

Echinostoma hortense Asada, 1926に関する研究

(4) 感染経過に伴う排卵数, 末梢血液好酸球, 抗体の変動

谷 重 和

秋田大学医学部寄生虫学教室

(昭和53年10月12日 受領)

はじめに

Echinostoma hortense の人体に対する 病害性について, 有菌ら (1976) は神戸市および大阪市で見出した本吸虫寄生者 4 例のいずれもが上腹部痛を訴え, 末梢血液中の好酸球増加を認め, さらにまた, 自家感染実験によつても同症状の発現が確認されたと述べている. しかし, 著者ら (1974, 1976) が秋田県内で見出した15例では自, 他覚的に何らの異常も認められず, 有菌らの報告とはやや異なるものであつた.

それゆえ今回は, 本吸虫寄生の人体に与える病害性を更に明確にする目的から, 実験的に感染させた5名について, 排卵数, 末梢血液中の好酸球, 各クラスの抗体などの推移を追跡すると共に, 前記15例の寄生者についても抗体の測定を実施し, 若干の考察を試みた.

材料および方法

(1) 感染実験

著者を含む5名(No. 1, S. T., 33歳: No. 2, K. I., 28歳: No. 3, S. I., 30歳: No. 4, T. S., 22歳: No. 5, H. M. 25歳, いずれも感染前の検査では糞便内に寄生虫卵を認めず, 血液像も正常)の健康男子にドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* より分離した本種吸虫メタセルカリアを30コづつ経口投与した. 投与後5日目より連日 AMSIII 法による糞便検査を行ない, 排卵開始日数を確認し, その後虫卵が陰性となるまで7~10日の間隔で AMSIII 法により EPG を算出した.

(2) 抗原の作製

本種メタセルカリアをハムスターに与えて得た成虫を

生食水で十分に洗い, 乳鉢を用いてよく磨砕したあと, 超音波を用いて10Kc. 15分間処理した. その後, 70,00×G, 30分遠心して上清をとり濃縮したあと, PBSに4C, 12時間透析したものを抗原として用いた.

(3) 標識抗体の作製

プールした人血清より分離した IgG, Macroglobulinemia 患者(山形県庄内病院例)血清より分離した IgM および IgA-myeloma 患者(秋田大学第3内科例)血清より分離した IgA から Miller and Metzger(1965)の方法に従い, γ , μ , α 鎖をそれぞれ分離し, Freund's complete adjuvant を加えて家兎に注射し免疫して抗血清を作製した. 各鎖に特異的な抗体は Avrameas and Ternyck (1969) に従い, ヒト血清 IgG, IgM, IgA を glutaraldehyde で不溶化し, immunoabsorbent として対応する抗血清に加えて特異抗体を反応させた後, 酸性緩衝液により解離して作製した.

酵素は Alkaline phosphatase Type IV (Sigma) を用い, Engvall and Perlman (1972) の方法に従い glutaraldehyde で抗体に標識を行なった.

(4) 抗体の測定

5名にメタセルカリア投与前ならびに投与後7-10日の間隔で採血し, 血清を-60Cに保存し一括して抗体の測定を行なった. なお, 採血の期間は No. 1, 2では200日目, No. 3, 4, 5では90日目までである. また同時に, 採血時に血液塗抹標本作製し血液像を調べた. さらに秋田県下に見い出された15例の本吸虫寄生者のうち, 駆虫時に採血できた9例(男6例, 女3例)について抗体測定を行なった. 対照として秋田市, 秋田県由利郡鳥海村および北海道網走地方に在住する一般住民

