

日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究

(2) Circumoval Precipitation Test (COPT) に使用する感染マウス 臓器内虫卵の分離集卵法について

横 川 宗 雄 佐 野 基 人

千葉大学医学部寄生虫学教室

(1966 年 7 月 25 日 受領)

はじめに

著者らは先に日本住血吸虫症の miracidium immobilization test (MIT) について種々検討を加えた結果、本反応は日本住血吸虫感染家兎の血清に対して、或る程度特異的に出現するといえるが、これと非特異的反應との区別は必ずしも容易でないことを報じた。すなわちミラシジュームの運動は感染家兎血清中では明らかに抑制されるが、このような抑制現象は正常血清中でもみられるので(多少の時間的ずれはあるが)実際の判定に当つては両者の区別が必ずしも容易でないことを明らかにした。

本研究では最近マンソン住血吸虫症の診断によく用いられている Oliver-Gonzalez らの考案になる circumoval precipitation test (COPT) を日本住血吸虫症の診断に応用するため、まず抗原として使用する日本住血吸虫卵の採集法その他についての検討を試みた。すなわち虫卵を日本住血吸虫感染マウスから採集する場合、その採集時期、採集部位及びその消化分離法などについて種々の点から検討を加えた。その結果、COPT の抗原としてもつとも適当と思われる虫卵の採集時期、部位及びその分離法などについて 2~3 興味のある所見をえたので以下に報告する。

実験材料と実験方法

実験に用いたマウスは DDD 系で、感染は皮下注射によつた。すなわち福岡県筑後川流域で採集した自然感染宮入貝を破碎してセルカリアを分離した。感染に当つては 3 コ以上の感染貝からえたセルカリアをよく混合させ、マウスの体重 1g 当りセルカリア一匹の割で皮下に注射した。

感染後のマウス体内各臓器内の虫卵の分布及びその發育状況を観察するため、感染後 18 日から 70 日までの間に 2 日乃至 4 日おきにマウスを殺し、臓器内及び便内の虫卵を観察した。

マウスの肝臓或いは腸組織内の住血吸虫卵を分離集卵するには所謂人工消化法を用いた。

人工消化法としては pepsin 及び trypsin 法の他に trypsin と collagenase を併用する Scorza(1961)の方法等の 3 法を比較検討のため同時に試みた。

それぞれの消化液の処方 Table 1 に示した如くである。また人工消化法による集卵法は次の如くである。同時に感染させた同一時期のマウス 3 匹の小腸と肝臓をそれぞれにとりまとめ、これを鉢で細切した後それぞれ 3 等分し、おのおのに上記 3 種の消化法を試みた。すなわち組織とほぼ等量の消化液を加えたのちホモジナイザー (3,000 rpm) に 3~5 分かけ、37°C 孵卵器に 3 乃至 4 時間保つた後、再びホモジナイザー (1,000 rpm) に 1 分間かけてから、ガーゼ 2 枚で濾過し、その濾液を 2,000 回転、1~2 分間遠心沈澱した。その沈査には N/10 NaCl 液を加えよく混和した後再び遠心沈澱した。この操作を 4 乃至 5 回繰返して完全に消化液を除いた後、N/10 NaCl 液を加え 5°C の冷暗所に保存し、随時実験に使用した。

なお保存期間中は 2 乃至 3 日おきにその保存液を交換した。保存液中の虫卵は経時的にその形態観察を行うと共に孵化法を試みてその生死の状況を観察した。

実験成績

1. 日本住血吸虫感染マウスの組織内における虫卵の分布と發育

COPT を実施するに当つてはその抗原とすべき日本

Table 1 Prescription of digesting solutions

Trypsin solution	Scorza's solution	Pepsin Solution
1/15 Na ₂ HPO ₄100 cc trypsin.....0.1 g	1/15 Na ₂ HPO ₄100 cc trypsin0.1 g collagenase 5,000VUM	pepsin.....0.1 g HCl.....0.7 cc dis. water100 cc

Table 2 Distribution and development of *Schistosoma* eggs in the tissues of the mice infected with *S. japonicum*

Organs examined	Days after infection													
	18	20	22	24	26	28	30	32	34	38	42	46	60	70
lung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊕	+	+
spleen	0	0	0	0	0	0	0	⊕	⊕	⊕	+	+	+	+
liver	0	0	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	+	+	+	+	+
intestine	0	0	0	0	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	+	+	+	+
stool in rectum	0	0	0	0	0	0	0	⊕	+	+	+	+	+	+

+.....mature egg

⊕.....immature egg

Number in parenthesis shows the percentage of mature eggs among the total eggs examined.

