

## コトナラットフィラリアにおける diethylcarbamazine の作用機序に関する脾臓細胞の関与

高岡 正敏† 田中 寛§

(昭和52年12月7日 受領)

### はじめに

Diethylcarbamazine (以下 DEC) は Hewitt *et al.* (1947) の発見以来、すぐれたフィラリア症治療剤として知られている。しかし、この薬剤は試験管内では抗フィラリア効果はなく、生体内でフィラリアに有効であるがその作用機序に関しては未知の部分が多く、興味ある作用を有していることが過去の報告で認められている。Hawking *et al.* (1950) は DEC がオプソニン様の作用があり、細胞内皮系の喰細胞を賦活化させ、マイクロフィラリアが捕えられると考えた。小林ら (1969) は *Litomosoides carinii* に感染したコトナラットで *L. carinii* 成虫抗原を用いた HA 反応で抗体が検出される時期に DEC の効果が顕著に発現することを認めた。その後、藤田ら (1970) は感染コトナラットの脾細胞が DEC 効果の発現に重要な役割を果していると述べている。本実験では、さらに検討を加え、*L. carinii* 感染のコトナラットを用い、DEC 効力発現に果す脾細胞の役割を明らかにした。

### 材料及び方法

実験に用いた *L. carinii* は1953年、テキサス大学の J. A. Scott 教授より当研究部に寄贈され継代されたものである。実験動物のコトナラット *Sigmodon hispidus* は同じく1953年より当研究部で累代飼育してきたものを用いた。

This investigation received financial support from the world Health Organization.

† 東京医科歯科大学医学部医動物学教室

§ 東京大学医科学研究所寄生虫研究部

生後約5週のコトナラットを *L. carinii* 感染幼虫を持ったイエダニ *Ornithonyssus bacoti* に吸血させて感染させた。

本実験では感染によらずに血中に出現するマイクロフィラリア(以下 mf) を利用したかったため、mf を正常コトナラットの腹腔内に注入し、mf 血症を実験的に作った。脾細胞は股静脈から注入し、DEC は腹腔内に注入した。

mf 血症を実験的に作るには mf を正常コトナラットの腹腔に注射した。mf を得るには感染コトナラットをエーテル麻酔し、股動脈を切断して放血死させ、胸腔を0.85%滅菌生理食塩水で洗滌し、その洗滌液を2,000rpm、3分間遠心し管底に mf を集めて上清を捨てた。この操作を3回くりかえし、30万~50万の mf 浮遊液を作り、注射器を用いてコトナラットの腹腔に注入した。

脾細胞浮遊液の調製には、コトナラットを放血死させ、その脾臓を無菌的に取り出し、細切して200メッシュの金網にのせ、指圧により通過したものを滅菌生理食塩水にて細胞浮遊液を作った。その細胞浮遊液を1,500rpm、5分間の遠心を3回行い、滅菌イーグル培養液0.25ml に浮遊し、血球計算盤で白血球数を数え、最終的に生脾細胞総数 $10^7 \sim 10^8$  個の浮遊液を作った。この細胞浮遊液を末梢血中に mf の出現したコトナラットの股静脈血管から注入した。

DEC の溶液は20mg を0.85%生理食塩水1ml に溶かして作製し、コトナラットに200 mg/kg の量を腹腔内に注入した。mf 数の観察は尾静脈血液の2.5cmm をメランジュールでとり、スライドガラスに線状の塗抹標本を作り、同一ネズミから2標本を採血し、一枚のスラ

イドグラスに塗抹した。乾燥後、水で溶血しメタノールで固定したのちギムザ染色を行なつて検鏡した。

血清、採血は眼窩静脈叢穿刺により採集し、血液を0.85%滅菌生理食塩水で4倍に希釈し2~3時間室温で放置後1晩4Cに保存し血清を分離した。この血清はその濃度の1/5に希釈されているとみなし、-20Cに保存した。

間接赤血球凝集反応(以下HA); 抗体価の測定はJacobs and Lunde (1957)のToxoplasma診断のための手技, Tanaka *et al.* (1968), 及び Kamiya and Tanaka (1969)の方法に準じたマイクロタイター法によつたが、羊血球はホルマリン処理を行つて(Csizmas, 1960)用いた。

