

蛔虫アレルギーにおける抗原および抗体に関する研究

第14報 BDB 反応による血中蛔虫抗体の証明

群馬大学小児科学教室 (主任: 松村龍雄教授)

高 橋 良

(受付: 6月19日, 1964)

緒 言

蛔虫アレルギーにおける血中抗体について, 黒梅¹⁾²⁾は Boyden のタンニン酸処理赤血球凝集反応を応用して体腔液感作タンニン酸処理赤血球凝集反応を考案し, 本法を用いて動物の実験的蛔虫症のみならず, ヒトの蛔虫寄生について血中抗体の証明に成功した。その後, 著者⁴⁾⁵⁾は本法を小腸蛔虫症および胃, 十二指腸蛔虫症の臨床に応用して, 興味ある結果を得て, 報告した。

今回は, Bis-diazotized Benzidine 反応, すなわち BDB 反応を用いて血中蛔虫抗体の検索を行ったので, その成績について報告する。

材 料

- 1) 蛔虫体腔液: 第11報⁶⁾に述べた通りである。
- 2) 蛔虫仔虫包蔵卵: 第11報に述べた通りである。
- 3) 蛔虫無感染モルモット: 第11報に述べた通りである。
- 4) 蛔虫感染モルモット: 第11報に述べたごとく, 蛔虫仔虫包蔵卵 1,000個を経口投与して, 感染させた。
- 5) BDB原液第Ⅰ液: 亜硝酸ソーダ 0.175 g を 5 ml の蒸留水に溶解した。BDB原液第Ⅱ液: 0.2N 塩酸 45 ml に 0.23 g のベンチジンを溶解した。

方 法

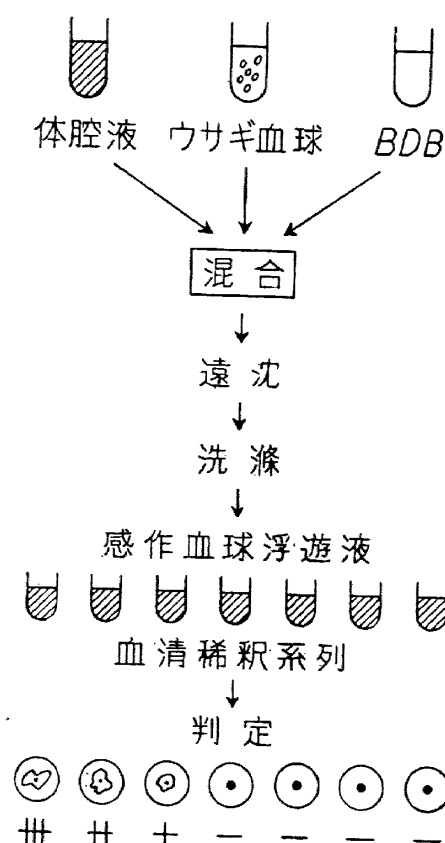
- 1) 使用血球: ウサギ赤血球を生理食塩水で3回洗滌し, 最後に pH 7.3 磷酸緩衝生理食塩水で50%赤血球浮遊液とした。

2) BDB液の作製

第Ⅱ液を振盪しつつ第Ⅰ液を滴下し, 約30分間に互つて時々振盪した。淡黄色のBDB原液が得られたら, pH 7.3の磷酸緩衝液にて15倍稀釈し, 0°Cに保った。

- 3) 感作方法: 次に 100倍体腔液 3.0ml と50%血球浮遊液 0.2ml を混じた後, BDBの稀釈溶液 0.5ml を加え, 室温に10分間放置後, なるべく 0°Cに保つように

図 BDB反応



して, 1,500回転3分間遠心した。遠心後 0°Cに保った。1%ウサギ血清加 pH 7.3 磷酸緩衝生理食塩水で洗滌し, 遠心して2%感作赤血球浮遊液を作った。

- 4) 被験血清稀釈液: 被験動物の血清は, 56°C30分間, 温浴中で非働化した。この血清に同量の洗滌ウサギ赤血球を混じ, 時々振盪しながら, 37°Cのフラン器に2時間放置して, ウサギ血球に対する異種血球凝集素を除去した。被験血清の稀釈は, 型の如く, 10倍, 20倍, 40倍・と行つた。

