

## マンソン孤虫症の間接蛍光抗体法による診断

石 井 明

東京大学医科学研究所寄生虫研究部

(昭和48年3月6日 受領)

### はじめに

ヘビ、ニワトリ、カエル等を生食した際に、たまたまマンソン孤虫症に罹患する者がある。これらは発熱、皮下腫、好酸球増多、血沈増進などを示し、時には烈しい急性症状を呈し、抗生物質を投与しても改善されず、診断に苦慮する場合もある。皮下腫を切開しても虫体を検出することは困難な場合が多いので、診断は既往歴によることが多い。

マンソン孤虫症は犬、猫の腸内に寄生する条虫、マンソン裂頭条虫 *Diphyllobothrium mansonii* の発育中間体が稀に人体に侵入するもので、東南アジア (Tansurat, P. 1971, Weinstein *et al.* 1954), アフリカおよびアメリカの一部の州 (Swartzwelder *et al.* 1964) からその人体症例の報告があり、日本では今迄に 200 例を越す報告がある (大河内ら, 1960)。

本症の免疫学的診断の試みとしては沈降反応、皮内反応等が行われたが (岡部, 村瀬, 1957), 今回、当研究部に数例の症例が集められたので、間接蛍光抗体染色法による診断を試みた。

### 材料と方法

抗原：シマヘビ *Elaphe quadrivirgata* またはヤマカガシ *Natrix tigrina* の皮下、筋肉、体腔より取出したプレロセルコイド Plerocercoid を用いた。先ず新鮮な卵白 1 個分に約 1 g のアラビアゴム粉末を加え、よく攪はんし混じた後 3000 rpm 15 分間遠心分離して上清をとる。アルミ箔で型をつくり卵白アラビアゴム液を入れ、この中にプレロセルコイドを包埋し、ドライアイス・アセトンによる $-70^{\circ}\text{C}$ 中で急速凍結する。このブロックをクリオスタットにて $5\sim 8\mu\text{m}$ 厚の切片となしカバーガラスにとる。切片は95%エタノールで7~10分の前処置を行った。ブロックは $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

抗体： $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した患者その他の人血清を用い

た。稀釈には生食水を用いた。

蛍光抗体染色法：蛍光抗体は抗ヒトγグロブリン兔標識抗体を用いた。医科学研究所、生物製剤試験製造施設で調製された凍結乾燥品 (Lot. 9) で、これを10倍稀釈し、0.1%に窒化ソーダを加えて $4^{\circ}\text{C}$ に保存した。実験には20倍稀釈液を用いた。

1 次反応は前処理の後乾燥した抗原の凍結切片に人血清をかけ、湿潤箱で乾燥を防ぎつつ $37^{\circ}\text{C}$  60 分間反応させた。反応後、リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.4) で反応物以外を洗い流した上、更に振動を加えつつ5分間 PBS 中で3回繰返して洗浄した。風乾した後、2次反応として蛍光抗体をのせ、同様に湿潤箱で $37^{\circ}\text{C}$  60 分間または $4^{\circ}\text{C}$  1 晩反応させた。標本は PBS で洗浄し、乾燥した後薄い無蛍光のスライドガラスに緩衝グリセリン (pH 9.5) を用いて包埋し観察した。結果は蛍光顕微鏡 (千代田光学 FM-200 A) を用いて、0 から3 の4段階に分け、2 を陽性とり、その時の血清稀釈倍数を表示した。0 は無蛍光、1 は弱い特異蛍光、2 は判然とした特異蛍光、3 は強い特異蛍光とした。観察結果をカラーフィルム (Anso, ASA 200) を用いて15~40秒間露出して写真撮影することを行った。

沈降反応：シマヘビから取出したリグラ幼虫をガラスホモジナイザーで磨砕し、0.15 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に10%液として $-20^{\circ}\text{C}$ に保存して抗原とした。蛋白量は約1g/dlであった。CRP 試験用毛細ガラス管に抗体を入れ、それに抗原を加えて粘土に立て $37^{\circ}\text{C}$ におき、沈降物生成を検した。

