

ジエチルカルバマジン剤投与前後におけるコトナラット 糸状虫ミクロフィラリアの体内分布に ついての実験的研究

三 井 源 蔵・佐 久 間 貞 重
田 坂 定 晴・田 中 英 文

東京大学伝染病研究所寄生虫研究部

(1966年1月25日受領)

まえがき

ミクロフィラリアの宿主体内分布に関する研究はその歴史も古く且つ業績も多い。とくに Manson (1879) 以来 *Wuchereria bancrofti* にみる末梢血中ミクロフィラリア (以下 mf と略す) の夜間定期出現性の研究に始まり、その季節的変動や宿主体内における分布の変動は多くの研究対象となつてきた。なかでも Hawking (1950) は diethyl carbamazine (以下 DEC と略す) による宿主体内分布の変動を追及することによつて DEC の作用機序を明らかにした。そこでわれわれは、このような変動を再検討し、mf の形態変化およびその分布状況を詳細に調べたところ、今まで知られなかつた変性した mf がジ剤投与後に多数臓器内にみられたにもかかわらず、流血中には 1 匹もみられなかつた事実を得た。

実験方法

Litomosoides carinii に感染した cotton rat に DEC を腹腔に注入し、尾血中の mf の減少を確認した後に屠殺の上 mf の体内分布を求めた。

実験方法は rat の頭と尾に両極をつないで 100 V を通電することによつて屠殺した。直ちに解剖し諸臓器に出入する諸血管を綿密に結紮した後に各臓器を摘出した。周囲に附着した血液を拭払してから計量した。解剖時の出血や臓器のうづ血、充血等は成績を著しく変えるので細心に注意した。次いで生理食塩水を加えて硝子製ホモジナイザーに入れて小型モーターで 3 分間控減攪拌

し、ガーゼ 2 枚で濾過し、その濾液を検査した。ホモジナイザーの回転時間は予備実験により、最も多数の mf が破損されずに得られる、それぞれの臓器についての至適な条件である。

屠殺直前の尾静脈血や上記濾液等も 2.5 mm のピペットにてスライドガラス上に蛇行塗抹し、ギムザ液にて染色し検査した。血液、臓器それぞれ 100 mg に含まれる mf の数を算出した。

さらに感染獣の胸腔内に多数発見される mf の死滅に伴う形態的变化を基準として、摘出臓器のスタンプ標本に見出される mf の状態を分類し、その比率を求めた。

諸臓器のうち、肺と肝に特に著しい変化があつたのでこれら二臓器については特に詳しく検討を行った。

この他衰弱死した感染獣を氷室に保存して一定時間後に諸臓器にみる mf の経時的变化を追求めた。

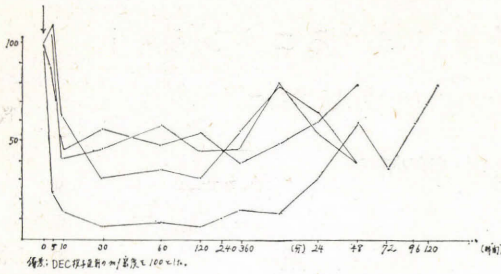
実験成績

a) DEC 投与後の尾血中 mf の消長

本実験に供した cotton rat の示せる尾血中の mf の消長を屠殺しなかつた例と比較検討する。

(1) 第 1 図は DEC 10 mg/kg という少量を 1 回腹腔に注入 (以下 ip と略す) した場合の mf の変動である。mf は佐藤の報告せる成績と同じく ip 後 10 ないしは 30 分ではほぼ最低値に急減しているが 4 例中 3 例は減少率が 50% 程度であつた。しかも 24 時間後には増加して旧に復する傾向が認められた。すなわちこの 24 時間の間、約半数の mf は死滅せずにいずれかの臓器に停滞してい

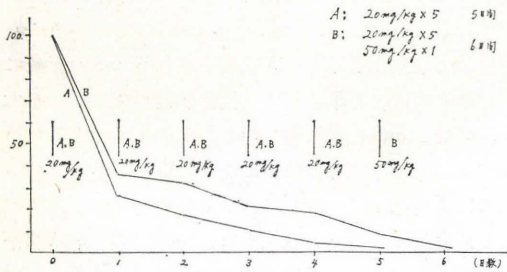
1) This study was supported by a WHO Research Grant on "Studies on filariasis" and by a Public Health Service Research Grant CCOOO17 from Nihon Kiseichu Yobokai.



