

## 日本住血吸虫病の免疫に関する研究

### (6) 蛍光抗体法について

佐藤 重房

群馬大学医学部衛生学教室 (主任: 沢田利貞教授)

(1965 年 2 月 6 日受領)

#### 緒言

蛍光抗体法間接法 (Indirect fluorescent antibody test ; FA test) が寄生虫感染症の免疫学分野において、血清学的診断法や血中抗体証明法として広く応用されて来た。

Sadun *et al.* (1960) は *Schistosoma mansoni* の cercaria (Cer.) を抗原とした FA test が schistosomiasis mansoni の血清学的診断法に応用できることを報告し、Anderson *et al.* (1961 a, 1962 b) および Sadun *et al.* (1961, 1962) はその実用化について検討を行い、FA test が血清学的診断法として、高度の感受性と特異性をもっており、優れた test であることを認めて報告した。又 Sadun *et al.* (1962, 1963) は trichinosis および trypanosomiasis において、Duxbury *et al.* (1964) は leishmaniasis において、いずれもこれらの疾病の血清学的診断に FA test を応用し、優れた成績を得たことを報告した。Williams *et al.* (1963) は trypanosomiasis, Collins *et al.* (1964 a, b) は quartan malaria および tropical malaria の血中抗体の証明に、いずれも FA test を用い、その鋭敏性と特異性の優れていることを報告した。

現在、日本における日本住血吸虫 (日虫) 症患者は、殆んど亜急性型あるいは慢性型が多く、糞便内虫卵検査による日虫症の診断が極めて困難であり、日虫症に対する免疫学的診断が望まれているが、未だその診断法は確立されていない。著者は高度の感受性と特異性をもつ FA test を日虫症の血清学的診断法として応用するために、本法の基礎的な反応条件について検討を行った。

#### 実験材料および方法

##### 1. 抗原:

*S. japonicum* の miracidium (Mir.) 又は Cer. を抗

原として用いた。Mir. は日虫感染家兎 (Cer. 感染 2 カ月後) の腸粘膜を搔爬して得た虫卵を孵化コルペンによつて孵化させ、コルペンの細管部に集つた活潑なものを用いた。Cer. は実験室内で人工感染した宮入貝より遊出した運動活潑なものを用いた。

##### 2. 被験血清:

Cer. (約 100 隻/kg) 感染後 100 日目の感染家兎 4 羽より得た混合血清および対照として正常家兎 5 羽より得た混合血清をそれぞれ 56°C で 30 分間非働化して用いた。血清の稀釈は 0.85 % saline で行った。

##### 3. 蛍光標識抗体 (FA):

抗家兎血清 globulin 免疫山羊血清 globulin に Fluorescein isothiocyanate (FITC, B.B.L.) を label した染色液 (Protein = 6.4 mg/ml, FP ratio =  $3.6 \times 10^{-3}$ : 東京大学伝染病研究所, 川村明義助教授より分与) を使用した。FA 液は非特異的染色性を除くために、マウスの肝 acetone 粉末で 2 回吸収し (FA 液 1 ml 当り 0.1 g の肝 Acetone 粉末を加え、良く攪拌し、室温で 1 時間放置してから、12,000 rpm, 30 分間遠心して得たその上清にさらに 0.05 g/ml の肝 acetone 粉末を加えて同様の操作を行った)、この液を 0.2 ml づつ ampule に封入し、速やかに凍結したのち使用時まで -20°C に保存した。

##### 4. 燐酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffer saline, pH 7.5 ; PBS):

蒸留水 100 ml に KCl 0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.15 g ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 g) および  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g を加えて保存液を調製し、使用時に再び蒸留水を追加して 1,000 ml とし、さらにこれに NaCl 8.5 g を加えた。

##### 5. slide glass および cover glass:

松浪製 slide glass A (76×26 mm) および cover glass

本研究の一部は文部省科学研究費の補助を受けた。ここに付記して感謝致します。

No. 1 (24×50×0.13-0.17 mm)を使用した。

#### 6. test 用包埋剤 (Mounting medium) :

三光純薬製エルパノール(成分: Polyvinyl alcohol 1 容に 0.14 M NaCl 加 0.01 M PBS 4 容を混和し, それに最純 glycerin  $\frac{1}{2}$  容を加えたもの, pH 6-7)あるいは特級 glycerin 9 容と PBS 1 容を混和した buffered glycerin を用いた。