兔の抗体：家兔2匹に対し、シマヘビから取ったリグラ幼虫20匹をゾンデを用いて10日間隔で2回強制経口投与した。1匹については上記抗原液を背皮下に1mlずつ週2回、4週にわたって注射し、5週目に1ml 2回静脈内注射をして免疫した。

マンソン孤虫症症例の簡単な病歴。

症例 1：29歳男。ヘビを生食した後、7日目から発熱

し、次いで腹壁に浸潤、硬結を生じた。首、腋下、鼠けい部リンパ節の腫脹を認め、白血球数増多し、好酸球は21%迄の増加を示した。血清タンパク分画で $\gamma$ -グロブリンは36.2%と増加していた。顎口虫抗原による皮内反応は陰性で、日本住血吸虫皮内反応も陰性であった。

症例 2: 28歳男。症例 1 と同じくシマヘビを生食した後、心窩部膨満感があり、2カ月後に腹壁に皮下硬結、腫脹を生じた。発赤、圧痛なく筋にゆ着している如くであった。白血球増多および好酸球増多(19.5%)が認められた。血清タンパク分画で $\gamma$ -グロブリンは26.4%に増加した。皮膚切開を行つたが、虫体は発見できなかった。

症例 3: 41歳男。8年前にシマヘビを生食した後、10日目から発熱、咳、頭痛が起り脾腫を認めた。白血球増多、好酸球増多を示した。40日後に胸痛が起り、X線撮影上、胸部に浸潤を認めた。次いで背部に3つの皮下腫を生じたため、皮膚切開した処、好酸球の浸潤を認めたが、虫体は発見できなかった。その後も発熱、咳、胸痛が続いたが、抗生物質の効果はなかつた。血沈が増進し、X線所見は胸膜炎の像を呈した。マンソン孤虫の抽出液による皮内反応が陽性を呈し、再度の皮膚生検の連続切片で虫体を確認した。

症例 4: 42歳男。3年前ヘビを生食してから10日後に39°Cの発熱を呈し、抗生物質を用いたが効果はなかつた。白血球数は11,900で、好酸球が11%で赤沈値の亢進をみた。2週間後に右前胸部に腫瘤が出現した。

症例 5: 38歳男。5~6年前ヘビの刺身を食べたことがあり、2~3年前濁った川水を飲んだことも、蛙の唐揚げを食べたこともある。数カ月前から、右眼窩部から後頭部にかけてズキズキする痛みがあり、仕事を休む程であった。脳波、X線所見に異常なく三叉神経痛と診断された。しばらくして右眼窩部に異物感のある痛みが出現し、熱感、下眼瞼腫脹をみた。診断が確定しないまま、しばらく経過したが眼瞼腫瘍が移動し球結膜に出たため切開した処、プレロセルコイドを摘出した。

## 成 績

人血清19例について行つたマンソン孤虫を抗原とした間接蛍光抗体法の成績を表1に示す。正常人血清5例では全て8倍稀釈以下で、その他の寄生虫症の血清でも16倍以下であった。マンソン孤虫症の5例では32倍稀釈以上で256倍稀釈でも反応を認めた。

マンソン孤虫の抗原切片に対して人の血清抗体が反応する部位を写真をもつて示す。これによると周辺部と筋

Table 1. Indirect fluorescent antibody test with frozen section of *Sparganum*: Titters of human sera.

Case #	History	Titer
009	Sparganosis 40 days	256
	5 months	256
010	Sparganosis 40 days	64
	5 months	256
056	Sparganosis 8 years	32
057	Sparganosis 3 years	256
104	Ocular sparganosis	64
003	Normal control	<8
043	ditto	<8
051	ditto	8
054	ditto	8
055	ditto	<4
014	filariasis	16
019	ditto, chyluria	16
023	ditto	8
067	Schistosomiasis japonica	16
069	ditto	4
071	ditto	8
008	Gnathostomiasis	<4
062	Ancylostomiasis	16
011	Strongyloidiasis	16



Photo. 1 Fluorescent antibody staining of the sparganum. Antibody of the patient binds to the body wall and the muscle tissue.

