

ブタ回虫卵を使用したマウス好酸球の採取法 ならびにその住血吸虫 *schistosomula* へ の付着, 障害作用

粕谷 志郎 大友 弘士

(昭和57年7月30日 受領)

Key words: eosinophils, *Ascaris suum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*

緒言

マウス好酸球の *in vitro* における殺寄生虫作用を証明した報告は多いが (Butterworth *et al.*, 1975; Kazura and Aikawa, 1980), そのほとんどは, 好酸球に富む細胞分画を得る手段として, マンソン住血吸虫, 旋毛虫などの感染動物を用いたものである。しかし, いずれも感染後の一定時期に細胞を採取しなければならない時間的制約のほか, 感染材料としての住血吸虫, 旋毛虫を継代, 維持するには大きな労力と実験者に対する危険 (バイオハザード, クラス3a) を併うため, より安全かつ簡便な方法の開発が望まれる。

われわれは, 比較的安全 (バイオハザード, クラス2b) で, 入手もさほど困難でないブタ回虫 (*Ascaris suum*) を使用してマウスの好酸球増多を惹起する方法を検討したところ, 虫卵の反復腹腔内投与方法が有効であること, この方法によれば, 動物の再利用が可能であるばかりでなく, 虫卵の反復投与を継続していれば, 常時, 充分量の好酸球の採取ができることが明らかになった。さらに, 得られた好酸球には住血吸虫 *schistosomula* に付着して障害する機能が保持されていることも判明し, その他の実験系への応用も含めて有用な方法であると考えられた。

材料と方法

実験動物: 市販の雄 ddy マウスを使用した。ブタ回虫卵, ブタ回虫抽出抗原 (Asc) の調製: 屠場から入手

本研究の一部は文部省科学研究費 (昭和55年度課題番号557098) によった。

岐阜大学医学部寄生虫学教室

したブタ回虫 (*Ascaris suum*) の雌虫より子宮を摘出し, Williams and Soulsby (1970) の方法によつて処理, 培養して幼虫包蔵卵とした。培養は内径8.5cm のガラスシャーレを用い, 各シャーレで5~10×10⁶個の虫卵を約20ml の1N H₂SO₄ 溶液に浮遊して行なつた。幼虫包蔵卵は4C で保存し, 2~3週に1回の割合で各シャーレごと40~50ml の空気を注射筒につめ, 泡立てて通気した。虫卵の一部は幼虫包蔵後, 直ちに無菌水で洗浄し, アンブルに入れ凍結乾燥して保存した。Asc は雌雄虫体より石崎 (1974) の方法で作製し, 0.5%となるようカルボールを添加し, 4C で保存した。

感染および感作: ブタ回虫の感染は虫卵を蒸留水で3回洗浄し, 各匹1,000~5,000個をカテーテルを用いて胃内へ注入した。虫卵による感作は, 虫卵を滅菌生理食塩水で3回洗浄後再浮遊し, 500~10,000個/0.5ml/匹となるよう毎週1回, マウス腹腔内へ注射した。Asc による感作は蛋白量として0.1~2mg を毎週1回マウス腹腔内へ投与した。

腹腔細胞の回収と好酸球の部分精製: 感作および感染後の各時期に, マウスにネンブタールを静注して麻酔し, 腹腔内に, ヘパリン (2.5U/ml) 加 Hanks 液 (HBSS) 5ml を注入して, 腹部をマッサージした後, 先端側部にあらかじめ小孔をもうけたベニユーラ針 (V5) を刺し, 直ちに内刃を抜去して, 腹部を下にし, 試験管内へ HBSS を回収した。なおブタ回虫感染群のみは腹腔細胞採取の2日前に10%protease pepton (Difco, U. S.A) 1.5ml を腹腔内へ注射した。腹腔細胞数は Türk 液にて希釈, 染色し, 血球計算盤で数え, 好酸球の割合はメタノール固定, Giemsa 染色した標本より算出した。Giemsa 液は, 1/15M Na₂HPO₄ 溶液 4 容と 1/15M KH₂PO

溶液6容で作製した緩衝液10 ml に対し、5滴(2.0~2.5ml)の割で希釈し、染色時間を12分とした。

好酸球の部分精製は Ramalho-Pinto *et al.* (1979) の方法に準じて行なつた。要約すると、好酸球に富む細胞分画を HBSS で2回洗浄し、 1×10^6 細胞/ml 程度となるよう Eagle's MEM (阪大微研, 大阪) に再浮遊し、プラスチックシャーレ (Falcon, U.S.A.) に深さ1 mm になるよう分注し、7~10分間炭酸ガス培養器 (37C, 5%炭酸ガス, 湿度100%) 中に静置した。その後シャーレを軽くゆり動かし、非付着細胞を遊離した後、培養液とともに吸引し、新しいプラスチックシャーレに移し、再び炭酸ガス培養器中に5分間静置した。同様に非付着細胞を集め、好酸球分画として以下の実験に供した。この方法により好酸球は60~80%に部分精製された。

