

フィラリア感染コトナラットの補体結合反応価と 間接赤血球凝集反応価の経時変化について

石井 明 田中 寛 藤田 紘一郎
神谷 正男 松田 肇 小林 準三

東京大学医科学研究所寄生虫研究部

(1968年7月15日 受領)

はじめに

フィラリア症に関する免疫学的研究は、診断的見地からのみを観ても、おびただしい研究報告があり、Kagan (1963)によれば、1916年から1962年までに、少なくとも百数十の文献がある。しかし、そのほとんどは動物フィラリアに由来する抗原を人間に用いた成績であり、人フィラリアを用いたものとしては *Wuchereria bancrofti* のマイクロフィラリアが感染した組織などを抗原に用いた少数の報告があるにすぎない。動物フィラリアについても、固有宿主の抗原・抗体反応について研究したものは数少ない。我々は、コトナラットを飼育繁殖せしめ、イエダニを中間宿主として、コトナラットフィラリア *Litomosoides carinii* の感染動物を多数に生産している。コトナラットは closed colony として性状がかなり温和になり、他の寄生虫感染の制御にも成功しているので、実験フィラリア症の免疫学的研究材料としても有用と考え、この研究を行った。

コトナラットフィラリア感染の免疫学的側面については、Scott ら一派が主に成虫の成長抑制を指標にして研究したが (Scott, 1958; Bertram, 1966) この報告はフィラリア感染における宿主の反応の免疫学的研究の1つとして補体結合反応と間接赤血球凝集反応を用いて、主にその経時変化を追跡した成績について述べる。

材料と方法

当研究部で繁殖飼育したコトナラット *Sigmodon hispidus* の生後約4週間のものを用いた。このコトナラットのコロニーについて、寄生虫学的に検査した。感染コトナラットを吸血後18日目のイエダニ *Ornithonyssus bacoti* を30匹解剖し、ダニ内の感染幼虫を算定し、累積百分率を求めた上、正規確率紙上で平均感染幼虫数を求めた処、ダニ1匹当たり2.5匹であった。この群のイエダニ

は30匹をコトナラット1匹に着ダニしたので、コトナラット1匹に平均75匹の感染幼虫をつけたことになった。コトナラット10匹を無作為に分けて7匹を感染群とし、残り3匹を対照とした。コトナラットは個別のケージに入れ、略25°Cの室内におき、水、固型飼料を自由に摂取させ、時折生野菜を与えて飼育した。

2週間毎に、コトナラットの尾端を穿刺し出血せしめて、血液2.5mm³をメランジュール型ピペットで2回とり、2本の線としてスライドガラス上に塗りマイクロフィラリア (以下 Mf と略す) 数を算定した。メタノール固定後、ギームザ氏液又はフィールド氏液で染色し、2本の線上の Mf 数を平均した。

同じく2週間毎に、尾端から採血し、長さ9cmのCRP検査用ガラス毛細管に血液をとり、一端を火焰で封じたのち、ヘマトクリット検査用遠心機にて、10⁴rpm 5分間遠心して血清を分け、-20°Cに保存した。又一部は採血用濾紙 (東洋濾紙) に採血し冷蔵した。これら保存血清は32週終了後、毛細管を用いて、生理的食塩水で8倍に希釈した。採血濾紙は生理的食塩水0.32mlに浸し室温に60分間放置し、これを8倍希釈液として用いた。これら希釈液は60°C20分間の熱処理を行ったのち、冷蔵庫に保存した。保存中に沈殿を生じたものは、3,000rpm 15分間の遠心を行った。

補体結合反応は Tanaka *et al.* (1968b) の開発したマイクロタイターによる微量法を用いた。Alsever 氏液に保存した綿羊赤血球をゼラチン加バルピタル緩衝食塩水 (A液 NaCl 42.5g, バルピタル 2.875g, 溶性バルピタル (Na 塩) 1.785g, CaCl₂ 0.083g, MgCl₂·6H₂O 0.498g, 蒸溜水 1,000ml, B液ゼラチン 1g, 蒸溜水 500ml, A液 200ml, B液 100ml に蒸溜水 700ml を加えて用いる。以下 BGS と略す。) で3回洗滌し、分光光度計で溶血度を指標にして 10⁹ cell/ml の浮遊液を調製した。溶血素は市販品 (東芝化学) を用い、力価を測定し

