚器官の特殊性と深い関係のあることを思わせる。従つて皮内反応を規定する要因には抗原量、抗体量(レアギン)の外に、皮膚の感受性という第3要素

を考えねばならない。

一方感染機会の累積から考えると高年ほど陽性率が高いはずなのに、むしろこれと逆な現象を呈するのは感染免疫と皮内反応の相互関係を考えるに当つて重要な問題を示すものと思われる。

犬糸状虫抗原による遅延反応はツベルクリン型と同定するには問題があるが、一方この反応は即時反応の消褪後に発生しているので即時反応の連続とも考えられず、本質的追求は今後の問題である。しかし陽性即時反応の紅量の直径と遅延反応の紅斑の直径が正比例することは興味がある。

#### 要 約

愛媛県下フィラリア症流行地において、犬糸状虫体抗原による皮内反応を実施した。皮内反応抗原の濃度及び注射量に対する人体側の反応を主として追究し、以下の如き結果を得た。

1) 皮内反応直径頻度分布曲線は膨疹、紅量共に2峰性を示しその谷間は地域、性別、年齢、注射量、抗原濃度に無関係に一定であつた。即ち膨疹9mm、紅量20mm付近(3mm間隔集計のため)である。

2) 上記谷間を境界とした陽性判定基準で皮内反応分布を解析すると皮内反応陽性率はMf陽性率の高い地域に高く感染との相関性がある。性別による皮内反応陽性率の差はなくこれはフィラリア症の感染型式からも考慮されることである。年齢分布曲線をみると青少年層では陽性反応の大きさの分布はあまり広がらないが高年層ではかなり大きく反応するものがみられ、同時にその陽性率はむしろ低下の傾向があつた。これはフィラリア感染機会から考えると注目すべき現象である。

3) 注射液量は0.05mlよりは0.02ml注射の方が安定した陽性率を示すように思われる。

4) 皮内反応に及ぼす抗原稀釈濃度の影響は10,000倍液で陽性反応を呈した者が100,000倍液では同じ大きさで反応するものと、反応が全く陰転するものと中間の群の3種に分かれた。

5) Mf陽性者54名の皮内反応は膨疹9mm、紅量20mmの陽性限界を少くともどちらか一方で越しているものの81%で残りの19%が陰性を示した。これは別報の理由から全く犬糸状虫抗原に対してレアギンがないということではなくもつと濃い濃度で反応する可能性が高い。しかし可成り高率に陰性者のいることは犬糸状虫抗原反応がむしろ類属反応である原因によるものであろう。