抗原濃度の測定や、検査血清の反応の際の標準陽性血清は、*L. carinii* 成虫をpH 7.2 磷酸緩衝生理食塩水(以下PBS-7.2)で抽出した抗原にフロイントアジュバントを加えて免疫したウサギの血清を用いた。

用いた抗原は *L. carinii* の乾燥重量の1:100の濃度にPBS-7.2で抽出し、-70Cに保存した。この抗原と標準血清との間でボックスタイトレーションを行い、抗原、抗体の力価を測定した結果、抗原価は1:6,000、抗体価は1:64,000であつた。

市販されているAlsever浮遊羊血球をCsizmas (1960)の方法でホルマリン固定して反応に用いた。この羊血球をPBS-7.2で洗滌し6万倍のタンニン酸で37C, 15分間処理し、1:6,000の*L. carinii* 抗原で28C, 15分間感作した。この感作タンニン酸赤血球を0.6%の正常ウサギ血清(NRS)に置換し、検査血清をNRSで32倍から8,000倍まで4倍希釈したものと反応させ、

3時間の室温放置後判定した。判定の規準はTanaka *et al.* (1968)により抗体価1:32以上を陽性と判定した。

## 結 果

本研究では正常コトナラットの腹腔内にmfを注入し、末梢血中に出現したmfに対するDECの効果および脾細胞の関与、流血抗体の役割を検討したので、大別して以下の4群の実験を行つた。

各動物は一定間隔で採血し、血中のmfの濃度とHA抗体価を測定した。

A群、mfを正常コトナラットの腹腔内に注入し、末梢血中のmfを観察した。

B群、末梢血にmfが出現した後、感染コトナラットの脾細胞を注入した。

C群、末梢血にmfが出現した後、正常コトナラットの脾細胞を注入し、DECの効力を調べた。

D群、mfが末梢血に出現した後、感染コトナラットの脾細胞を注入し、2日後、1週、2週、3週後にDECの効力を調べた。

A群; 生後約5週の正常コトナラットの腹腔にmfを注入した3頭の結果をTable 1に示した。mf濃度は2本の塗抹標本中のmf数を数え、その実数を表中に示した。また、その下にHA抗体価をカッコ内に示した。腹腔内に移入したmfは翌日から末梢血中に出現し、1、2週後には最高値に達し、その後6週を経過してもmfは末梢血中に認められた。

抗体価を測定した2例中1例は3週から5週の間低い抗体価を認めた(Table 1)。

Table 1 Density of transferred microfilariae of *Litomosoides carinii* in blood in the cotton rat.

CR No.		Days after intraperitoneal injection of mf								
		1 day	3	5	1 week	2	3	4	5	6
12	mf	9	—	—	79	34	67	44	13	26
	Density	4			78	48	53	38	33	33
	(HA)	(<32)			(<32)		(32)	(32)	(32)	(<32)
18	mf	9	51	—	48	71	55	54	36	29
		14	50		69	96	54	31	46	25
25	mf	—	—	36	—	—	—	—	—	22
				40						14
	(HA)			(<32)						(<32)

mf count/2.5 cmm in two smears and HA titer (Reciprocal)

CR: cotton rat

HA: hemagglutination

Table 2 Change of density of transferred microfilariae of *Litomosoides carinii* and HA titer after inoculation of spleen cells of an infected cotton rat.

CR No.	Number of spleen cells (million)		After inoculation of mf				After inoculation of spleen cells							
			1 day	2	4	1 week	1 day	2	1 week	2	3	4	5	6
9	21	mf	2	4	10	—	11	19	17	27	5	0	0	—
		Density (HA)	0	3	15		26	28	26	17	4	0	0	
						( $<32$ )		(128)	(1,000)	(1,000)			( $<32$ )	
13	900	mf	13	59	114	114	107	110	97	106	50	0	0	0
			9	77	76	76	102	107	120	76	40	0	0	0
		(HA)	( $<32$ )	( $<32$ )	( $<32$ )		( $<32$ )		(128)	(128)	(32)	( $<32$ )		

mf count/2.5 cmm in two smears and HA titer (Reciprocal)

CR: cotton rat

HA: hemagglutination

Table 3 Effect of DEC (200 mg/kg) administered to transferred microfilariae of *Litomosoides carinii* 2 days after inoculation of spleen cells from a normal cotton rat.