たのち、0.2% フェノール加生理的食塩水で希釈し冷蔵庫保存した。試験管法で測定した4単位の溶血素を等量の赤血球液に加え、37°C 20分間反応させ、これを感作血球（以下 EA と略す）とし、BGS で9倍に希釈して用いた。補体は凍結乾燥したモルモット血清（東芝化学）をグリーン氏液で溶かし、力価をマイクロタイター板にて測定し、3正単位の希釈倍数を求めた。同時に50%溶血法により力価測定した処、4.8C'H₅₀/ml であったので、毎回50%溶血法で補正した。検査血清を BGS で系列希釈し、補体3正単位（即ち 4.8C'H₅₀/ml）を1滴加え、抗原を1滴入れた上湿潤箱に入れ、4°C 1晩反応させた。翌朝室温に戻したのち、EA を2滴加え混和して、37°C 60分間反応させ、更に室温に3時間放置してから成績を判定した。反応は5段階に分けて判定し、3を終点とした。抗原を欠く対照で各検体の抗補体作用を検し、抗体を欠く対照1つで抗原の抗補体作用を検した。

抗原は *Litomosoides carinii* 成虫の Coca 抽出液を用い、重曹は0.05%にした。抗原調製は Davies らが住血吸虫に用いた方法 (Kagan & Pellegrino, 1961) に準じた。抗補体作用を避けるために、虫体乾燥重量の8,000倍で使用した (田中ら, 1968b)。

標準血清には、兎を成虫抗原で免疫したものを使用した。*Litomosoides carinii* の成虫を磨砕し乾燥虫体重量の100倍量生理食塩水にとき、初回 0.5ml を兎に静脈注射し、週2回繰返し、最後は 2ml とし、合計8回の注射をした。これは人O型赤血球を用いた間接赤血球凝集反応で24,000倍であり、沈降価は4倍であった。

間接赤血球凝集反応（以下 HA と略す）はほぼ Jacobs & Lunde (1957) がトキソプラズマ症に用いた方法、Tanaka *et al.* (1968a) がコトナラット糸状虫症に用いた方法に準じたが、これを緬羊赤血球を用いたマイクロタイター法に変えた。試験管法で大略の見当をつけたのち、マイクロタイター法で使用する抗原と標準血清の濃度をボックスタイトレーションして調べた処、抗原8,000倍、標準血清6,000倍が適当な値となった。タンニン酸濃度は抗原8,000倍において同様のボックスタイトレーションして35,000倍と決定した。Alesver 氏液保存の緬羊赤血球をリン酸緩衝生理的食塩水 (pH 7.2, 以下 PBS と略す) で3回洗い、2.5% 浮遊液を調製し、等量のタンニン酸溶液を加えて37°C 15分間処理したのち、再び洗い、次に生理的食塩水で浮遊させ、抗原液を等量加えて、室温20分間反応させた。反応終了後0.6% 正常兎血清加リン酸緩衝生理的食塩水 (pH 7.2, 以下 NRS と略す)

で2回洗った上、同液に再浮遊させた。最終的には2.5% 赤血球液の1.5倍量に浮遊した。検体を NRS で4倍系列希釈し、感作赤血球を1滴加え、よく混和し、室温3時間又は4°C 1夜放置反応させたのち判定した。判定は5段階に分けて、2を終点とした。ここに用いた抗原は、*Litomosoides carinii* の成虫を磨砕し、更に超音波破壊を行ったのち、PBS で抽出したもので、虫体乾燥重量の5,000倍を使用濃度とした (Tanaka *et al.*, 1968a)。タンニン酸処理赤血球に抗原を反応させない対照をおき、各検体について非特異凝集を検査した。

コトナラット血清が緬羊赤血球を非特異的に凝集するか否かを検するために、次の方法をとった。羊赤血球を PBS で3回洗い、NRS で2.5% 液に調製して、血清は NRS で4倍系列希釈した。希釈血清 0.2ml、羊赤血球液 2.5% を1.5倍したもの 0.2ml に NRS 0.6ml を加え、37°C 1時間反応させた。これらの血清について、羊赤血球を用いたマイクロタイター法で HA 価を測定した。

成 績

使用したコトナラットのコロニーについて寄生虫学的に検査した処、糞便直接塗抹検査100例の全例が陰性、糞便培養検査100匹の全例が陰性、尿中の虫卵検査100匹の全例が陰性で、10例の解剖検査で胸腔腹腔臓器に寄生虫を認めなかった。

感染させたコトナラットは、感染後8週から32週の間ですべて死亡したが、非感染コトナラットはすべて32週以上生存した。Mf は感染8週後には血流中に見出され、死亡に至る迄陽性であった。死亡した場合は可能な限り病理解剖して胸腔から成虫をとり出し、その数を検査した。これらの成績を Table 1 に示した。

