

黒酵母培養液ソフィβ-グルカン経口投与によるイヌ回虫症の マウスモデルにおける肺の病理組織学的研究

吾妻 美子^{1,2)}, 福永 佐枝²⁾, R.P.V.J.RAJAPAKSE³⁾
Susiji WICKRAMASINGHE⁵⁾, Lalani YATAWANI⁵⁾
長瀧 充⁵⁾, 渡部 嘉哉⁴⁾, 吾妻 健⁵⁾

Immunohistological effects of oral administration of the Sophy β-glucan on lung toxocaniasis in a mouse model

Yoshiko AGATSUMA^{1,2)}, Sae FUKUNAGA²⁾, R.P.V.J. RAJAPAKSE³⁾
Susiji WICKRAMASINGHE⁵⁾, Lalani YATAWANI⁵⁾
Mituru NAGATAKI⁵⁾, Toshiya WATANABE⁴⁾, Takeshi AGATSUMA⁵⁾

Abstract

The Sophy β-glucan was orally administered to every mice two weeks before infection with *Toxocara canis*, and a patho-histological examination was performed on infected mice 4 days, 7 days, 10 days, 15 days post-infection to research an immunological effect of the Sophy β-glucan on toxiocaniasis in mice model.

Mainly we examined histology of inflammation and repair of lungs in infected mice. The hemorrhages were recognized in the alveolus largely. Injured tissues are immediately followed by a acute local reaction characterized by vascular changes, including the outpouring of plasma fluids and proteins, and soon thereafter by massing of leukocytes (mainly neutrophils and eosinophils).

However, a little of plasma fluids and proteins were observed, and the effusion of the leukocytes was induced more rapidly in the Sophy β-glucan group, than in con-

-
- 1) 高知学園短期大学医療衛生学科医療検査専攻、780-0955 高知市旭天神町292-26
Department of Medical Technology, Kochi Gakuen College. 292-26 Asahitennjinmami Kochi. 780-0955
 - 2) 高知学園短期大学専攻科応用生命科学専攻、780-0955 高知市旭天神町292-26
Applied Life Science Course, Kochi Gakuen College. 292-26 Asahitennjinmami Kochi. 780-0955
 - 3) ペラデニア大学獣医学部
Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Peradeniya, Sri Lanka.
 - 4) 株式会社ソフィ研究開発部 781-1522 高知県吾川郡仁淀川町田村248
Life Science Center, Sophy Inc. 248 Tamura, Niyodogawacho Agawagun, 781-1522
 - 5) 高知大学医学部環境保健学教室 783-8505 南国市岡豊町小蓮
Department of Environmental Health Science, Kochi Medical School, Kochi University.
Kohasu Okocho Nankoku, 783-8505

trol.

These were inflammatory responses and the process of repair to injury with infection of *Toxocara canis*. Many alveolar macrophages were activated, and phagocytosed the erythrocytes. After phagocytosis, the hemogiderin were stocked in the cytoplasm of alveolar macrophages.

Macrophages were more strongly and rapidly activated in the Sophy β -glucan group than in the control group, resulting in the appearance of multinucleated giant cells and remarkably active phagocytosis of erythrocytes.

In the Sophy β -glucan treated mice, more lymphocytes were also observed, and immuno-histochemical study revealed that T lymphocytes were dominated in the C57 BL/6 mice, and B lymphocyte and plasma cell, in the BALB/c mice. In the Sophy β -glucan treated mice, the natural immunity response was more rapidly generated in comparison with the non-treated mice, and afterwards acquired immunity reaction was responsible for the elimination of *Toxocara canis* and repair of tissue damage.

In the Sophy β -glucan treated mice, there were no individuals which fell into the serious pulmonary edema. It was confirmed that the Sophy β -glucan revealed immunological effects on toxocaniasis in a mouse model.

はじめに

イヌ回虫症 toxocaniasisは*Toxocara canis* (以下*T. canis*) の感染によって発症する。本疾患は世界的に分布しており、特に幼犬の感染率が高い^{1,2)}。ヒトへの感染は、感染イヌの虫卵含有糞便の土壌を介してなされ³⁾、これに接触する機会の多い1～3歳の乳幼児が好発年齢層である。1987年のAgudelo⁴⁾の報告によると、ニューヨークで4,652人の小児の血清を調べたところ男児5.7%、女児5.1%に*T.canis*抗体陽性が検出された。イヌ回虫症症例は世界各地から報告されているが、近年のペット嗜好の風潮で、小児の本感染症は増加するものと予想される⁵⁾。

β -グルカン⁶⁾は酵母の壁細胞由来の多糖類であるチモサン顆粒であり、網内系細胞を刺激する物質としての効用については、50年以上前から知られていた⁶⁾。Soltysら^{7~9)}は動物に実験的イヌ回虫症を発症させてグルカンが免疫力を高めることを研究した。近年、マクロファージの β -グルカンのリセプターとしてのデクチン-1についても研究が進展してきている^{10~15)}。株式会社ソフィ社が生産する黒酵母AFO-202株の培養液に産生された水溶性の β -1, 3-1, 6 グルカン(以下ソフィ β -グルカン)はマクロファージ、NK細胞などの免疫細胞の活性化、サイトカイン産生の促進、細菌やウイルス感染防止などの作用があることが知られている¹⁶⁾。

著者ら¹⁷⁾は、C57BL/6と、BALB/cの2系統のモデルマウスに*T. canis*を実験的に感染させ、肺組織傷害と炎症反応について報告した。本研究はさらに*T.canis*感染と並行してソフィ β -グルカンを経口投与することによりイヌ回虫症toxocaniasisに対するソフィ β -グルカンの効用について病理組織学および免疫組織化学的に検討した。

方 法

本研究では、実験的イヌ回虫症toxocaniasisの組織傷害像と修復機序を、ソフィ β -グルカン摂

取マウスとコントロールとして水のみ摂取させたマウスについて、C57BL/6とBALB/cの2系統のマウスについて病理組織学的および免疫組織化学的方法を用い、肺の組織について比較検討した。

1. 病理組織学的方法

C57BL/6とBALB/cの2系統モデルマウス（両系統とも雌）に*T. canis*の卵1,000個、3,000個、5,000個を経口投与により感染させた。*T. canis*感染は、ソフィβ-グルカン摂取についてはC57BL/6マウス17匹（内1匹死亡）、BALB/cマウス14匹と、非摂取（水のみ投与）についてはC57BL/6マウス19匹、BALB/cマウス13匹を用いた。また感染なしの個体数は、ソフィβ-グルカン摂取についてはC57BL/6マウス3匹、BALB/cマウス3匹と非摂取（水のみ投与）については、C57BL/6マウス5匹とBALB/cマウス5匹をコントロールとして用いた（表1）。ソフィβ-グルカン5%水溶液を感染14日前から経口的に投与した。感染後4日、7日、10日、15日目に屠殺・剖検し肺を摘出した。肺を10%緩衝ホルマリンで48時間以上固定後パラフィン包埋を行った。ユング型ミクロトームで3μに薄切したパラフィン切片を剥離防止用スライドガラス(MATSUNAMI, MASコート)に貼り付けた。

表1 実験に用いたマウスの個体数

C57BL/6

感染卵数	水				ソフィβ-グルカン			
	0	1,000	3,000	5,000	0	1,000	3,000	5,000
4日	2	2	2	3	1	2	1	3
7日	2	2	2	2	1	2	2	1 (死)
10日	1	2	2	N.D.	1	1	2	N.D.
15日	N.D.	N.D.	2	N.D.	N.D.	N.D.	3	N.D.