より採血した血清についても同時に測定を行ない比較した。

IgG, M, A 抗体の測定は Engvall *et al.* (1971) によつて開発された Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) に準じて行なつたが、固形相としては Polystyrene tube のかわりに容量 1ml の Disposable polystyrene cuvette (4×10×45mm³) を用いた。各 Cuvette には上記の如く作製した抗原を Coupling buffer (0.1M Sodium carbonate, pH 9.6, 0.02% NaN₃) を用いて蛋白量 10μg/ml となるように希釈したものを 1ml 注入し、一晚室温で軽く振盪して吸着させた。翌日 Washing buffer (0.05M PBS, pH 7.4, 0.1% Tween 20) を用いて 3 回吸引洗滌後、Dilution buffer (0.05M PBS, pH 7.4, 0.2% BSA, 0.02% NaN₃, 0.1% Tween 20) で 100 倍に希釈した被検血清を 1ml 注入して 27°C 2 時間反応させた。なお Dilution buffer のみを入れた Cuvette 4 本も対照として爾後同様の操作を行なつた。血清反応後、Washing buffer で 2 回、Dilution buffer で 1 回洗滌し、Dilution buffer で 400 倍に希釈した標識抗体を 1ml 再び 27°C 2 時間反応させた。反応終了後、Dilution buffer で 1 回、Substrate buffer (0.05M Carbonate buffer, pH 9.8, 0.01M MgCl₂) で 2 回洗滌し、Substrate buffer に基質 p-Nitrophenylphosphate を 1mg/ml となるように溶解した基質液を 1ml 注入し、27°C、1 時間反応させた。その後は、1N NaOH 0.1ml を加えて反応停止させた後、分光光度計 (日立 333 型) を用いて波長 400nm で吸光度を測定した。なお、加えた標識抗体全部の酵素活性を知るため標識抗体 0.1ml に基質液 1.0ml を加えた Cuvette 5 本を用意した。

IgE 抗体は Wide *et al.* (1967) によつて開発された Radioallergosorbent (RAST) によつて測定した。固形相として宮本ら (1973) に従つて CNBr で活性化した直径 4mm の東洋濾紙 No. 6 に抗原を結合した Disc を用い、¹²⁵I 標識 anti-IgE は第 1 ラジオアイソトープ研究所より供与を受けた Phadebas RAST Kit (Pharmacia Diagnostic 製) を使用した。測定は同キットに添付されている説明書に従つて行なつた。Disc に結合した放射能活性は Scintillation Gammmer Counter (Aloka) を用いて 1 分間測定した。ELISA および RAST によつて測定した値は鈴木ら (1976) の方法に従つて $\frac{\text{被験血清の測定値}-\text{対照ゼロサンプル測定値}}{\text{標識抗体の測定値}} \times 100 =$ (%) として特異抗体の量を示した。

成 績

(1) 自覚症状

5 名とも全経過を通じて下痢、便秘などの便の異常を示したものはなかつたが、5 名中 Case 1, 2 の 2 名にメタセルカリア投与後 20 日より 30 日目頃までの間にいずれも 3 回軽度の腹痛があつた。

(2) 排卵開始後の EPG の変動 (Fig. 1)

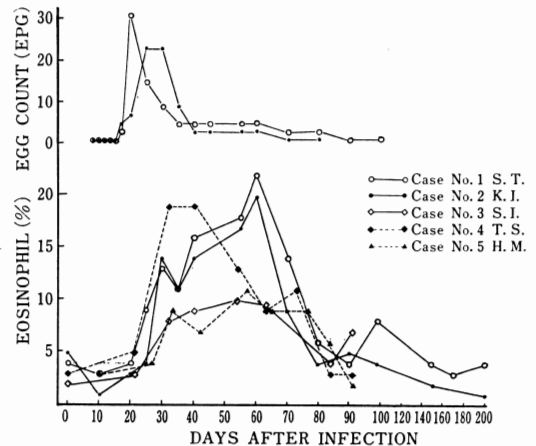


Fig. 1 Time-course fluctuation of fecal egg counts and eosinophils.

本種メタセルカリア投与後、5 日目から連日 AMSIII 法により糞便検査を続けたところ、Case 1, 2 で 17 日より虫卵が検出されるようになった (前報, 谷, 1978)。その後の EPG による排卵の経過は Fig. 1 に示す如くである。Case 1 は 20 日目 (EPG 30) Case 2 は 25 日目 (EPG 22) にそれぞれピークに達した。その後 Case 1 は早くも 25 日目、Case 2 は 30 日目を過ぎる頃排卵数が急激に減少し、Case 1 は感染後 70 日目、Case 2 は 90 日目にそれぞれ虫卵は完全に陰性となつた。Case 4 は 16 日目に初めて虫卵が検出されたが、その後の経過は追跡していない。しかし Case 3, 5 では糞便検査を 1 カ月間にわたり行なつたが、ついに虫卵は検出できなかった。