#### 7. FA test の手技 :

あらかじめ slide glass 上に卵白を薄く塗布し, 風乾したのち, 新鮮な Mir. (又は Cer., 約 20-30 隻)を点滴塗抹し, 扇風器を用いて速やかに充分乾燥 (約 30 分間)してから固定(室温で 5 分間)を行つた。次に Mir. (又は Cer.) の上に被験血清を 1 滴盛り上げ, 湿室 (底に湿った濾紙を敷いたプラスチック箱)中に静置し, 37°C で 40 分間 incubate した。次に PBS で簡単に血清を洗い落してから, PBS の入った洗浄槽内で 10 分間づつ 2 回洗浄 (magnetic stirrer を使用)した。濾紙で軽く押えて水分を除いたのち, FA 液を 1 滴 Mir. (又は Cer.) 上に盛り上げ, 再び湿室内で 37°C, 40 分間染色した。次に PBS で前回と同様操作によつて染色液を洗浄してから充分に風乾し, mounting medium をのせ, cover glass をかけ, 蛍光顕微鏡下で Mir. (又は Cer.) の蛍光の有無を観察した。蛍光装置はパーマレー・千代田光学の高輝度水銀装置 H250 (uv 励起フィルターおよび uv 吸収フィルター使用)を使用した。

#### 8. 反応の判定基準 :

抗原 (Mir. 又は Cer.) に黄緑色の蛍光を全く認めないものを (-), わずかに弱い蛍光のみを認めるものを (±), 蛍光を認めその強さによつて (1+, 2+, 3+) と判定して記録した。

### 実験成績

実験 I Mir. を抗原とした FA test の基礎的条件についての検討

Mir. の固定は, formalin, ethanol, methanol, acetone および火焰について検討を行つた。又, 同時に特異反応を観察するのに必要な被験血清と FA 液の適正濃度についても検討を行つた。

卵白で処理した slide glass に Mir. を点滴塗抹し, 95 % ethanol, 99 % methanol, 10 % formalin, 95 % acetone および火焰を用いて, それぞれ固定した (但し, 火焰固定のみは軽く行つた)。次に, Mir. を日虫感染家兎血清 および 正常家兎血清の 1:3, 1:10, 1:30 およ

び 1:100 稀釈液でそれぞれ incubate したのち, FA 原液で染色して Mir. の蛍光の有無について観察した。

95 % ethanol で固定した Mir. は, 感染血清で incubate した場合に 1:100 稀釈まで蛍光を認め, 正常血清の場合は 1:30 稀釈まで蛍光を認めた。99 % methanol, 95 % acetone および火焰で固定した各 Mir. は感染血清および正常血清のいずれを用いた場合にも 1:100 稀釈までそれぞれ蛍光を認めた。10 % formalin で固定した Mir. は感染血清および正常血清のいずれを用いた場合にも 1:3 稀釈および 1:10 稀釈に蛍光を認めた。なお, 対照として, 血清の代りに 0.85 % saline を用いたところ, いずれの固定法でも蛍光を全く認めなかつた。これらの実験成績より, FA 原液で染色した Mir. はいずれの固定法を用いても, 感染血清で incubate した場合と正常血清で incubate した場合との間に著明な反応の差異を認めることはできなかつたので, 次に FA 液の適正濃度について検討を行つた。

前実験によつて, 感染血清 1:100 稀釈液で incubate したのち FA 原液で染色した Mir. に強い蛍光を認めたので, 血清 1:100 稀釈液で Mir. を incubate してから, FA の原液, 1:3, 1:10 および 1:30 稀釈液でそれぞれ染色して, その蛍光の有無について観察した。

95 % ethanol で固定した Mir. は感染血清で incubate した場合には, FA 液の 1:10 稀釈まで蛍光を認め, 正常血清で incubate した場合には, FA 原液にのみ弱い蛍光 (±) を認めた。99 % methanol で固定した Mir. は感染血清で incubate した場合は, FA 原液および 1:3 稀釈に蛍光を認め, 正常血清の場合には, FA 原液にのみ蛍光を認めた。10 % formalin で固定した Mir. は, 感染血清および正常血清のいずれの場合も, FA 原液および各稀釈液で染色した Mir. に蛍光を全く認めなかつた。火焰で固定した Mir. は, 細心の注意を払つて行つたにも拘らず Mir. が slide glass より剥れ Mir. を観察することはできなかつた。

95 % ethanol, 99 % methanol, 10 % formalin, 95 % acetone および火焰を用いて Mir. の固定について検討したが, 特異蛍光の検出に特に優れた固定剤を認めることはできなかつた。しかし, 5 種の固定剤中 95 % ethanol が比較的良かったので, Mir. を 95 % ethanol で固定したのち, 特異反応に関与する血清 (一次抗体) と FA 液 (二次抗体) の適正濃度を両者の box titration test を行つて検討した。