BALB/c

感染卵数	水				ソフィβ-グルカン			
	0	1,000	3,000	5,000	0	1,000	3,000	5,000
4日	2	2	2	1	1	2	2	1
7日	2	1	2	1	1	2	1	1
10日	1	2	2	N.D.	1	1	2	N.D.
15日	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2	N.D.

0 : 感染なし N.D. : not done

本実験は、通常のヘマトキシリン・エオジン染色に加え、幼虫体、好中球の証明のためにPAS反応 (Periodic acid Schiff reaction)、また肥満細胞はトルイジン青染色で検出した。HE染色の組織中に赤い顆粒を有する分葉核細胞が多数認められたので、その細胞が好酸球であることを証明するためにダイロン染色を行った。この染色法はアミロイド染色として有用であるが、好酸球顆粒も特異的に検出される。マクロファージ細胞質内の褐色粗大顆粒が、ヘモジデリンであることの証明のためにベルリン青染色を行い、さらにダイロン染色とベルリン青染色の二重染色を試みた。

2. 免疫組織化学酵素抗体法 (表2)

組織中に出現した単核細胞がTリンパ球またはBリンパ球のどちらであるかを同定するために、Tリンパ球には一次抗体として抗マウスCD4ラットモノクローナル抗体 (Ray Biotech社)、2次抗体としてHRP標識抗ラットIgGラビットポリクローナル抗体 (DAKO社) を用い酵素抗体間接法で検索した。また、抗ヒトCD45ROモノクローナル抗体を用いてLSAB法 (labeled streptavidin-biotin complex method) 法で検索し、ヒトとマウスの交叉反応の有無について検討した。Bリンパ球の同定には、抗ヒトCD79aラビットポリクローナル抗体 (LABVISION社) を用いた。この抗体はヒトのCD79a蛋白のN末端に由来する合成ペプチドを免疫源としておりヒト、サル、ウマ、マウス、モルモット等の哺乳類に特異性があるとされている。2次抗体には、HRP標識抗ラビットIgGブタポリクローナル抗体 (DAKO社) を用い酵素抗体間接法で検索した。また、ヒトBリンパ球の幅広い成熟段階に発現する抗ヒトCD20モノクローナル抗体 (DAKO社) をLSAB法で検索した。動物組織用抗体として市販されている一次抗体には限界があるため、ヒト組織用一次抗体の交叉反応を利用して、動物の免疫組織化学にヒトの抗体で検索することがある¹⁸⁾。

寄生虫感染宿主ではIgEが高値になることはよく知られている。また、吾妻ら¹⁷⁾は肺病変の気管支粘膜下、胸膜下に多数の形質細胞を確認した。そこで、組織中における形質細胞がIgEを産生しているか否かについて、一次抗体として抗マウスIgEヤギポリクローナル抗体 (BETHYL社)、2次抗体はHRP標識抗ヤギIgGラビットポリクローナル抗体 (DAKO社) を用い酵素抗体間接法で検索した。また、HE染色で成熟形質細胞も認められたので、IgG産生についても検索した。IgGは一次抗体としてLSABキットのビオチン標識抗マウス・ラビット抗体、次に酵素試薬であるHRP標識ストレプトアビジンを反応に用いた。この方法は、3,000個、5,000個感染マウスに対して施行した。

表2 免疫組織化学酵素抗体法

	一次抗体	二次抗体	標識	方法
Tリンパ球	抗マウスCD4ラットモノクローナル抗体 (RayBiotech社)	抗ラットIgGラビットクローナル抗体 (DAKO社)	HRP	間接法
	抗ヒトCD45ROモノクローナル抗体 (DAKO社)	抗マウス・ラビットIgG抗体 (DAKO社)	HRP	LSAB法
Bリンパ球	抗ヒトCD79aラビットポリクローナル抗体 (LABVISION社)	抗ラビットIgGブタポリクローナル抗体 (DAKO社)	HRP	間接法
	抗ヒトCD20モノクローナル抗体 (DAKO社)	抗マウス・ラビットIgG抗体 (DAKO社)	HRP	LSAB法
IgE	抗マウスIgEヤギポリクローナル抗体 (BETHYL社)	抗ヤギIgGラビットポリクローナル抗体 (DAKO社)	HRP	間接法
IgG	ビオチン標識抗マウス・ラビット抗体 (DAKO社)	ストレプトアビジン (DAKO社)	HRP	LSAB法

結 果

1. *T.canis* 感染C57BL/6マウスにおける肺の病理組織変化 (表3、表4)

1) ソフィβ-グルカン非摂取マウス (コントロール)

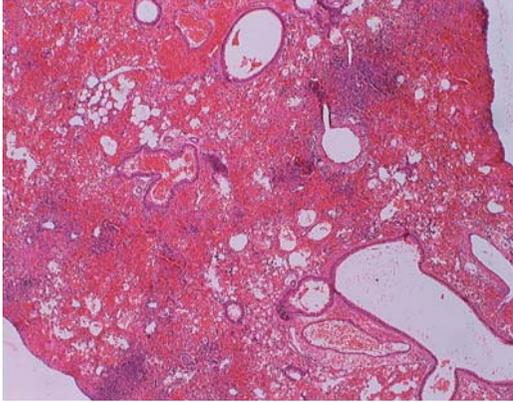


図1 BALB/c *T.canis* 5,000個感染後4日目、ソフィβ-グルカン(-)、肺全体に見られる非常に強い出血。H E染色、x 110

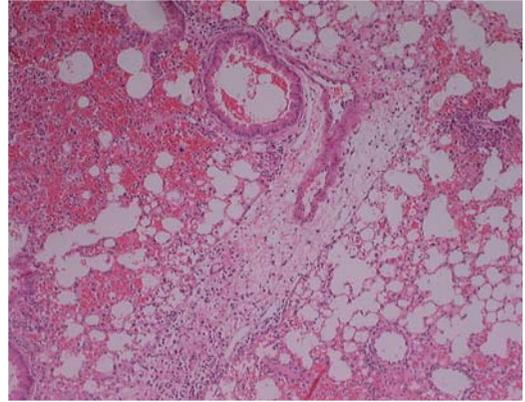


図2 C57BL/6 *T.canis* 5,000個感染4日目、ソフィβ-グルカン(-)、血管周囲と肺胞内浮腫。H E染色、x 110

感染4日後では肺の正常構造は破壊され、肺胞内、肺間質へ非常に大量の出血がおこっている。この肺胞破壊と出血の程度は感染卵数に比例して高度になり、1,000個では、気管支内への出血は認められないが、3,000個、5,000個では気管支内にも及んでいる。特に5,000個では、肺全体の破壊と肺胞内への出血が顕著で肺水腫病変を呈している(図1、2)。血管からの血漿の滲出のため血管周囲は浮腫に陥り、その中に炎症細胞も少数散在しているが、主体は血漿成分である。滲出している炎症細胞は、好中球、好酸球が主体で単核のリンパ球も少数滲出している。肺には本来肺胞マクロファージが常在しているが、これらの細胞による赤血球貪食像も認められる。しかし、ヘモジデリン含有細胞は少ない。5,000個感染マウスでは、血漿成分だけで炎症細胞はほとんど認められない。幼虫は、1,000個感染マウスで1mm²あたり3匹、5,000個感染マウスで、1mm²あたり2匹以上で非常に多い。感染後7日目でも、肺胞内に出血巣が残存し、3,000個感染マウスでは気管支内にも大量に出血が残存している。5,000個感染マウスでは、肺の基本的構造が破壊され7日後では修復されていない。血管周囲には浮腫があるが、滲出現象は、血漿成分から炎症細胞へと移行している。炎症細胞は好酸球、リンパ球が主体で、出血巣にもこれらの細胞は認められ、マクロファージも活性化され、血球貪食が活発化している。ベルリン青陽性のヘモジデリン含有マクロファージも増加している。5,000個感染マウスでは、好中球、好酸球、リンパ球、マクロファージが集簇し、大きな炎症巣を形成している。感染卵数が多い場合には組織傷害と炎症反応が強く認められる。