(3) 末梢血液好酸球の変動 (Fig. 1)

全例感染後 20 日目を過ぎる頃から好酸球の百分率は上昇しはじめ、Case 4 は 30 日目 (19%) に早くもピークに達し、次いで Case 3, 5 は 50 日目 (Case 3, 10%, Case 5, 11%), Case 1, 2 は 60 日目にそれぞれ遅れてピークに達した (Case 1, 22%, Case 2, 20%)。特に Case 1, 2, 4 の 3 例は 19—22% の高値を示した。

なお、これら3例にはいずれも糞便内に虫卵が認められたものである。その後 Case 4は40日目、Case 1, 2, 3, 5では遅れて60日目を過ぎる頃よりそれぞれ下降しはじめ、感染後80日目頃にはほとんど全例感染前の値にもどった。Case 1, 2についてはその後200日目まで観察したが、いずれも正常値範囲内であった。なお、単球、リンパ球、好中球には全経過を通じて変動は認められなかった。

(4) 人体感染例の IgG, M, A およびE抗体の変動

ELISA 法によって測定した本種吸虫に特異的な IgG, M, A 抗体の変動は Figs. 2-4に示した如く IgG 抗体は Case 1, 3, 4の3例に軽度な上昇がみられた。すなわち、感染後20日目頃から上昇がみられ、40日目頃に1つのピークを形成している。Case 4ではその後、漸時下降しているが、Case 2, 3では40日目以後もゆるやかな上昇をつづけ、80日目頃にさらに高い山を形成し、その後は下降している。次に IgM 抗体は Case 3の1例にしか上昇がみられなかった。すなわち、感染後20日目から急速に上昇し、40日目にピークに達し、その後下降しはじめ、90日目では感染前の値にもどった。

IgA 抗体は IgM 抗体と同じく Case 3の1例に上昇がみられた。すなわち、感染後20日目から急速な上昇

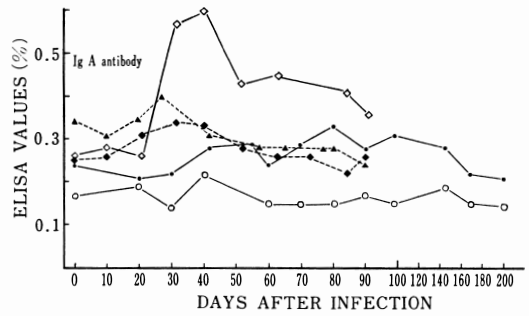


Fig. 4 Time-course development of IgA antibody measured by ELISA.

がみられ、40日目でピークとなり、その後は下降している。

RAST 法によって測定した IgE 抗体の変動は Fig. 5に示した如く Case 3, 4の2例に明らかな上昇がみられた。すなわち、Case 3は感染後10日目、Case 4は20日目を過ぎる頃から急激に上昇しはじめ、60日目にそれぞれピークに達した。以後下降しはじめたが観察した90日目になっても2例とも比較的高い値を持続していた。

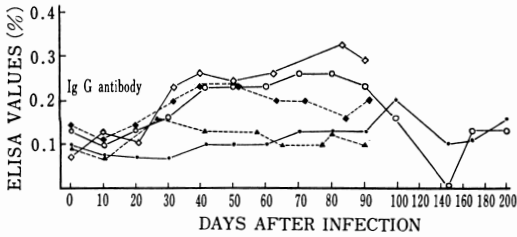


Fig. 2 Time-course development of IgG antibody measured by ELISA.

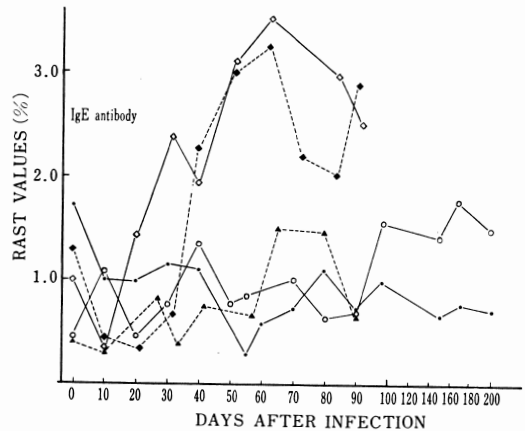


Fig. 5 Time-course development of IgE antibody measured by RAST.