補体結合反応の成績は、非感染対照の3匹は全期間を通じて1:16以下の陰性であった。感染群の補体結合価を表に示した。この他8週で死亡した1例は6週迄16倍以下で8週になって128倍陽性となった。フィラリア感染後4週目頃から補体結合価の上昇がみられ、遅くとも10週目には上昇した。補体結合価は最高128倍希釈に迄なった。血中に Mf が検出されても、補体結合価が低下したものがあつた。又 Mf の絶対数が多いことと、補体結合価の高低は一致していなかった。コトナラット No. 01, 03 においてはむしろ Mf 数が上昇すると、補体結合価が低下する傾向さえ観察された。死亡時期に補体結合価の低下するものがあつた。

間接赤血球凝集反応の成績の一部を Table 1 に示し

Table 1 Progressive changes in titers of complement fixation test and indirect hemagglutination test in some cotton rat with filaria infections

| Cotton rat # | 01 | | | 02 | | | 03 | | | 04 | | | 07 | | | 09 | | |
|--------------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-----|-------|-------|-----|--------|-------|------|-------|------|------|-------|
| | Mf | CF | HA | Mf | CF | HA | Mf | CF | HA | Mf | CF | HA | Mf | CF | HA | Mf | CF | HA |
| 0 | - | <16 | x | - | <16 | <16 | - | <16 | / | - | <16 | / | - | <16 | x | - | <16 | <16 |
| 2 | - | ≤16 | ≤16 | - | <16 | <16 | - | <16 | <16 | - | <16 | <16 | - | <16 | x | - | <16 | ≤16 |
| 4 | - | <16 | ≤16 | - | 32 | 1,024 | - | <16 | 3,072 | - | <16 | 1,024 | - | <16 | x | - | 16 | ≤16 |
| 6 | - | <16 | 2,048 | - | 16 | 512 | - | <16 | 1,024 | - | <16 | 1,024 | - | <16 | <16 | - | 128 | 256 |
| 8 | 47 | ≤16 | x | 19 | 32 | 2,048 | 35 | <16 | 64 | 6 | <16 | <16 | 51 | 64 | / | 92 | ≤16 | / |
| 10 | 496 | 64 | <16 | 144 | 64 | 2,048 | 685 | 32 | 64 | 213 | 128 | 768 | 158 | 128 | 512 | 550 | <16 | 4,096 |
| 12 | 1,092 | 32 | / | 261 | 128 | 2,048 | 1,144 | 32 | / | 471 | 64 | 3,072 | 1,102 | - | | ♂56, | ♀51. | |
| 14 | - | <16 | | 417 | 64 | 4,096 | 1,338 | 32 | 256 | 458 | 128 | 4,096 | 1,844 | 128 | 1,024 | | | |
| 16 | ♂67, | ♀65. | | 1,078 | 64 | 2,048 | 2,380 | 16 | 1,024 | 587 | 128 | 16,400 | 949 | 128 | 256 | | | |
| 18 | | | | 778 | 128 | 2,048 | 3,933 | <16 | 256 | 1,069 | 128 | 32,800 | ♂78, | ♀77. | | | | |
| 20 | | | | 564 | 32 | - | 2,306 | <16 | x | | | | | | | | | |
| 22 | | | | 249 | 16 | x | 3,962 | <16 | 256 | | | | | | | | | |
| 26 | | | | 316 | 64 | x | | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | 288 | 16 | 2048 | | | | | | | | | | | | |
| 30 | | | | 286 | 16 | / | | | | | | | | | | | | |
| | | | | ♂17, | ♀24. | | | | | | | | | | | | | |

Note: Mf.....number of microfilariae/2.5 mm³.

.....examination not conducted.

CF.....complement fixation test.

HA.....indirect hemagglutination test.

♂ ♀.....number of adult worms recovered at autopsy.

x.....omitted because of non-specific agglutination.

/.....omitted because of absence of tanned-cell control.