CR No.	Number of spleen cells (million)		After inoculation of mf	After inoculation of spleen cells		After treatment with DEC						
			2 days	2 days	1 week	1 hr	1 day	3	1 week	2	4	6
29	20	mf	70	93	128	21	60	58	81	47	25	27
		Density	78	119	105	22	62	53	83	55	22	23
		(HA)	( $<32$ )			( $<32$ )				( $<32$ )		

mf count/2.5 cmm in two smears and HA titer (Reciprocal)

CR: cotton rat

HA: hemagglutination

Table 4 Effect of DEC (200 mg/kg) administered 2 days after inoculation of spleen cells of infected cotton rat on transferred microfilariae of *Litomosoides carinii*.

CR No.	Number of spleen cells (million)		After inoculation of mf				After inoculation of spleen cells		After treatment with DEC								
			1 day	2	4	1 week	2	1 day	2	5 min	1 hr	6	1 day	1 week	2	3	6
11	84	mf	0	5	11	15	15	11	10	—	2	—	4	2	0	0	0
		Density	0	0	6	16	19	6	15		3		3	2	0	0	0
		(HA)				( $<32$ )	(512)	(1,000)					(3,000)	(2,000)	(512)	(32)	
21	190	mf	0	66	69	—	—	131	—	10	18	37	19	36	39	0	—
			0	37	44			173		26	10	71	27	39	25	0	
		(HA)	( $<32$ )				(128)										(2,000)
23	15	mf	15	—	—	16	—	12	13	10	4	4	11	0	0	—	—
			10			19		24	26	2	2	10	10	0	0		
		(HA)		( $<32$ )		( $<32$ )								(256)		(256)	

mf count/2.5 cmm in two smears and HA titer (Reciprocal)

CR: cotton rat

HA: hemagglutination

Table 5 Effect of DEC (200mg/kg) administered 1 week after inoculation of spleen cells from infected cotton rat on transferred microfilariae of *Litomosoides carinii*.

CR No.	Number of spleen cells (million)		After inoculation of mf			After inoculation of spleen cells			After treatment of DEC										
			1day	2	3	1 day	2	1 week	5 min	1 hr	1 day	2	3	1 week	2	3	4	5	6
8	57	mf	0	5	19	20	22	39	4	2	13	8	8	14	10	2	0	0	—
		Density	1	6	12	21	22	28	8	2	11	12	4	23	7	6	1	0	
		(HA)	(<32)			(<32)			(128) (128) (128) (1,000)										
31	20	mf	30	—	158	—	—	254	141	49	115	134	175	178	85	23	0	—	0
			32		178			273	109	52	112	118	154	133	90	26	0		0
		(HA)	(<32)			(64)			(500) (500) (<32)										

mf count/2.5 cmm in two smears and HA titer (Reciprocal)

CR : cotton rat

HA : hemagglutination

Table 6 Effect of DEC (200mg/kg) administered 2 weeks after inoculation of spleen cells from infected cotton rat on transferred microfilariae of *Litomosoides carinii*.

CR No.	Number of spleen cells (million)		After inoculation of mf			After inoculation of spleen cells				After treatment with DEC										
			1day	2	3	1day	2	1week	2	5 min	1 hr	1 day	2	3	1 week	2	3	4	5	
2	8	mf	4	—	11	46	83	46	77	6	2	9	—	17	29	13	10	—	—	
		Density	6		11	37	123	58	96	4	5	12		18	32	11	14			
		(HA)	(<32)		(<32)		(32) (32)		(64) (128) (128)											
30	20	mf	—	4	—	—	—	—	29	—	16	11	—	9	4	2				
				1					29		7	10		14	6	4				
		(HA)	(<32)			(128)			(250) (500)						(64)					

mf count/2.5 cmm in two smears and HA titer (Reciprocal)

CR : cotton rat

HA : hemagglutination

B群 ; mf が末梢血中に出現したものの2例について、感染コトラット由来の脾細胞を1例 (No. 9) に  $2.1 \times 10^7$ 、他の1例 (No. 13) に  $9 \times 10^8$  個を股静脈より注入した (Table 2)。

mf 濃度は2例共に脾細胞注入後2週頃から減少しはじめ4週で全て消失した。

HA 抗体価は脾細胞注入後1週から2週後に出現しはじめ、mf の減少時に増大する傾向にあり6週後には消失した。

C群 ; mf が血中に出現したものに正常コトラットの脾細胞  $2 \times 10^8$  個を注入し、DEC 効果をみた1例 (No. 29) では、DEC 注入後1週には mf は DEC 注入前の80%にまで復帰し、その後6週に到っても血中に認められた (Table 3)。

