

## コトナラット糸状虫症などにおける間接螢光抗体 染色法と間接赤血球凝集反応の研究

石井 明 田 中 寛

東京大学医科学研究所寄生虫研究部 (主任 佐々学 教授)

(1968年10月11日 受領)

### はじめに

フィラリア感染における免疫現象の研究は1910年代から数多くの報告が出されている。Kagan (1963) の綜説によれば、その内の大多数は、動物フィラリアを抗原とし、交叉反応を利用して人に適用したものである。しかしながら、基礎的な問題としては、同種間の免疫現象の解明から始めて、異種間の交叉反応性に及ぶことが必要であろう。

我々の研究部では、実験フィラリア感染としてコトナラットを飼育繁殖させ、イエダニを中間宿主として、コトナラットフィラリアを継代している。このコトナラットは他の寄生虫感染がないコロニーであり、同種の抗原-抗体系として有用であると考え、間接螢光抗体染色法および間接赤血球凝集反応を試みたので、その成績について報告する。

### 材料と方法

コトナラット *Sigmodon hispidus* にコトナラットフィラリア *Litomosoides carinii* を中間宿主イエダニ *Ornithonyssus bacoti* を用いて実験感染させた。コトナラットは当研究部で飼育繁殖させたもので、寄生虫感染のない状態に管理されている (石井ら, 1968)。コトナラットの尾端から採血しマイクロフィラリアの数を算定し、感染11週目頃に股動脈から全採血し、血清を分離した。同時に胸腔からフィラリア成虫をとり出し、生理的食塩水で洗って抗原に供した。血清は 56°C 30分間熱処理して -20°C に凍結保存した。

犬フィラリア *Dirofilaria immitis* の成虫は感染犬の肺動脈からとり出し、生理的食塩水で洗って抗原に用いた。

検査血清には、上記感染コトナラット血清およびフィラリア症などの患者血清および正常人血清を用いた。

間接螢光抗体染色法 (以下 IFAT と略す) は、ほぼ

川村 (1966) の方法に従った。抗原には土井 (1968) の方法に準じて、フィラリア成虫の切片を用いた。すなわち新鮮な卵白 1 個分に約 1g のアラビアゴムを混和し、遠心分離してその上清をとり、これに虫体を包埋し、ドライアイスとアセトンにより -70°C 下で急速凍結し、クリオスタットで約 5 $\mu$  厚の切片にした。この切片は 95% エタノールで約 8 分間前処理した。螢光抗体は人血清に対して抗ヒト $\gamma$ グロブリンウサギ標識抗体 (医科研試験製造部) を 20 倍希釈して用い、コトナラット血清には、抗コトナラットグロブリンウサギ標識抗体を調製し、4 倍希釈して用いた。螢光抗体染色の手技は、抗原切片に系列希釈した血清をかぶせて、湿潤箱に入れ蒸発を防ぎつつ 37°C 40~60 分間反応させたのち、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2, 以下 PBS と略す) で 5 分間ずつ 3 回、時折振動を加えて洗い、反応に与らなかった成分を流して乾燥させる。次に対応する螢光抗体を生理的食塩水で使用回数に希釈して、再び切片にかぶせ、同様にして 37°C 40~60 分間又は 4°C 1 晩反応させる。再び PBS で洗い乾燥させたのち、薄手無螢光のスライドガラス上に緩衝グリセリン液 (pH 9.5) で包埋する。螢光顕微鏡は千代田社 FM-200A 型を用いて鏡検した。反応は 0 から 3 の 4 段階に分けて 2 を終点とした。1 次血清を PBS でおきかえたもの、螢光抗体を PBS でおきかえたものを対照にして非特異反応を検査した。

間接赤血球凝集反応 (以下 IHA と略す) は Tanaka *et al.* (1968) がコトナラットフィラリアに用いた方法に準じた。抗原には *Litomosoides carinii* 成虫をガラスホモジナイザーで磨砕し 20 回凍結融解を繰返して 4°C 24 時間の PBS 抽出を行い、3,000 rpm 15 分間遠心分離して上清をとり、更に 4°C 2 日間おいた後に 13,000 G 30 分間遠心分離した上清を、-20°C に保存して用いた。使用倍数は虫体乾燥重量比 8,000 倍であった。人 O 型赤血球は 120,000 倍希釈タンニン酸で 37°C 15 分間処理して