住血吸虫感染血清：マウスに30~50匹の日本住血吸虫セルカリアを腹腔内注射し、4, 6, 9, 11~13, 19週以後の各時期に心臓より採血した。マンソン住血吸虫感染血清は、セルカリアを各匹100~150匹皮下注射し、11週後に同様採血して得た。いずれも虫体が確認できた感染動物の血清のみを以下の実験に使用した。血清は-30Cで保存し、使用前に56C, 30分加温して非働化した。

好酸球の schistosomula に対する付着、障害作用：schistosomula は Clegg and Smithers (1972) の方法に準じて用意した。すなわち、上下に分離できる試験管の中間に皮膚を張ることのできる器具を準備して (粕谷・大友, 1982b), マウス腹部皮膚を境いに、下室には0.5% lactalbumin (Difco, U.S.A.) を含む MEM を充滿し、上室に少量の水とともに圧潰した宮入貝もしくはセルカリア浮遊液 (マンソン住血吸虫) を入れ、下室のみを温浴中で37Cに保温した。2~3時間静置後、皮膚を貫いて試験管底へ沈澱した schistosomula を集め培養液 (10%牛胎児血清加 MEM) で2回洗浄した。

培養はプラスチックチューブ (Falcon, 13×100mm) で行い、各チューブに schistosomula 100匹を分注し、感染血清 (最終濃度10%) を添加し、少なくとも30分炭酸ガス培養器中で培養し、 10^5 個の好酸球を各チューブへ添加した。培養液の量は最終的に0.2ml とし、37C, 5%炭酸ガス, 湿度100%で80時間まで培養した。培養終了後、培養液の半量以上を吸引除去し、残った内容をスライドガラスに載せ、1) schistosomula に付着した細胞数、および 2) schistosomula の運動性を観察した。1)については schistosomula あたり10個以上、および5個以上 (10個以上を含む) 付着の場合をそれぞれ記載した。2)については直ちに運動性が確認できない場合には

最低1分間の観察によつて運動性の有無を判定し、運動性を有する schistosomula の百分率をもつて viability とした。

成 績

ブタ回虫感染による好酸球の遊出

ブタ回虫卵1,000個を経口投与し、1, 2, 3週後に腹腔細胞を採取し検討したところ、2週が腹腔細胞数、好酸球の割合とも最も高値となつた。一方5,000個感染ではこのピークは3週に移行したが、腹腔細胞数、好酸球の割合ともに1,000個感染とほぼ同程度であつた。1,000個感染2週後に再び1,000個感染させた動物では、ピークは1週後となり、1回感染に比し腹腔細胞数、好酸球の割合とも有意な増加が観察された (Table 1)。そこでさらに感染回数を多くしたところ、腹腔細胞数が増加する傾向を示したが、好酸球の割合はほとんど変化が認められなかつた (Table 2)。

抗原感作による好酸球の遊出

Asc の反復腹腔内注射による腹腔好酸球の増多を検討した成績が Table 3 であるが、Asc 0.1~2 mg の範囲ではいずれの群においても、ほぼ同程度の好酸球の遊出が認められた。腹腔細胞数は最高 3.1×10^7 個と著明な増多は観察されなかつた。好酸球の割合には著しい個体差が認められた。

虫卵感作による好酸球の遊出

各匹それぞれ、500個、2,000個、10,000個の虫卵を毎週1回、計5回腹腔内注射した成績を比較すると、好酸球の割合は3群とも平均34.3~39.2%と高い値を示し、それぞれの群で有意差はなかつた。腹腔細胞数は500個の群でやや低値を示したが他の2群は $4.2 \sim 4.3 \times 10^7$ 個であつた。2,000個の10回注射群では腹腔細胞数が 7.4×10^7 個と有意の増多が認められたが、好酸球の割合は5回注射群と同程度であつた (Table 4)。

虫卵注射から腹腔細胞採取までの時間的経過と腹腔細胞数ならびに好酸球の割合に関する成績を Table 5 に示した。注射後24時間では細胞数、好酸球の割合ともにやや低値であつたが、36時間以後72時間までほぼ同程度の腹腔細胞数と、好酸球の割合を示した。