感染後10日目になると、1,000個感染マウスの肺胞内出血はほぼ消失し、一部の血管が肥厚し血管炎に陥っている。ラングハンス型多核巨細胞が出現し、細胞質内にヘモジデリンを含有している。そして、肺組織中に、好酸球、リンパ球、マクロファージ、類上皮細胞、多核巨細胞からなる大きな結節様構造肉芽腫が形成されている。好酸球は10日目になると7日目より減少している。しかし、3,000個感染マウスでは、肺組織は強く傷害され、正常肺胞は消失し肺出血も肺全体に及び肺水腫を発症している。血管周囲の浮腫は顕著で、炎症細胞は極めて少ない。マクロファージによる赤血球貪食はあるが、多核化したマクロファージは認められない。3,000個感染マウスでは、15日目になっても出血巣が残存しており、また血管からの炎症細胞滲出現象が顕著で血管周囲に炎症細胞が多い。炎症細胞は、リンパ球、形質細胞、マクロファージで、マクロファージは大型になり、細胞質内に線維様構造物が認められる。

免疫組織化学酵素抗体法の結果、3,000個感染マウスにおいては、抗ヒトCD45RO陽性Tリンパ球は4日目、7日目に少数出現したが10日目は肺水腫に陥りリンパ球は認められなかった。しかし、15日目には、CD45ROおよびCD4陽性リンパ球が出現した。抗ヒトCD20陽性Bリンパ球は4、7日目では全く認められなかったが、10日、15日になると出現した。しかし、Tリンパ球に比べると数は少ない。5,000個感染マウス肺組織にはT,Bリンパ球とも全く認められなかった。今回用いたCD79a抗体は、検索したすべての組織において全く検出されなかった。IgEは、3,000個感染15日目の肺組織中の気管支粘膜下未熟形質細胞細胞質内と気管支粘膜上皮細胞内に陽性であった。しかし、IgG陽性細胞はなかった。

2) ソフィβ-グルカン摂取マウス

感染後4日目、1,000個感染マウスの肺組織における出血範囲、出血量ともに、非摂取マウスに比べ少ない。血管周囲の浮腫もなく炎症細胞の滲出現象が主体である。滲出している炎症細胞は、リンパ球、マクロファージが優勢で好中球、好酸球は少ない。3,000個では肺胞内出血は起こっているが、気管支出血はなく、出血量は全体に少ない。マクロファージが活性化され、赤血球貪食も活発である。好中球、リンパ球に加え、免疫芽球や少数ではあるが形質細胞も出現している。5,000個感染マウスでは、幼虫が認められ、1mm²あたり0.18~0.83匹である。得られた肺組織全体におよぶ程の広範な出血があるが、炎症細胞滲出も非摂取マウスに比べ顕著で好酸球、リンパ球、マクロファージが大きな結節様集簇を多数形成している。マクロファージによる赤血球貪食も活発である(図3, 4)。

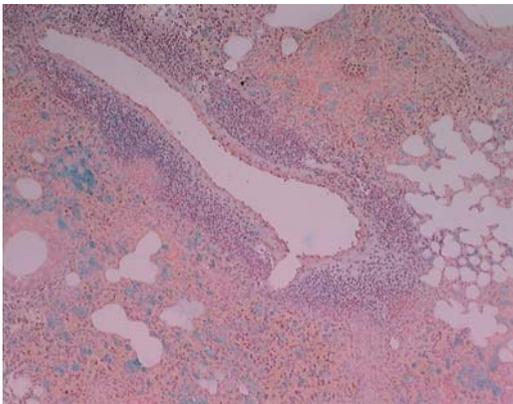


図3 C57BL/6 *T.canis* 3,000個感染後7日目、ソフィβ-グルカン(+), 血管周囲への炎症細胞滲出。ベルリン青陽性担鉄マクロファージの集団。ベルリン青・ダイロン染色, x110

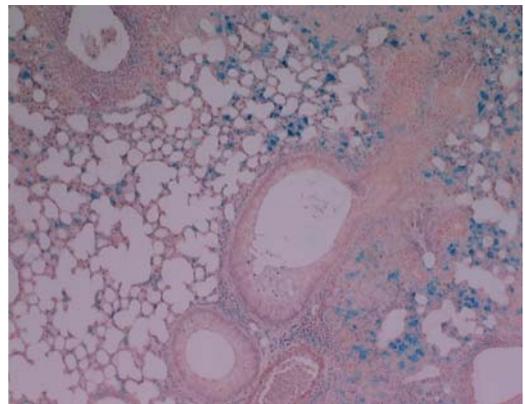


図4 C57BL/6 *T.canis* 3,000個感染後10日目、ソフィβ-グルカン(+), 気管支粘膜下のリンパ球、好酸球およびマクロファージ。ベルリン青・ダイロン染色, x280

7日目のソフィβ-グルカン摂取マウスでは、1,000個、3,000個とも出血巣は少なく、正常肺胞も多い。血管周囲浮腫もあるが炎症細胞滲出も顕著で、好酸球、リンパ球、マクロファージ、そしてマクロファージが融合したラングハンス型多核巨細胞も出現(図5)し、赤血球、ヘモジドリンを活発に貪食している。マクロファージの数と多核化大型化は明らかにソフィβ-グルカン摂取マウスが優位である。胸膜下および気管支粘膜下に少数の形質細胞の集簇がある。5,000個感染マウスは7日目には死亡した。10日目では1,000、3,000個感染マウスとも出血は肺胞、間質にわずかに残存しているが、非摂取マウスに比べると、有意な差が認められる程縮小している。血管周囲の浮腫もなく、組織全体への炎症細胞滲出が顕著である。好酸球、リンパ

球、マクロファージ、類上皮細胞も伴って大きな結節を形成している。胸膜下には少数であるが形質細胞も認められる。15日目では、気管支粘膜下および胸膜下にリンパ球、形質細胞が多数集簇している。

免疫組織化学酵素抗体法の結果(表5)、小～中型Tリンパ球は4日目から出現し、10、15日目では多数に上った。Bリンパ球は4日目は少数、7日目、10日目、15日目と斬増しているが、Tリンパ球に比べて少ない。IgEは未熟型形質細胞細胞質内に陽性で、より成熟した形質細胞はIgG陽性である。5,000個感染マウスでは、4日目にわずかにTリンパ球を認めるのみで、Bリンパ球、IgE、IgG陽性細胞は認めない。

