

## イヌ糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) の虫体成分 による好酸球増多について

鷲見方孝

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(昭和45年5月25日 受領)

寄生蠕虫症のばあい、ヒトおよび動物の罹患例を含めて、末梢血中の好酸球増多が特徴であるといわれている。ヒトのバンクロフト糸状虫症の血液像については、有里(1954)は、135例の患者の血液像をしらべ、好酸球増多が仔虫陽性者に認められることを報告している。津崎(1957)はバンクロフト糸状虫症患者の血中好酸球は、有症者と無症者とを問わず、その半数以上において増加していると報告している。著者が本実験で材料とした、イヌ糸状虫症についてはこれに罹患したイヌの血液像についての業績は意外に少ない。

石原(1953)によると感染したイヌでは、好酸球増多がみられるといわれているが、その論文でも他の寄生虫の罹患の有無はのべられていない。以上のべたような、本来の宿主に対する糸状虫寄生の場合とは別に Beaver(1956)の提唱した幼線虫移行症の中にも、糸状虫感染の場合があると考えられている。その1つに eosinophilic lung 又は tropical eosinophilia がある。Webb et al.,(1960)によると、これらの患者は高度の好酸球増多を伴ない、しかもイヌ糸状虫抗原での補体結合反応も陽性であり、ジェチルカルバマジンの投与で血中好酸球も、著明な低下をみると述べており、動物糸状虫症 zoonotic filariasis とみるべきではないかと考えられている。最近の Beaver(1970)の綜説によると、ヒト糸状虫の短期間の感染もその原因とされている。

一般にヒトでの好酸球増多の生物学的意義については不明な点が多く、寄生蠕虫症の場合とか、アレルギー性疾患に特異的に起こるとされている。Litt(1964)は、好酸球が抗原抗体結合物のみを特異的に摂取するという説をのべているが、Hirsh(1965)は異種蛋白に対する好酸球の喰作用を重視している。

この他に Vaughan(1954)や小林(1968)は、寄生虫抽出液中の peptide 分画にも、好酸球誘出能のある

ことを報告している。著者は、以上のような諸研究者の報告からみて、好酸球増多の原因を異種蛋白およびその分解物に対する喰作用という考え方と、アレルギーの場での結果、抗原抗体結合物への喰作用という考え方の両方が共存するのではないかと考えて、イヌ糸状虫を材料として、好酸球増多の成因について若干の解明を試みたのでここに報告する。

### 材料および方法

#### 1. イヌ糸状虫乾燥末の作製法

野犬の心臓から採取したイヌ糸状虫 *Dirofilaria immitis* を材料とし、あらかじめ成虫を充分滅菌生理的食塩水で洗滌、磨砕し、これに同量のアセトンを加えて攪伴し、4,500rpm 10分間遠心沈澱して、その上清部が無色透明になるまでこれをくりかえした。

得られた沈澱を更にエーテルで洗滌し乾燥した。これをイヌ糸状虫乾燥末とした。(以下乾燥末と略す)。

ヤマトゴキブリ *Periplaneta japonica* アニサキス *Anisakis* sp. 成虫のアセトン乾燥末の製法もこの方法に準じた。

#### 2. 実験動物

実験動物は体重300g~400g のハートレー系雄のモルモットを用い、固形飼料で飼育した。

#### 3. 生理的食塩水抽体液の調製

アセトン乾燥末1.0gにつき、20ml の割合で滅菌した磷酸緩衝食塩水(純水1lにつき68gのNaCl, 1.43gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>Oと0.43gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2)を加え、磨砕器で磨砕したのち、12,000rpm 30分冷凍遠心沈澱した。その上清をミリポエフィルターでこし、無菌化したものを stock solution とした。また蛋白濃度は280m $\mu$  吸光度法で測定し、抗原の稀釈には磷酸緩衝食塩水を滅菌して用いた。実験に用いた抗原液は、8.9

mgP/ml を基準とした。これを以下抽出液という。

4. 感作方法

a) 心臓内に直接穿刺による場合は、8.9mgP/ml の抽出液 1 ml を注射した。腹腔内注射にはモルモットの下腹部に抽出液 1 ml を注射した。皮下注射の場合には背側または腹壁を選びそれぞれ抽体液 0.1ml を注射した。