使用した。検査血清は 0.6% 正常兔血清加生理食塩水で系列希釈し、抗原処理赤血球と室温 3 時間反応させたのち、結果を判定した。判定は 5 段階に分けて 3 を終点とした。抗原を処理しないタンニン酸処理赤血球を用いて非特異凝集を検査した。

### 成 績

*Litomosoides carinii* に感染させたコトンラット 25 匹の血清に対して、対応する *Litomosoides carinii* の成虫を抗原に用いた時の結果は、IFAT で 25 倍から 3,125 倍希釈迄反応した。25 倍が 3 例、50 倍が 3 例、125 倍が 6 例、625 倍が 9 例、1,024 倍が 1 例、3,125 倍が 3 例であった。これらの血清の IHA 値は、16 倍が 2 例、125 倍が 3 例、250 倍が 1 例、500 倍が 2 例、1,000 倍が 5 例、

2,000 倍が 3 例、8,000 倍が 4 例で 16,000 倍が 4 例であった。IFAT の希釈倍数の対数をとると、反応値はほぼ正規分布になり、IHA の希釈倍数を 2 を底とする対数にとると同様に正規分布になったので、相関関係を検した。 $r=0.47$   $F_s=6.16$  となり  $F_{22}^1(0.05)=4.30$  で統計上有意の相関を認めた。血中マイクロフィラリア数と胸腔内寄生成虫数はいずれも正規分布型であったが、IFAT との相関は、それぞれ、 $r=0.39$ ,  $F_s=3.97$  と  $r=0.37$ ,  $F_s=3.55$  で両者共  $F_{22}^1(0.05)=4.30$  以下で相関関係がなかった。両者の対数をとった結果では  $M_f$  で  $r=0.427$ ,  $F_s=4.90$  で成虫数で  $r=0.415$ ,  $F_s=4.57$  となり、統計上有意の相関関係を示した。これらの成績を対応させて Table 1, 2 に示した。

Table 1 Results of indirect fluorescent antibody test and indirect hemagglutination test of cotton rats infected with *Litomosoides carinii*

Cotton rat serum number	No. of microfilariae per 2.5 mm <sup>3</sup>	No. of adult worms	IFAT titer	IHA titer	
174	809	48	1 : 3,125	1 : 250	positive
186	199	11	1 : 25	1 : 125	"
180	415	47	1 : 625	1 : 8,000—	"
172	490	16	1 : 625	1 : 500	"
246	361	47	1 : 1,024		
208	359	45	1 : 625	1 : 16,000—	"
213	327	16	1 : 50	1 : 1,000	"
206	500	42	1 : 625	1 : 2,000	"
207	319	9	1 : 50	1 : 500	"
032	233	26	1 : 50	1 : 16	negative
166	747	20	1 : 125	1 : 1,000	positive
179	273	27	1 : 3,125	1 : 16,000—	"
205	493	58	1 : 25	1 : 125	"
211	403	35	1 : 125	1 : 1,000	"
082	257	39	1 : 625	1 : 2,000	"
193	525	36	1 : 125	1 : 125	"
204	428	41	1 : 625	1 : 16	negative
081	432	30	1 : 125	1 : 1,000	positive
151	224	24	1 : 625	1 : 16,000	"
175	641	56	1 : 3,125	1 : 8,000	"
177	941	46	1 : 625	1 : 16,000	"
183	418	57	1 : 125	1 : 8,000	"
077	128	35	1 : 25	1 : 1,000	"
196	290	33	1 : 125	1 : 2,000	"
185	—	—	1 : 625	1 : 8,000	"

Table 2 Correlation between IFAT titers and parasitic burden

Parasitic burden	r	Fs
Number of adult worms	0.373	3.55
Density of microfilaria	0.391	3.97
Log. number of adult worms	0.415	4.57*
Log. number of microfilaria	0.427	4.90*

n=24, \*F<sub>22</sub><sup>1</sup>(0.05)=4.30 Fs, significant.