非感染C57BL/6マウスでは、ソフィβ-グルカン摂取の有無にかかわらず組織変化は認められなかった。

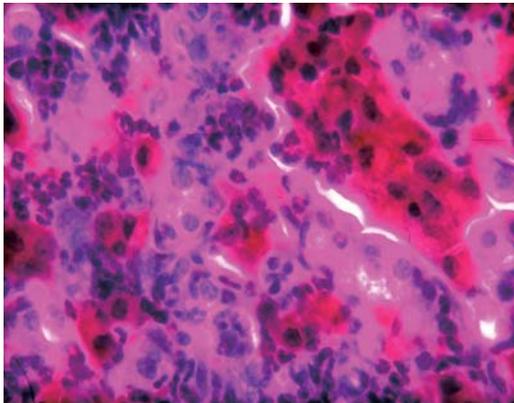


図5 C57BL/6 *T.canis* 3,000個感染後10日目、ソフィβ-グルカン(+)、ラングハンス型多核巨細胞、HE染色、x 2,800

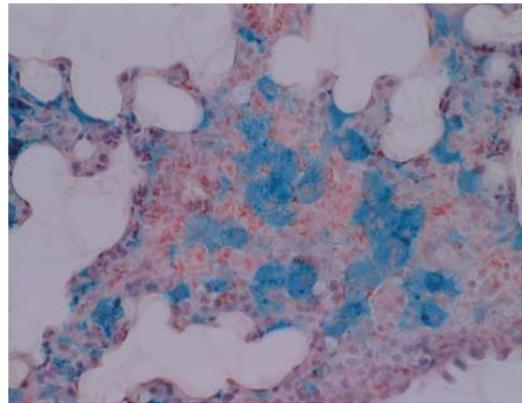


図6 C57BL/6 *T.canis* 3,000個感染後10日目、ソフィβ-グルカン(+)、ベルリン青陽性担鉄ラングハンス型多核巨細胞、ベルリン青・ダイロン染色、x 1,100

表3 *T.canis* 感染C57BL/6マウスの肺組織障害の比較

感染卵数	1,000						3,000								5,000			
	G(-)			G(+)			G(-)				G(+)				G(-)		G(+)	
感染後日数	4	7	10	4	7	10	4	7	10	15	4	7	10	15	4	7	4	7
肺胞内出血	+++	+	+	+	+	-	++	++	++	++	+	+	+	-	+++	+++	++	死
間質出血	++	+	-	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-	+++	+++	++	
気管支内出血	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	+++	+++	-	
血管周囲浮腫	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	-	-	+	++	-	
炎症細胞	++	++	++	+	+	+	+	+	+	-	++	++	++	-	+	++	+++	
肺水腫	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	

表4 C57BL/6 マウスの肺組織で観察された炎症細胞の比較

感染卵数	1,000						3,000						5,000					
	G(-)			G(+)			G(-)			G(+)			G(-)		G(+)			
感染後日数	4	7	10	4	7	10	4	7	10	15	4	7	10	15	4	7	4	7
好中球	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	+	++	+	死
好酸球	+	+	-	+	+	+	+	++	+	+	+	++	++	-	+	++	+++	
リンパ球	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	++	+++	
単核マクロファージ	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+++	+	++	+++	
多核化マクロファージ	-	+	+	-	+	++	-	-	-	+	-	++	++	+++	-	++	++	
ラングハンス型巨細胞	-	-	+	-	+	++	-	-	-	+	-	+++	++	+++	-	++	++	
赤血球貪食・担鉄細胞	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+	++	+++	
類上皮細胞	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	++	+++	-	-	-	
形質細胞	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+++	-	-	-	

表5 C57BL/6マウス免疫組織化学酵素抗体法結果

感染卵数	3,000								5,000			
	G(-)				G(+)				G(-)		G(+)	
感染後日数	4	7	10	15	4	7	10	15	4	7	4	7
抗マウスCD4陽性Tリンパ球	-	-	-	+	ND	+	ND	++	-	-	-	ND
抗ヒトCD45RO陽性Tリンパ球	+	+	-	+	+	+	++	++	-	-	-	ND
抗ヒトCD20陽性Bリンパ球	-	+	-	+	+	+	++	++	-	-	-	ND
IgE陽性細胞	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	ND
IgE陽性気管支粘膜上皮細胞	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	ND
IgG陽性細胞	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	ND

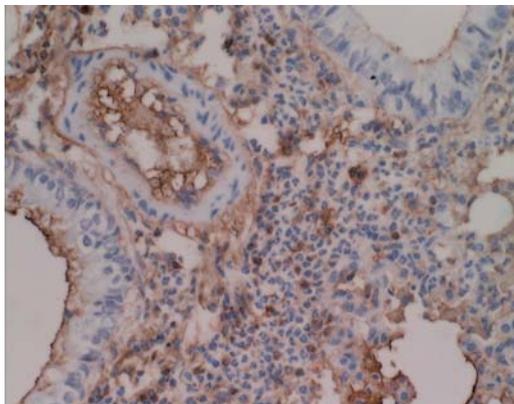


図7 C57BL/6 *T.canis* 3,000個感染後10日目、ソフィβ-グルカン(+)、抗ヒトCD45RO陽性Tリンパ球。免疫組織化学、×1,100

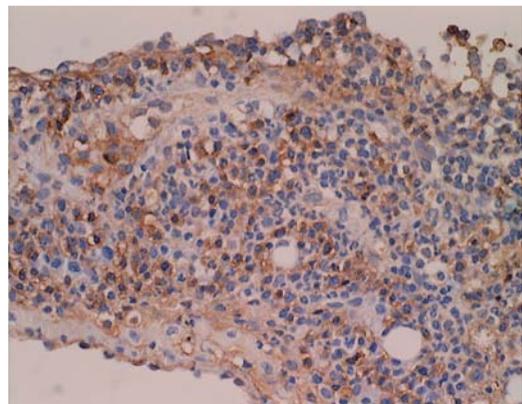


図8 C57BL/6 *T.canis* 3,000個感染後10日目、ソフィβ-グルカン(+)、抗ヒトCD20陽性Bリンパ球免疫組織化学、×1,100

2. *T.canis* 感染BALB/cマウスにおける肺の病理組織学的変化 (表6、表7)

1) ソフィβ-グルカン非摂取マウス (コントロール)

C57BL/6と同じ組織傷害が発生しており、肺組織全体に及ぶ広範な出血があり、肺胞の基本的構造も破壊されている。特に3,000個、5,000個感染マウスでは被害状態が非常に強く肺水腫に陥っている。炎症細胞は少数で集塊形成には至らない。4日目の炎症細胞の主体は好中球で、マクロファージは少ない。小数のリンパ球と気管支周囲、胸膜下に少数の形質細胞が認められる。7日目では、出血巣残存範囲は広範で、特に5,000個感染マウスでは、肺水腫に陥っている。血管周囲には浮腫があり、滲出炎症細胞は好酸球が主体で、他に、リンパ球、マクロファージであるが、出血巣に比べ、炎症細胞の集塊は少ない。赤血球貪食マクロファージも少ない。

10日目には、1,000個感染マウスでは肺胞内出血は消失し、滲出している炎症細胞は好酸球、リンパ球、マクロファージであるが、多核巨細胞はC57BL/6程多くはない。好酸球は7日目より減少している。気管支粘膜下に形質細胞が多く、ラッセル小体も認められる。