b) 人工血管による腹腔内感作方法は、前述のアセトン乾燥末をさらに処理して細末とし、200メッシュ以下の粉末とした。この70mg を0.5cm 径のテフロン製人工血管に封入した。その方法は各々、2.5cm に切断したものの一端をナイロン糸で結紮し、管の中へ乾燥末を入れたのち、他端も同様な方法で結紮した。これをオートクレーブで120°C 15分間滅菌し、モルモットをエーテル麻酔したのち、無菌的に開腹して腹腔内に挿入縫合した。

c) 成虫片埋没の方法

無菌的にとり出した成虫を滅菌生理的食塩水で充分洗滌して、一匹の成虫の虫体の体中央部を5mm の長さで切ったもの3片ずつを、1群のモルモットには腹腔内に、また他の群には背側皮下に、無菌的に切開埋没縫合した。

5. 末梢血白血球および好酸球の算定法

白血球の算定はモルモットの耳静脈から採血し、メランジュールにとり、型の如く処理して、ビルケルチュルク計算板で1mm<sup>3</sup> 当りの白血球を算定した。好酸球の算定は前者と同じく採血し、普通塗抹標本を型の如く作製し、ギームザ染色で染色を行い、全白血球中の好酸球の百分率を求めた。

6. アレルギー剤および抗アレルギー剤

ヒスタミン(半井化学薬品 K.K.) 0.5mg/kg, アセチルコリン(第一製薬 K.K.) 0.1mg/kg, セロトニン(半井化学薬品 K.K.) 0.5γ/kg. 抗アレルギー剤としては、ホモクロミン(エーザイ K.K.) 1ml, 水溶性プレドニン(塩之義製薬 K.K.) 0.4mg/kg, ネオレスタミン「コワ」(興和化学 K.K.) 0.3ml/kg を用いた。

実験成績

1. イヌ糸状虫の細片を腹腔内および皮下に埋没する方法で感作した場合の末梢血好酸球の変動

4匹のモルモットを用いイヌ糸状虫の成虫の細片を無菌的処理の下に、その2匹には腹腔内に、他の2匹には腹部皮下に埋没して、末梢血の好酸球の動態をしらべた。いずれの場合にも5日後までは、好酸球が1~2%

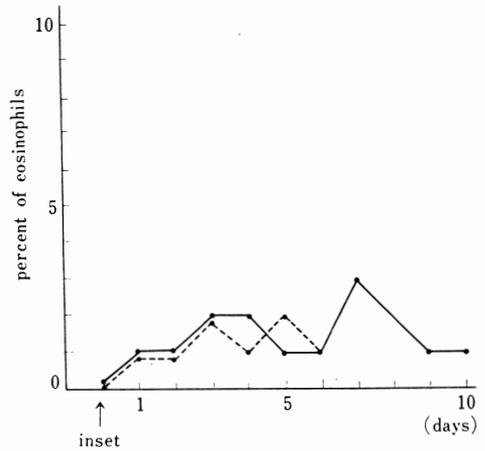


Fig. 1 Eosinophils in peripheral blood of guinea pigs after subcutaneous or intraperitoneal inset of small pieces *Dirofilaria immitis* adult.

●—● subcutaneous inset (each plot represents mean value of 2 cases)  
 ..... intraperitoneal inset (each plot represents mean value of 2 cases)

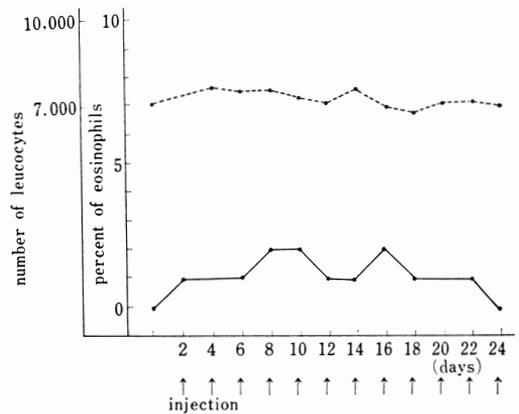


Fig. 2 Number of leucocytes and percent of eosinophils in peripheral blood of guinea pigs after injections of 1ml (8.9mg P/ml) of saline extract in peritoneal cavity.