第1図 10 mg/kg の DEC 腹腔注射後の mf 密度の時間的消長

たに過ぎない事が考えられる。また48時間から72時間にかけて大きな変動がみられた。これは治療に際し mf 数の減少が比較的少ない場合や投薬後に再び増加する時によく現れるもので第3, 4, 5図にもみられる。

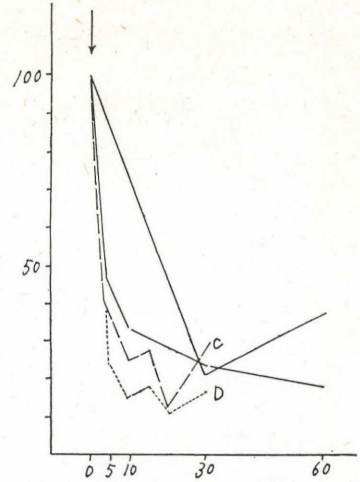
(2) 第2図は DEC 200 mg/kg を連日投与した2頭の rat の24時間々隔の検血成績である。初回投薬したあと24時間までは急に減少しており、そのあと48時間以後は、なだらかな下降を示した。この場合は第1図の48時間前後にみられるような変動はない。



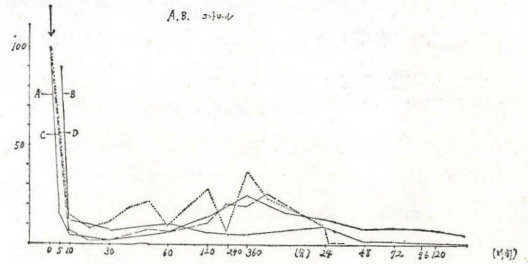
第2図 20 mg/kg の DEC 腹腔注射後の mf 密度の時間的消長

(3) 第3図は DEC 100 mg/kg というやや大量を腹腔内に1回注射した際の経過である。ここに示した4頭のうち A, B 2頭は96時間まで追跡したが C, D 2頭は ip 後30分で屠殺した。屠殺例では ip 後15分で最低値を示したが屠殺時にはすでに増加が始つた状態になっていた。

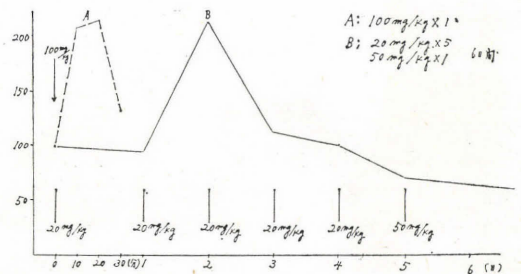
(4) 第4図は A, B, C, D 4頭のうち A, B 2頭は 500 mg/kg の大量投与1回の例で C, D 2頭は1回投与後24時間で2回目の500 mg/kg を投与せる例である。投薬量が多ければ減少する速度も比率も大きいが60分以上も経過すると多少の増減を繰り返す変動を起す。



第3図 100 mg/kg の DEC 腹腔注射後の mf 密度の時間的消長



第4図 500 mg/kg の DEC 腹腔注射後の mf 密度の時間的消長



第5図 DEC 投与後流血中 mf 密度が一時的に増加した例

(5) 第5図は DEC 投与後に血中 mf が一時的に増加する現象を示した例である。

b) 尾血, 肺, 肝内の mf 分布と DEC 投与によるその変動の観察

Litomosoides carinii に感染した cotton rat 14頭を用いた。14頭中の9頭は尾血 2.5 cmm の塗抹を終えて

直ちに屠殺した。そのあと前記の方法にしたがつて臓器内 mf の分布を求め、尾血中の mf 数と比較した。

解剖時の肉眼的所見は、No. 1, 2 はほぼ正常、No. 3, 4, 5 は慢性肋膜炎、No. 6 は慢性肋膜炎に肺炎併発の例であるが以上は飼育ケージの境板は飛び越し得たので非衰弱群とした。

No. 7 は病変は No. 6 と同様であつたが境板飛越が不可能になつた時期に屠殺した。No. 8, 9 は同様状態から自然斃死した例であり、これらを衰弱群とした。