D群 ; 末梢血中に mf が存在している動物に感染コト

ラットの脾細胞を注入し、その後2日、1週、2週、3週目に DEC を注入して mf 濃度の変化を測定した。

mf の濃度変化はB群のごとく感染コトラットの脾細胞注入のみによっても注入後1週、2週と高濃度を保ち3週より減少しはじめ4週目には mf 数は消失した。DEC 効果の判定は感染コトラットの脾細胞注入後3週までの間で各々 DEC を注入し、mf 数がB群のカーブに復帰もしくはそれに近い動向を示したものを効果なし、これに対し、強い mf の減少及び消失をきたしたものを効果ありとした。

感染コトラットの脾細胞注入後2日目に DEC を注入した3例では末梢血中の mf 数は DEC 注入5分後には注入前の mf 数の10%~20%の減少を示し、B群のカーブに復帰することなく2週以内に末梢血より消失した (Table 4)。

Table 7 Effect of DEC (200mg/kg) administered 3 weeks after inoculation of spleen cells from infected cotton rat on transferred microfilariae of *Litomosoides carinii*

CR No.	Number of spleen cells (million)		After inoculation of mf				After inoculation of spleen cells					After treatment with DEC					
			1day	2	3	1 week	1day	2	3	1week	2	3	5min	1hr	1day	1week	3
7	57	mf	1	2	11	—	18	18	—	52	24	18	2	0	0	0	0
		Density (HA)	0	1	17		19	23		24	37	14	2	1	0	0	0
					(<32)					(256)	(500)	(500)					(2,000)
15	900	mf	3	—	11	43	42	—	30	43	10	8	0	0	0	0	0
		(HA)	5		11	44	31	20	41	31	12	4	0	0	0	0	0
					(<32)					(<32)		(64)					(128)

mf count/2.5 cmm in two smears and HA titer (Reciprocal)

CR: cotton rat

HA: hemagglutination

HA 抗体価は感染 コトラット 脾細胞注入後 1 日で 1:512 まで上昇したのも認められ、1 週間には低いものでも 1:256、高いものでは 1:3,000 に達し、4 週を経過しても抗体は認められた。

感染脾細胞注入後、1 週、2 週目の DEC 注入の各 2 例については、DEC 注入後 1 週で mf 濃度は注入前の 40%~50% に回復し、4 週を経過しても末梢血中に mf を認めた (Table 5, 6)。

HA 抗体価は 脾細胞注入後 1, 2 週目には 1:256 から 1:500 で、4 週後も存続していた。

感染コトラット脾細胞注入後 3 週目に DEC を注入した 2 例については、DEC 注入後、mf 数は著しく減少し消失した。

HA 抗体価は感染脾細胞注入後 1 週後に出現し、4 週に到つても検出された (Table 7)。

以上のことから、腹腔内に移入された mf は翌日から末梢血中に出現し、6 週に到つても末梢血中に認められるが、感染コトラットの脾細胞を注入すると mf 数は次第に減少し 4 週後には消失した。また、正常コトラットの脾細胞を注入したものは DEC による mf 減少、消失効果は強く認められなかった。感染コトラットの脾細胞注入後、2 日目と 3 週目に DEC を注入すると著しい mf の減少、消失効果がみられた。これに対し、1 週、2 週目に DEC を注入したものでは 1 過性の mf 減少はみられたが、その後 mf 濃度の復帰が認められ、6 週を経過しても末梢血中に mf がみとめられるものさえあった。

## 考 察

*L. carinii* 感染コトラットの mf に対する DEC

の作用について、Hawking *et al.* (1950)、佐藤 (1959)、田中 (1964) らは末梢血中の mf に対して強い効力を示すことを報じ、DEC 注入後 3 分後には血中の mf 濃度が注入前の  $1/10$  に減少し、その状態が数週は継続することを認めている。また、mf の消失について、肝臓の病理組織像の検索により、クッパ氏細胞に捕えられることが、Hawking *et al.* (1950)、小林ら (1969) により示された。

また、*in vitro* の実験において、DEC は *L. carinii* の成虫、mf に対し効果のないことが Hawking *et al.* (1950)、松田ら (1968)、小林ら (1969) により認められている。その中で特に Hawking *et al.* (1950) は DEC が肝臓の細網内皮系の喰細胞の捕食を助長する働きがあると推定した。