5) 血球凝集反応測定方法：判定方法は試験管法によつた。まず被験血清を1%ウサギ血清加 pH 7.3 磷酸緩衝生理食塩水で10倍、20倍、40倍と希釈して、各希釈液が1ml になるようにした。次で各希釈系列に2%感作血球を0.05ml 滴下し、よく混和し、室温に放置して、3時間後に肉眼およびアグリュノスコープで、管底の血球凝集塊の出現の有無を観察した。かくて、血球凝集塊の認められた最終希釈濃度をもつて、血球凝集素価とした(図)。

成 績

1) BDB液と体腔液の至適濃度

体腔液を10倍、100倍、1,000倍と生理食塩水で希釈し、一方BDBは15倍、30倍、60倍と希釈してBDB反応を行つた結果、BDBは原液の15倍液、体腔液は100倍希釈液を使用すると最もよい成績が得られた(表1)。

表1 BDBと体腔液の至適濃度

		BDB濃度		
		15×	30×	60×
体腔液濃度	10×	100×	10×	10×
	100×	100,000×	10,000×	100×
	1,000×	100,000×	10,000×	1,000×
使用血清		沈降素価：100,000×		
		沈降素量：16×		

2) 体腔液によるBDB抗体の吸収試験

BDB反応によつて、検出される抗体が、蛔虫に特異的な抗体であることを証明するため、次の如き吸収試験を行つた。使用した抗体腔液ウサギ血清は、BDB抗体価100,000倍、沈降素価100,000倍、沈降素量16倍であつた。まず体腔液を1%ウサギ血清加 pH 7.3 磷酸緩衝生理食塩水で、5倍、10倍、20倍……2,560倍と希釈し、これらの体腔液希釈液を上述の抗体腔液ウサギ血清に等量加え、37°C 2時間放置し、その後氷室に一昼夜保存した。このように、種々の程度の吸収操作を行つた抗体腔液血清について、BDB反応を行つた。その結果BDB抗体は体腔液原液を等量加えることにより完全に吸収され、80倍希釈より濃い希釈体腔液で吸収した場合には大部分が吸収された。以上の吸収試験から本反応が蛔虫に特異的であることが到明した(表2)。

3) BDB抗体の温度による影響

BDB抗体の温度による影響を検討した。用いた温度

表2 体腔液によるBDB抗体の吸収試験

抗体腔液ウサギ血清	1×	"	"	"	"	"	"
体腔液	1×	10×	20×	40×	80×	160×	生食
吸収後のBDB抗体	0×	10×	10 ² ×	10 ³ ×	10 ⁴ ×	10 ⁵ ×	10 ⁵ ×

抗血清：BDB抗体価10⁵倍

は、56°C 2時間、60°C 30分、67°C 30分、70°C 30分の4種であり、加熱は温浴によつた。使用した血清はBDB抗体価100,000倍の抗体腔液ウサギ血清である。

i) 56°C、2時間、60°C 30分間加熱の場合、BDB抗体価は影響されなかつた。

ii) 67°C、30分間、70°C 30分間加熱の場合、BDB抗体価は10,000倍とやや減少した。

この成績から、BDB抗体はかなりに耐熱性であることがわかつた(表3)。

表3 BDB抗体の温度による影響

温 度	時 間	抗 体 価
56°	2 時間	100,000
60°	30 分	100,000
67°	30 分	10,000
70°	30 分	10,000
対 照		100,000

4) 蛔虫感染モルモットに於けるBDB抗体価およびBoyden 抗体価の消長

2匹の無感染モルモットに蛔虫仔虫包蔵卵1,000コを1回に経口投与した後、各週毎に、BDB抗体価およびBoyden 抗体価の変動を5週ないし6週間追求した。BDB抗体価は蛔虫感染1週間後には10倍、20倍であり、2週間後には最高となり、80倍、160倍を示し、以後徐々に減少し5週間後は20倍となつた。一方 Boyden 抗体はBDB抗体と同様な消長を示したが、常にBDB抗体よりは低い値にとどまっていた(表4)。

5) BDB抗体価と糞便内蛔虫卵との関係

小学生39名について、BDB抗体価と糞便内蛔虫卵との関係を検査した。その結果、虫卵陰性者23名では全例40倍以下であり、10倍が最も多かつた。一方、虫卵陽性者16例では10倍から80倍にわたっており、40倍を呈するものが最も多かつた。即ち、糞便内蛔虫卵陽性者は陰性者にくらべて高値を示していた(表5)。