住血吸虫卵が常に容易に手に入ることが望ましいが、それにはマウスが一番適当な動物であると考えた。

そこで、日本住血吸虫に感染したマウスを経時的に殺してその小腸、肝、肺及び脾内の虫卵を一定の方法で集め、その集卵の状況及び発育の状況を比較観察した。

その結果、Table 2 に示した如く、感染後18日では抱合雌雄虫体が見出されたが、雌の子宮内には未だ虫卵の形成は認められなかった。

20日後に虫卵は子宮内に認められたが、いまだ宿主臓器内には虫卵は見出されなかった。

感染後22日に至り初めて肝臓から少数の未成熟虫卵が認められた。

ついで26日には小腸壁から、32日には脾臓からそれぞれ未成熟虫卵が認められた。

成熟虫卵(ミラシジウム包蔵卵)がはじめて発見されたのは、肝では感染後32日、小腸壁及び小腸内容中では34日、脾では42日であった。

なお、白色の虫卵結節が認められたのは肝では感染後25日、小腸では42日、脾では44日以後であった。

成熟虫卵が最も多く認められたのは肝と小腸であるが、肝では感染後34日では集卵された全虫卵の34%が成熟卵であった。小腸では感染後42日目では成熟卵は全虫卵の39.0%をしめていた。

しかし、感染後70日をこえると組織内の虫卵は増加

するが、組織の反応も顕著となり、特に肝では虫卵周囲の組織反応が強く、変性死卵も増加して来た。

従つて成熟虫卵を臓器組織から集めるにはマウスでは感染後40日から50日前後が最も適当と思われる。

2. 各種人工消化法による虫卵の分離能の比較

日本住血吸虫の成熟卵を最も能率的に集めるには感染後40日乃至50日を経過したマウスの肝及び小腸から集めるのがもつとも良いことがまず明かにされた。

そこで次に組織から虫卵を人工消化法によつて分離する場合、もつとも効果的でしかも虫卵に対する影響がもつとも少い方法について比較してみた。すなわち感染後40日を経過したマウスの肝及び小腸を trypsin 法、pepsin 法と trypin に collagenase を併用する Scorza 氏法の3者の方法により消化し、その集卵状況と虫卵に対する影響を比較した。

なお感染後70日と100日をそれぞれ経過したマウスの臓器についても同様な消化試験を行なつた。

その結果は Table 3 に示した如く、感染後40日のものではいずれの方法でも臓器組織はよく消化され、集卵状況にも殆んど差がなくまた集卵された虫卵にも消化液による影響は殆んど認められなかった。

すなわち人工消化法により得られた虫卵は、その卵殻周囲の附着物質はすべて除かれその棘も明瞭に認められ内部のミラシジュームの運動も正常であつた。

Table 3 Comparison of the longevity* of the *Schistosoma* eggs at 5°C isolated from the liver and intestine of the mice** with three kinds of digestive solution

Days	Trypsin		Trypsin with collagenase		Pepsin	
	Liver	Intestine	Liver	Intestine	Liver	Intestine
2	alive	alive	alive	alive	alive	alive
3	"	"	"	"	died	died
10	"	"	"	"		
20	"	"	"	"		
40	"	"	"	"		

* Miracidium hatching method was used in addition to the microscopical examination.

** 40 days after infection with *S. japonicum*.

然しこれらの虫卵を保存した場合の生存期間について比較したところ、かなりの差異がみられた。すなわち5°Cの冷暗所に保存し、保存液を交換し乍ら40日間観察を行なった。その結果、trypsin及びScorza氏両法でえられた虫卵は40日の観察期間中何ら異常は認められず、卵内のミラシジウムは生存し焰細胞の波動も明かに認められ、また孵化試験でも両法でえられた成熟卵はすべていまだ孵化能力のあることが認められた。