次に、虫卵の腹腔内注射は毎週1回2,000個とし、腹腔細胞を採取する間隔について検討した。それぞれの採取時期は虫卵注射後48時間に一定した。Fig. 1 で明らかなように、毎週腹腔細胞を採取する群では、好酸球の割合が2回目、3回目と上昇する傾向が見られた (3回目の平均59.0%)、隔週の場合も、2回目は1回目より高値 (50.1%) を示した。ところが、3週後に2回目の腹

Table 1 Peritoneal leucocyte counts and percentages of eosinophils from *Ascaris*-infected mice

No. of eggs inoculated	Weeks after infections		
	1	2	3
1,000	$1.6 \pm 0.2 \times 10^7$ *	3.7 ± 0.6	3.3 ± 0.7
	8.8 ± 4.4 %	18.1 ± 2.9	9.6 ± 3.4
5,000	2.0 ± 0.3	3.0 ± 0.2	3.2 ± 0.5
	4.1 ± 3.0	11.5 ± 1.5	18.9 ± 2.8
1,000+1,000 (with a 2-week-interval)	5.0 ± 0.9	3.3 ± 0.6	
	34.1 ± 5.5	3.2 ± 1.2	

* Mean \pm SE of five mice.

Table 2 Peritoneal leucocyte counts and percentages of eosinophils from mice repeatedly infected with *Ascaris suum*

No. of infections*	Peritoneal leucocytes (ranges)	Percentages of eosinophils (ranges)
3	$3.1 \pm 0.2 \times 10^7$ † (1.2-4.7)	23.7 ± 1.8 % (14.0-44.0)
4	6.0 ± 0.4 (4.3-7.7)	23.8 ± 1.1 (17.0-26.0)
5	7.7 ± 0.9 (5.4-10.5)	30.0 ± 2.9 (22.0-40.0)

* 1,000 eggs were administered with 2-week-intervals.

† Peritoneal cells were harvested 7 days after the last infection. Mean \pm SE.

Table 3 Peritoneal leucocyte counts and percentages of eosinophils from *Ascaris*-antigen(Asc)-sensitized mice

Dose of Asc*	Peritoneal leucocytes (ranges)	Percentages of eosinophils (ranges)
2 mg	$2.9 \pm 0.2 \times 10^7$ † (2.6-3.1)	31.5 ± 2.7 % (7.7-35.3)
	0.5	1.7 ± 0.4 (1.1-2.2)
0.1		1.9 ± 0.2 (1.4-2.5)

* Asc was injected into peritoneal cavities 10 times weekly.

† Peritoneal cells were harvested 48 hours after Asc injections. Mean \pm SE.

Table 4 Peritoneal leucocyte counts and percentages of eosinophils from mice intraperitoneally inoculated with *Ascaris*-eggs

Doses of eggs \times No. of injections	Peritoneal leucocytes (ranges)	Percentages of eosinophils (ranges)
500×5	$3.4 \pm 0.2 \times 10^7$ *	39.2 ± 4.6 (26.0-53.5)
	$2,000 \times 5$	4.2 ± 0.2 (3.3-5.4)
$10,000 \times 5$		4.3 ± 0.1 (3.7-4.6)
	$2,000 \times 10$	7.4 ± 0.5 (5.6-9.4)

* Peritoneal cells were harvested 48 hours after the last egg-injection. Mean \pm SE of 5 mice

Table 5 Peritoneal leucocyte counts and percentages of eosinophils at various times after the last egg-injection

Hours*	Peritoneal leucocytes	Percentages of eosinophils
24	$5.8 \pm 0.9 \times 10^7$ †	20.0 ± 1.4 %
36	8.6 ± 0.3	31.2 ± 7.2
48	7.4 ± 0.5	37.7 ± 1.2
72	ND‡	37.2 ± 0.8

* Hours after 10th egg-injection (2,000 eggs per each injection).

† Mean \pm SE of 4 mice.

‡ Not done. Another series of experiment indicated that almost the same numbers of peritoneal leucocytes as at 48-hours were harvested at 72 hours.

