

学 位 論 文 題 名

IMMUNOHISTOPATHOLOGICAL AND SEROLOGICAL STUDY OF  
DIROFILARIASIS IMMITIS IN THE DOG

（犬フィラリア症 (*D.immitis*) における  
免疫病理組織学および血清学的研究）

学位論文内容の要旨

犬フィラリア (Di) 感染犬にみられる病理変化のうち、肺病変の軽重は本症の予後を判定する上で最も重要な指標のひとつとなる。これら肺病変のうち、とりわけ肺胞壁の肥厚が免疫反応の関与によって惹起するとの示唆があるものの、その部位での免疫関連物質（抗原、抗体、免疫複合体等）の存在を systemic に観察した報告はほとんどない。この免疫関連物質を肺病変中に証明し、その時の液性免疫反応との関係を明らかにするために本研究を行った。

まず、免疫酵素抗体染色法 (PAP) を用いて、摘出した Di 虫体（成熟雌雄）および末梢血中マイクロフィラリア (mf) などの虫体抗原がはたして染色されるかどうか、また染色されるならどのような染色分布を示すかを調べた。一次抗体として成熟 Di に対する抗血清（新鮮 Di 由来およびホルマリン固定・パラフィン処理 (FP 処理) Di 由来）を作製し、また抗犬抗体 (IgG, IgG Fc, IgM) 血清および抗犬補体 (C 3) 血清をそれぞれ使用した。対照として正常家兔血清を用いた。

その結果、成熟雌雄 Di では Cuticle, 皮下, 筋層, 生殖器, 子宮内 mf および卵（いずれも切断面上に反応）などに強い抗原性がみられた。しかし末梢血液中 mf の外表皮には陽性反応はみられなかった。また、その過程で PAP 法の至適条件も決定した。

次に、非感染犬23例（年齢0.5-2.5歳）、自然感染犬34例（年齢1.0-7.0歳以上、寄生虫数1-85隻）および実験的感染犬20例（未感染幼若犬に新鮮あるいはFP処理虫体を挿入）について肺の連続切片を作製した後 PAP 染色し、肺胞肥厚部位における免疫関連物質を観察した。

その結果、自然および実験的感染群のいずれの例からも免疫複合体（連続切片上において抗原・抗体・補体が同一箇所が存在する場合）は観察し得なかったものの、感染例の肺胞壁において

成虫 Di, mf, 卵, IgG, IgG Fc, IgM, および C 3 等の免疫関連物質の存在が感染の強度に応じて観察された。

最後に、非感染犬138例（年齢1.0-7.0歳以上）、自然感染犬134例（年齢0.5-7.0歳以上、寄生虫数1-98隻）および実験的感染犬15例の血漿中抗体価（ELISA）ならびに、抗原と反応する抗体の分子量別分布（新鮮雌性成熟虫体から得た抗原抽出液を SDS-PAGE 法で電気泳動させたものを Western blotting (WB) した）の変化を調べ、さらに肺の肉眼変化、末梢血中の mf の有無などを調査した。

その結果、血漿中の抗体価の大小は感染虫体数と相関した ( $r = 0.58, p < 0.01$ )。また抗体の分子量別分布は感染初期あるいは軽度感染期において重いバンド (80k ダルトン以上) 上にみられたが、重症例では軽いバンド (37k ダルトン以下) 上に反応がみられた。このことから、感染の経過にともない、抗体価に変化が現れるだけでなく抗体の分布においても変化がみられる点が明らかとなった。また、ELISA による抗体価の強弱と WB による抗原に対する抗体のパターン別反応強度を比較したところ両者によく相関 ( $p = 0.77, p < 0.01$ ) した。しかし、両成績のなかには、false negative や false positive がそれぞれ散見された。

上で得られた肺の免疫組織所見と血漿抗体価、および抗原と反応する抗体の分子量別分布の変化を総合的に解析し以下の成績を得た。すなわち、生後1年以内では自然感染例はみられず、抗体価、抗体分布および肺に何ら変化はみられなかった。しかし、虫体の存在しない例であっても加齢とともに感染の暴露を受けるため、時には抗体価の上昇もみられ、これが false positive の原因となった。Di 未感染犬に新鮮虫体を挿入した場合、挿入直後から肺への抵抗 (虫体, mf, 卵等) 暴露が始まり、肺の病変がこれら異物に対する防御反応としてみられるものの、その変化は軽微であり虫体挿入後10日目に至っても抗体産生に防御反応はみられなかった。FR 処理した死虫体を挿入した場合では10日目で抗体価の上昇および Di 抗原の重量バンドに反応する抗体の出現がみられた。しかしこの場合には抗原側を担うのは処理虫体のみで mf, 卵そのほかの active な抗原物質はみられない。したがって、感染初期での免疫応答は分子量の大きい非特異抗体の産出に始まり、生虫体そのものあるいは生虫体が肺泄する種々の物質に対する反応は起こらないものと考えられた。一方、自然感染例の成績を感染の軽重別に分類した場合、感染虫体数の増加に応じて抗体価は上昇し、抗体の分布は重いバンドから軽いバンドへと移行した。このことは感染が経過するにともない、分子量が小さく、しかも抗体価の高い特異抗体の産生があり、また免疫関連物質の肺胞壁および肺細血管等への分布あるいは沈着がこれらの変化と関連することを示している。本症は成熟虫体が心・肺動脈に寄生するという特徴から、そのすぐ下流に位置する肺細