Correlation between IFAT and IHA.

r=0.47, F<sub>22</sub><sup>1</sup>(0.05)=4.30 Fs=6.16, significant.

Table 3 Results of indirect fluorescent antibody test and indirect hemagglutination test of uninfected cotton rat sera

Cotton rat serum number	IFAT titer	IHA titer	
232	1:32	1:16	negative
226	1:25	1:16	"
231	1:25	1:16	"
219	1:25	1:16	"
227	1:625	1:16	"
230	1:25	1:16	"
231	1:125	1:16	"
233	1:25	1:16	"
235	1:125	1:16	"
203	1:125	1:8	"
169	1:25	1:32	"
218	1:125	1:16	"
176	1:25	1:16	"

非感染コトナラット13例について試みた IFAT では25倍から625倍希釈迄に反応し、25倍が7例、32倍が1例、125倍が4例、625倍が1例であった。希釈倍数の対数をとると正規分布型となり、感染コトナラット群との分散は  $F_0=2.08$  であり、 $F(24, 12, 0.025)=3.02$  以下で分散に差異がなく、平均値の差を検定した処、 $t_0=15.07$  で  $t(35, 0.01)=2.72$  以上で差は高度に有意であった。非感染群の IHA 価は8倍から32倍希釈に納まり、8倍が1例、16倍が11例で32倍が1例で、感染群との差は明白であった。両者を対応させた成績を Table 3 に示した。

*Litomosoides carinii* に感染させたコトナラット血清に対して、異種である *Dirofilaria immitis* を抗原に用いた時、IFAT では25倍から625倍希釈迄に交叉反応し、

25倍が1例、125倍が6例、625倍が2例であった。非感染コトナラットでは5倍が1例、25倍が2例、125倍が6例であった。血中 Mf 数と寄生成虫数をつけ加え、*Litomosoides* を抗原とした IHA 価を参考に対照させた成績を Table 4 に示した。

象皮腫、乳糜尿などを呈してフィラリア症を疑われた人患者血清10例に対して、異種である *Litomosoides* 成虫を抗原として用いた成績では、IFAT で4倍から64倍希釈迄に交叉反応を示し、4倍が1例、8倍が1例、32倍が5例、64倍が3例であった。IHA では16倍から2,000倍希釈迄に交叉反応し、16倍が7例、500倍が1例、2,000倍が1例であった。マンソン孤虫症2例は IFAT で8倍と32倍、IHA で1例が16倍で、糞線虫症2例は IFAT で32倍と64倍で IHA で32倍と2,000倍希釈に交叉反応した。

正常人血清12例では、IFAT で4倍から128倍希釈迄の交叉反応を示し、4倍が1例、16倍が2例、32倍が3例、64倍が4例、128倍が1例であった。IHA では16倍から2,000倍希釈迄に交叉反応し、16倍が6例、64倍が6例、2,000倍が1例であった。以上の成績を対応させて Table 5 に示した。

上記の人血清の一部に、異種である *Dirofilaria immitis* の成虫を抗原に用いた IFAT では、16倍から64倍希釈に交叉反応したが正常血清との間に差なく、16倍が8例、64倍が1例であった。これらの成績を Table 6 に示した。

## 考 察

フィラリア感染の免疫現象を追求するに当って Scott (1958) は寄生虫の成長抑制を指標にした報告を出しているが、寄生虫数により成長が左右される点を考慮せねばならない。一般に血清反応を指標にするが、固有宿主から寄生虫を集めることが人フィラリアでは困難であるため、異種フィラリアを抗原として用いざるをえない。そのためにはこの背景である異種フィラリア間の交叉反応の問題を解明する必要がある。

抗原に *Litomosoides carinii* の成虫を用いた場合は、固有宿主であるコトナラットでは、感染と非感染を IFAT と IHA の両方法において統計上有意に区別した結果であったが、異種の系である人血清については人フィラリアの感染・非感染の間に差異がでなかった。若干の交叉反応性はあるが、その反応価は低く、*Litomosoides carinii* と人フィラリアとは抗原性の近縁さが低いこと