- 6) 犬糸状虫抗原による遅発反応も観察した。

### 参考文献

- 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. 日本獣医師会雑誌, 11(1), 32-35.
- 2) Beye, H.K., Mille, R., Thooris, G. & John Tapu (1956) : Preliminary report on the use of the antigen of *Dirofilaria immitis* as an epidemiologic tool and as a therapeutic agent in *Wuchereria bancrofti* infection in french oceania. Am. J. Hyg., 64, 23-29.
- 3) Bozicevich, J. & Hutter, A. H. (1944) : Intradermal and serological tests with *Dirofilaria immitis* antigen in case of human filariasis. Am. J. Trop. Med., 24, 203-208.
- 4) Bozicevich, J., Donovan, A., Mazzotti, L., Diaz, F. A. & Padilla, E. (1947) : Intradermal and complement fixation reactions elicited by various antigens in persons infected with *Onchocerca volvulus*. Am. J. Trop. Med., 27, 51-62.
- 5) Danaraj, T. J. & Schacher, J. F. (1959) : Intradermal tests with *Dirofilaria immitis* extract in eosinophilic lung (tropical eosinophilia). Am. J. Trop. Med. & Hyg., 8, 640-643.
- 6) Fairley, N. H. (1931) : Serological and intradermal tests in filariasis. A preliminary report. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 24, 635-648.
- 7) Huntington, R. W. (1945) : Skin reactions to *Dirofilaria immitis* extract. U. S. Nav. Med. Bull., 44, 707-717.
- 8) 石崎達・久津見晴彦・熊田三由・小宮義孝・荒木英斉・野崎繁男・宮下義正 (1960) : フィラリア症消長の疫学的研究 (1) 静岡県吉原市川尻町の実態. 寄生虫学雑誌, 9(6), 692-700.
- 9) 石崎達・荒木英斉・久津見晴彦(1961) : 皮内反応の基礎的研究 (1) 即時反応陽性判定規準及び反応の特質に就て. アレルギー, 10(5), 307-317.
- 10) 石崎達・久津見晴彦・熊田三由・波多野精美・小糸賢太郎・矢田部勤・辻谷重兵衛(1963a) : フィラリア症消長の疫学的研究 (2) 愛媛県西宇和郡三崎町の実態. 寄生虫学雑誌, 12(1), 82-87.
- 11) 石崎達・久津見晴彦・熊田三由・荒木英斉・宮本昭正・広瀬俊一・高橋坦(1963b) : 鉤虫皮内反応の諸性質. 寄生虫学雑誌, 12(1), 77-81.
- 12) King Boyd, G. (1944) : Diagnosis of early filariasis. Am. J. Trop. Med., 24, 285-298.
- 13) 北村精一・片峰大助(1953) : 糸状虫症 (臨床篇). 最新寄生虫病学, 第14篇, 医学書院, 東京.
- 14) Lippelt, H. & Mohr, W. (1938) : Zur Diagnostik der filarenerkrankungen. Klin. Wschr., 17, 1684-1689.
- 15) 岡部浩洋・山口富雄・山下博 (1954) : バンクロフト糸状虫症の免疫学的研究. 第1報, 馬糸状虫抗原による皮内反応と補体結合反応. 鹿児島大学医学部紀要, 16(1), 188-192.
- 16) Oliver-Gonzales, J. & Hernandez-Morales, F. (1945) : Common antigens among filarial and other nematode parasites of man. J. Infect. Dis., 77, 92-95.
- 17) Oliver-Gonzales, J. (1953) : Intradermal reactions to schistosome and filaria antigens in patients before and after treatment of the parasitic infections. Am. J. Trop. Med & Hyg., 2, 79-84.
- 18) Taliaferro, W. H. & Hoffman, W. A. (1930) : Skin reactions to *Dirofilaria immitis* in persons infected with *Wuchereria bancrofti*. J. Prev. Med., 4, 261-280.
- 19) Wharton, D. R. A. & Stelma, T. (1946) : Comparative cutaneous tests for filariasis with antigens of different dilutions. J. Infect. Dis., 78, 49-59.
- 20) 山本孝(1959) : Filaria 症の免疫学的研究(2) 皮内反応について. 日本衛生学雑誌, 14(5), 699-706.

STUDIES ON THE INTRADERMAL REACTION BY  
 THE ANTIGEN OF *DIROFILARIA IMMITIS*  
 I. DETERMINATION OF THE NEW CRITERION FOR POSITIVE  
 SKIN REACTION AND FACTORS RELATED TO OR  
 AFFECTING THE SKIN REACTION

TATSUSHI ISHIZAKI, HARUHIKO KUTSUMI, MITSUYOSHI KUMADA,  
 (Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo, Japan)

MASAHARU MURANAKA, TERUMASA MIYAMOTO, SOHEI MAKINO  
 (Department of Physical Therapy and Medicine, School  
 of Medicine, University of Tokyo)

&

RYUKICHI NAGAI

(Department of Dermatology, Koseikai Hospital, Tokyo)

1) The frequency distribution of diameter values of wheal and/or erythema caused by the antigen was found to have a bimodal character. The trough between the two peaks of the distribution curve of the wheal and/or erythema are situated at the definite point in the curves regardless of the amount or concentration of the antigen injected and of the sex or age difference of the population; i. e., 9 mm in wheal and approximately 20 mm in erythema in diameter.

2) The higher positive rate of intradermal test was obtained in the group which showed higher positive rate of microfilaria.

No difference between sexes was obtained in the positive rate of intradermal test. This fact may be attributed to the mode of infection of filariasis.

Distribution curves of positive reaction among age groups showed that the diameter of both wheal and erythema in the older ages were larger than that in younger ages.

3) The amount of antigen solution injected seemed to be more reliable in 0.02 ml than in 0.05 ml for reading of skin reaction, because the wheal size gotten from 0.05 ml-injected showed marked discordance comparing with erythema reaction.

4) Individuals positive for the antigen diluted 1:10,000 were found to consist of three groups according to the types of reaction (positive, negative and intermediate) to the antigen diluted 1:100,000.

5) Forty-four (81 %) of 54 microfilaria carriers was positive for wheal or erythema of the skin test and 19 % of them was found negative. The results of these tests suggest that these negative individuals might react to a higher concentration of the antigen. Meanwhile, such a high percentage of negative case might be due to the cross-reaction of the skin test using *Dirofilaria immitis*.

6) Some observations were made also on the delayed reaction.