肉組織に強い特異蛍光を認める。

沈降反応では症例2の5カ月後の血清が2倍稀釈で陽性反応を呈したが、症例1, 3, 4共陰性で対照正常人血清1例も陰性であった。兎については、免疫した兎のみ16倍稀釈で陽性であったが、経口感染兎2匹、対照未処置兎1匹共に陰性であった。

## 考 察

寄生虫が単に腸管内に止まるだけでなく、宿主の真の体内(組織内)に入る時、これに対して宿主は烈しく反応する。マンソン孤虫症でも虫体は腸管から更に組織内に迄侵入するため、時には烈しい急性症状を呈することが、今回の症例にもみられる。比較的稀な疾患であるので既往歴に注意する等、この疾患を考慮に入れていない時には診断に苦慮する場合があるが、このことは今回の症例でも例外ではない。マンソン孤虫症では、人は第1中間宿主のミジンコを川水と共に飲用して第2中間宿主となるか、あるいは今回の症例の如く第2中間宿主たる動物—今回の症例は全てヘビ—の生食により第2次の第2中間宿主となるかの2つの経路で感染するのが普通である。しかしタイ、ベトナムなどでは眼病の消炎に効果があるとしてカニの生肉を眼部に当てるため、眼にマンソン孤虫症をみることもあるという。いずれにしても人体内部では成虫に至らず人体を徘徊することになる。診断は既往歴に頼ることが多く、皮下に出た場合には腫瘍から虫体を取れば確実であるが、これも必ずしも容易でない。診断を裏付ける方法としては免疫学的方法が考えられる。

免疫診断として今迄に沈降反応、補体結合反応、皮内反応等が試みられた。岡部・村瀬(1957)はトノサマカエルから取出したマンソン孤虫から抗原をとり沈降反応を行った処、患者症例血清に対しては抗原稀釈で800~3,200倍稀釈迄陽性反応を呈し、対照血清には100~480倍以下の反応陽性で両者の間に差を認めたとしている。しかしわれわれの試みでは、抗体稀釈法でみると反応値は上らず、実際の使用には困難があることが知られた。岡部・村瀬(1957)は虫体抗原を用いて患者に皮内反応も行い、患者症例では膨疹の径が10×10mm以上、対照では7×6mm以下であったが、日本住血吸虫患者5名について行ったところ、3名が類属反応を呈したとしている。

今回試みた間接蛍光抗体法は、手技がかなり複雑であること、判定基準が主観的になりかねないという欠点もあるが、抗原が少量ですみ、長く凍結保存もできること、感度、特異性は補体結合反応程度に良い等の利点がある。またその上に切片を用いる場合には、免疫組織学的な追跡ができるのは大きい特徴である。今回得られた一連の成績は、マンソン孤虫症患者血清に高い反応値を示し、本症の診断に有用であることが判明した。正常人

対照血清にも反応はみられるが反応値は8倍稀釈以下と低く、他の寄生虫感染者の血清反応値も16倍稀釈以下で患者血清の32~256倍稀釈に比べて差がある。他の寄生虫との間の共通抗原の存在は、ある程度は考えられることであり、非特異反応であるが、その反応値は低いので障害とはならない。

蛍光抗体法で寄生虫体の組織の抗体結合性—抗原性を追求した試みはいくつかあるが、筆者らはコトナラットフィラリア(石井ら、1969)、広東住血線虫(Ishii & Kamiya, 1973)等においては線虫のクチクラに抗体結合なく、筋組織に最も強い反応を検出し報告した。糸虫ではColeman & Fonorny, 1962が*Hymenolepis nana*を用いた短い報告がある。今回われわれは糸虫の中間発育体であるプレロセルコイドを用いたわけであるが、外周の体表と内部の筋組織に強い蛍光抗体染色を認めた。線虫と異り、プレロセルコイドの体表に抗体結合があるのは興味深い。この所見から考えてもマンソン孤虫症での宿主側の烈しい反応症状の発現については理解し易い。