Talbe 4 Results of indirect fluorescent antibody test of cotton rat sera with antigen prepared from *Dirofilaria immitis*

Cotton rat serum number	History	Mf*	Worms**	IFAT titer	IHA titer***	
208	infected with <i>Litomosoides carinii</i>	359	45	1 : 125	1 : 16,000	positive
213	"	327	16	1 : 625	1 : 1,000	"
175	"	641	56	1 : 125	1 : 8,000	"
176	"	1,043	90	1 : 125	1 : 2,000	"
177	"	941	46	1 : 625	1 : 16,000	"
179	"	273	27	1 : 125	1 : 16,000	"
185	"	—	—	1 : 125	1 : 8,000	"
193	"	525	36	1 : 125	1 : 125	"
207	"	319	9	1 : 25	1 : 500	"
206	uninfected control	—	—	1 : 5	1 : 16	negative
230	"	—	—	1 : 25	1 : 16	"
231	"	—	—	1 : 25	1 : 16	"
235	"	—	—	1 : 125	1 : 16	"

\* Number of microfilariae in 2.5 mm<sup>3</sup> of blood

\*\* Number of adult worms found at autopsy

\*\*\* Indirect hemagglutination test, *Litomosoides carinii* as antigen

Table 5 Indirect fluorescent antibody test and indirect hemagglutination test applied to human sera, *Litomosoides carinii* as antigen

Serum number	Sex	Age	History	IFAT titer	IHA titer	
human 014	m	38	elephantiasis	1 : 32	1 : 2,000	positive
023	m	59	chyluria, microfilaremia	1 : 32	1 : 16	negative
006	f	51	chyluria	1 : 64	1 : 16	"
007	f	27	"	1 : 64	1 : 16	"
012	m	—	"	1 : 4	1 : 500	positive
017	m	65	" , hydrocele	1 : 32	1 : 16	negative
019	m	—	"	1 : 32	1 :	"
021	m	—	"	1 : 8	1 : 16	"
044	m	41	hydrocele	1 : 32	1 : 16	"
024	m	66	chyluria	1 : 64	1 : 16	"
human 010	m	—	sparganosis	1 : 8	1 : 16	"
056	m	—	"	1 : 32	1 :	"
011	m	59	strongyloidiasis	1 : 32	1 : 32	"
054	m	43	"	1 : 64	1 : 2,000	positive
human 005	m	24	normal control	1 : 4	1 : 16	negative
016	m	70	"	1 : 16	1 : 16	"
043	f	26	"	1 : 32	1 : 16	"
046	f	20	"	1 : 64	1 : 64	"
047	m	26	"	1 : 32	1 : 64	"
048	m	31	"	1 : 128	1 : 2,000	positive
049	m	43	"	1 : 16	1 : 16	negative
050	m	29	"	1 : 64	1 : 64	"
051	f	19	"	1 : 64	1 : 64	"
052	m	29	"	1 : 16	1 : 16	"
053	m	19	"	1 : 64	1 : 64	"
045	m	26	"	1 : 32	1 : 16	"

Table 6 Titers of some human sera in indirect fluorescent antibody test with *Dirofilaria immitis* antigen and indirect hemagglutination test with *Litomosoides carinii* antigen

Serum number	Sex	Age	History	IFAT titer	IHA titer
human 005	m	24	normal	1 : 64	1 : 16
045	m	26	"	1 : 16	1 : 16
049	m	43	"	1 : 16	1 : 16
050	m	29	"	1 : 16	1 : 64
048	m	31	"	1 : 16	1 : 2,000
014	m	38	elephantiasis	1 : 16	1 : 2,000
007	f	27	chyluria	1 : 16	1 : 16
054	m	43	strongyloidiasis, four years in filaria endemic area	1 : 16	1 : 2,000
011	m	59	strongyloidiasis	1 : 16	1 : 32