表4 蛔虫感染モルモットにおけるBDB抗体価と Boyden 抗体価の消長

		前	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週
BDB抗体価	1	0	10×	160×	40×	40×	20×	
	2	10×	20×	80×	20×	20×	20×	10×
Boyden抗体価	1	0	0	40×	20×	20×	10×	
	2	0	10×	40×	10×	0×	0×	

表5 BDB抗体価と糞便内蛔虫卵との関係

		BDB抗体価					
		0	10×	20×	40×	80×	計
蛔虫卵	+	0	3	5	6	2	16
	—	2	12	7	2	0	23
	計	2	15	12	8	2	

6) BDB抗体価と皮膚反応との関係

健康な小学生38名について、体腔液による搔破試験を行い、BDB抗体価との関係を検査したところ、両者の間の相関関係は認められなかった。この事実からBDB反応と皮膚反応とは、蛔虫感染にもとづく蛔虫感作の異なる面を示しているものと推定できよう(表6)。

表6 BDB抗体価と皮膚反応との関係

		BDB抗体価					
		0×	10×	20×	40×	80×	
皮膚反応	—	2	6	6	4	2	20
	+	0	0	3	2	1	6
	++	1	2	3	0	0	6
	+++	1	1	2	2	0	6

総括並びに考按

BDB反応は1942年, Campbell, Pressman, Pauling⁷⁾ によつて初めて考按された方法であるが、最初のうちは鋭敏度が低いとされて、余りかえりみられなかった。

現在一般に使用されているBDB反応は、1955年, Stavisky⁸⁾によつて改良された方法である。BDB反応は操作が簡単であり、臨床面においてもかなり広く応用されている。即ち、1956年, Stavisky⁹⁾は糖尿病患者においてインシュリン抗体を証明した。1957年, Sehon¹⁰⁾, Frick 等は喘息、枯草熱等の疾患に応用している。薬物アレルギーにおいては1959年 Marguerite¹¹⁾はペニシ

リン抗体証明に応用した。さらに Stavisky¹²⁾¹³⁾ はジフテリヤ並びに破傷風毒素に対する抗体証明法としてBDB反応を応用して、抗毒素量の測定に、毒素の分析、検定に、好成績を改めている。教室の松村、黒梅¹⁴⁾は本反応の応用につき綜説を書いている。著者は、BDB反応を用いて、蛔虫感染動物およびヒトについて、蛔虫に対する抗体を証明し、その抗体の性状並びに蛔虫症における本抗体の意義について述べた。

その成績を総括すると次の通りである。

1) 方法について BDB、体腔液、血清を加える際のBDB原液の15倍液、体腔液は100倍稀釈液を用いて、好成績が得られた。

2) 特異性について、BDB抗体の体腔液による吸収試験を行った結果、BDB抗体価100,000倍のBDB抗体は、体腔液80倍稀釈よりも高濃度の溶液の等量添加によつて、大部分が吸収された。かくして本反応が蛔虫に特異的であることが判明した。

3) 抗体の性状について、BDB抗体の温度による影響についての実験から、BDB抗体はかなり耐熱性であることが判明した。

4) BDB抗体価とBoynen抗体価、蛔虫感染モルモットではBDB抗体価がBoyden抗体価よりも高い傾向を示していた。

5) BDB抗体価と糞便内蛔虫卵との関係、小学生39名についてしらべた結果、BDB抗体価は、糞便内蛔虫卵陽性者は陰性者にくらべて高値を示していた。

6) BDB抗体と皮膚反応との関係、小学生38名についてBDB抗体と皮膚反応との関係を検査したところ、両者の間の相関関係は認められず、蛔虫による感作の示標として、両者が異なつた面をもっていると思われた。

結 語

BDB反応を、蛔虫体腔液感染ウサギ、蛔虫感染モルモットおよびヒトの血中抗体証明法に応用し、実験方法について種々検討を行った。即ち、本反応の特異性を、抗体腔液ウサギ血清の体腔液による吸収試験によつて証明した。また、本反応によつて証明された抗体の、温度による影響を観察し、本反応とBoyden反応との関係、本反応と糞便内蛔虫卵との関係、更に本反応と皮膚反応との関係につき実験を行つて、興味ある成績を得た。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師松村教授に深く感謝します。また御援助、御助言を戴いた黒梅博士、御協力下さつた小児科研究室小林氏に感謝します。

(本論文の要旨は昭和35年6月第29回日本寄生虫学会
総会に報告した)。

文 献

- 1) 黒梅恭芳：アレルギー， 8 (1), 17, 1959.
- 2) 黒梅恭芳：アレルギー， 8 (4), 358, 1959.
- 3) 黒梅恭芳：アレルギー， 8 (5), 445, 1959.
- 4) 高橋良：アレルギー， 11 (2), 69, 1962.
- 5) 高橋良：アレルギー， 11 (7), 73, 1962.
- 6) 高橋良：アレルギー， 10 (7). 408, 1961
- 7) Pressman, D.: J. Immunol., 44, 101, 1942.