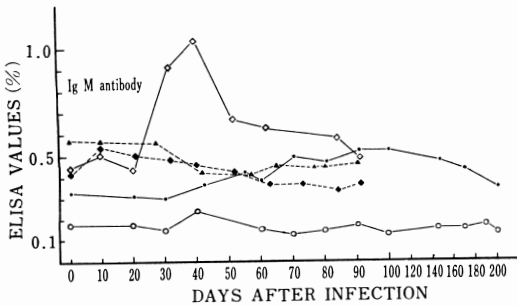


Fig. 3 Time-course development of IgM antibody measured by ELISA.

(5) 小括

以上述べた様に末梢液好酸球ならびに IgG, M, A およびE抗体は排卵が始まる16-17日目より少し遅れて上昇しはじめ、排卵数の減少した40-60日目にピークとなった。その後糞便内に虫卵が検出されなくなった70-90日目に感染前の値にもどるものが多かった。このうち、特に Case 3では IgG, M, A およびE抗体のい

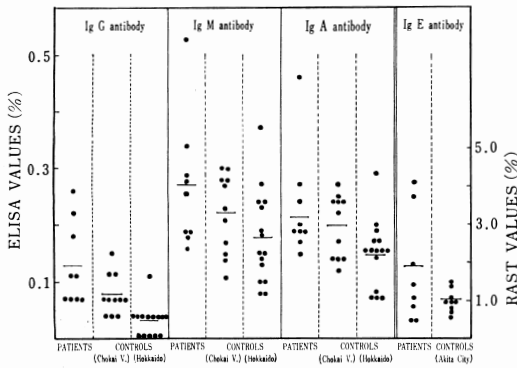


Fig. 6 Immunoglobulin G, M and A values determined by ELISA and IgE by RAST in echinostomiasis patients

ずれにも上昇が認められている。

(6) 自然感染者の血液検査と Specific IgG, M, A および E 抗体

秋田県で見い出された本種吸虫の自然感染者 9 名の特異的な血清抗体は Fig. 6 に示した如く, IgG, ($0.128 \pm 0.068\%$), IgM ($0.267 \pm 0.108\%$), IgA ($0.228 \pm 0.088\%$) 抗体とも対照群である鳥海村一般住民 11 名の IgG ($0.076 \pm 0.032\%$), IgM ($0.221 \pm 0.066\%$), IgA ($0.197 \pm 0.052\%$) に比べると統計学的に有意差は認められなかった ($p < 0.05$). しかし同じ対照群である北海道一般住民 15 名の IgG ($0.028 \pm 0.028\%$), IgM ($0.176 \pm 0.078\%$), IgA ($0.146 \pm 0.056\%$) に比べると明らかな高値を示し, 有意の差が認められた ($p < 0.05$). 同様に本種吸虫自然感染者 8 名の IgE 抗体 ($1.792 \pm 1.314\%$) は対照群である秋田市一般住民 9 名のそれ ($0.992 \pm 0.278\%$) に比べると有意差は認められなかった ($p < 0.05$).

また本種吸虫自然感染者 9 名についての好酸球 $2.50 \pm 1.08\%$, 血清蛋白分画, T. P 7.81 ± 0.86 g/dl, Alb. $62.25 \pm 1.99\%$, α_1 3.47 ± 0.76 , α_2 9.41 ± 1.40 , β 9.08 ± 1.01 , α 15.52 ± 2.31 , A/G 1.70 ± 0.12 でありいずれも正常値の範囲であった。

考 考

Echinostoma hortense のヒト体内における寄生態度について明らかにするため 5 名に本種吸虫メタセルカリアを 30 コづつ経口投与した。糞便内に虫卵を認めた 3 名のうち 2 名に感染後 20 日目より 2 ~ 3 日間隔に 3 回程度軽度の腹痛が認められた。有菌ら (1976) の 2 名の感染実験では (投与メタセルカリア数 10 コ) 2 名ともに糞便内に虫卵を認め, 自覚症状として 2 名ともに腹痛がみら