腔細胞を採取した群では初回とほぼ同程度の好酸球の割合であつた。従つて腹腔細胞の採取は毎週もしくは隔週が優れていることが明らかとなつた。

そこで、虫卵の腹腔内注射を各匹、毎週2,000個とし、隔週の注射後48時間に腹腔細胞を採取し、細胞数、各細胞の構成、さらに末梢血白血球数、各細胞の構成の推移を調べた。Table 6 に示すように、腹腔細胞数は、1～7回目注射のどの時期もほぼ同値を示した。細胞の構成では、好酸球が初回には3.0%であつたのに対し、3回目には43.0%と急激な増加を示し、5回目、7回目にもほぼ同値を維持した。単球、マクロファージ系も、初回8.0%、3回目23.0%、5回目36.8%と上昇の傾向を示した。これに対して、リンパ球は初回86.2%に対し、3回目33.8%、5回目18.6%と減少の傾向であつた、好中球は極めて低値であつたし、mast cell は1個も検出されなかつた。末梢血白血球数はこの間ほぼ一定値を示した。好酸球の割合は初回すでに9.0%と軽度の上昇を示したのに続き、3回目以後は17.6～24.2%の範囲であつた (Table 7)。

なお保存の容易な凍結乾燥虫卵でも同様の検討を行ったところ、腹腔細胞数は回数とともに減少の傾向を示し、好酸球の割合は5回目に45.6%と新鮮虫卵投与群とほぼ同値を示したが、7回目では再び減少の傾向であつた。好中球は新鮮虫卵群より多く、mast cell も見出され

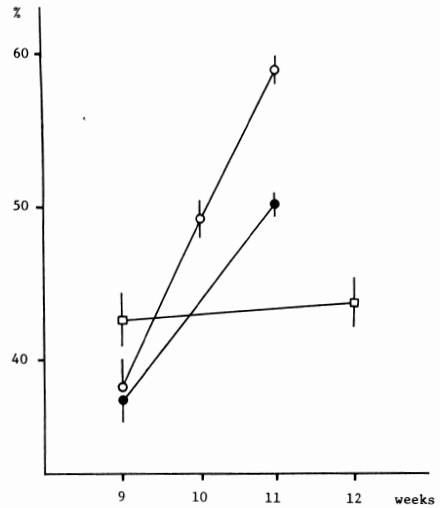


Fig. 1 Percentages of peritoneal eosinophils following repeated harvest at various intervals.

○—○ : weekly, ●—● : biweekly, □—□ : once per 3 weeks. High responder mice (over 30%) at the first harvest (48 hours after 9 weeks) were examined, through all period *Ascaris* eggs were injected weekly. Mean \pm SE of your mice.

Table 6 Peritoneal leucocytes induced by multiple injections of *Ascaris*-eggs

		No. of injections*			
		1st	3rd	5th	7th
Fresh eggs	leu†	5.3 \pm 0.3 $\times 10^7$ ‡	5.9 \pm 0.2	5.9 \pm 0.3	6.0 \pm 0.1
	lym	86.2 \pm 2.5%	33.8 \pm 2.0	18.6 \pm 1.6	19.2 \pm 1.9
	mon	8.0 \pm 1.5	23.0 \pm 1.8	36.8 \pm 2.5	39.2 \pm 0.6
	neu	2.8 \pm 0.6	0.5 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
	mas	0	0	0	0
	eos	3.0 \pm 0.5	43.0 \pm 1.8	44.4 \pm 1.9	41.0 \pm 1.7
Lyophilized eggs	leu	7.0 \pm 0.2 $\times 10^7$	4.8 \pm 0.2	4.2 \pm 0.4	3.7 \pm 0.2
	lym	93.8 \pm 0.9%	45.8 \pm 2.7	21.8 \pm 2.5	27.4 \pm 3.0
	mon	3.0 \pm 0.6	33.8 \pm 1.9	31.4 \pm 1.0	32.0 \pm 1.8
	neu	1.0 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	1.6 \pm 0.5
	mas	0	0.2 \pm 0.1	0	0.4 \pm 0.2
	eos	1.2 \pm 0.3	19.4 \pm 2.1	45.6 \pm 2.6	38.6 \pm 2.2

* Peritoneal leucocytes were harvested 48 hours after each injection.

† leu : leucocytes, lym : lymphocytes, mon : monocytes plus macrophages, neu : neutrophils, mas : mast cells, and eos : eosinophils.

‡ Mean \pm SE of five mice.