2) ソフィβ-グルカン摂取マウス

4日目は、1,000個感染マウスでは出血巣が少なくほとんどが正常の肺胞構造を維持している。出血巣および間質には好中球、好酸球、リンパ球、マクロファージが出現しているが、出血巣が少ないためかマクロファージによる赤血球貪食は比較的少ない。

3,000個では、出血巣は顕著であるがそれに対応して炎症細胞滲出も顕著で、好中球よりリンパ球が優位である。赤血球貪食マクロファージも多数認められ、また肺胸膜下には形質細胞も集団で出現している。5,000個感染マウスでは広範な出血があり幼虫も1mm²あたり0.18匹認められる。しかし、マクロファージが活性化され、マクロファージ細胞数の増加と赤血球貪食が旺盛である。7日目では、出血巣はわずかに残っているがほぼ消失している。血管周囲には炎症細胞の滲出が顕著で、出血巣には好酸球、リンパ球、マクロファージ、類上皮細胞が集簇して結節を形成している (図9)。類上皮細胞は、BALB/cのソフィβ-グルカン投与で7日目にはすでに出現するが、C57BL/6では認められない。ヘモジデリン含有大型マクロファージが出現し、気管支粘膜下組織には、リンパ球、形質細胞、ラッセル小体が多数認められる。3,000個では特に形質細胞が多く、胸膜下組織全体、血管周囲に多数存在している。胸膜の肥厚が顕著で、これは*T.canis* 感染 (+)、ソフィβ-グルカン (+) のBALB/cマウスの特徴である。

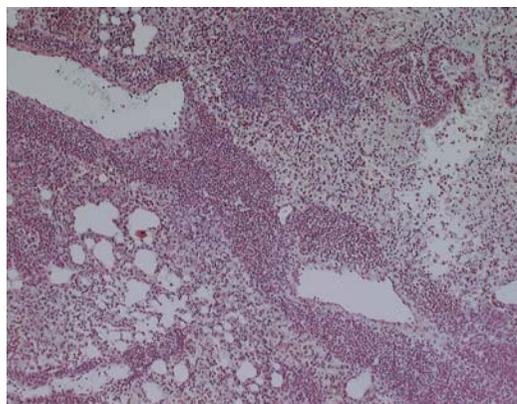


図9 BALB/c *T.canis* 3,000個感染後7日目、ソフィβ-グルカン (+)、血管周囲の好酸球とリンパ球。ベルリン青・ダイロン染色、x 280

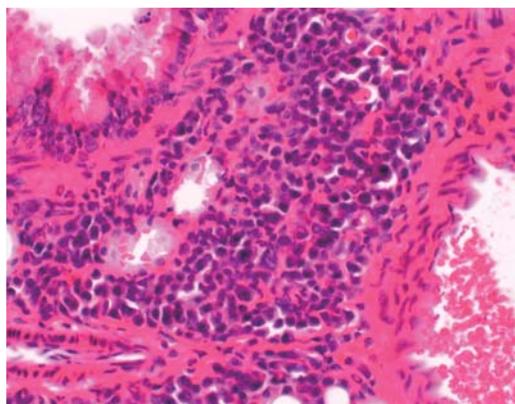


図10 BALB/c *T.canis* 3,000個感染後10日目、ソフィβ-グルカン (+)、気管支粘膜下のリンパ球と形質細胞。HE染色、x 1,100

表6 *T.canis* 感染BALB/cマウスの肺組織障害の比較

感染卵数	1,000						3,000								5,000			
	G(-)			G(+)			G(-)				G(+)				G(-)		G(+)	
感染後日数	4	7	10	4	7	10	4	7	10	15	4	7	10	15	4	7	4	7
肺胞内出血	++	+	-	+	+	-	++	++	++	+	++	+	-	-	+++	+++	++	+
間質出血	++	+	-	+	-	-	++	++	+	+	++	+	-	-	+++	+++	++	+
気管支内出血	++	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	+
血管周囲浮腫	++	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	-
炎症細胞	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++	+++	+++	++	++	+	++	++	++
肺水腫	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-

表7 *T.canis* 感染BALB/cマウスの肺組織で観察された炎症細胞の比較

感染卵数	1,000						3,000								5,000			
	G(-)			G(+)			G(-)				G(+)				G(-)		G(+)	
感染後日数	4	7	10	4	7	10	4	7	10	15	4	7	10	15	4	7	4	7
好中球	+++	+	-	++	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
好酸球	+	++	+	++	++	++	+	+	+	-	+	++	+	-	+	+	+	+
リンパ球	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	++
単核マクロファージ	+	+	+	+	++	++	+	++	++	+	+	++	++	++	+	+	++	++
多核化マクロファージ	-	-	-	-	++	+	-	-	+	+	+	++	++	++	-	-	++	++
ラングハンス型巨細胞	++	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	++	++	-	-	-	+++
赤血球貪食・担鉄細胞	+	+	+	+	++	++	++	+	++	+	++	++	+++	++	+	+	++	+++
類上皮細胞	-	-	-	-	++	++	-	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	-	++
形質細胞	+	+	+	+	++	++	-	+	-	+	++	++	+++	+++	-	-	-	-

表8 BALB/cマウス免疫組織化学酵素抗体法結果

感染卵数	3,000								5,000			
	G(-)				G(+)				G(-)		G(+)	
感染後日数	4	7	10	15	4	7	10	15	4	7	4	7
抗マウスCD4陽性Tリンパ球	-	+	+	N.D.	-	++	+	+	-	-	-	-
抗ヒトCD45RO陽性Tリンパ球	-	+	N.D.	N.D.	+	+	+	++	-	-	-	-
抗ヒトCD20陽性Bリンパ球	-	+	++	N.D.	+	++	+	+	-	-	-	+
IgE陽性細胞	-	+	+	N.D.	-	+	+	-	-	-	-	+
IgE陽性気管支粘膜上皮細胞	-	+	+	N.D.	-	+	+	-	-	-	-	+
IgG陽性細胞	-	+	++	N.D.	-	+	+	-	-	-	-	+

N.D. : not done

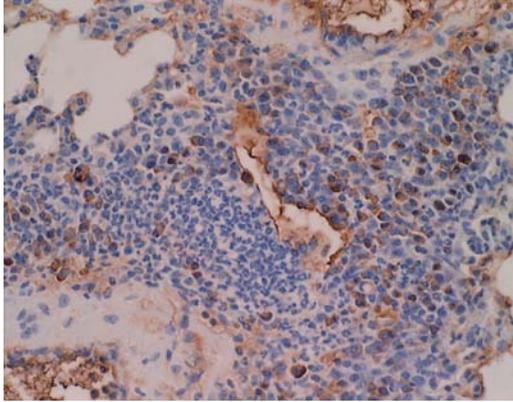


図11 BALB/c *T.canis* 3,000個感染後10日目、ソフィβ-グルカン(+)、リンパ管周囲の抗CD20陽性Bリンパ球。免疫組織化学、x 1,100