感染血清の場合は, 1:100 および 1:300 稀釈血清で

Table 1 Representative titration in the fluorescent antibody tests using miracidia as antigen for optimal dilutions of serum and fluorescent antibody solution

Serum specimen	Serum dilutions	FA diluted 1 :				
		1	2	4	8	16
Infected rabbit	1 : 100	2+	2+	1+	1+	±
	1 : 300	2+	1+	1+	1+	±
	1 : 1,000	1+	1+	1+	±	-
Noninfected rabbit	1 : 100	±	±	±	±	-
	1 : 300	±	±	±	±	-
	1 : 1,000	±	±	±	-	-
Control (0.85% Saline)		-	-	-	-	-

incubate した Mir. に FA 1 : 8 稀釈まで蛍光 (2+, 1+) を認め、1 : 1,000 稀血清で incubate した Mir. に FA 1 : 4 稀釈まで蛍光 (1+) を認めた。正常血清の場合は、1 : 100 および 1 : 300 稀釈血清で incubate した Mir. に FA 1 : 8 稀釈までいずれの FA 稀釈液も弱い蛍光 (±) を認め、1 : 1,000 稀釈血清の場合も FA 1 : 4 稀釈までいずれも弱い蛍光 (±) を認めた。なお、対照として、0.85% saline で incubate した Mir. にはいずれも蛍光を全く認めなかつた (Table 1)。これらの実験成績より、感染血清で incubate した Mir. と正常血清で incubate した Mir. との間に著明な反応の差異を認めることはできなかつたので、特異蛍光を指標とする FA test において、Mir. は抗原として不相当であると考えられた。

実験 II Cer. を抗原とした FA test の基礎的条件についての検討

実験 I によつて、Mir. を抗原として用いることは適切でないことが判つたので、Cer. を抗原とした FA test について検討を行つた。

Mir. の固定に比較的良好な成績を認めた 95% ethano. によつて Cer. を固定したのち、1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 および 1 : 800 稀釈血清で incubate し、FA 原液、1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128 および 1 : 256 稀釈液で染色した Cer. について観察し、特異蛍光の検出に適した被験血清と FA 液の稀釈濃度を両者の Box titration test によつて検討した。

感染血清の場合は、1 : 100 稀釈血清で incubate した Cer. に FA 1 : 128 稀釈まで蛍光 (3+, 2+, 1+) を認め、1 : 200 稀釈血清では、FA 1 : 128 稀釈まで蛍光 (3+, 2+, 1+) を認め、1 : 400 および 1 : 800 稀釈血清では、FA 1 : 32 稀釈まで蛍光 (3+, 2+, 1+) を認めた。正常血清の場合は、1 : 100 稀釈血清で incubate した Cer. に FA 1 : 16 稀釈まで蛍光 (2+, 1+) を認め、1 : 200 稀釈血清では FA 1 : 8 稀釈まで蛍光 (2+, 1+) を認め、1 : 400 稀釈血清では FA 1 : 4 まで蛍光 (2+, 1+) を認め、1 : 800 稀釈血清では FA 原液および 1 : 2 稀釈に蛍光 (2+, 1+) を認めた。なお、対照として 0.85% saline で incubate した Cer. にはいずれも蛍光を全く認めなかつた (Table 2)。

特異的な抗原抗体反応の結果として Cer. に現われる蛍光は、感染血清の 1 : 100 および 1 : 200 稀釈液で incubate した場合には FA 1 : 64 あるいは 1 : 128 稀釈液によつて、又、感染血清の 1 : 400 および 1 : 800 稀釈液で incubate した場合には FA 1 : 16 あるいは 1 : 32 稀釈液によつて染色した時にそれぞれ認められた。なお、これらの中で FA test の反応条件として、Cer. を incubate するのに必要な血清の濃度は 1 : 400 稀釈、染色に用いる FA 液の濃度は 1 : 16 稀釈が最も良かった。

血清と FA 液の適正濃度が判つたので、これらの条件により Cer. の固定法について検討を行つた。固定に

Table 2 Representative titration in the fluorescent antibody tests using cercariae as antigen for optimal dilutions of serum and fluorescent antibody solution

Serum specimen	Serum dilutions	FA diluted 1 :								
		1	2	4	8	16	32	64	128	256
Infected rabbit	1 : 100	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	±
	1 : 200	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	±
	1 : 400	3+	3+	3+	2+	2+	1+	±	±	-
	1 : 800	3+	2+	2+	1+	1+	1+	±	±	-
Noninfected rabbit	1 : 100	2+	2+	2+	2+	1+	±	-	-	-
	1 : 200	2+	2+	2+	1+	±	±	-	-	-
	1 : 400	2+	2+	1+	±	-	-	-	-	-
1 : 800	2+	1+	±	±	-	-	-	-	-	
Control (0.85% Saline)		-	-	-	-	-	-	-	-	-