Table 7 Blood leucocytes induced by multiple injections of *Ascaris*-eggs

		No. of injections*			
		1st	3rd	5th	7th
Fresh eggs	leu†	9960±251/cmm‡	10540±326	10120±518	11860±872
	lym	64.8±1.1%	54.2±2.1	49.2±2.2	53.2±2.6
	mon	5.2±0.4	4.4±0.4	4.6±0.4	5.2±0.6
	neu	21.0±0.8	19.0±0.4	27.6±2.3	24.0±3.2
	eos	9.0±0.8	24.2±1.8	18.6±1.9	17.6±1.5
Lyophilized eggs	leu	13600±663/cmm	12860±585	9360±493	14420±297
	lym	54.8±1.1%	49.4±2.3	59.5±2.3	41.6±3.0
	mon	10.0±0.9	4.4±0.4	4.3±0.7	4.8±0.4
	neu	24.8±0.4	30.2±1.7	30.7±2.5	38.0±2.1
	eos	10.4±1.1	16.0±1.3	6.2±0.7	15.4±2.6

* Blood was collected 48 hours after each injection.

† leu: leucocytes, lym: lymphocytes, mon: monocytes, neu: neutrophils, and eos: eosinophils.

‡ Mean±SE of five mice.

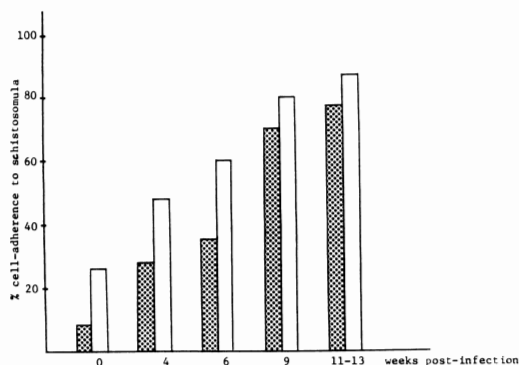


Fig. 2 Influences of serum from mice infected with *S. japonicum* on cell-adherence to schistosomula of *S. japonicum*.

▨ > 10 cells/schistosomula,
□ > 5 cells/schistosomula (include > 10 cells)

た (Table 6).

Schistosomula におよぼす影響

上記方法で遊出させた好酸球を部分精製して schistosomula におよぼす影響を検討した。感染血清の存在下で 10^2 個の schistosomula に対し、 10^6 個の好酸球を添加し、混合培養すると、schistosomula に著明な細胞の付着が認められた。Fig. 2 に示すように、血清の細胞付着能は感染後の時間経過とともに増強する傾向を認めた。Fig. 3 は培養時間と付着率の関係を観察したものであり、80 時間培養に比し、48 時間培養のほうが細胞の付着率が高

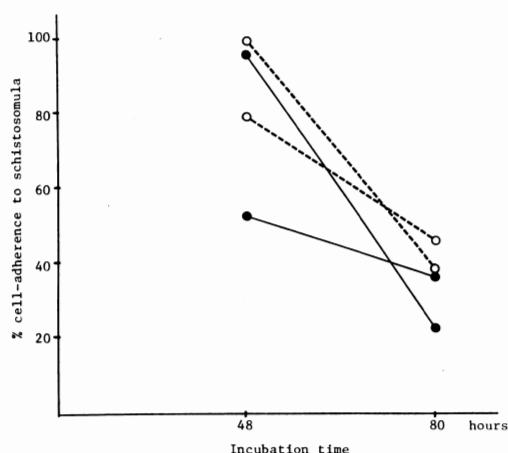


Fig. 3 Cell adherence to schistosomula of *S. mansoni*.

●—● > 10 cells/schistosomula,
○—○ > 5 cells/schistosomula (include > 10 cells)

い。viability は細胞の付着の程度とは直接関連するとは言いがたく、日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 感染血清では感染後13週血清の添加では viability の低下は見られないが、感染後19, 20週の血清ではその低下が認められた (Table 8)。 Manson 住血吸虫 (*S. mansoni*) では感染後11週の血清においても viability の低下が観察された (Table 8)。

Table 8 Viabilities of schistosomula after co-cultivation with eosinophils

Experiment No.	Serum added	Without eosinophils	With eosinophils*
1	SJ(13 weeks) No 1†	100	100
	SJ(13 weeks) No 2	100	100
	NMS‡		100
2	SJ(19 weeks) No 1	100	88.0
	SJ(20 weeks) No 1	100	81.8
3	SM(11 weeks) No 1§	93.3	73.3
	SM(11 weeks) No 2	93.3	83.3
	NMS		100

* 10^2 schistosomula were co-cultivated with 10^5 eosinophils.

† Serum from 13-week-*S. japonicum* infected mouse was added to schistosomula of *S. japonicum*.

‡ NMS: normal mouse serum

§ Serum from 11-week-*S. mansoni* infected mouse serum was added to schistosomula of *S. mansoni*.