た。血清希釈最高32,800倍迄に陽性反応がみられた。感染後4週から6週で陽性反応を示した。非感染群は、全期間を通じてほとんどが16倍以下であったが、若干例が偽陽性を呈した。いくつかの検体は16倍希釈で非特異凝集を起したが、タンニン酸処理のみの対照に検体量の不足したものも含めて、これらは除外した。感染初期に反応を示したり、感染が確実である時期に低い反応価を示したものがあったので、実験を繰返した処、抗原のロットが変わったせい、再現性は完全でなかった。

コトラット血清の羊赤血球に対する非特異凝集の有無について検した結果、非感染血清4例、感染血清10例を60°C 20分間熱処理したもの、及び非感染血清12例と感染血清2例で56°C 30分間熱処理したもの、すべてに非特異凝集はみられなかった。37°C 1時間反応後で2倍希釈血清の11例に1又は2の弱い凝集を生じたが、4°C 1晩放置後ですべて陰性であった。この血清のHA価は感染血清の内、4,096倍が1例、1,012倍が2例、256倍が1例、128倍が1例、64倍が1例、16倍が3例、4倍が1例で4倍以下が2例であり、非感染血清の内、8倍が5例、4倍が2例で4倍以下が8例であった。感染血清と非感染血清のHA価の間には明らかな差異を

認め、非感染血清に偽陽性はなかったが、少数例に偽陰性をみた。

考 察

コトラットにおけるフィラリア感染では4週目頃にフィラリアは成虫となり、8週目頃からコトラットの末梢血中にMfが出現する(田中, 1964; 神田・田坂, 1966)。この実験で補体結合反応価の上昇が4週から10週目頃にみられたのは、成虫を抗原としたことから当然予想される結果であった。したがって感染初期では、成虫抗原を用いた補体結合反応により感染を証明することはできなかった。Mfが血中に増加しても、必ずしも補体結合価が上昇する結果は得られず、むしろ低下するものがあったが、Tanaka *et al.* (1968a, b) は抗体価とMf数の間に相関が低い事を報告している。いくつかの例においては、感染の進行後、死亡前に至って補体結合価が低下した。補体結合反応で陽性反応ならば、感染を推定できたが、陰性反応で感染を否定することはできなかった。

間接赤血球凝集反応の結果には、解釈に困難を与える点があった。非特異凝集について Daminn & Weller

(1945)は人フィラリア症患者血清の114例中45例に羊赤血球を凝集する異好抗原を検出したと報告しているが、この実験においては、コトナラット血清には、羊赤血球を凝集する異好抗原を検出できなかった、これは除外できた、1つの原因としては方法自体の感度が高いだけに非特異の要因が入り易い事がある。微量の血清を保存し、希釈したために、かなりの検体が溶血ないし血球を混じ、熱処理したのち沈澱を生じたことは、これらの血清が不適当になった事を考えさせる。感染時期にはさまる低反応価であるが、Lunde & Jacobs (1963)はラットの血清中に間接赤血球凝集反応を抑制する因子があることを報告しているが、この点も考慮せねばなるまい。

Pacheco (1966)は *Dirofilaria immitis* の犬における感染に間接赤血球凝集反応を用いて、1カ月目に初期の反応価の山を認めたが、この実験で4ないし6週にそれらしい山を3例程に認めたが、これと同じものかどうかは、にわかに断じ難い。

総 括

1) 寄生虫感染がない事を寄生虫学的検査で調べたコロニーのコトナラット *Sigmodon hispidus* 7匹にフィラリア *Litomosoides carinii* をイエダニ *Ornithonyssus bacoti* により実験感染させ、3匹を非感染対照とした。2週間毎に尾端から採血し、Coca 抽出成虫抗原を用いたマイクロタイターによる補体結合反応と生理的食塩水抽出成虫抗原を用いたマイクロタイターによる間接赤血球凝集反応でコトナラットフィラリア感染の免疫学的経時変化を追跡した。

2) 非感染群は全期間を通じて補体結合価が16倍以下であったが、感染群では4週から10週の間上昇し、最高128倍に迄達した。このうち4例で感染期間が進むと補体結合価が低下し、死亡時に16倍以下になったものがあつた。マイクロフィラリア数との関係は一定せず、逆の場合もあつた。

3) 間接赤血球凝集反応では4から6週で反応価が上昇し、最高32,800倍希釈に迄陽性反応がでた。非感染群は全期間ほとんど16倍以下陰性であつたが、二三偽陽性を呈したものがあつた。若干の検体は16倍希釈で非特異凝集を呈し、感染の確立した時期に低い反応価を示したものがあつた。

ただし、別の材料で適正に保存されたコトナラット血清のフィラリア感染12例と非感染16例の熱処理したものは、羊赤血球に4°C 1晩反応させても非特異凝集を起さ

ず、これらの血清は、マイクロタイターによる間接赤血球凝集反応で感染群は最高4,096倍の陽性反応で差異を認めたが、感染2例は偽陰性反応を呈した。

この研究に援助と指導を下された寄生虫研究部長佐々学教授、御協力下さった寄生虫研究部諸氏に感謝します。酒井健夫、篠田恵子、岸本敬子、山下池作の方々は管理上の、東大医学部渡辺千之、山田昭夫、野沢俊子の方々は技術上の協力をされたことを記して感謝致します。