は実験 I で使用した 5 種の固定剤を用いた。

95% ethanol 固定の場合は, Cer. に Auto-fluorescence を認めなかつた。又, 感染血清で incubate したのみの Cer. および感染血清で incubate しないで FA 液で染色したのみの Cer. にいずれも蛍光を認めなかつた。感染血清で incubate したのち, FA 液で染色した Cer. には蛍光(2+)を認めたが, 正常血清で incubate してから FA 液で染色した Cer. には蛍光を認めなかつた。99% methanol 固定の場合は, Cer. に Auto-fluorescence を弱く(±)認めた。又, 感染血清で incubate したのち, FA 液で染色した Cer. に弱い蛍光(±)を認めた。10% formalin 固定の場合は, Cer. に auto-fluorescence を認めなかつたが, 感染血清で incubate したのち, FA 液で染色した Cer. に弱い蛍光(±)を認めたのみであった。95% acetone 固定の場合は, Cer. に auto-fluorescence はなく, 感染血清で incubate したのみの Cer. および FA 液で染色したのみの Cer. にも蛍光を認めなかつた。感染血清で incubate したのち, FA 液で染色した Cer. に蛍光(1+)を認めたが, 正常血清で incubate した場合の Cer. にも蛍光(1+)を認めた。火焰固定の場合は, Cer. が slide glass より剥れ Cer. を観察することができなかつた。

Cer. の固定には 95% ethanol が良いことが判つたので, さらに ethanol の濃度による Cer. の特異蛍光の消長について観察を行つた。99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60% および 50% ethanol でそれぞれ固定したのち, 血清の 1:400 稀釈液で incubate し, FA 1:16 稀釈液で染色した Cer. について観察した。感染血清の場合は, 99%, 95% および 90% ethanol 固定を行つた各 Cer. に強い蛍光(2+)を認め, 80% ethanol では前者に比して蛍光は弱く(1+), 70%, 60% および 50% ethanol 固定を行つた各 Cer. には弱い蛍光(±)を認めたのみであった。なお, 正常血清の場合は, いずれの濃度の ethanol を固定に用いても蛍光を全く認めなかつた。Cer. の固定に用いる ethanol は 90% 以上の高濃度のものが良く, これより低濃度になるにしたがつて, 蛍光が減弱することが判つた。

実験 III 実験的日虫感染家兎の FA test ならびに Cercarienthüllen reaction について

日虫感染家兎の血中抗体の証明に FA test を応用して, test の感受性および特異性について観察した。抗原には Cer. を用い, その固定は 95% ethanol で行い, 被検血清は 0.85% saline で 1:400 稀釈し, 染色は AF

Table 3 Comparison of results obtained in the fluorescent antibody tests and the cercarienthüllen reactions for schistosomiasis in infected and noninfected rabbits

Serum specimen	Rabbit number	FA test	CHR
Infected rabbits	61	2+	+
	62	2+	+
	63	2+	+
	64	2+	+
Noninfected rabbits	59	—	—
	60	—	+
	65	—	—
	66	—	—
	67	—	—
	68	—	—
	69	—	—
	70	±	±
	71	±	+

1:16 稀釈液を用いて, 日虫感染家兎 (per kg 100 隻の Cer. を感染して 100 日を経過した家兎) 4 羽と正常家兎 9 羽について, FA test を行つた。なお, 抗血清中で Cer. に抗原抗体反応が起るといふ点で FA test の反応様相と類似していると考えられる Vogel & Mining (1949) の Cercarienthüllen reaction (CHR) を同一血清について行い, FA test の成績と CHR の成績とを比較検討した。

日虫感染家兎 4 羽はすべて FA test の反応が陽性 (2+ 蛍光) であつた。正常家兎は 9 羽の中 2 羽は反応が疑陽性 (± 蛍光) であり, 7 羽は陰性であつた。正常家兎 No. 70 および No. 71 の血清に認めた弱い蛍光(±)は non-specific なものと考えられ, 感染血清による陽性蛍光(2+)に比べると明かに差異を認めた。CHR は日虫感染家兎 4 羽はすべて陽性であつた。正常家兎 9 羽の中 2 羽は陽性, 1 羽は疑陽性, 6 羽は陰性であつた。正常家兎 No. 60 および No. 71 の血清に認めた non-specific な CHR 陽性反応は, 感染家兎 4 羽の血清に認めた CHR 陽性反応と全く同様に観察された。No. 60 の正常家兎の FA test は陰性であつたが CHR は陽性であつた。又, No. 71 の正常家兎の FA test は疑陽性であつたが CHR は陽性であつた (Table 3)。