..... number of leucocytes  
 ●—● percent of eosinophils  
 \* number of leucocytes and percent of eosinophils. Each plot represents mean value of 3 cases

に止つていた。腹腔内埋没の場合には6日後に2匹とも死亡したが、その好酸球も前者と同様であった。

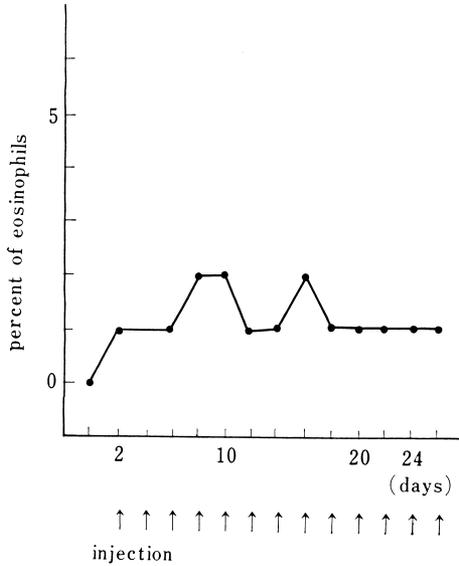


Fig. 3 Eosinophils in peripheral blood of guinea pigs after intradermal injection of 0.02ml (8.9mg P/ml) of saline extract.

Each plot represents mean value of 3 cases

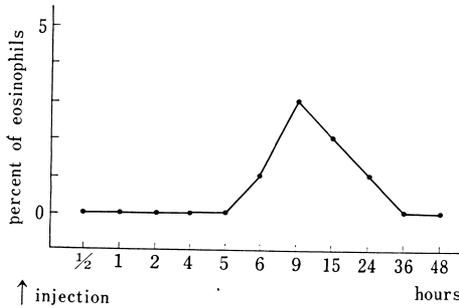


Fig. 4. Eosinophils in peripheral blood of guinea pigs after intracardiac injections of 1ml (8.9 mg. P/ml) of saline extract.

●—● Each plot represent mean value of 2 cases

2. イヌ糸状虫抽出液感作による末梢血好酸球の変動.

1) 腹腔注射

3匹のモルモットを使用し、抽出液 1 ml を腹腔内に隔日に注射したときの好酸球の変動は、Fig. 2 のようである。即ち24日間の観察期間中、2~6日間迄は1%、8~10日迄は2%、10日~12日迄は1%を示し16日目には2%を示して24日目に好酸球は殆んど0%となった。

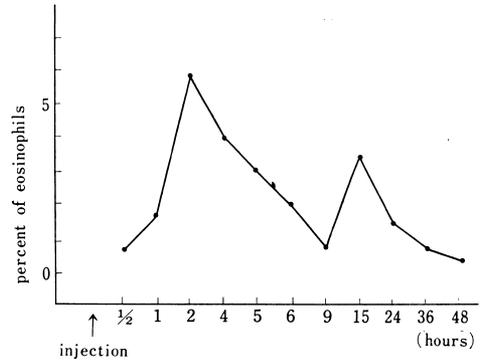


Fig. 5 Eosinophils in peripheral bloods of guinea pigs after intracardiac injection of 1ml (30mg. P./ml) of saline extract.

Each plot represents mean value of 5 cases

2) 腹部皮下注射

3匹のモルモットの腹部皮下に抽体液0.02mlを隔日に注射して、24日間にわたり、好酸球の変動をしらべた。その結果は Fig. 3 に示すように初め2~7日間は1%、8~10日迄は2%、12日~14日迄は1%、16日後2%の好酸球の出現をみ、18日~24日後は1%の好酸球を示した。

3) 心臓内注射

抽出液 1 ml をそれぞれ2匹のモルモットの心臓内に注射し、経時的に好酸球の変動をしらべた。この結果は Fig. 4 に示すように、5時間後から増多傾向を示したが、9時間目でも最高3%であった。その後経時的に減少して、36時間後に0%となった。アニサキス、ヤマトゴキブリ抽出液に比較してイヌ糸状虫抽出液は、好酸球誘出能が乏しいので、カーボワックスで濃縮して30 mgP/ml としその作用をしらべた。その1 ml をそれぞれ5匹のモルモットの心臓内に注射して、末梢血好酸球の変動をしらべた。その結果 Fig. 5 に示すように、1時間から上昇し始めて2時間で最高7%を示し、その後9時間目には減少して1%となり、その後再び増多傾向を示し、15時間後に4%となりその後急速に減少して殆んど0%となった。