14頭中他の5頭は DEC 投与例である。No. 10, 11, 12 は 100 mg/kg 1回投与例で No. 13, 14 は投与量の多い 500 mg/kg 2回投与の群である。投薬より屠殺までの時間はいずれの例も約 30 分である。

第1表は前記14例の示した mf の体内分布である。血中 mf 数を1とした時の肺、肝の mf 数について比較検討した。すなわち解剖時の肉眼的病理所見の軽度の例

第1表 末梢血、肺、肝における mf の分布とその変動

ラット 番号	末梢血		肺 100mg	肝 100mg	血	肺*	肝*
	2.50 mm	100 mg					
1	78	3,120	10,470	630	1	3.35	0.201
2	284	11,360	25,440	1,600	1	2.23	0.140
3	115	4,600	9,000	1,500	1	1.95	0.326
4	2,056	82,240	142,080	22,960	1	1.72	0.279
5	5,684	227,360	259,520	19,200	1	1.14	0.084
6	4,771	190,840	163,440	9,120	1	0.85	0.047
7	723	28,920	3,360	300	1	0.11	0.010
8	1,175	47,000	15,950	300	1	0.33	0.006
9	627	25,080	3,430	180	1	0.13	0.007
10	218	8,720	180,000	48,000	1	20.64	5.504
11	613	24,500	127,150	29,280	1	5.18	1.194
12	2,087	83,500	147,200	41,200	1	1.76	0.493
13	81	3,240	76,000	33,500	1	23.45	10.33
14	118	4,720	178,000	20,000	1	37.71	4.23

* 末梢血内 mf 密度を1とした時の比率

No. 1 は肺が 3.35 で肝が 0.201。No. 2 は肺が 2.23 で肝が 0.14、No. 6 の如く病理所見が著しくなると肺が 0.85。肝が 0.047 と低下し始め、衰弱群となるとこの傾向はさらに著しく強くなる。

DEC 投与に際しては反対に肺、肝臓における mf の値は高くなつていて、しかも薬用量の多い方が mf 数も多くなつていて。

肺、肝ともに mf 数は衰弱群、病変軽度群、DEC 少量投与群、大量投与群の順に多くなつていて。

次にいずれの臓器にこの変動が著しいかを比較すると病変軽度の群 No. 1-6 の肺の mf 数平均値を1とすると、衰弱群は 0.21 と減じ、DEC 少量投与群では 3.25、

大量投与群では 26.81 と増量している。しかし肝ではこの間の変動はさらに著しく病変軽度の群における肝の mf 数を1とすると衰弱群では 0.084 と強い減少を示したが、DEC 投与例では少量投与群で 13.767、大量投与群で 62.813 と激増した。肺、肝を比較すれば mf 数の変動は肝が著しい。

c) mf の染色性による生死判定と分布の変動

1) *Litomosoides carinii* の感染が成立して尾血に mf が証明される例を解剖して、その胸腔内の漿液を採取しギムザ液で染色鏡検すると、形態ならびに染色性の変化に富む多数の mf を認め得る。それらの mf について検討の結果、次のような分類を試みた。

第1期、虫体は S 字状に律動の様相をみせ、Sheath は明瞭で虫体内の核等内部構造もよく Azur II によつて染め分けられているものを第1期とした。虫体は正常に活動していたものとする。

第2期、虫体は真直かへの字程度に伸展し、sheath と構造等は明瞭に染め分けられているものを第2期とした。虫体は死んでいるか死後間もない状態とする。

第3期、虫体は伸展しており、内部構造が不明瞭となつて Eosin が強くなつているものを第3期とした。虫体は死後変化を起しているものとする。

第4期、虫体は伸展または破壊しており、淡紅色の sheath のみの場合もあり、内部構造がまったく不明瞭で、全体の色調が紅色をしているものを第4期とした。虫体の変性は進行しているものとする。

2) 胸腔内における mf 染色性変化の推移によつて前項各期の時間的経過を実験的に検討した。第2表は実験に供した9例の成績である。実験例の No. 1 は感染獣のショック死直後に採取した胸水にみられる mf の期別分布である。第1期の mf が 46% で著明に多く、2, 3期と順に減少して、4期になると 4% と急減している。

No. 2 は死後 12 時間氷室に保存してから材料を取つた。成績は第4期が最も多くなつてしたが、第2期が次に高かつた。No. 3, 4, 5 は 24 時間、No. 6 は 48 時間の氷室保存例である。