#### 総括および考按

FA test を日虫症の血清学的診断法に応用するために基礎的な諸条件の検討を行つた。抗原については, Mir および Cer. を用いて検討を行つた。Mir. を用いた場合は感染血清と正常血清との間に著明な反応の差異がないので, Mir. は FA test において非特異性が強いこと

を認めた。抗原に Cer. を用いて観察すると、感染血清で incubate した場合には正常血清で incubate した場合に比較して、より稀釈された血清によっても反応が強く陽性に現われ、感染血清と正常血清との間に著明な反応の差異を認めた。したがって、以後の実験には抗原として Cer. を使用した。

Sadun *et al.* (1962) は *S. mansoni* において、虫卵, Mir., Cer. および成虫体の抗原性について検討を行い、Mir. および Cer. に抗原として良い成績を得たことを報告したが、Mir. に非特異蛍光が強く現われなかつたのは、Mir. の固定に RBA による counterstaining を併用したため、非特異蛍光の出現を阻止できた結果ではないかと推察される。

抗原物質の抗原性は固定法によつて大いに影響されるので、その特異的な生物学的活性を保持するために適切な固定が必要とされる。Cer. の固定については 99%~50% ethanol, 99% methanol, 10% formalin, 95% acetone および火焰を用いて検討したところ、99%~90% ethanol による固定が最も良かった。80%以下の濃度の ethanol では、Cer. の蛍光が減弱することを認めた。99% methanol および 95% acetone による固定は非特異蛍光が強く、特異蛍光のみを観察することは困難であつたので、固定法としては不適當と考へた。10% formalin による固定は 95% ethanol に比較して蛍光は著しく弱かつた。火焰固定は塗抹した Cer. が剥れ易い欠点があつて固定法としては不適當であつた。Anderson *et al.* (1961) および Sadun *et al.* (1962) は *S. mansoni* の Cer. や *Trichinella spiralis* の larva は RBA で counterstaining したのち 10% formalin で固定するかあるいは RBA を含んだ 10% formalin で固定することが最も良く、10% formalin, polyvinyl alcohol, acetic acid, carnoy's solution, 2%-, 5%-, 7%-alcohol および RBA による各単独固定では満足な成績が得られなかつたことを報告した。固定のために抗原に非特異蛍光が強く現われ、種々の固定法によつてもこれを除去することが困難な場合には Anderson や Sadun *et al.* が報告した RBA による counterstaining あるいは Rhodamin B200 による double staining 等を併用して、非特異蛍光を除去し、FA による特異蛍光を観察することは良い方法と考へられる。

FA test は適正稀釈の被験血清を対象とし、適正濃度の FA 液で抗原を染色する必要がある。被験血清の適正稀釈は宿主の種類や感染の時期等によつて異なり、又

FA 液の適正濃度は FITC を label する以前の antiserum globulin の抗体価, FA の蛋白量, label した FITC と蛋白の比および抗原処理に用いた被験血清の稀釈度等により異なる。

95% ethanol で固定し、実験的日虫感染家兎血清(家兎体重 1 kg 当り 100 隻の Cer. を感染して 100 日目に採血分離したもの)の 1:400 稀釈液で incubate したのち、FA 1:16 稀釈液で染色した Cer. に特異蛍光(2+)を認めたので、これらの条件で日虫感染家兎および正常家兎より得た血清について FA test を行つたところ、日虫感染家兎はすべて反応陽性(2+蛍光)であり、正常家兎は反応陰性(9羽中7羽)および反応疑陽性(±蛍光; 9羽中2羽)であつた。この疑陽性反応は陽性反応に比較して著しく蛍光が弱く、両反応の間に著明な差異を認めることができた。よつて、FA test を日虫症患者の検出に応用できることが示唆された。

同一血清について行つた CHR は日虫感染家兎のすべてに反応陽性を認め、正常家兎は反応陽性(9羽中2羽)反応疑陽性(9羽中1羽)および反応陰性(9羽中6羽)をそれぞれ認めた。

正常家兎 No. 60 は FA test が陰性で、CHR は陽性の反応を認め、正常家兎 No. 71 は FA test が疑陽性で、CHR は陽性の反応を認めた。Sato *et al.* (1964) は FA test と CHR の反応物質がそれぞれ異なつてゐることを報告したが、正常家兎 No. 60 および No. 71 に認めた FA test と CHR との反応の相異は、これに關与する反応物質が異なることを示唆している。