- 8) Stavisky, A.B.: J. Immunol., 74, 306, 1955.
- 9) Stavisky, A.B.: J. Clin. Invest., 35, 458, 1956.
- 10) Schon, A.H.: Science, 125, 597, 1957.
- 11) Marguerite: Science, 27, 1959.
- 12) Stavisky, A.B.: Int. Arch. Allerg., 13, 1, 1958.
- 13) Stavisky, A.B.: J. Immunol., 72, 360, 1954.
- 14) 松村龍雄， 黒梅恭芳：小児科診療， 23 (11), 1526, 1960.

Studies on Antigen and Antibody in Ascaris Allergy

14. Demonstration of circulating ascaris antibody by BDB reaction

Ryo Takahashi

Department of Pediatrics, School of Medicine, Gunma University

(Chief : Prof. Tatsuo Matsumura)

With the object to determine the circulating antibody in ascaris allergy, Kuroume devised ascaris-body-fluid-sensitized tanned cell hemagglutination, a modification of the Boyden's tanned cell hemagglutination, and successfully applied it not only in experimental animal ascariasis but also in human ascariasis. Later, the author employed this method clinically in human intestinal and gastroduodenal ascariasis, and reported on results of interest (Report 12 and 13).

In the present experiments, investigations for circulating ascaris antibody were made by means of BDB (Bis-diazotized benzidine) reaction.

BDB reaction was initiated by Campbell, Pressman and Pauling in 1942, and modified by Stavisky in 1955.

The procedures of the reaction are as follows:

In the first, the original BDB liquids 1 and 11 are prepared.

Liquid 1: Prepared by dissolving 0.175 g of sodium nitrite in 5 ml of distilled water.

Liquid II: Prepared by dissolving 0.23 g of benzidine in 45 ml of 0.2 N hydrochloric acid.

Liquid 1 is dropped into liquid II while shaking, which is repeated from time to time for about 30 minutes. When light yellow liquid is obtained, it is diluted 15-fold with phosphoric acid buffer of pH 7.3, and kept at 0°C. Three ml of 1:100 ascaris body fluid dilution is mixed with 0.2 ml of 50% rabbit red cell suspension (pH 7.3), 0.5 ml of the above described BDB dilution added to it, the mixture allowed to stand at room temperature for 10 minutes, and centrifuged at 1,500 rpm for 3 minutes, keeping the temperature as far as possible at 0°C. Then it is washed with phosphoric acid (pH 7.3) buffered saline solution containing 1% rabbit serum, and again subjected to centrifugation to prepare 2% sensitized red cell suspension. The test serum is diluted 10- and 20-fold with the above mentioned serum added saline solution, and into each 1 ml of these dilutions is dropped 0.05 ml of the sensitized red cell suspension. The mixtures are stirred well, allowed to stand at room temperature, and after 3 hours, examined both macroscopically and agglutinoscopically for the presence or absence of red cell clump in the bottom of the tube. The final dilution which produces such clump is taken as hemagglutinin titer.

The best results were obtained when the original BDB liquid is diluted by 15 folds, and ascaris body fluid by 10 folds. BDB antibody was absorbed completely by adding the same volume of the original body fluid, and thus the reaction was demonstrated to be specific to ascaris. BDB antibody was appreciably thermostable, being unaltered after 56°C 2 hour and 60°C 30 minute heating and slightly diminished by 70°C 30 minute heating.

BDB antibody titers in infected guinea pigs were always higher than Boyden antibody titers, and they changed in parallel with each other.

Titration with 39 elementary school children showed that BDB titer was higher in the stool ascaris ova-positive group than in negative group, and no correlation was observed between scratch tests with ascaris body fluid and BDB antibody titers. It was subsequently considered that BDB reaction and scratch test would reveal two different phases of ascaris sensitization due to ascaris infection.