しかし、小林ら (1969) は mf を培養液中で DEC に接触させ非感染コトラットの腹腔に移植しても mf は末梢血中に出現し、3 日後に DEC を注入してもその効果がなかつたことを示している。また、DEC 作用は *L. carinii* 抗原を用いた HA 反応で抗体価の検出される時期に効果を発揮することから DEC の効果は宿主が感作された状態で発現すると報じている。以上の実験では流血抗体の検出可能な時期に DEC の効果が出現するという関係が認められただけで、真に流血抗体が有効に作用しているという証明は得られていない。

その後、小林ら (1969) は正常コトラットに移入された mf に対し、感作コトラットの血清を注入し、DEC の効果発現の有無を調べたが、流血抗体の関与について直接証明することは出来なかつた。

一方、藤田ら (1970)、Tanaka *et al.* (1970) は mf を移入したコトラットに感染コトラットの脾細胞を

移入した場合に DEC の効果が出現することを少数動物実験で認めて予報として報じている。

本実験ではかなり多数の動物実験を繰返し脾細胞注入後の効果の変化に関しても一定した結果を得た。本研究の結果、感染コトラットの脾細胞の注入で、注入後4週で mf が消失することから人為的に作られた感染状態でも mf に対して何らかの影響を及ぼしたと考えられる。また、感作脾細胞を注入してから2日後及び3週後の DEC 注入に対して顕著な mf 減少を認めしたが、1週、2週後の DEC 注入ではその効果が認められなかった。

実験に用いたコトラットは1953年に2、3組の成獣から累代飼育されたもので、純系にならぬ様注意が払われてきたが、かなり近縁になっている。異腹のコトラット間の皮膚移植で3カ月後でも拒否反応がみられないことから遺伝的に近いものと考えられ、いわゆる閉鎖系 (closed colony) といえる。

そのために注入された脾細胞は2日後に機能を発揮したが、1週以後には機能を失ったものと推定される。感染脾細胞注入後3週目の DEC 注入による mf の減少はマクロファージなどと共に導入された *L. carinii* の抗原が宿主を感作したものと推定される。

HA 抗体価は mf 移入のみによつても低い値で出現することもある。また、感作脾細胞注入後 mf 数の減少につれて抗体価の上昇が認められ、mf 消失時期及びその後高い値を示し、その後徐々に減少した。DEC を注入した動物の HA 抗体価は脾細胞注入後、早いものでは1日、遅いもので1週間過ぎには上昇した。

感染脾細胞を注入してから1週、2週後には DEC 効果が認められないが、その時期にも HA 抗体価が検出されていることから、DEC の効果の発現に流血抗体の存在だけでは十分な条件となりえないと考えられた。

#### ま と め

抗フィラリア剤 diethylcarbamazine (以下 DEC) の作用機序に関し、Hawking *et al.* (1950) はオプソニン様の作用と推定し、小林ら (1969) は DEC の効果発現には宿主の感作状態が重要な条件であると報じた。本研究では感作された宿主の脾細胞の役割を検討した。

30万~50万の *L. carinii* のマイクロフィラリア (mf) を3匹の非感染コトラットの腹腔に移入した結果、mf は翌日より末梢血中に出現し、6週を経過しても流血中に認められた。この様に mf を移入したコトラット2匹に感染コトラットの脾細胞を股静脈より注入した場

合、血中の mf は次第に減少し、4週後には消失した。

移入された mf を持つコトラットに感染動物の脾細胞を注入した後、1日、1週、2週、3週目に DEC (200mg/kg) の効果を調べた。DEC 注入後、mf 濃度が低下し、DEC 非注射群の mf 減少傾向にまで回復しなかった場合に DEC の効果が発現したと判定した。感作脾細胞注入後2日、3週目に DEC を注入した各3匹と2匹において、DEC の効果が出現し、1週、2週後に DEC 注入した各2匹では DEC の効果は認められなかった。

これらのコトラットの HA 抗体価は感作脾細胞注入後1日から1週後に出現し始め、のち6週後にも認められた。なお、正常コトラットの脾細胞注入後2日目に DEC を注入されたもの1例では DEC の効果は認められなかった。