## 結 語

日虫症の血清学的診断を目的とした FA test について、基礎的な諸条件について検討を行つた。

1. FA test の抗原として Mir. および Cer. について検討したが、Mir. は Cer. に比較して非特異性が強かつた。
2. Cer. の固定には 99%~90% ethanol を用いて良い結果を得た。
3. 実験的日虫感染家兎についての FA test は全例に陽性反応を認め、正常家兎についての FA test は全く陽性反応を認めなかつた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜つた沢田利貞教授ならびに今村晋助教授に衷心より感謝致します。また蛍光抗体を分与された東京大学伝染病研究所川村明義助教授に謝意を表します。

本論文の要旨は第22回日本寄生虫学会東日本支部大会に於いて報告された。

### 文 献

- 1) Anderson, R. I., E. H. Sadun & J. S. Williams (1961 a): A technique for the use of minute amounts of dried blood in the fluorescent antibody test for schistosomiasis. *Exptl. Parasitol.*, 11(2, 3), 111-116.
- 2) Anderson, R. I., E. H. Sadun & J. S. Williams (1961 b): Preserved cercariae in the fluorescent antibody (FA) test for schistosomiasis. *Exptl. Parasitol.*, 11(2, 3), 226-230.
- 3) Collins, W. E., G. M. Jeffery & J. C. Skinner (1964): Fluorescent antibody studies in human malaria I) Development of antibodies to *Plasmodium malariae*. *Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.*, 13(1), 1-5.
- 4) Collins, W. E., G. M. Jeffery & J. C. Skinner, (1964): Fluorescent antibody studies in human malaria II) Development and persistence of antibodies to *Plasmodium falciparum*. *Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.*, 13(2), 256-260.
- 5) Duxbury, R. E. & E. H. Sadun (1964): Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.*, 13(4), 525-529.
- 6) Goldman, M., R. K. Carver & N. N. Gleason (1960): Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody II. *E. histolytica* and *E. hartmanni*. *Exptl. Parasitol.*, 10(3), 366-343.
- 7) 川村明義(1961): 螢光抗体法. 医学のあゆみ, 39(9), 336-343.
- 8) Kreier, J. P. & M. Ristic (1964): Detection of a *Plasmodium bergi* antibody complex formed. *Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.*, 13(1), 6-10.
- 9) Nielson, H. A. & O. Idsoe (1963): Evaluation of the fluorescent treponemal antibody test (FTA). *Acta. Pathol. Microbiol. Scandinavica*, 57(3), 331-347.
- 10) Sadun, E. H., R. I. Anderson & J. S. Williams (1961): Fluorescent antibody test for laboratory diagnosis of schistosomiasis in humans by using dried blood smears on filterpaper. *Exptl. Parasitol.*, 11(2, 3), 117-120.
- 11) Sadun, E. H., R. I. Anderson & J. S. Williams (1962): The nature of fluorescent antibody reactions in infections and artificial immunizations with schistosomiasis mansoni. *Bull. Wid. Hith. Org.*, 27, 151-159.
- 12) Sadun, E. H., R. I. Anderson & J. S. Williams (1962): Fluorescent antibody test for the serological diagnosis of trichinosis. *Exptl. Parasitol.*, 12(6), 423-433.
- 13) Sadun, E. H. & J. S. Williams (1960): Fluorescent antibody technic for the serodiagnosis of schistosomiasis in human. *Proc. Soci. Expt. Biol. Med.*, 105(2), 289-291.
- 14) Sato, S., S. Imamura & K. Yoneyama (1964): Fluorescent antibody studies of *Schistosoma japonicum* infections. *Gunma Jour. Med. Sci.*, 13(3), 199-205.
- 15) 鈴江懐・浜島義博(1963): 螢光抗体法. 医学書院, 東京.
- 16) Vogel, H. & W. Mining (1949): Hüllenbildung bei *Bilharzia*-Cercariaen im Serum *bilharzia*-infezierter Tiere und Menschen. *Zbl. Bakt. Parasitol. Abt. I Orig.*, 153, 91-105.
- 17) Williams, J. S., R. E., Duxbury, R. I. Anderson & E. H. Sadun (1963): Fluorescent antibody reactions in *Trypanosoma rhodesiense* and *T. gambiense* in experimental animals. *Jour. Parasitol.*, 49(3), 380-384.

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON SCHISTOSOMIASIS JAPONICA VI.  
INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST IN  
EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS

SHIGEFUSA SATO

(*Department of Hygiene, School of Medicine, Gunma University, Maebashi*)

The fluorescent antibody test for the sero-diagnosis of schistosomiasis was investigated in sera from experimentally infected rabbits.