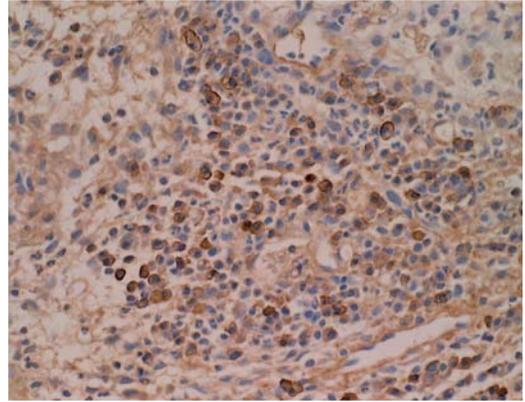


図12 BALB/c *T.canis* 5,000個感染後7日目、ソフィβ-グルカン(+)、IgE陽性形質細胞。免疫組織化学、x 1,100

5,000個感染マウスでは、幼虫の死骸はあるが、生存しているものはない。出血巣もわずかに残存しているが、肺組織全体に炎症細胞の集簇巣が広がっている。炎症細胞の主体は好酸球よりも、大型リンパ球、マクロファージで、マクロファージは多数のラングハンス型多核巨細胞化し、赤血球、ヘモジデリンを細胞内に含有している。

10日目では、1,000個、3,000個感染マウスとも共通して出血巣は消失し、炎症細胞の滲出現象が顕著である。好酸球は減少し、リンパ球、マクロファージが増加し、マクロファージは大型化および多核化し、赤血球貪食が活発で細胞質全体にヘモジデリンを含有している。しかし、この数はC57BL/6より少ない。形質細胞の増加が顕著で、血管周囲、気管支粘膜下組織、胸膜下組織に集簇しており、非摂取マウスに比べ優位に多い(図10)。

免疫組織化学酵素抗体法の結果、3,000個感染マウス肺組織ではTリンパ球は4日目から出現し、7日、10日、15日と増加している。Bリンパ球は4日目の胸膜下、7日目は胸膜下、気管支粘膜下、間質に多数認められるが(図11)、10日目以降は7日目程多くない。IgE陽性細胞は、7日目が多く10日になるとIgG陽性のほうが多くなった。5,000個感染マウスでは、Bリンパ球が7日目には認められたが、Tリンパ球は陰性であった。IgEは未熟形質細胞、IgGは成熟形質細胞に陽性であった(図12)。

なお、非感染BALB/cマウスではソフィβ-グルカン投与および非投与マウスの肺には何の変化も認められなかった。

考 察

*T.canis*は経口的に感染し、小腸から血行性あるいはリンパ行性に肝臓に移行し、さらに心臓、肺へ移行する。肺に幼虫がみられるのは、感染侵入後3ないし7日といわれ、この時期に咳、喘息、発熱等の臨床症状を呈する^{19,20}。本研究は、マウスに*T.canis*を感染後4, 7, 10, 15日目に剖検し病理組織学的に観察した結果、4日目の肺組織にすでに幼虫が認められた。組織中の幼虫の数は、感染卵数に比例して多く出現し5,000個感染個体が最も多かった。

また、これらの幼虫がもたらしたと思われる組織傷害も感染卵数に比例して強く発生していた。組織傷害として肺胞内出血、血管周囲浮腫、気管支内出血、肺水腫の肺病変が発生した。

肺組織が破壊され、血管から肺胞内への出血は、ソフィβ-グルカン摂取いかんにより発生するが、肺胞内出血は非摂取マウスの肺組織でより強く広範に認められた。さらに、気管支内出血はソフィβ-グルカン摂取マウスでは認められない。また、血管周囲浮腫も、ソフィβ-グルカン摂取マウスでは認められない。浮腫は、血管からの血漿成分の滲出現象に起因するが、血漿成分が大量に滲出することにより、肺胞内に貯留し肺水腫に陥る。非摂取マウスの3,000個感染以上マウスで必発した。しかし、ソフィβ-グルカン摂取マウスでは、感染初期から血管からの血漿成分の滲出は認めないか、極少量で細胞成分が主体のため、肺水腫に陥っているマウスは皆無であった。

T.canis 感染によって組織中に滲出している炎症細胞は、好中球、好酸球、リンパ球、形質細胞、マクロファージであった。時系列に観察すると、初期は好中球優勢で、好酸球も初期から多数滲出していた。幼虫の周囲を好酸球が取り囲んでいるが、虫体に侵入して虫体組織を破壊していることは全くなかった。寄生虫感染により eosinophilia が惹起されることはよく知られているが、Yoshikawaら²¹⁾は通常はほとんど0に近い好酸球が、*T.canis* 感染により、炎症細胞に占める割合が84.8%に達するとし、その好酸球が肺血管の透過性を亢進させると報告している²²⁾。また Takamotoら²³⁾によると好酸球はTリンパ球が産生するIL-5に刺激されて血管から滲出してくる。好酸球の毒性は細胞質内の好酸性顆粒が含有しているカチオンタンパク cation protein である。このタンパクは major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO), eosinophil-derived neurotoxin (EDN) である²⁴⁾。これらのカチオンタンパクにより寄生虫体や幼虫が殺傷されると思われる。しかし、*T.canis* の幼虫は好酸球に包囲されているが、虫体内に好酸球が侵入して殺傷されている像は全く認められなかった。*T.canis* の幼虫と好酸球の関係については、Badleyら²⁵⁾の走査電顕を用いた研究があり、*Sistosoma* 類への侵入は認められているが、*T.canis* では、好酸球は幼虫の上表から離れた莢のような層の表面には接着しているが、幼虫の表皮内には入り込んでいないので、この莢が幼虫を保護していると推察している。*T.canis* 感染における好酸球滲出の意義について D.I.Fattahら²⁶⁾の、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた形態学的検索による詳細な報告によると、好酸球は幼虫に近づき、脱顆粒するが幼虫は死滅することなく生存している。直接 *T.canis* に侵入はしないが、好酸球は c3b、c3bi に対するレセプターをもち、さらに IgG と結合する能力がある。従って、補体と抗体を誘導することにより、*T.canis* に応対しているものと思われる。*T.canis* に対する宿主の反応は好酸球の血管からの動員、それに引き続き補体や抗体の働きによる。従って、幼虫は宿主内で長期間生存可能である。しかし、このカチオンタンパクは組織傷害性も強く、寄生虫感染が、気管支粘膜等の組織破壊や血管炎をもたらす^{27,28)}。これが、臨床症状として現れる。しかし、ソフィβ-グルカン摂取マウスでも好酸球滲出は顕著に認められたが、組織傷害の程度は少なかった。

肺組織中に出現している細胞は、他に好中球、リンパ球、形質細胞、マクロファージである。好中球は4日目に優勢で7日目には減少した。リンパ球は少数ではあるが初期から出現し、7日、10日、15日と時間が経過するに従い増加してきた。免疫染色によるTリンパ球、Bリンパ球の同定の結果、C57BL/6、3,000個感染ソフィβ-グルカン摂取マウスでは、非摂取マウスに比べてTリンパ球、Bリンパ球とも有意に多数の細胞が認められた。ソフィβ-グルカンにより、免疫系の活性化が惹起されたと思われる。特に15日目では、Tリンパ球、Bリンパ球とも増加していた。しかし、5,000個感染組織では、認められないので、傷害が強い場合は炎症細胞の反応にも閾値がある。BALB/c マウスも類似の結果であるが、Tリンパ球よりBリンパ球が優位である。特に気管支粘膜下、リンパ管、胸膜下に多い。この部位は、広義の間質でリンパ路と呼ばれている²⁹⁾。この部位には、免疫芽球様細胞や形質細胞も多く、それらの細胞は免疫組織化学酵素抗体法で IgE、IgG 陽性