4) 腹腔内注射

12匹のモルモットを3匹づつ4群に分け、その第1群は抽体液 1 ml を腹腔内に1回注射して、1週間の好酸球の変動をしらべた。次に第2群は隔日に1 ml づつ3回注射した。第3群は最初、隔日1 ml づつ3回注射して、次の1週間を休み、次に腹腔内に1 ml づつ3回注射して、好酸球の変動をしらべた。第4群は抽出液 1

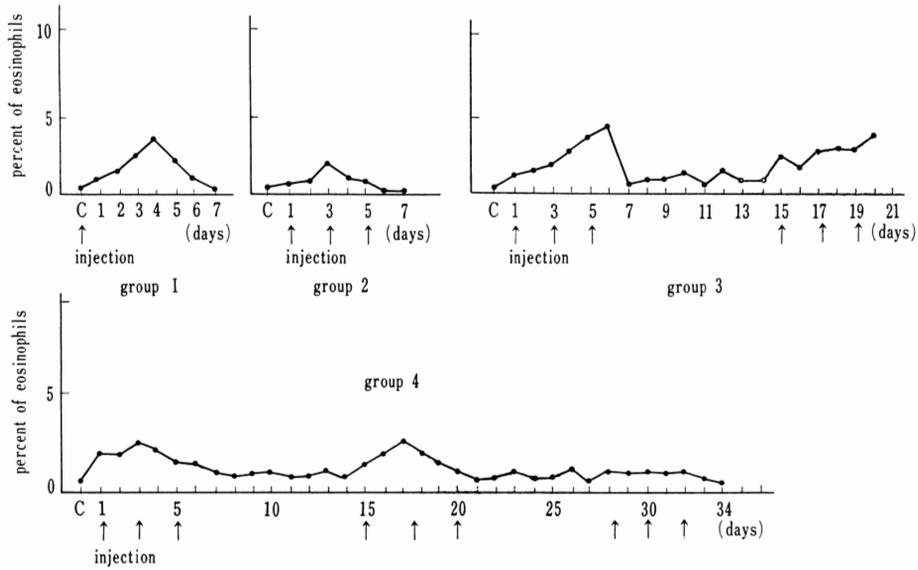


Fig 6. Eosinophils in peripheral blood of guinea pigs after intraperitoneal injections of 1ml (8.9mg. P./ml) of saline extract.

C. control

●—● Each plot represents mean value on 3 cases

ml を隔日3回注射して、また1週間休んだ。そしてその次にまた隔日に1ml ずつ3回注射を行なった。その結果は Fig. 6 に示すように、第1群は3~4日で最高3.5%を示し、1週間で0%となった。第2群では4~5日目で約2%を示し、その後1週間で0%となった。第3群は3日目2%、4日目4%、6日目4.5%となり、1週間目で0%となった。休止期間中はほぼ1%であったがその後の再注射で初回注射から15日目には2.5%を示し、20日目で4%を示した。その後注射を続けても21日目には0%となった。第4群では初回隔日注射のときは1.5%を示し、第2週の休止期間は1%であり、第3週目の注射期間中は2.5%を示し、第4週の休止期間中は1%で、第5週の注射期間中は1%の好酸球の出現に止まった。

3. イヌ糸状虫乾燥末を人工血管に封入して、腹腔内に挿入する方法で感作した場合の末梢血好酸球の変動

3匹のモルモットにイヌ糸状虫のアセトン乾燥末 70mg を人工血管に封入して、腹腔内に挿入し、末梢血好酸球の変動をしらべた。その結果は Fig. 7 に示すように、若干の好酸球の増多傾向を示し、5日に4%となり、11日目に3%を示し、その後20日間にあたり、1~2%の好酸球を示し30日後に殆んど0%となった。

4. 好酸球増多におよぼす薬剤の影響

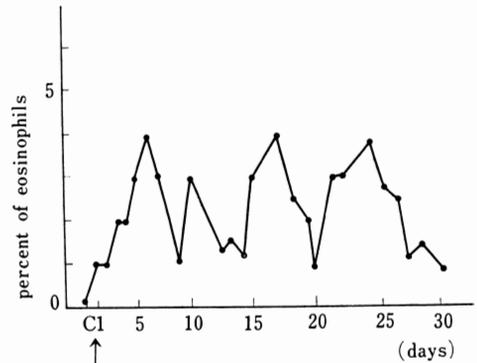


Fig 7. Eosinophils in peripheral blood of guinea pigs after inset of 70mg of acetone dry powder packed in artificial blood vessel

↑ inset of artificial blood vessel.