考 察

モルモット腹腔へ馬血清などの抗原を反復投与することによって好酸球増多を惹起する実験系はすでに古くから知られている (Litt, 1960). われわれもブタ回虫抗原 (Asc) や dinitrophenyl 化 Asc の反復腹腔内注射によって高率の腹腔好酸球増多を惹起させた (Kasuya *et al.*, 1977, 粕谷・大友, 1982a). こうした好酸球増多のメカニズムを Litt (1961) は immune complex によるものであると結論し, Ward *et al.*, (1966) も immune complex にひきつづく C^{567} の形成によるものであるとし, eosinophil chemotactic factor of complement (ECF-C) に関する研究の端緒となつたが, さらに, Tanaka *et al.* (1979) はブタ回虫体腔液に ECF が存在することを証明し, 寄生虫によってひきおこされる好酸球増多現象の一端を明らかにした.

今回われわれは, ブタ回虫を用いて, マウス好酸球増多の惹起法を検討した. 全虫体抽出抗原である Asc の反復腹腔内注射では, モルモットで報告されるほど著明な好酸球増多は観察されなかつた (Table 3). また, ブタ回虫感染マウスの腹腔細胞中にも, マンソン住血吸虫感染 (Butterworth *et al.*, 1975), 犬回虫感染 (Sugane and Oshima, 1980) で報告されたほど高率の好酸球は見出されなかつた (Tables 1, 2). 実験動物の種, 寄生虫種の相異により, 好酸球増多反応も多様であると考えられる. 以上の方法に比し, ブタ回虫卵の反復腹腔内注射が好酸球増多の惹起に優れていることが明らかとなつ

た (Table 4).

虫卵の反復腹腔内投与による好酸球増多のメカニズムの解明は今後の問題であるが, ECF-C の関与をはじめ多くの興味ある考察ができる. 大橋・石井 (1981) は, 日本住血吸虫虫卵に ECF の存在することを *in vitro* の系で証明した. われわれのブタ回虫卵の腹腔内投与の実験においても, 初回投与 (無感作状態) の48時間後の血中に9.0%と, 軽度の好酸球増多が認められ, さらに凍結乾燥虫卵投与群においても同程度の好酸球増多が観察されることから, ブタ回虫卵にも ECF の存在する可能性も考えられる (Table 7). しかし, 腹腔好酸球の増多は初回投与ではほとんどなく, 3回目より著増することから虫卵の ECF の作用より, 免疫細胞系, 抗体などの関与がより強く示唆された (Table 6).

Schriber and Zucker-Franklin (1975) はラテックス粒子に, ヒト γ -グロブリンをコートし, ラット静脈内に注射し, 血中好酸球の増多を観察したが, この好酸球増多が遅延型過敏症の発症とよく相関することなどから T 細胞に mediate されるものと推察した. また Vadas (1981) も keyhole limpet hemocyanin を complete Freund's adjuvant とともにマウスに免疫する際, 2日前に cyclophosphamide を投与することによって著明な血中好酸球増多を惹起できることを報告した. ところが, スードマウスではこの現象が起らないことから, T 細胞が関与していることを示唆した.

一方, 生理食塩水で反復して腹腔を洗う非特異的な刺激によっても腹腔好酸球増多が惹起できることはラット

(Archer and Hirsch, 1963), モルモット (Gleich and Loegering, 1973) を使用してすでに報告された。Fig. 1 では虫卵の腹腔内注射を毎週1回とし、腹腔洗浄によって細胞を回収する間隔を毎週、1週おき、2週おきにした場合、毎週および1週おきの洗浄では好酸球の割合が上昇するのに対して、2週おきの洗浄ではそうした現象が認められないことを示した。従つて非特異的な腹腔の刺激も重要な効果をもたらしているものと推察できた。

Asc と虫卵の好酸球増多の惹起能を比較すると、腹腔細胞数では虫卵感作群が有意に多かつた。好酸球の割合は、今回の実験では平均がほぼ同程度であり、Asc 感作群に個体差が大きかつたが (Tables 3, 4), Balb/c を使用した別の実験 (未発表) では Asc 感作群の好酸球の割合は平均20.2% (範囲15.3~25.3%) で増多傾向は著明ではなかつた。従つて intact な虫卵の持つ抗原性、粒子状の抗原形態などが好酸球増多にとって重要な意味を持つているのかもしれない。

凍結乾燥虫卵によつても腹腔、血中好酸球増多を惹起できることから、虫卵の生死はこの反応の基本にはかわらないと思われるが、生虫卵投与群において持続的、安定な好酸球増多が惹起できるため (Tables 6, 7), 詳しい機序をさらに検討中である。