血管および肺胞壁への病変発生が最も起こり易いと考えられる。このようなことから本症における免疫反応は肺病変形成に大きな役割を担っていると考えられた。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 尾 禎 明 彦  
副 査 教 授 杉 村 誠  
副 査 教 授 板 倉 智 敏  
副 査 教 授 神 谷 正 男

犬フィラリア (Di) 感染犬にみられる病理変化のうち、肺病変の軽重は本症の予後を判定する上で最も重要な指標のひとつとなる。これら肺病変のうち、とりわけ肺胞壁の肥厚が免疫反応の関与によって惹起するとの示唆があるものの、その部位での免疫関連物質の存在を系統的に観察した報告はほとんどない。申請者はこの免疫関連物質を肺病変中に証明し、その時の液性免疫反応との関係を明らかにするために本研究を行った。本論文は英文157頁からなり、参考論文14編を付いている。

申請者はまず、免疫酵素抗体染色法 (PAP) を用いて、摘出した Di 虫体および末梢血中ミクロフィラリア (mf) などの虫体抗原の染色性とその染色分布を調査した。その結果、成熟雌雄 Di ではクチクラ、皮下、筋層、生殖器、子宮内 mf および卵などに強い抗原性がみられた。しかし末梢血液中 mf のクチクラには陽性反応はみられなかった。次に、非感染犬、自然感染犬および実験的感染 (虫体挿入) 犬の肺について PAP 染色し検索した。その結果、自然および実験的感染群の例から肺胞壁において成虫 Di, mf, 卵, IgG, IgG Fc, IgM, および C 3 等の免疫関連物質の存在が感染の強度に応じて観察された。最後に、非感染犬、自然感染犬および実験的感染犬の血漿中抗体価 (ELISA) ならびに、抗原と反応する抗体の分子量別分布の変化 (Western blotting) を調べ、さらに肺の肉眼変化、末梢血中の mf の有無などを調査した。その結果、血漿中の抗体価の大小は感染虫体数と相関した ( $r=0.58$ ,  $p<0.01$ )。また抗体の分子量別分布は感染初期あるいは軽度感染期において重いバンド (80Kダルトン以上) 上にみられたが、重症例では軽いバンド (37Kダルトン以下) 上に反応がみられた。このことから、感染の経過にともない、抗体価に変化が現れるだけでなく抗体の分布においても変化がみられる点が

明らかとなった。また、抗体価の強弱と抗原に対する抗体のパターン別反応強度を比較したところ両者はよく相関 ( $r=0.77$ ,  $p<0.01$ ) した。

得られたこれらの成績を総合的に解析したところ、生後1年以内では、抗体価、抗体分布および肺に何ら変化はみられなかった。しかし、虫体の存在しない例でも加齢とともに感染の暴露を受けるため、時には抗体価の上昇もみられた。Di 未感染犬に新鮮虫体を挿入した場合、虫体挿入後10日目に至っても抗体産生による防御反応はみられなかった。ホルマリン・パラフィン処理した死虫体を挿入した場合では10日目で抗体価の上昇および Di 抗原の重いバンドに反応する抗体の出現がみられた。しかしこの場合には抗原側を担うのは処理虫体のみで mf、卵そのほかの抗原物質はみられなかった。したがって、感染初期での免疫応答は分子量の大きい非特異抗体の産生に始まり、生虫体そのものあるいは生虫体が排泄する種々の物質に対する反応は起こらないものと考えられた。一方、自然感染例を感染の軽重別に分類した場合、感染虫体数の増加に応じて抗体価は上昇し、抗体の分布は重いバンドから軽いバンドへと移行した。このことから感染の経過にともない、分子量が小さく、抗体価の高い特異抗体が産生するとともに免疫関連物質の肺胞壁および肺細血管等への分布・沈着が関連して起こることを明らかにした。

以上のごとく申請者は、本症は成熟虫体が心・肺動脈に寄生するという特徴から、そのすぐ下流に位置する肺細血管および肺胞壁に病変が発生し易い事実と関連して、免疫反応が本症における肺病変形成に大きな役割を担っているとした。この結果は犬フィラリア症の病態発生の解明に資するところ大きいと判断される。よって審査員一同は、田中公一氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。