C. control.

●—● Each plot represents mean value on 3 cases

1) 抗アレルギー剤の影響

一般にイヌ糸状虫成虫は、好酸球誘出能が少ない。しかし乾燥末を人工血管に封入して腹腔に挿入する方法で、好酸球の増多傾向がみられそれが比較的長期持続したので、この方法を用い抗アレルギー剤の影響をしらべた。

とか血中にイヌ糸状虫成分を投与するような方法では、好酸球増多について異種の物質としての認識が宿主側に強く作用しないのではないとも考えられる。このことは前述の人体寄生例が大部分肺動脈寄生である点およびそのような症例で一般に末梢血に好酸球増多を示さないのと相共通するようと思われるが、皮下に成虫の断片を埋没しても、その末梢血好酸球増多を示さなかつた事は、どう解釈していいか解らない。

以上、イヌ糸状虫成虫成分を感作材料として末梢血の好酸球の変動についてしらべたが、いずれも好酸球増多を惹起する傾向がみられなかつた。

### 結 語

イヌ糸状虫 *Dirofilaria immitis* の成虫成分をモルモットの心臓内、血中、皮下または腹腔内に注入することによって、末梢血中にみるべき好酸球増多を示さなかつた。

1) 新鮮成虫体の断片を皮下または腹腔内に埋没した場合モルモットの末梢好酸球は7日後に最高値を示し、3%であつた。抽出液(8.9mgP/ml)を0.02mlを隔日に12回皮下注射しても1~2%に止まつた。同様に腹腔内に注射しても同様であつた。

2) 抽体液を心臓内に1ml注射すると5時間後から流血中に好酸球増多がみられ、9時間後には3%となり、その後次第に減少して36時間後には殆んで0%となつた。抽体液の蛋白濃度を30mgP/mlとして1ml注射すると30分後から増多傾向を示し、15時間後に再び4%となり2峯性を示した。

3) 抽出液1mlを腹腔内に1回だけ注射して、1週間好酸球の変動を観察したが、3~4日後にて2%を示しその後0%となつた。隔日に3回注射したところ5日後に2%を示し、1週間休止後隔日に注射したところ4~5%を示した。同様に一週間の休止期間を置いて隔日注射する方法で、34日間の観察でも注射時にのみ2~4%の好酸球がみられた。

4) アセトン乾燥末封入の人工血管を腹腔内に挿入すると、5日後4%で11日後で3%、30日後に0%となつた。

5) 好酸球増多に対するアレルギー剤、抗アレルギー剤の影響をしらべたが、感作モルモットにアレルギー剤を投与すると、一過性の好酸球増多が誘発された。また抗アレルギー剤による好酸球増多の抑制は著明でなかつた。