が出来る。コトナラットフィラリアを用いた報告の内で Warren (1947) は補体結合反応において同様の結果を述べているが、Oliver-Gonzalez *et al.* (1945) は皮内反応について *Litomosoides* が良かったとしている。Culbertson *et al.* (1944) は *Litomosoides* を用いた皮内反応と補体結合反応と沈降反応において、人血清でそれぞれ 81%, 77%, 75% の陽性結果を得たと報告している。

*Litomosoides* の固有の系では、コトナラット血清の反応価は、いずれの方法においても、十分高かったが、これはフィラリア実験感染がかなりの濃厚感染であり、抗体産生量も多いことを意味するが、人血清について、これに比す抗体産生を自然界で求める事は困難かつ稀であると考えられ、交叉反応性は存在しても、感染・非感染を区別する迄に至らないと考えられる。

コトナラットの系では IFAT と IHA の両方法の間に対数値で相関関係があり、成虫数と Mf 数の対数値が IFAT の反応価と相関関係が認められたが、予想できる事である。Tanaka *et al.* (1968) は IHA と補体結合反応 (CFT) の成績の間、および IHA と Mf 数の対数値の間に相関関係が存在することを報告している。

Garcia *et al.* (1968) は *Dirofilaria immitis* を抗原に用いて人血清の IHA を行った結果、感染と非感染について成績が乱れたことを報告している。この実験において *Litomosoides* を用いて人血清に行った IFAT との結果が同様に単純でなかった事と考え合わせると、交叉反応を通常の血清反応で行い、応用する迄には解明、開発すべき点が未だ残されていると考える。

フィラリア感染コトナラット血清は抗原 *Dirofilaria*

*immitis* に対しても IFAT で交叉反応を示し、少数ながら感染群で反応価が高くでた。しかし人血清は抗原 *Dirofilaria immitis* に対して低い価で交叉反応は呈したが、感染・非感染を区別するには至らなかった。

#### 総 括

*Litomosoides carinii* を実験感染させたコトナラットの血清25例に対して *Litomosoides carinii* の成虫を抗原に用いて、間接蛍光抗体染色法 IFAT と間接赤血球凝集反応 IHA を行った。IFAT で最高 3,125 倍希釈迄、IHA で最高 16,000 倍迄反応した。非感染コトナラット 13例では IFAT で 625 倍迄、IHA で 32 倍迄反応し感染群の反応価との間には有意差があった。IFAT の反応価の対数値とマイクロフィラリア数、成虫数の対数値との間に有意の相関があり、IFAT と IHA の反応価の対数値の間に有意の相関があった。

*Dirofilaria immitis* 成虫を抗原に用いた IFAT ではコトナラット血清 13例は最高 625 倍希釈迄の交叉反応を示し、感染・非感染をかなりよく区別した。乳糜尿などを呈してフィラリア症を疑われた血清 10例に対して *Litomosoides* 成虫を抗原に用いた処、IFAT で 64 倍、IHA で 2,000 倍希釈迄の交叉反応を呈したが、正常人血清、マンスン孤虫症、糞線虫症も同様に交叉反応を示し、感染・非感染の間に明白な差がなく、まちまちであった。*Dirofilaria* 成虫を抗原に用いた場合も交叉反応は呈したが、反応価は低く感染・非感染の間に差がなかった。濃厚な感染であって抗体産生が十分な時で同種の系を用いたら良好な成績を得たが、自然感染では抗体産生が低いためか、交叉反応性は示したが、感染を証するには至

らなかつた。

この研究に援助と御指導下さった寄生虫部部长佐々学教授，協力された寄生虫部諸氏に感謝致します。蛍光抗体法実施に便宜を与えられた医科研・免疫研究部，病理研究部に対し，又人血清を提供された内科学研究部海老沢 功博士に感謝致します。