本法で惹起し、部分精製したマウス好酸球は、感染動物血清の存在下で日本住血吸虫、 Manson 住血吸虫の schistosomula に付着し障害する作用を保持していることが明らかとなつた (Figs. 2, 3, Table 8). この現象には IgG が関与し (Kassis *et al.*, 1979), 好酸球に含まれる major basic protein (Butterworth *et al.* 1979), peroxidase (Jong *et al.* 1981), cationic protein (McLaren *et al.* 1981) などの直接作用が注目されているが、本法を利用して得られた好酸球のこうした分野での検討も今後期待できるものと思われる。

要 約

ブタ回虫 (*Ascaris suum*) を用いて、ddy マウスの好酸球増多反応を検討し、以下の結論を得た。

1) ブタ回虫感染 (1回および反復)、ブタ回虫抽出抗原 (Asc) およびブタ回虫卵 (虫卵) の反復腹腔感作による腹腔好酸球増多の惹起能を検討した結果、虫卵の反復腹腔感作が細胞数、好酸球の割合の点からみて最も有効な方法であることがわかつた。

2) 虫卵数はマウス各匹500~10,000個とし、週1回、腹腔内へ注射したが、この範囲内では各群に有意差はみられなかつた。

3) 腹腔細胞数、好酸球の割合は、虫卵注射後36, 48, 72時間ではほぼ同程度であつた。

4) 腹腔細胞採取の間隔は1~2週間に1度が有効で、好酸球の割合は初回採取時より2, 3回目の採取時のほうが有意に高値であつた。3週目の採取ではこのような増加は認められなかつた。

5) 毎週1回、2,000個の虫卵注射を行い、隔週に腹腔細胞を採取した場合、3回目の注射後より1匹あたりの細胞数 5.9×10^7 個、好酸球43.0%と著増し、実験期間中 (7週まで) ほぼ同程度の細胞数、好酸球の割合となつた。末梢血好酸球はすでに初回より9.0%と軽度上昇を示し、3週に24.2%とさらに増多した。

6) この方法によつて得られた細胞を、プラスチックシャーレで短期間培養し、付着細胞を除外することによつて好酸球を部分精製することができた (60~80%)。この細胞を感染動物血清の存在下で日本住血吸虫もしくは Manson 住血吸虫の schistosomula と培養したところ、細胞が付着し、生存虫体数の減少を認めた。従つて、この方法によつて得た好酸球は殺寄生虫能を保持しているものと考えられ、他の分野の研究にも用いられるものと思われる。

謝 辞

住血吸虫および中間宿主貝の分与、供与を受けた国立予防衛生研究所、林 滋生副所長、同寄生虫部、川中正憲技官、山梨県立衛生公害研究所、葉袋 勝先生、巨摩 共立病院、加茂悦爾院長に深謝いたします。

文 献

- 1) Archer, G. T. and Hirsch, J. G. (1963) : Isolation of granules from eosinophil leucocytes and study of their enzyme content. *J. Exp. Med.*, 118, 277-300.
- 2) Butterworth, A. E., Sturrock, R. F. and Houba, V. (1975) : Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 256, 727-729.
- 3) Butterworth, A. E., Wassom, D. L., Gleich, G. J., Longering, D. A. and David, J. R. (1979) : Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.*, 122, 221-229.
- 4) Clegg, J. A. and Smithers, S. R. (1972) : The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Internat. J. Parasitol.*