氷室保存の時間が長く、12 時間が 524 時間になると、第1期の mf はほとんど 0 になる。続いて 2, 3 期が増加する。No. 6 になると 2, 3 期も減少して 4 期が増量しており、mf は第1期から 2, 3 期を径て第4期に移行して消滅していく事が認められた。新鮮標本では第1期が最高の値を示すが、48 時間氷室保存すると第4期が最高値となり、12 時間と 24 時間保存例を併せ検討すると

第2表 胸腔内 mf の形態学的変化

ラット 番号	死因及び剖検 までの条件	投薬量 mg/kg	成虫		mf 密度		mf の形態学的分類型式								
			♂	♀	治療 前	治療 後	観察数	1		2		3		4	
								数 (%)		数 (%)		数 (%)		数 (%)	
1	ショック死, 直後剖検	500	195	176	379	—	400	184	46	116	29	84	21	16	4
2	死後12時間, 氷室保存	—	30	39	2,152	—	200	17	8.5	73	36.5	29	14.5	81	40.5
3	死後24時間, 氷室保存	—	23	22	28	—	300	4	1.3	115	38.3	138	46.0	43	14.3
4	死後24時間, 氷室保存	—	34	32	159	—	100	0	0	49	49	40	40	11	11
5	死後24時間, 氷室保存	—	8	10	403	—	100	0	0	42	42	54	54	4	4
6	死後48時間, 氷室保存	—	15	17	667	—	300	0	0	36	12	69	23	195	65
7	屠殺直後, 剖検	500×1	34	38	861	504	200	0	0	18	9	79	39.5	103	51.5
8	屠殺直後, 剖検	20×5 50×1	3	13	7,781	1,154	100	0	0	6	6	18	18	76	76
9	死亡直後, 剖検	20×5 50×1	58	71	1,537	373	100	0	0	4	4	9	9	87	87

No. 7 腹腔内投与後72時間で屠殺, No. 8 治療開始後10日で屠殺, No. 9 治療開始後7日で屠殺

第3表 肺肝組織内 mf の形態学的変化

ラット 番号	死因及び剖検 までの条件	投薬量 mg/kg	肺における mf の形態学的 分類型式 (%)				肝における mf の形態学的 分類型式 (%)					
			観察数	1	2	3	4	観察数	1	2	3	4
1	ショック死	—	30	42	46	12	0	30	10	50	32	8
2	氷室保存	—	30	8	70	20	2	30	22	66	10	2
3	氷室保存	—	30	0	70	30	0	30	0	25	55	20
4	氷室保存	—	30	0	10	60	30	30	0	5	55	40
5		150	30	0	10	80	10	30	0	40	50	10
6		150	30	0	30	50	20	30	4	34	46	16
7		100	30	0	10	70	20	30	0	20	60	20

各期毎の進行時間は約12時間内外となっている。

感染 rat に DEC を与えて尾血中の mf を減少させた後, 胸水を検査すると, 第1期の mf は認められなくなっているが, 血中の mf はことごとく第1期のものである。

No. 7 と No. 8, 9 では投薬量や投薬方法および検査までの時間等にはやや差があるが胸水内の mf の変性の段階はいずれも一定の進み方をしている。また第1期の mf がすでにかなり以前から胸腔に補給されなくなっている事が明らかとなっているが血中の mf はいまだ第1期の形態を保っていた。

3) 第3表は肺・肝のスタンプ標本から mf の形態, 染色性の変化を観察することによって体内分布の変動と mf の運命を検討した成績である。観察した mf の数はいずれも30匹づつである。臓器内の mf は非常に少かった。

No. 1 は DEC 500 mg/kg ip で15分後にショック死した例で第2表の No. 1 と同例である。第2表の実験では DEC の作用がそれほど早く胸腔内 mf に影響しているとは考えなかつたが, この実験では多少影響し始