しかしながら pepsin 法により集められた虫卵は5°Cで1~2日保存しただけですでに卵内ミラシジウムの運動は不活発となり、3日目にはすべて死滅してしまった。

感染後70日以上を経過したマウスの臓器を消化した場合は何れの方法でも卵殻周囲の附着物が完全に消化されていない虫卵が多数見られ、100日以上を経過したものは臓器組織そのものの消化が悪くなるためか分離されてくる虫卵数が著るしく減少して来た。

なお、一般的にいつて肝では分離された虫卵中に未熟卵或いは変性卵の含まれてくる率が小腸組織内のそれに比して比較的高いような傾向がみられた。

考 察

著者らは日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究として、先に miracidium immobilization test を行なった結果、判定基準その他に問題があり、日本住血吸虫症の診断法としてはいまだ実用的段階には至っていないと考えた。

最近 Oliver-Gonzalez(1957) は Manson 住血吸虫症の診断法として虫卵沈降反応 (COPT) が極めて価値のあ

ることを報告している。

そこで著者らは本反応を日本住血吸虫症に試みるに先立つて、まずその基礎となるいくつかの条件について検討を加えた。

その結果 COPT に用いる日本住血吸虫卵は感染動物の便から集めるよりは、感染マウスの肝及び小腸組織内の虫卵を人工消化法により集めるのがもつとも容易であることを明らかにした。

なお、感染マウスの組織から虫卵を集める時期についても検討を加えた結果、肝及び小腸では感染後40日から50日の間がもつとも適当でそれ以上を経過すると虫卵数は増加するが虫卵周囲の附着物の完全消化が困難となり、70日以上を経過すると組織の消化が不良となり虫卵の分離が困難となってくる。

なお組織内の虫卵の分離法に関しては、人工消化法を用いずともただ単に臓器組織を鉗で細切しただけでも可成り多数の虫卵を集めることができ、しかもこれらの虫卵は5°Cに保存すれば8週間に亘って生存させ得るといふ報告もある。(Newsome, 1957; Oliver-Gonzalez, 1963)。

しかしこの方法では分離される虫卵の数は人工消化法に比べれば著しく少い。また卵殻周囲の粘液も必ずしも充分には除かれなことは明らかである。ただ人工消化法を用いた場合に消化液の虫卵に及ぼす影響がもつとも重要な点であるが上記3種の方法では虫卵の分離能には著るしい差はみられなかつたが、pepsin 法により分離された虫卵は短時日の間に死滅することが明らかにされた。しかし trypsin 及び Scorza 氏法により分離された虫卵は何れも40日間以上は保存液中で生存し、充分実験に使用しうることが明らかとされた。分離能及び生存期間にも両者の間に差がないとすればもつとも簡単な trypsin 消化法で充分であるといえよう。

Benex(1960) は Manson 住血吸虫卵の分離に pepsin 法を用いたところ液の酸性が強いためか、すぐミラシジウムが死滅する傾向があり、人工消化法としては papain 或いは trypsin 法の方がすぐれていると報じているが、この点我々の成績とよく一致しており興味深い。

ま と め

著者らは COPT に使用する虫卵の採集方法を検討する目的で日本住血吸虫感染マウスの体内臓器における虫卵の分布とその發育状況を観察すると共に、組織内虫卵の人工消化法による分離を試みて次の様な結論をえた。

1) 日本住血吸虫感染マウスでは、成熟卵が認められるのは肝では感染後32日、小腸では34日、脾では42日であった。便中には34日後から成熟卵がみられた。

2) 組織内虫卵の分離には trypsin 液, trypsin に collagenase を加えた Scorza 氏液及び pepsin 液の3種の人工消化液を用いた。その結果はいずれの方法でもよく虫卵が分離されたが、pepsin 液により分離された虫卵は分離後短時間で死滅した。しかし trypsin 及び Scorza 氏液で分離されたものは分離後5°C では40日間生存していた。

3) 虫卵を採集する臓器としては、肝及び小腸がもつとも適当であるが、感染後70日以上を経過すると虫卵周囲の組織反応が著明となり、消化分離が困難となるので、虫卵の採集時期は感染後40日から50日の間がもつとも理想的である。