であった。IgEはTh2が産生するIL4, IL5によって刺激され、寄生虫感染症やアレルギーでは高値になる³⁰⁾。このIgEが寄生虫を殺す主役で、感染すると正常の100倍のレベルにも達する³¹⁾。しかも、IgEは気管支粘膜上皮細胞にも陽性であった。BALB/cマウスでは、Bリンパ球が活性化されIgE, IgGを産生するTh2タイプの液性免疫反応であった。また、5,000個感染ソフィβ-グルカン非摂取マウスでは、リンパ球は全く出現しなかった。

T.canis 感染による最も顕著な組織傷害は出血である。肺は構造・機能上毛細血管が密に分布しているので、幼虫の移行により広範な出血が起こる。出血の程度は、マウスの種に関係なく *T.canis* 感染数が多いほど、またソフィβ-グルカン非摂取マウス程より強く現れた。ソフィβ-グルカン非摂取マウスでは、肺胞内や間質だけではなく、気管支内にも顕著に起こっていたが、摂取させたマウスでは、感染数が多くても気管支内出血は全く認められなかった。ソフィβ-グルカン非摂取マウスにおける出血巣は、1,000個感染マウスでは4日目に多かったが、7日目には減少し10日目にはほとんど消失した。しかし、3,000個、5,000個感染マウスでは日数が経過しても減退することはない。しかし、ソフィβ-グルカン摂取マウスでは、感染数にかかわらず、7日目以降減少し、1,000個、3,000個感染マウスでは、10日目には出血は消失した。出血巣の減少には、マクロファージが大きく寄与している。肺胞内に滲出した赤血球は、肺胞内に常在している肺胞マクロファージにより貪食される。貪食された赤血球はマクロファージ内で溶血し、ヘモグロビンを分解してヘモジデリンという褐色色素になりマクロファージの細胞質内に蓄えられる。担鉄細胞とも呼ばれ、ベルリン青が陽性になる。

マクロファージの活性化は、ソフィβ-グルカン摂取マウスで、ソフィβ-グルカン非摂取マウスに比べ顕著に早く現れ、1,000個、3,000個感染マウスでは、感染7日目から、5,000個感染マウスでは、4日目から数の増加と赤血球の旺盛な貪食が始まった。しかし、ソフィβ-グルカン非摂取マウスでは、3,000個感染マウスでは同様に7日目から増加したが、1,000個、5,000個ではマクロファージの数はソフィβ-グルカン摂取マウスに比べ極端に少なかった。また、マクロファージは侵入してきた病原菌や異物に対して、その数が増加するだけではなく、多核化、大型化して応答する。このようなマクロファージの応答はやはりソフィβ-グルカン摂取マウスで顕著であった。これらの細胞が、活発に赤血球を貪食して、出血巣、傷害を受けた組織の修復をしたものと思われる。2系統のマウスにおいて7日目、10日目にはラングハンス型多核巨細胞が認められた。また、マクロファージは類上皮細胞として肉芽腫を形成する。この類上皮細胞は、C57BL/6のソフィβ-グルカン摂取マウスでは、1,000個感染10日目、3,000個感染では7日目から増加し、10日目では肉芽腫形成に至った。しかし、ソフィβ-グルカン非摂取マウスでは、類上皮細胞は少なく肉芽腫の形成には至らない。BALB/cマウスで、類上皮細胞および肉芽腫形成が認められたのは、ソフィβ-グルカン摂取、1,000個感染7日目、10日目と、5,000個感染の7日目であるが、ソフィβ-グルカン非摂取マウスではどの時期においても全く認められなかった。

マクロファージは、外来から異物が侵入すると即時に活性化し、好中球とともに自然免疫担当細胞としての役割を担い、その抗原刺激をTリンパ球に提示する役割も担当している。さらに、マクロファージにdectin 1, LSR (lactosylceramide selected scavenger receptors), CR3の3種類のβ-グルカンレセプターがある¹⁰⁻¹⁹⁾。従って、ソフィβ-グルカンを投与することによりマクロファージが活性化される。

Taylorら¹⁰⁾は、樹状細胞等の他の単球系よりも、肺胞マクロファージが最も強く細胞表面レセプターを表現していると報告している。このことは、ソフィβ-グルカン摂取マウスでは、感染14日前から投与したβ-グルカンによりマクロファージは活性化され、多核化大型化も進行し、感染と組織傷害が発生した早期に赤血球の貪食と組織傷害の修復が開始したと思われる。さらに、

次の免疫反応であるマクロファージによるTリンパへの刺激伝達が起こりIL-5の産生により好酸球の血管からの滲出現象、Tリンパ球のBリンパ球刺激により形質細胞への分化が促進されIgE産生が起こり、その後IgGの産生もひき続いたと思われる。C57BL/6マウスでは、マクロファージの多核巨細胞化と類上皮細胞、Tリンパ球の反応が強いTh1反応、BALB/cマウスではBリンパ球と形質細胞による抗体産生による液性免疫のTh2反応が優勢で、それぞれのマウスの免疫応答の違いが確認できた。

Akaoら^{32,33)}は、犬回虫症や猫回虫症のモデル動物として、スナネズミmongolian gerbilsに眼病変発症させている。

今回の実験系では、Toxiocaniasisの肺組織傷害とその修復機転におけるソフィβ-グルカンの効用について確認することができた。今後は、サイトカインの発現やリンパ球の種類の間定および肺以外の組織障害と修復機転について検討する。

まとめ

*T.canis*感染2系統マウスの肺組織に共通して認められた病変は、肺胞内および気管支内への顕著な出血である。水のみ摂取させたコントロールマウスでは、組織傷害が強く10日経過しても修復されず肺水腫に陥っている個体もあった。ソフィβ-グルカン摂取マウスはコントロール群に比べ、気管支内出血はほとんどなくまた肺胞内出血も少なく、傷害を受けない正常肺胞が残存していた。感染後の変化として、コントロール群は血管周囲の浮腫が顕著で、これは血管からの血漿成分の滲出の結果と思われる。しかし、ソフィβ-グルカン摂取マウスは2系統とも血管浮腫はなく、早期から炎症細胞の滲出現象が認められた。コントロール群も血漿成分に混在し炎症細胞の滲出が見られるが、ソフィβ-グルカン摂取マウス2系統に比べ細胞数は少ない。炎症細胞は、初期にはまず好中球、好酸球が滲出し、時間経過に伴いリンパ球、マクロファージと変わっていく。この経過はソフィβ-グルカン摂取マウス2系統ともコントロール群より時期が早い。また、炎症巣の形成も早く、組織傷害修復がより早期に行われている。マクロファージについても、明確な違いが認められた。すなわち、ソフィβ-グルカン摂取マウス2系統ともコントロール群よりマクロファージが活性化され、数が増加するとともに、大型化多核化したラングハンス型巨細胞が出現し始める時期が早い。細胞質内にバルリン青染色陽性のヘモジデリンを有しているマクロファージ、多核巨細胞の集簇巣があり、活発に出血巣の赤血球を貪食し出血巣と組織の修復を行っている。また、BALB/cでは、リンパ球の出現が顕著で、さらに7日、10日経過すると気管支粘膜下あるいは、胸膜下に多数の形質細胞の集団が認められ、細胞性免疫と液性免疫機構の働きも活性化するものと考えられた。この形質細胞の集簇をなすほどの出現は、コントロール群のみならず、ソフィβ-グルカン摂取C57BL/6系の肺組織でも認められなかった。

本実験により、ソフィβ-グルカン摂取マウスは、*T.canis*感染による組織傷害がコントロール群より少なく、さらに炎症細胞や免疫細胞が活性化され、より早く傷害の修復がなされることが明らかになった。

引用文献

- 1) 山口富雄：犬蛔虫幼虫、臨床寄生虫学、300-303、1994、南江堂、東京。
- 2) 石崎 連：線虫類、新医寄生虫学、174-176、1994 第一出版、東京。
- 3) Kerr-Muir MG: *Toxocara canis* and human health. Br Med J, 309, 5-8, 1994.