- tol., 2, 79-98.
- 5) Gleich, G. J. and Loegering, D. (1973) : Selective stimulation and purification of eosinophils and neutrophils from guinea pig peritoneal fluids. *J. Lab. Clin. Med.*, 82, 522-528.
 - 6) 石崎 達 (1974) : 医寄生虫学, 第一出版株式会社, 203-204.
 - 7) Jong, E. C., Mahmoud, A. A. F. and Klebanoff, S. J. (1981) : Peroxidase-mediated toxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 126, 468-471.
 - 8) Kassis, A. I., Aikawa, M. and Mahmoud, A. A. F. (1979) : Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 122, 398-405.
 - 9) Kasuya, S., Ohtomo, H. and Ishizaki, T. (1977) : Suppressing effects of purified eosinophils derived from guinea pigs sensitized with *Ascaris* antigen on lymphocyte-blastformation. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 30, 297-307.
 - 10) 粕谷志郎・大友弘士 (1982a) : 感作リンパ球の誘導にともなう hapten 依存性腹腔好酸球増多の抑制, *アレルギー* 31, 51-57.
 - 11) 粕谷志郎・大友弘士 (1982b) : ヒト好酸球による抗体依存性殺虫寄生作用の観察 (住血吸虫を使用して)免疫実験操作法XI, 日本免疫学会編, 3565-3575.
 - 12) Kazura, J. W. and Aikawa, M. (1980) : Host defense mechanisms against *Trichinella spiralis* infection in the mouse : Eosinophil-mediated destruction of newborn larvae *in vitro*. *J. Immunol.* 124, 355-361.
 - 13) Litt, M. (1960) : Studies in experimental eosinophilia I. Repeated quantitation of peritoneal eosinophilia in guinea pigs by a method of peritoneal lavage. *Blood*, 16, 1318-1329.
 - 14) Litt, M. (1961) : Studies in experimental eosinophilia III. The induction of peritoneal eosinophilia by the passive transfer of serum antibody. *J. Immunol.* 87, 522-529.
 - 15) McLaren, D. J., McKean, J. R., Olsson, I., Venge, P. and Kay, A. B. (1981) : Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic protein *in vitro*. *Parasite Immunol.*, 3, 359-373
 - 16) 大橋 真・石井 明 (1981) : 日本住血吸虫卵の好酸球遊走因子, *寄生虫誌*, 30 (増), 70.
 - 17) Sugane, K. and Oshima, T. (1980) : Recovery of large numbers of eosinophils from mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 799-802.
 - 18) Ramalho-Pinto, F. J., Rossi, R. and Smithers, S. R. (1979) : Murine Schistosomiasis mansoni : anti-schistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement and eosinophil-mediated killing of schistosomula *in vitro*. *Parasite Immunol.*, 1, 295-308.
 - 19) Schriber, R. A. and Zucker-Franklin, D. (1975) : Induction of blood eosinophilia by pulmonary embolization of antigen-coated particles : the relationship to cell-mediated immunity. *J. Immunol.*, 114, 1348-1353.
 - 20) Tanaka, J., Baba, T. and Torisu, M. (1979) : *Ascaris* and eosinophil II. Isolation and characterization of eosinophil chemotactic factor and neutrophil chemotactic factor of parasite in *Ascaris* antigen. *J. Immunol.*, 122, 302-308.
 - 21) Vadas, M. A. (1981) : Cyclophosphamide pretreatment induces eosinophilia to nonparasite antigen. *J. Immunol.*, 127, 2083-2086.
 - 22) Ward, R. A., Cochrane, C. G. and Muller-Eberhard, H. J. (1966) : Further studies on the chemotactic factor of complement and its formation *in vitro*. *Immunology*, 11, 141-153.
 - 23) Williams, J. F. and Soulsby, E. J. L. (1970) : Antigenic analysis of developmental stages of *Ascaris suum* I. Comparison of eggs, larvae and adults. *Exp. Parasitol.*, 27, 150-162.

Abstract

A METHOD OF INDUCTION OF EOSINOPHILIA IN MICE
SENSITIZED WITH EGGS OF *ASCARIS SUUM*

SHIRO KASUYA AND HIROSHI OHTOMO

(*Department of Parasitology, School of Medicine,
Gifu University, Gifu 500 Japan*)

The induction of eosinophilia of ddY mice with *Ascaris suum* was studied. The results are as follows:

1) A large number of peritoneal cells contained high percentage of eosinophils were harvested from mice sensitized with *Ascaris-egg* (intraperitoneally inoculated). The sensitization with *Ascaris*-antigen or infections (single or multiple) were less effective to induce the peritoneal accumulations of eosinophils than sensitizations with the eggs.

2) The numbers of peritoneal cells (or eosinophils) were almost identical at 36, 48 and 72 hours after the last injection of the eggs.

3) The percentages of peritoneal eosinophils were increased when peritoneal cells were harvested with one- or two-week-intervals, but not increased with three-week-intervals.

4) In the experimental system with weekly intraperitoneal injections with 2,000 eggs per animal and cells were harvested biweekly 48 hours after egg-injections. The percentages of eosinophils were markedly increased to 43.0% and total cells were 5.9×10^7 3 weeks after, then the levels continued to the end of experiment (7 weeks). On the other hand, eosinophils in peripheral blood were slightly increased at first injection with the eggs and reached to 24% 3 weeks after, then persisted at almost equal levels.

5) Eosinophils were partially purified (60-80%) with a removal of plastic-adherent-cells from the peritoneal cells harvested from egg-sensitized mice. This cell fraction adheres to schistosomula of both *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* in the presence of serum from infected mice *in vitro*, and the viabilities of schistosomula were decreased.