## ま と め

ヘビを生食したことにより罹患した5例のマンソン孤虫症患者について、免疫学的診断を試み、間接蛍光抗体反応と沈降反応を行った。蛍光抗体法では感染後8年を経過した患者血清では32倍稀釈で陽性反応を呈し、他の患者血清も64から256倍稀釈と高い反応値を示した。フィラリア症、日本住血吸虫症等の他の寄生虫感染者血清にも交叉反応をみたが血清稀釈16倍以下でその間には差があり、正常人対照血清では、それが8倍稀釈以下であった。間接蛍光抗体法はマンソン孤虫症の診断の一助に用いることができる。組織学的にプレロセルコイドに対する感染者の抗体結合は、その体表と筋組織にみられた。沈降反応では患者の抗体価が低く、対照との間に差をみず、實際上に困難がある。

## 謝 辞

寄生虫研究部佐々学教授に御指導を受けた事、東大病院第3内科高木宏子医師に御協力いただいた事を感謝します。

## 引用文献

- 1) Coleman, R. M. and Fonorny, N. M. (1962) : In vitro isolation of *Hymenolepis nana* and antibody-binding sites. Nature, Lond., 195,

- 920.
- 2) 石井 明, 松田 聡, 神谷正男, 小林準三 (1969) : 各期虫体の凍結切片を抗原としたコトシラット糸状虫症の間接蛍光抗体法について. 寄生虫学雑誌, 18, 1-7.
  - 3) Ishii, A. and Kamiya, M. (1973) : Indirect fluorescent antibody test in experimental infection of *Angiostrongylus cantonensis* in rats. Jap. J. Exp. Med., 43, 17-23.
  - 4) 大河内一男, 山田栄八郎, 大屋匠人 (1960) : 蛇を生食することによつておこされたマンソン裂頭条虫症について. 一特に感染早期の諸徴候について. 日本臨床, 18, 96-102.
  - 5) 岡部浩洋, 村瀬 幹也 (1957) : マンソン孤虫症の免疫学的研究. 久留米医学会誌, 20, 907-913.
  - 6) Swartzwelder, J. C., Beaver, P. C. & Hood, M. W. (1964) : Sparganosis in southern United States. Amer. J. Trop. Med. & Hyg., 13, 43-47.
  - 7) Tansurat, P. (1971) : Sparganosis. in "Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases" ed. Marcial-Rojas, P. A., p. 585-591, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, U. S. A.
  - 8) Weinstein, P. P., Krawczyk, H. J. & Peers, J. H. (1954) : Sparganosis in Korea. Amer. J. Trop. Med., 3, 112-124.

### Abstract

#### INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST IN HUMAN SPARGANOSIS

Akira ISHII

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

Indirect fluorescent antibody test was conducted on five sera of human sparganosis patients. *Sparganum* was collected from a Shimahebi, *Elaphe quadrivirgata*, and used as antigen. It was mounted in egg-white and gumarabic medium and sections were made by the use of cold-microtome. Anti-human  $\gamma$ -globulin fluorescent antibody was used at 20-fold dilution to stain human antibody against *Sparganum*. Sera of sparganosis patients reacted up to 256-fold dilution and the lowest titer was 32-fold dilution that was seen in the serum of a patient with 8 years history. Five normal control sera reacted at less than 8-fold dilution. Nine sera of other helminthic infections, i.e. filariasis, schistosomiasis and others, reacted up to 16-fold dilution. Thus indirect fluorescent antibody test was found to be useful in the diagnosis of sparganosis. Antibody binding sites of the *Sparganum* were body wall and muscle tissue. Precipitin test appeared not to be useful in the diagnosis.