#### 引用文献

- 1) Culbertson, J. T., Rose, H. M. and Demarest, C. R. (1944): Filariasis bancrofti; its diagnosis by immunological tests with antigen derived from *Litomosoides carinii*. Amer. J. Hyg., 39, 156-162.
- 2) 土井陸雄 (1968): 蚊・小昆虫など微小標本の蛍光抗体検査用凍結切片作成方法. ウイルス, 18, 196-198.
- 3) Garcia, E. G., Cabrera, B. D. and Lara, E. D. (1968): Diagnosis of human filariasis by passive-hemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody technic (SAFA). Jour. Philippin Med. Ass., 44, 149-155.
- 4) 石井明・田中寛・藤田紘一郎・神谷正男・松田肇・小林準三 (1968): フィラリア感染コトシ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. 寄生虫誌, 17, 402-406.
- 5) 川村明義 (1966): 蛍光抗体法. 微生物検査必携, 日本公衆衛生協会, 695-771.
- 6) Kagan, I. G. (1963): A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. J. Parasit., 49, 773-798.
- 7) Oliver-Gonzalez, J. and Morales, F. H. (1945): Common antigens among filarial and other nematode parasites of man. J. Infect. Dis., 77, 92-95.
- 8) Scott, J. A. (1958): The early induction in cotton rats of immunity to their filarial worms. J. Parasit., 44, 507-511.
- 9) Tanaka, H., Kobayashi, J., Matsuda, H. and Sasa, M. (1968): Hemagglutination test with *Litomosoides carinii* antigen in the diagnosis of cotton rat filariasis. Jap. J. Exp. Med., 38, 19-25.
- 10) Warren, V. G. (1947): Studies on filariasis. V. Serological relationships between antigenic extracts of four nematodes. Amer. J. Hyg., 45, 299-301.

**Abstract**

## STUDIES ON INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE AND INDIRECT HEMAGGLUTINATION METHOD IN COTTON RAT FILARIASIS

AKIRA ISHII AND HIROSHI TANAKA

*(Department of Parasitology, the Institute of Medical Science, the University of Tokyo, Japan)*

Cotton rats, *Sigmodon hispidus*, were experimentally infected with the cotton rat filaria, *Litomosoides carinii*, through tropical rat mite, *Ornithonyssus bacoti*. The cotton rats used were bred and maintained in this laboratory and proved to have no other helminthic infections. Around eleven weeks after infection, their microfilaremia were examined and they were bled to prepare sera, which were then treated for thirty minutes at 56°C and stored in deep freezer. Adult worms of the cotton rat filaria, *Litomosoides carinii*, were collected from pleural cavity of the cotton rats and utilized as antigen. Adult worms of the dog filaria, *Dirofilaria immitis*, were collected and also utilized as antigen. Indirect fluorescent antibody technique (IFAT) was performed with frozen section of adult worms as antigen and with anti-cotton rat globulin fluorescent tagged antibody or anti-human gamma globulin fluorescent tagged antibody. Indirect hemagglutination test (IHA) was conducted with antigen of phosphate buffer extract of adult worms.

Twenty-five sera of filaria infected cotton rats reacted in IFAT up to 3,125-fold serum dilution and in IHA up to 16,000 serum dilution. Ten normal cotton rats reacted in IFAT up to 625 dilution and in IHA up to 32 dilution. Although a few false negative in IHA and false positive in IFAT were observed, good specificity as to diagnosis of the infection was seen in this homologous system. Correlation between logarithmic number of serum dilution in IFAT and in IHA was statistically significant. Correlation between that in IFAT and logarithmic number of microfilariae and logarithmic number of adult worms also statistically significant. Nine filaria infected cotton rats cross-reacted to *Dirofilaria immitis* in IFAT up to 625 dilution and four normal control also reacted in IFAT up to 125 dilution. The result was rather good to discriminate infection. Ten filariasis suspected human sera cross-reacted to *Litomosoides carinii* in IFAT up to 64 dilution and in IHA up to 2,000 dilution. Twelve normal control sera also cross-reacted in IFAT and in IHA. Although cross-reactivity was confirmed, the result could not discriminate infection. Same results were seen against *Dirofilaria immitis*. Experimental infection could induce enough antibody formation for *in vitro* serological tests but naturally acquired infection of human filariasis did not show enough crossreactivity to discriminate the infection with heterologous antigens.

---

This study was supported by WHO Research Grant on Filariasis. (Principal investigator: Prof. Manabu Sasa.)