れ, そのうち 1 名には下痢もみられたとしている。今回の人体感染実験では有菌ら (1976) に比べて投与メタセルカリア数が多かったにも拘わらず自覚症状の発現は顕著ではなかった。また本種吸虫の自然感染者の臨床所見でもなんらの異常を認めておらず, 有菌 (1976) の成績とやや異なるようであった。

次にヒト体内での生存期間は排卵期間から 70—90 日と推定され, 有菌ら (1976) の 8—10 週に比べてやや長かった。しかしラットおよびハムスター体内の生存期間は 21 週以上であったこと (谷, 1978) に比べるとヒト体内での生存期間は短かく, ラット, ハムスターの半分以下であった。

末梢血液好酸球数については全例に著明な増加が認められ, 有菌ら (1976) の成績と一致した。しかし, 有菌ら (1976) が観察した単球の増加は今回は認められなかった。

前報 (谷, 1978) と今回の成績とを併せ考えると, ヒトは本種吸虫の好適宿主ではなく, メタセルカリアを摂取しても成虫にまで発育するのは極めて少なく, 成虫となっても人体内の生存期間は比較的短かい。しかも, 人体に寄生してもその病害は比較的軽度で, 稀に軽い腹痛を感じる程度であるため, 多くの例では気づかぬ間に自然に排虫されてしまうものと思われた。

次に本種吸虫の感染の経過に伴う各種抗体の変動を ELISA 法および RAST 法によつて調べた。その結果 Specific IgG 抗体については 5 例中 3 例 (Case 2, 3, 4) に, Specific IgM および A 抗体について 1 例 (Case 3) にそれぞれ軽度な上昇が, Specific IgE 抗体は 2 例 (Case 3, 4) に上昇がそれぞれ認められた。このような感染後体内移行を行わない腸管寄生虫でも IgG および E 抗体の上昇は鞭虫, 広節裂頭条虫などに認められており (中里, 1974; 荒木ら, 1976; 近藤ら, 1977), 本種吸虫の感染によつて同様に軽度ながら主として IgG および E 抗体の上昇することが観察された。さらにこれらの免疫反応によつて本症に特有な抗体が検出できることが確かめられれば, 本症診断の補助手段として用いる可能性も出てくるわくであるが, 抗体の上昇も顕著ではなくしかも個体差がいちじるしいため診断的価値の期待できないものと思われた。

本種吸虫の自然感染者 9 例の Specific IgG, M, A 抗体は対照群である北海道一般住民に対して明らかな高値を示したが, 本症の流行地である鳥海村 (谷, 1976) 一般住民との間には有意の差は認められなかった。また, 自然感染者の IgE 抗体についても同様に秋田市一般住

民との間に有意差は認められなかつた。伊藤 (1972) は IgE 抗体について日本の蛔虫寄生者はブラジルの蛔虫寄生者に比較して著しく低いということから感染の度合が大きく影響しているためであろうと述べているが、本種吸虫と免疫グロブリンとの関係についても同様の事が言い得るか否かはさらに多数の症例について検討する必要がある。

ま と め

ドジョウより分離した *E. hortense* のメタセルカリアを実験的にヒトに経口投与すると、5 例中 3 例の 16—17 日後から虫卵陽性となり、その後 70—90 日まで持続するところから、本吸虫は体内でも成熟し、ある期間生存することが再確認された。また本吸虫感染により全例に好酸球の著明な増加がみられたが、抗体産生はきわめて軽度でしかも個体差が認められた。すなわち、Specific IgG, E 抗体の上昇は 5 例中それぞれ 3, 2 例, IgM, A 抗体の上昇は 5 例中 1 例にしか観察されなかつた。また、本種吸虫感染者の IgG, M, A 抗体は対照群に比べてやや高値を示した。以上の如く、本種吸虫のように比較的短期間しか寄生が持続しない腸管寄生虫での抗体産生はきわめて軽度であることが知られた。

謝 辞

擧筆に当り、御指導、御校閲いただいた教室主任鈴木俊夫教授に深甚なる謝意を表すとともに、研究に御協力いただいた当教室石田和人助手、石郷岡清基技官、第 1 病理学教室、土井優子技官、ならびに医学部学生森久、鈴木敏文の両君に対し、感謝の意を表します。また、Phadebas RAST-Isotope reagents を提供下さった第 1 ラジオアイソトープ研究所に感謝します。なお、本論文の要旨は第 47 回日本寄生虫学会総会において報告した。