1. Miracidia and cercariae as antigen were stained by fluorescein labeled antibodies in tests. A striking degree of specific fluorescence was observed in cercariae which were incubated with antiserum.

2. Fixations of cercariae with methanol, formalin, acetone and heat gave generally unsatisfactory results. Best results were obtained when the cercariae were fixed with 90 % to 99 % ethanol prior to incubation with antiserum.

3. Sera from rabbits infected with *Schistosoma japonicum* yielded all positive reactions in the fluorescent antibody tests, whereas the results in the tests of normal rabbits sera were not positive.

## Cestocide Bayer 2353 (Yomesan) による 櫃原条虫駆虫試験

沢 田 勇

奈良学芸大学生物学教室

(1965 年 2 月 15 日受領)

鶏に寄生する条虫の駆虫薬としては最近わが国で Bithionol, Dichlorophen および Butynorate などが相ついでで実用化されて極めてよい成績をおさめている。一方ドイツでは *Moniezia*, *Taenia hydatigena* の駆虫に効力を有する新条虫駆虫薬 Cestocide Bayer 2353 (Yomesan) [N-(2'-chloro-4'-nitrophenyl)-5-chlorosalicylamide] が発表された。しかし本剤は *Dipylidium caninum*, *Raillietina*, *Davainea proglottide* および *Echinococcus granulosis* の駆虫にはその有効性が確められていない。本邦では横川・吉村 (1962) が本剤は *Hymenolepis nana* の駆虫に有効であることを報告した。今回著者は本剤の駆虫効力が確められていない *Raillietina* 属の 1 種である鶏条虫 *Raillietina* (*P.*) *kashirwarensis* に対して駆虫効力を検討する機会を得たのでその結果を報告する。

なお、本剤の産卵におよぼす影響を検討する試験に関しては松井奈良県種鶏場長の協力による。厚く感謝する次第である。

### 材料および方法

1964 年 2 月孵化の雌中雛 5 羽に 5 月 5 日櫃原条虫の中間宿主である *Euponera soiltaria* (オオハリアリ) の尾部 5 尾ずつをパン片に挿入して強制的に食させた。それから 23 日後の 5 月 28 日、5 羽の鶏の糞便を調査し、排泄片節の存在からすべての鶏が櫃原条虫に感染していることを確認した。ついで 5 月 30 日 20 時、体重測定後 5 羽にそれぞれ 1 錠ずつの Yomesan を投与した。翌 31 日早朝 5 羽の鶏の糞便を調査し、排泄虫体数を数えた。その後外部から条虫が感染しないように注意して飼育し、5 日後の 6 月 5 日、5 羽の鶏を屠殺解腸し、小腸内の残存虫体の有無を調査して本剤の駆虫効力を検討した。なお別に産卵鶏 10 羽に 1 錠ずつの Yomesan を投薬して、投薬前後 10 日間ずつの産卵数を比較し、Yomesan の投薬が産卵におよぼす影響についても検討した。

### 結 果

投薬時の体重および 1 羽あたりの投薬量は第 1 表に示すとおりである。一方 6 月 5 日早朝における排泄虫体数ならびに解腸時における残存虫体数は第 2 表のごとく、

第 1 表 投薬時における体重および投薬量

鶏番号	体重 (g)	投与量	1 羽あたりの投薬量 (mg)
No. 1	1100	1 錠	450
2	1210	〃	413
3	1120	〃	437
4	1340	〃	373
5	1280	〃	390

第 2 表 排泄虫体数および屠殺時における残存虫体数

鶏番号	排泄虫体数	残存虫体	
		数	長さ (mm)
No. 1	7	1	53
2	6	0	
3	3	0	
4	5	0	
5	9	1	47

すべての鶏から 3~9 条の虫体が排泄された。また解腸時には残存虫体は No. 1 と No. 5 の 2 羽に再生虫体と考えられる長さ 47-53 mm の小条虫がそれぞれ 1 条ずつ寄生していた以外他の鶏には残存虫体は認められなかつた。

なお、投薬後の糞便には下痢便は皆無ですべて正常便のみであつた。また解体時における内臓諸器官には何んら異常は認められなかつた。

一方投薬が産卵におよぼす影響を調査する目的のもとにおこなつた投薬前後 10 日間ずつの産卵は第 3 表に示すとおりである。この投薬前後 10 日間ずつの産卵数の差を統計的に検討すると、 $\Pr\{|t| > 1.25\} = 0.25$  となり



第3表 投薬前後10日間ずつの産卵数

鶏番号	産 卵 数	
	投薬前 10日間	投薬後 10日間
No. 1	9	8
2	7	7
3	7	6
4	9	10
5	7	7
6	8	5
7	7	8
8	8	6
9	7	7
10	8	8

両者間の産卵数の差には有意性が認められないことが明らかに became.