めていると考えた方が正しい。その場合血中の mf は常に第1期の形態, 色調をしているから, No. 1 の場合 DEC の影響があるとすれば第1期の部分である。No. 2 は12時間氷室保存の例で, No. 3, 4 は48時間氷室保存の例である。48時間で第1期の mf は消失し2または3期が増加している。No. 5 は20 mg/kg 連日投与例で第2図のBである。5日間の連続投与で血中 mf は極度に減少した。第2表では No. 8 となっているが, 胸腔内 mf は第1期0, 2期6, 3期18で4期が76%であつたが, スタンプ標本では肺も肝も第1期0, 第2期は肺10肝40, 第3期は肺80, 肝50, 第4期は肺, 肝ともに少く10%であつた。No. 7 も大体 No. 5 と同じで第2図のAである。肺, 肝の mf 分布まで No. 5 と近い値を示している。No. 6 は第5図のBで200 mg/kg を5日間連続投与してもさらに50 mg/kg を6日目に投与しても血中 mf は著明な低下を示さなかつた例である。したがって肝に第1期の mf が認められている。そして No. 5, No. 7 に比べて第2期, 第3期の mf 数の間の差異が少い。

mf は胸腔内では血中にいるほど長くは生きない。胸

腔内で死んだ mf は 2, 3, 4 期と経て 48 時間内外で消失する。臓器内では血中 mf が多い時は第 1 期のものも多数認め得る。

第 2, 3 期の mf は第 1 期の mf がなくなった後にも認められる。臓器では第 4 期の像が少いのが特徴である。

考 察

この実験に使用した感染 cotton rat の経過は次のようであった。

cotton rat にイエダニをつけて *Litomosoides carinii* を濃厚に感染せしめると約 60 日の潜伏期を経て後に流血中に mf が現われ始め、徐々にその数を増して感染後約 120 日目から 180 日にかけて最高値を示し、その頃の流血 2.5 cm³ 中の mf 数は 1,000 から 7,000 に達する。しかしその値は時間とともに次第に下降し、270 日前後で宿主は斃死するものが多かった。この斃獣を解剖すると、多くの例で死因が慢性肋膜炎と散発的に繰返される肺炎によるものである事が確認された事について田坂(1965)が報告した。

さきに田中(1964)は cotton rat フィラリアには夜間定期出現性を認めないが、15 分間継続採血において mf 密度が不規則な変動をしたと報じた。しかしこの実験成績によると、DEC によつて明らかに流血中の mf の変動がみられた。佐藤(1960)は DEC およびマファルゾールを用いた実験で、DEC を投与すると流血中の mf 密度は急減するが、治療を中止すると再び増加する事を証明した。われわれの実験においても同じような成績が得られた。

結 論

Litomosoides carinii に感染した cotton rat の一部に種々な量の DEC を腹腔内に与え、その後の流血中および肺、肝等の臓器の mf 密度の変化を追求した。DEC の投与量は 1 回 10 mg/kg から 500 mg/kg とし、これを 1 回投与後すぐに屠殺観察したもの、少量を連日長期投与したもの等がある。

1) 尾血の mf 密度は DEC 投与後急速に減少し、通常 30 分後には最低に達するが、およそ数時間後には再び増加する。この場合薬量が大きいほど、減少率は大きく、薬量が小さいと回復時間が早く且つ投薬前の水準と大差ない程度にもどる傾向がみられる。長期間投薬すればその度に減少の傾向があるが、20 mg/kg 5 回程度の

薬量では mf の完全な消失はみられなかつた。

2) 血中 mf 密度と肺、肝のそれを比較すると、病変の軽度は感染獣の肺で血液よりやや高く、肝では約 1/10 程度であつた。病変が慢性にかつ悪化して衰弱期になると、両臓器ともその比が减小し、肺では約 1/4、肝では約 1/100 となる。DEC を与えると、その直後から血中の mf 密度の減少に応じて両臓器とも mf が増加し、その増加は DEC の薬量が多くなれば大となり、臓器では変動は肝に著しい。

3) mf は非治療群でも、とくに胸腔内では常時変性死亡を示す像がみられた。流血中および肺、肝内にみられる mf は概ね健全なもののみであつた。DEC 投薬後の肺、肝には、このような死後変性の像を示す mf が多くみられた。これにより DEC 投与後の mf は特に肝内で破壊されるものと考えられる。

終りに臨んで本研究は当研究部における *Litomosoides carinii* の共同研究の一部をなすもので協力を得た当研究部の 佐々学教授、林滋生助教授、神田鍊蔵博士、長沢ヤエ子氏に深謝する。