引用文献

- Bertram, D. S. (1966): Dynamics of parasitic equilibrium in cotton rat filariasis. *Advances in Parasit.*, Vol. 4, 255-320.
- Dammin, G. J. and Weller, T. H. (1945): Heterophile agglutinins and cold autohemagglutinins in schistosomiasis, filariasis, malaria and leprosy. *Am. J. Trop. Med.*, 25, 97-102.
- Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957): A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 43, 308-314.
- Kagan, I. G. (1963): A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. *J. Parasit.*, 49, 773-798.
- Kagan, I. G. and Pellegrino, J. (1961): A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 25, 611-674.
- 神田鍊蔵・田坂定晴 (1966): *Litomosoides carinii* の定量的接種法によるコトナラットの発症経過の観察. *寄生虫誌*, 15, 138-147.
- Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1963): Toxoplasma hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. *J. Parasit.*, 49, 932-936.
- Pacheco, G. (1966): Progressive changes in certain serological responses to *Dirofilaria immitis* infection in the dog. *J. Parasit.*, 52, 311-317.
- Scott, J. A. (1958): The early induction in cotton rats of immunity to their filarial worms. *J. Parasit.*, 44, 507-511.
- 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 (2). *Litomosoides carinii* の感染経過について. *寄生虫誌*, 13, 507-513.
- Tanaka, H., Kobayashi, J., Kamiya, M., Matsuda, H., and Sasa, M. (1968a): Hemagglutination test with *Litomosoides carinii* antigen in the diagnosis of cotton rat filariasis. *Jap. J. Exp. Med.* (in press)
- Tanaka, H., Kobayashi, J., Ishii, A., and Sasa, M. (1968b): Complement fixation test with adult

AbstractIMMUNOLOGICAL TIME COURSE IN COTTON RAT FILARIASIS STUDIED BY
COMPLEMENT FIXATION TEST AND INDIRECT HEMAGGLUTINATION TESTAKIRA ISHII, HIROHI TANAKA, KOICHIRO FUJITA, MASO
KAMIYA, HAJIME MATSUDA AND JUNZO KOBAYASHI*(Department of Parasitology, Institute of Medical Science, the University of Tokyo)*

The immunological time course was studied by complement fixation tests and indirect hemagglutination test in cotton rats infected with the cotton rat filaria, *Litomosoides carinii*. Thirty tropical rat mites harbouring an average of 2.5 infective larvae per mite were allowed to bite on each of seven rats, and a drop of blood was collected once in every two weeks from the infected as well as from other three uninfected animals. The blood was preserved in a deepfreezer either soaked in filter paper, or after the serum was separated in a capillary tube. Microfilarial counts in 2.5 mm³ blood samples were carried out at the same time at two weeks' intervals. The complement fixation test and hemagglutination test were made with the microtiter method, using antigens prepared from crude extracts of the adult worms in Coca's solution and phosphate buffered saline.

The complement fixation titers of the non-infected animals remained to be negative (below 1:16) throughout the period of observation, while significant rises in the titers were seen in all of the infected animals from four to ten weeks after the inoculation, either a few weeks earlier or at about the same time when microfilariae started to appear in the circulating blood. In four of the infected animals which sufficiently long period, the CF titers showed a peak during some time between ten to fourteen weeks with the maximum value of 1:128, and then gradually decreased, until the reaction became negative near the time of death in some cases. There was no direct correlation between the CF titers and the microfilarial densities in relation to the course of infection, and the latter usually kept on increasing until the animals died.

In our previous studies reported by Tanaka and others (1968), the indirect hemagglutination test was shown to be specific and useful in diagnosis of the cotton rat filaria infection so long as the sera were collected 11 weeks after the infection and were preserved adequately. In the present study using sera preserved after inactivated by heat or those eluted from blood soaked in filter paper, the results in connection with the time course of infection were not so consistent as in the CF test, and occasionally positive reactions were seen with the non-infected samples. Some samples showed non-specific hemagglutination at 1:16 dilutions, and were thus excluded from the results. Reproducibility of the results at the two successive tests with the same samples at different times were also not consistent. However, no heterophile agglutination to sheep erythrocytes was seen in twelve infected and sixteen non-infected cotton rat sera at incubation of 60 minutes at 37°C.