### 論 議

投薬の翌早朝糞上に排泄された虫体は3~9条の成虫体であったが、これら排泄虫体は頭節をも含めた完全駆虫であるか否かは疑問である。そこでもし頭節を小腸壁に残して頸部から離脱した虫体であれば、しばらくの期間鶏をそのまま外部から条虫の感染源としてのアリ、小甲虫類が侵入しないように注意して飼育した後、屠殺開腸すれば小型の再生虫体が宿っているはずである。そこで本実験では投薬後5日を経過してから屠殺開腸して残存虫体の有無を調査した。この結果は第2表に示すごとく、5羽中2羽の鶏に47-53mmの小型再生虫体がわずかに1条ずつ残存していたに過ぎなかつた。かかる事実からして Yomesan プロキロ 373-450 mg 1回の投薬では100%の完全駆虫は期待できなかつたが、他の条虫駆虫薬に比してその駆虫効力は決して劣るものではない。1羽あたりの投薬量を少々減量して、2~3回連続投与すれば恐らく100%の駆虫効果が得られるものと思われる。これに関しては今後機をみて駆虫試験を行つて検討する心算である。

投薬後の糞便には全く下痢便が認められなかつたこと

は他の条虫駆虫薬にはみられない長所であろう。Bithionol, Dichlorophen および Butynorate などでは投薬翌朝の糞便には必ず多少の下痢を誘発するのが普通である。

つぎに本剤の産卵への影響については第3表に示すごとく、投薬によつて産卵を低下させるような悪影響は全く認められなかつた。かかる点からして本剤は産卵鶏に投薬しても何んらの副作用を伴うことなく、条虫を駆虫することが可能であると判断してさしつかえない。

### 摘 要

- 1) 櫃原条虫を宿した雌中雛5羽に Yomesan 1錠 (0.5g) を投薬して条虫に対する駆虫効力を検討した。
- 2) 投薬の翌朝すべての鶏から3~9条の虫体が排泄された。
- 3) 投薬後の糞便には下痢便は全く認められなかつた。
- 4) 投薬後5日を経過してからすべての鶏を屠殺開腸した結果、2羽に小型の再生虫体が1条ずつ宿つていた。
- 5) 投薬の前後10日間ずつの産卵数を比較検討したがその差には有意性は認められなかつた。
- 6) Yomesan は鶏体に何んの副作用を与えることなく、鶏条虫を駆虫することができる。

### 文 献

- 1) Horak, G. (1962): Modified critical and controlled anthelmintic tests on the conical Fluke *Paramphistomum microbothrium*. J. S. Afr. vet. med. Ass., 33(2): 203-208.
- 2) Zettl, K. (1962): Versuche mit dem Bandwurm-mittel Yomesan in nordhessischen Schafherden. Vet. Med. Nachricht., No. 1: 19-33.
- 3) 横川宗雄・吉村裕之 (1962): Cestocide Bayer 2353 (Yomesan) による矮小条虫の駆虫成績について. 寄生虫誌, 11(5), 387-389.

EXPERIMENTAL REMOVE OF THE CHICKEN TAPEWORM, *RAILLIETINA*  
*KASHIWARENSIS* WITH CESTOCIDE BAYER 2353 (YOMESAN)

ISAMU SAWADA

(*Biological Laboratory, Nara Gakugei University, Nara, Japan*)

Yomesan was supplied for the removal of tapeworms in chickens. Yomesan is a crystalline, pale yellow compound which is tasteless and colourless. Its chemical constitution is N-(2'-chloro-4'-nitrophenyle)-5-chlorosalicylamide. One tablet containing 0.5 g of Yomesan (about 340 mg per kg body weight) was administered to five chickens experimentally infected with *Raillietina kashiwarensis* without previous starvation. Three to nine tapeworms were discharged from each of the five chickens on the next morning following the medication. No marked decrease in appetite was noticed in any of the chickens and the droppings were not liquidized for the next day following the medication.

At postmortal examination on the 5th day after the medication, one small immature tapeworm was parasitized in the mucosa of the small intestinal wall of each of the two chickens out of the five. Comparing the number of egg production for 10 days before medication with that for 10 days after medication, the difference in the number of egg production between two periods was not statistically significant.

On the basis of the obtained data mentioned above, it is obvious that Cestocide Bayer 2353 (Yomesan) possesses anthelmintic activity for the removal of *Raillietina kashiwarensis* from chickens with no unfavorable influence on egg production.