文 献

- 1) Benex, J. (1960) : Preservation of live eggs of *Schistosoma mansoni*. Trop. Dis. Bulletin, 58 (3), 334-335.
- 2) Benex, J. (1960) : Practical method of recovering *Schistosoma* eggs by enzymatic digestion. Trop. Dis. Bulletin, 58 (3), 337.
- 3) Coit, M. C. (1965) : A revised method for isolation of *Schistosoma mansoni* eggs for biological experimentation. Proc. Soc. Exper. Biol. Medicine, 92, 780-782.
- 4) 宮川米次 (1916) : 種々の物理学的及び化学的刺激に対する日本住血吸虫卵子の变化並に同虫卵の栄養について。東京医学会誌, 26(16), 1-20 ; 26(17), 11-27.
- 5) Moore, D. V. & Carandall, R. B. (1963) : Studies Schistosomiasis XX. Further studies on the immunologic significance of *Schistosoma mansoni* egg in albino-mice when subjected to homologous challenge. J. Parasitology, 49(1), 117-120.
- 6) 中山平次郎 (1910) : 宿主の組織内における日本住血吸虫卵の発育並に日虫症における組織変化について。福岡医大誌, 3(3), 11-110.
- 7) Newsome, J. (1957) : Storage of live schistosome eggs. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 51(4), 229-300.
- 8) 織田卓五郎 (1959) : 日本住血吸虫症における組織内虫卵の運命及び組織変化に関する研究。久留米医学会誌, 22(1), 185-216.
- 9) Oliver-Gonzalez, J. (1957) : Anti-egg precipitin in the serum of human infected with *Schistosoma mansoni*. J. Infect. Dis., 96(1), 86-91.
- 10) Ritchie, L. S. & Berrios-Durand, L.A. (1961) : A simple procedure for recovering schistosome eggs in mass from tissues. J. Parasitology, 47 (3), 363-365.
- 11) 桜林満治 (1955) : 日本住血吸虫卵による組織病変の成立に関する研究。慶応医学会誌, 32(11), 459-466.
- 12) Scorza, J. V. (1961) : Eine neue Methode zur Isolierung von *Schistosoma japonicum* Eier durch Enzyme. Zeit. Tropenm. und Parasitologie, 12, 196-207.
- 13) Smithers S. R. (1960) : The isolation of viable schistosome eggs by a digestion technique. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 54(1), 68-70.
- 14) 杉浦三郎 (1932) : 日本住血吸虫卵に関する知見補遺。東京医事新報, 2806, 2718-2721.
- 15) 田中和男・伊藤二郎・横川宗雄・佐野基人 (1951) : 日本住血吸虫症に関する研究 (1), 日本住血吸虫卵の各種動物における感染実験, 特に糞便内虫卵の排出状況。公衆衛生, 10(2), 1-3.
- 16) Vogel, H. (1942) : Ueber Entwicklung Lebensdauer und Tod den Eier von *Bilharzia japonica* in Wirtsgewebe. Deut. Tropenmed. Zeitschrift, 46, 57-91.
- 17) Weinmann, C. T. (1961) : Studies on schistosomiasis XVI. The effect of immune serum upon egg production by *Schistosoma mansoni* in mice. Exper. Parasitology, 11, 56-62.
- 18) 横川宗雄・佐野基人 (1966) : 日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究 (1), Miracidium Immobilization Test (MIT) について。寄生虫誌, 15(5), 389-393.

Abstract

IMMUNOSERO-DIAGNOSIS OF SCHISTOSOMIASIS JAPONICA
II. ISOLATION TECHNIQUES OF THE *SCHISTOSOMA* EGGS FROM
THE TISSUES FOR CIRCUMOVAL PRECIPITATION TEST

MUNEO YOKOGAWA & MOTOHITO SANO

(Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan)

The isolation techniques of *Schistosoma* eggs from the tissues of the mice experimentally infected with *Schistosoma japonicum* for circumoval precipitation test were studied.

The results obtained are as follows :

1) The liver and intestine of the mice seemed to be the most favorable organs for the isolation of the *Schistosoma* eggs with the digestion technique. The suitable period for the isolation of the eggs from the tissues of the mice is from 40 to 50 days after infection.

2) Among the digestion techniques using pepsin, trypsin and trypsin with collagenase solutions, the pepsin solution was found to be quite detrimental on the longevity of the isolated eggs.

No difference was found in the isolation capacity of the eggs from the tissues and the longevity of the isolated eggs between the trypsin and trypsin with collagenase solutions.