文 献

- 1) 荒木恒治・中里秀男・生駒一正 (1976) : 寄生虫免疫に関する研究 (第 1 報). 寄生蠕虫症 (鉤虫症, 回虫症, 鞭虫症) における血清 IgE 値とその変動について, 寄生虫誌, 25, 153-160.
- 2) 有菌直樹・上村駿一・近藤力王至・松野喜六・吉田幸雄・前田東作・吉田弘・武藤京子・井上善英・高橋桂一 (1976) : *Echinostoma hortense* Asada, 1926 の研究, 特に人体感染について, 寄生虫誌, 25, 36-45.
- 3) Avrameas, S. and Ternyck, T. (1969) : The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochem.*, 6, 53-56.
- 4) Engvall, E., Jonsson, K. and Perlman, P. (1971) : ELISA II. Quantitative assay of proteins antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme labelled antigen and antibody coated tubes. *Biochem. Biophys. Acta*, 251, 427-434.
- 5) Engvall, E. and Perlman, P. (1972) : Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129-135.
- 6) 伊藤幸治 (1972) : 各種疾患における IgE レベル, 最新医学, 27, 1472-1483.
- 7) 近藤力王至・吉村裕之・西田和美・大西義博・上村清 (1977) : 広節裂頭条虫症の免疫血清学的研究, (1) 感染者の血清グロブリン, 特に IgE 値および沈降反応について, 寄生虫誌, 26, 265-270.
- 8) Miller, F. and Metszger, H. (1965) : Characterization of a human macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 240, 4740-4745.
- 9) 宮本昭正・真野健次・伊藤幸治・富谷百合子・堀内淑彦 (1973) : Paper disc を用いての Radioallergosorbent Test (RAST) に関する研究 : アレルギー, 22(9), 584-593.
- 10) 中里秀男 (1974) : 腸管寄生虫 (鉤虫, 回虫, 鞭虫) 感染者における血清免疫グロブリンの変動, 寄生虫誌, 23, 325-333.
- 11) 鈴木俊夫・石田和人・浅石和昭・西野干郷 (1976) : アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究, 6. Radioimmunoassay による皮内反応ならびに間接赤血球凝集反応の再検討, 寄生虫誌, 25, 17-23.
- 12) 谷重和・吉村裕之・大森康正・神谷晴夫・山川博 (1974) : 秋田県で見いだされた棘口吸虫人体寄生の 1 例, 寄生虫誌, 23, 404-408.
- 13) 谷重和 (1976) : *Echinostoma hortense* Asada, 1926 に関する研究, (1) 人体寄生棘口吸虫類の種の同定と感染経路について, 寄生虫誌, 25, 262-273.
- 14) 谷重和 (1978) : *Echinostoma hortense* Asada, 1926 に関する研究, (3) ヒトおよび実験動物への感染, 寄生虫誌, 27, 495-501.
- 15) Wide, L., Bennich, H. and Johansson, S. G. O. (1967) : Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet*, ii, 1105-1107.

Abstract

STUDIES ON *ECHINOSTOMA HORTENSE* ASADA, 1926
 (4) VARIATION OF EGG COUNT, PERIPHERAL EOSINOPHILS AND
 ANTIBODIES IN HUMAN VOLUNTEERS EXPERIMENTALLY
 INFECTED WITH *E. HORTENSE*

SHIGEKAZU TANI

(Department of Parasitology, Akita University School of
 Medicine, Akita City, Japan)

When five volunteers were orally given 30 metacercariae of *E. hortense* collected from loaches, *Misgurnus anguillicaudatus*, 3 began to discharge the eggs in the feces at the 16 th-17 th infection days and continued for 70 to 90 days. This result indicates that the flukes develop to full adult and live for a certain period in man.

An evident increase of peripheral eosinophil counts was recognized in all cases after the infection. However, the antibody production was very slight with individual differences; namely, the specific IgE antibody was detected by the RAST in 2, the specific IgG antibody was detected in 3, the specific IgM antibody was detected in one and the specific IgA antibody was detected by the ELISA in one out of 5 cases, respectively. The significantly higher levels of the antibodies were shown in sera of 9 echinostomiasis patients than those in 15 sera from a non-endemic area.