この結果より、DEC の作用機序に、感作された脾細胞が重要な役割をはたしていると考えられる。

感染コトラットを供給して下さった田辺製薬業理研究所の大島慧氏、田中英文氏に深く感謝の意を表す。

#### 参 考 文 献

- 1) Csizmas, L. (1960) : Preparation of formalinized erythrocytes. Proc. Soc. Exp. Biol., 103, 157-160.
- 2) 藤田紘一郎・小林準三・橋口淳一・篠田恵子・工藤美子 (1970) : DEC の作用機序、特に細胞性抗体の関与について。寄生虫誌, 19, 403.
- 3) Hawking, F., Sewell, P. and Thurston, P. (1950) : The mode of action of Hetrazan on filarial worms. Brit. Jour. Pharmacol., 5, 217-238.
- 4) Hewitt, R. I., Kushner, S., Stewart, H. W., White, E., Wallace, W. S., and Subbarow, Y. (1947) : Experimental chemotherapy of filariasis. Effect of 1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine hydrochloride against naturally acquired infection in cotton rats and dogs. J. Lab. Clin. Med., 23, 1314-1329.
- 5) Jacobs, L., and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit., 43, 308-315.
- 6) Kamiya, M., and Tanaka, H. (1967) : Hemagglutination test in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Jap. J. Exp. Med., 39, 593-599.
- 7) 小林準三・松田肇・藤田紘一郎・酒井健夫・篠田恵子 (1969) : コトラットフィラリア *Li-tomosoides carinii* に対する Diethylcarbamazine citrate の作用機構に関する実験。寄生虫

- 誌, 18, 563-574.
- 8) 松田 肇・小林準三・酒井健夫(1968) : コットンラット糸状虫 *Litomosoides carinii* の生体外飼育とこれによる抗フィラリア剤の検定. 寄生虫誌, 17, 221-228.
- 9) 佐藤孝慈(1959) : Cotton rat を用いた糸状虫症化学療法の実験的研究 (1) スパトニン及びマファゾールの流血中のミクロフィラリア数に及ぼす影響. 寄生虫誌, 8, 962-971.
- 10) 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 (3) 糸状虫症化学療法の実験的研究, 特に diethylcarbamazine の影響について. 寄生虫誌, 14, 1-5.
- 11) 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.
- 12) Tanaka, H., Fujita, K., Matsuda, H., and Sasa, M. (1970) : Immunologic studies in experimental infections of *Schistosoma japonicum* and filariae. Japan. J. Trop. Med., 11, 72-73.

## Abstract

### ROLE OF SPLEEN CELLS TO ACTION OF DIETHYLCARBAMAZINE IN COTTON RAT FILARIASIS

MASATOSHI TAKAOKA AND HIROSHI TANAKA

(Department of Parasitology, The Institute of Medical Science,  
University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108, Japan)

The mode of action of diethylcarbamazine (abbreviated as DEC) on filaria was first studied by Hawking *et al.* (1950) and they considered that this drug has opsonin-like activity. Following Kobayashi *et al.* (1969), the effect of DEC exhibits when the humoral antibody is detected in the cotton rats infected with *Litomosoides carinii*.

In the present paper, the role of spleen cells from the experimentally infected host to the mechanism of action of DEC was studied. When three normal cotton rats were transferred with  $3 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  microfilariae (abbreviated as mf) of *Litomosoides carinii* into the peritoneal cavity, mf appeared in peripheral blood from the next day and remained even after 6 weeks. In 2 animals having transferred mf, after inoculation with spleen cells ( $10^6$ - $10^8$ ) from infected cotton rats, mf decreased gradually and disappeared in 4 weeks. Effect of DEC was tested 2 days, 1, 2, 3 weeks after inoculation of spleen cells, mf decreased clearly in two groups composed of 3 and 2 rats injected with DEC at a dose of 200 mg/kg 2 days or 3 weeks after the inoculation of spleen cells respectively. On the other hand, decrease of mf was not so remarkable when DEC was administered 1 or 2 weeks after the inoculation of spleen cells. But in the animal inoculated with spleen cells from normal cotton rat, effect of DEC was not found.

The HA titer in these cotton rats began to rise in a period from the following day to no longer than 1 week after inoculation of spleen cells and lasted at least for 6 weeks. From these results, it was considered that spleen cells sensitized with *Litomosoides carinii* were recognized to play an important role on the mode of action of DEC.