文 献

- 1) Brown, H. W. & Williams, R. W. (1945) : A method for counting the microfilariae of *Litomosoides carinii* of the cotton rat. *Amm. Jour. Trop. Med.*, 25(1), 67-69.
- 2) Hawking, F., Sewell, P. & Thursron, P. (1950) : The mode of action of Hetrazan on filarial worms. *Brit. Jour. Pharmacolog.*, 5, 217-238.
- 3) 佐藤孝慈 (1959) : cotton rat を用いた糸状虫症化学療法の実験的研究. (1) スパトニン及びマファルゾールの流血中マイクロフィラリア数に及ぼす影響. *寄生虫誌*, 8(6), 962-971.
- 4) 佐藤孝慈 (1960) : cotton rat を用いた糸状虫症化学療法の実験的研究. (2) スパトニン及びマファルゾールの成虫に及ぼす影響. *寄生虫誌*, 9(1), 22-31.
- 5) 田中英文 (1964) : フィラリア実験動物としての cotton rat に関する研究. (3) 糸状虫症化学療法の実験的研究, 特に Diethylcarbamazine の影響について. *寄生虫誌*, 14(1), 1-5.
- 6) 田坂定晴 (1965) : 実験的コトナラット糸状虫症の病理組織学的研究. *寄生虫誌*, 14(5), 414-425.
- 7) 若杉幹太郎 (1955) : コトナラット糸状虫 *Litomosoides carinii* に関する研究. 第 1 報 実験室内に於ける累代感染法について. *寄生虫誌*, 4(4), 375-379.
- 8) 若杉幹太郎 (1958) : コトナラット糸状虫 *Litomosoides carinii* に関する研究. 第 2 報 糸状虫感

染コトナラットの感染経過及び病変について. 寄生虫誌, 7(1), 78-83.

- 9) 若杉幹太郎(1958): コトナラット糸状虫 *Litomosoides carinii* に関する研究. 第3報 成虫及びマイクロフィラリアの形態とイエダニ体内におけ

る幼虫の発育について. 寄生虫誌, 7(5), 66-74.

- 10) Wharton, D. R. A. (1947): Pathological changes in natural and experimental filariasis in the cotton rat. Jour. Infect. Diseases, 80, 307-318.

Abstract

STUDIES ON THE DISTRIBUTION OF THE MICROFILARIAE OF *LITOMOSOIDES CARINII* IN THE COTTON RAT BEFORE AND AFTER DIETHYLCARBAMAZINE ADMINISTRATIONS

GENZO MITSUI, SADASHIGE SAKUMA, SADAHARU TASAKA
& HIDEFUMI TANAKA

(Department of Parasitology, the Institute for Infectious Diseases,
the University of Tokyo)

Comparative studies were made on the microfilarial densities of *Litomosoides carinii* in the blood and in visceral organs of cotton rats before and after intraperitoneal administrations of various doses of diethylcarbamazine.

Specimens were prepared by making smears of 2.5 mm³ samples on the slides taken from the tail blood or from the homogenates of various organs and examined after stained with Giemsa solution.

Nine untreated cotton rats of various infection stages were dissected and examined. In the two rats at the acute stage and without recognizable macroscopical changes (No. 1 & 2), the microfilarial density of the lung was about three or two times higher than the blood while that of the liver was about one fifth. The relative densities of the both organs were found to drop as the disease became more chronic and the pathological changes were more pronounced, and the ratios of the lung and the liver in three fatal cases (No. 7, 8, 9) were 0.25 and 0.009 in the average.

Intraperitoneal administrations of diethylcarbamazine cause immediate drops in the microfilarial density of the blood. In small doses such as 10 mg/kg, the drops were slight and were followed by the increase to the previous levels within several hours. In larger doses such as 100 mg/kg and 500 mg/kg, the decrease in the blood densities were more pronounced and of permanent nature. At the dissections after administrations of the drug at the doses 100 mg/kg once or 500 mg/kg twice i. p., remarkable increases in the densities in the liver and the lung were always demonstrated corresponding to the drops in the blood stream. The relative indices in the increase were higher for the liver than for the lung.

Morphological changes relative to the deaths and destructions of microfilariae in the pleural cavity, in the liver and the lung before and after the drug treatments were studied. As a sign of immunity against the parasite, microfilariae were estimated to be killed partly in the pleural cavity after produced and liberated from the mother worms.

The destruction of the microfilariae were seen in the lung and especially in the liver after the hosts were treated with the drug. The drug was found to be also effective in reducing or eliminating the production of new microfilariae by the mother worms in the pleural cavity.