6) イヌ糸状虫成分で感作したモルモットの血清を正常モルモットの心臓内に注射すると、3~4時間後と12時間後に2峯性の好酸球増多がみられた。

### 引用文献

- 1) 有里実行(1954) : 糸状虫症の血液学的研究. 長崎医学会雑誌, 29(9), 712-725.
- 2) Beaver, P. C. (1956) : Larva migrans. Exp. Parasit. 5, 587-621.
- 3) Beaver, P. C. (1970) : Filariasis without microfilaremia. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 19(2), 181-188.
- 4) Benkin, C. A., Colvin, S. H. and Beaver, P. C. (1966) : Cause of pulmonary nodular disease. J.A.M.A. 198, 665-667.
- 5) Campbell, D. H. (1943) : Relationship of the anaphylaxis J. Inf. Dis, 72, 42-48.
- 6) Danaray, I. J., Dasilva, L. S. and Schacher, J. E. (1959) : The serological diagnosis of eosinophilic lung (Tropical eosiniphilia) and its etiological implications. Am. J. Tro. Med. Hyg. 8, 151-159.
- 7) Harison, E. G. and Thompson, J. H. (1955) : Dirofilariasis of human lung. Am. J. Clin. Path. 43, 224-234.
- 8) Hirsh, J. G. (1965) : Neutrophil and eosinophil leucocytes, edited by Zweifach, B. W, Grant, L. and Meclusky, R. T.: The inflammatory process, 245-280. Academic press, New York, London.
- 9) Nishimura, T., Kondo, K. and Shoho, C. (1964) : Human injection with subcutaneous *Dirofilaria immitis*. Biken. J. 7, 1-8.
- 10) 石原肇(1953) : 犬の心臓糸状虫のヘモグラムについて. 獣医畜産新報, 120, 953-954.
- 11) 小林瑞穂・山田稲好・松浦聡照・細井達夫・西田佑三・鷺見方孝・岩永大・加藤信博・堀場通明・篠田寛(1969) : 寄生性好酸球症に関する研究(1) 寄生虫誌, 18, 141-148.
- 12) 勝沼英宇・杉本民雄・野田実・川下典夫・星和男・佐藤蕃・米山弥一郎・遠藤輝男・本島元義・川久保亮・芝本源治(1950) : 神経性体液性血球調節について. 臨床血液, 1, 813-823.
- 13) Litt, M. (1964) : Eosinophils and antigen-antibody reaction. A. n. n. New York Academy of Science. 116, 964-984.
- 14) Navarrete-Regna and Noon R. (1968) : Pulmonary dirofilariasis manifested as a coin lesion. Report of cause and review of the literature. Arch. Path. 85, 266-276.
- 15) Tuazon, R. A., Firestone, F. and Blaustein, A. U. (1967) : Human pulomony dirofilariasis manifesting as a coin lesion. A cause

- report. J.A.M.A. 199, 45-46.
- 16) 津崎文雄(1957) : フィラリヤ症の血液学的研究 (3). 鹿児島大学医学会雑誌, 8(5), 33-38.
- 17) Vaughan, J. (1954) : The stimulation of the eosinophil leucocytes. J. Path. & Bact. 64, 91-102.
- 18) Webb, J. K. G., Job, C. K. and Gault, E. K. (1960) : Tropical eosinophilia. Demonstration of microfilaria in lung, liver and lymphnodes. Lancet, 1, 835-842.
- 19) 吉村裕之(1969) : 熱帯性エオジノフィリー (Tropical eosinophilia) と犬糸状虫感染症 (Dirofilaria) 動物寄生性フィラリアの人体感染症. Minophagen Medical Review, 14(1), 1-14.

## Abstract

### STUDIES ON THE EOSINOPHILOTACTIC ACTIVITY OF *DIROFILARIA IMMITIS*

MASATAKE SUMI

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

Guinea pigs were examined for the occurrence of eosinophilia in blood after injection with saline extract of *Dirofilaria immitis* by intradermal, intracardiac or intraperitoneal route, the animals exhibited only in low level of eosinophilia in peripheral blood. Results obtained are summarized as follows.

1) When small pieces of the adult worm were embeded under the skin or into the peritoneal cavity of the animals, eosinophilia occurred in the level of 3%. When 0.02 ml (8.9 mg P/ml) of saline extract injected intracutaneously every other days for 12 times, eosinophilia occurred only in level of 1-2%. Similar phenomenon was observed after injection of 1 ml of saline extract by intraperitoneal route, every other days for 12 times.

2) When 1 ml (8.9 mg P/ml) of saline extract was injected by intracardiac or intraperitoneal route, eosinophilia exhibited in level of 3% at 9 hours and turned to 0% at 36 hours after injection. While 1ml(30 mg P/ml) of concentrated saline extract was injected by intracardiac route, eosinophilia was observed in level of 6% after 2 hours and 4% after 15 hours.

3) When guinea pigs were injected intraperitoneally with 1 ml (8.9 mg P/ml) of saline extract every other weeks for 3 times, 2-5% of eosinophilia were observed only in the injection period.

4) When artificial blood vessel made of Tephlon packed with acetone dry powder was inserted into the peritoneal cavity of guinea pigs, eosinophilia were shown 4% at 5 days, 3% at 11 days and 0% at 30 days after treatment.

5) In experiment with anti-allergic agent, an inhibitory tendency of eosinophilia was slightly recognized. When sensitized guinea pigs were injected with allergic chemical mediator, transient pronounced eosinophilia was observed.

6) When normal guinea pigs were injected with *Dirofilaria* antigen by intracardiac route, eosinophilia occurred with two peaks, at 3-4 and 12 hours after injection.