- 4) C. Agudelo, E. Villareal et. al.: Human and dog *Toxocara canis* infection in a poor neighborhood in Bogota. Mem Inst Oswaldo Cruz., 85 (1) 75-78. 1990.
- 5) D. Despommier : Toxocaniasis : Clinical aspects epidemiology medical ecology, and molecular aspects. Clin Microb Reviews, 16, (2), 265-272, 2003.
- 6) Benacerraf. B. and M. M. Sebestyen : Effect of bacterial endotoxins on the reticuloendothelial system. Fed Proc 16 : 860-867, 1957.
- 7) J. Soltys, M. Benkova, Z. Boroskova : Immunorestorative effect of glucan immunomodulator on guinea pigs with experimental ascariasis. Veterinary Immunology and Immunopathology 42, 379-388, 1994.
- 8) J. Soltys, Z. Boroskova, P. Dubinsky, O. Tomasovicova, H. Auerand, H. Aspöck : Effect of glucan immunomodulator on the immune response and Laval burdens in mice with experimental toxocarosis. Appl. Parasitol, 37, 161-167, 1996.
- 9) Z. Boroskova, K. Reiterova, P. Dubinsky, O. Tomasovicova and B. Machnicka : Inhibition of lymphoproliferative response and its restoration with experimental larval Toxocarosis. Folia Microbiol 43, 475-476, 1998.
- 10) G. D. Brown, P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. C. Wong and S. Gordon : Dectin 1 is a major β -glucan receptor on macrophages. JEXP Med 196, 407-412, 2002.
- 11) G. D. Brown, J. Herre, D. L. Williams, J. A. willment, A. S. J. Marshall and S. Gordon : Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. J. Exp. Med, 197, 1119-1124, 2003.
- 12) P. R. Taylor, G. D. Brown, D.M.Reid, J. A. willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Gordon and S. Y. C. Wong : The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. J. Immunology, 169 : 3876-3882. 2002.
- 13) B. N. Gantner, R. M. Simmons, S. J. Ganavera, S. Akira and D. M. Underhill : Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. Exp Med 197, 1107-1117, 2003.
- 14) Y. Adachi, T. Ishii, Y. Ikeda, A. Hoshino, H. Tam, S. Tanaka, and N. Ohno : Characterization of β -glucan recognition site on C-type lectin, dectin. Infect Immun 72, 4159-4171, 2004.
- 15) P. R. Taylor, G. D. Brown J. Herre, D. L. Williams, J. A. willment, and S. Gordon : The role of SIGNRI and β -glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. J Immun 172, 1157-1162, 2004.
- 16) 藤井 昇、池脇信直 : 黒酵母培養液、ソフィβグルカンのカー生理活性・免疫機能・食効を高める多糖類、1-93, 2005、微生物βグルカン研究会、宮崎。
- 17) 吾妻美子、熊澤綾乃、吉良佳那、R. P. V. J. Rajapakse, S. Wickramasinghe、渡部嘉哉、吾妻 健 : イヌ回虫の経口感染によりモデルマウス肺に発生したイヌ回虫症の病理組織学的研究、高知学園短期大学紀要、36、75-85, 2005.
- 18) 長嶋健二、服巻ゆかり : 免疫組織化学検査におけるヒト組織と動物組織の反応性、Med Tech 33, 758-764, 2005.
- 19) M. Yoshida, Y. Shirao, H. Asai, H. Nagase, H. Nakamura, T. Okazawa, K. Kondo,

- T.H. Takayanagi, K. Fujita and N. Akao: A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan: correlation with antibody prevalence and ophthalmological findings of patients with weitis. *J Helminthology* 73, 357-361, 1999.
- 20) M. Marmor, L. Glickman, F. Shofer, LA Faich, C. Rosenberg, B. Cornblatt and S. Friedman: *Toxocara canis* infection of children: epidemiologic and neuropsychologic findings. *Am. J. Pub Health association*, vol 77, 554-559, 1987
- 21) S. Yoshikawa, G. S. Kayes and J. C. Parker: Eosinophils increase lung microvascular permeability via the peroxidase-hydrogen peroxidase-halide system. *Am Rev Respir Dis* 147: 914-920, 1993.
- 22) S. Yoshikawa, S. G. Kayes, S. L. Martin and J. C. Parker: Eosinophilia-induced and airway remodeling and hyperresponsiveness in rat lungs. *J Appl Physiol* 81:1279-1287, 1996.
- 23) M. Takamoto, K. S. Ovington, C. A. Behm, K. Sugane, I. G. Young, and K. I. Matth: Eosinophilis, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57BL/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology* 90, 511-517, 1997.
- 24) S. Motojima, E. Frigas, DA Loegering, and GJ Gleych: Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis*, 139: 801-805, 1989.
- 25) J. E. Badley, R. B. Grieve. J. H. Rockey, and L. T. Glickman: Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of excretory secretory antigens. *Parasite Immunol*, 9: 133-143, 1987.
- 26) D. I. Fattah, R. M. Maizels, P. Venge and Z. A. Cohn: *Toxocara canis*: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Exp Parasitology* 61, 421-431, 1986.
- 27) J. D. Young, C. G. B. Peterson, P. Venge and Z.A. Cohn: Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321: 613-616, 1986.
- 28) A. A. Rayes and J. R. Lambertucci: Human toxocariasis as a possible cause of eosinophilie arthritis. *Rheumatology*, 40: 109-110, 2001.
- 29) 小橋陽一郎: 間質病変の見方および診断の進め方 *病理と臨床* 24、801-808、2006
- 30) AJ Coyle, K Wanger, C. Bertrand, S. Tsuyuki, J. Bews and C. Heusser: Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration: inhibition by a nonanaphylactogenic anti-IgE antibody. *J Exp Med* 183, 1303-1310, 1996.
- 31) A. Obwaller, E. J. Jarolim, A. Huber, D. Kraft, and H. Aspöck: *Toxocara infestations* in humans: symptomatic course of toxocarosis correlates significantly with levels of IgE/anti-IgE immune complexes site. *Immun*, 20, 311-317, 1998.
- 32) T. Takayanagi, N. Akao, R. Suzuki, M. Tomoda, S. Tsukidate, and K. Fujita: New animal model for human ocular toxocariasis: ophthal mascope observation. *Br. J. Ophthalmol.* 83; 967-972, 1999.
- 33) N. Akao, T. Takayanagi, R. Suzuki, S. Tsukidate, and K. Fujita: Ocular larva migrans caused by *Toxocara cati* in mongolian gerbils and a comparison of ophthalmologic findins with those produced by *T. canis*. *J. Parasitol* 86, 1133-1135, 2000.

(2006年9月28日受付; 2006年11月27日受理)