

## 各期虫体の凍結切片を抗原としたコトンラット 糸状虫症の間接螢光抗体法について

石井 明 松田 肇  
神谷 正男 小林 準三

東京大学医科学研究所寄生虫研究部(主任 佐々 学教授)

(1968年11月2日 受領)

### はじめに

フィラリア感染における宿主の反応としての免疫現象について、1910年代から数多くの研究がなされている。それらについては Kagan (1963) の広汎な綜説があるが、その内の大多数は動物フィラリアを抗原として用いて交叉反応を利用し人のフィラリア症を診断しようとした報告である。しかし宿主-寄生虫の関係を解明するためには、先ず基礎的に固有の宿主-寄生虫関係から始める必要がある。コトンラットフィラリアに関しては、Scott (1958) が主にフィラリア成虫の成長抑制の面からみた宿主の免疫現象を研究した一連の報告がある。我々の研究部では、コトンラットを多数飼育繁殖せしめて、他の寄生虫感染がない状態に管理している。コトンラットフィラリアは実験フィラリアとして用いるに決して容易ではないが、成虫がほとんど胸腔内に寄生して回収し易いこと、コトンラットが多数飼育維持できることなど、いくつかの利点を有している。石井ら (1968) はさきの間接螢光抗体法と間接赤血球凝集反応を用いてコトンラットフィラリア感染の研究を行つたが、今回はフィラリアの各成長段階の虫体に対して宿主血清がどの様に反応するかについて、間接螢光抗体染色法を用いて追跡した成績について報告する。フィラリアの様に各時期の抗原を多量に集めることが困難である場合には、螢光抗体法はその免疫学的研究には有利な方法であると考えられる。

### 材料と方法

コトンラット *Sigmodon hispidus* に中間宿主イエダニ *Ornithonyssus bacoti* を用いてコトンラットフィラリア *Litomosoides carinii* を実験感染させた。感染11週間後に股動脈から全採血し、血清を分離し56°C 30分間

熱処理を行い、アンプルに封入して-20°C で凍結保存した。同時に胸腔からフィラリア成虫をとり出し生理的食塩水(以下生食水と略す)で洗い、抗原に用いた。新鮮な卵白1個分にアラビアゴム粉末約1gを加え、マグネチックスタラーで充分攪拌したのち3,000rpm 約10分間遠心分離した上清液に成虫を包埋し、アルミカップに入れドライアイスとアセトンによる-70°C 下で急速凍結して-20°C に保存した。又成虫の一部は、馬血清を加えた Simm 氏液に入れ、37°C 2日間飼育し、その液にマイクロフィラリア(以下 Mf と略す)を産出させ、遠心分離して沈渣に Mf を集めて、上記の液に包埋・凍結した。この凍結ブロックをクリオスタットを用いて-20°C 下で約5 $\mu$ 厚の切片とし、カバーグラスにとり、95%エタノールで8分間の前処理をして脂質などの反応阻止要因を除き、抗原に用いた。また、感染幼虫の材料は感染イエダニを実体顕微鏡下で解剖してとり出し、前記卵白アラビアゴム液を薄く塗つたカバーグラスにはりつけて用いるか、そのまま試験管内で用いた。

螢光抗体の調製は川村(1966)の方法に拠つた。まず正常コトンラット37匹分の血清をプールし、リン酸緩衝食水(pH 7.4, 以下 PBS と略す)で2倍に薄め、飽和硫酸アンモニウム塩析法を用い、1/2 飽和を3回、1/3 飽和を2回行い、粗 $\gamma$ -グロブリンとした。蒸留水に十分透析したのち、再び PBS に溶解して、屈折計で0.6mg/dl のタンパク液となつた。これをフロイント完全アジュバントを用いて兎に免疫した。足裏、背筋に2回注射し、最後に静脈内注射1回の免疫で、毛細ガラス管沈降反応32倍陽性の免疫血清を得た。この兎の全血清より前記と同様の飽和硫酸塩析法でグロブリンを分画した。このグロブリンに螢光色素 FITC (fluorescein isothiocyanate) を4°C で4時間反応させて標識した。Sephadex G-25 を用いて未結合の色素を除いたのち、DEAE-cellulose

を通して精製し、最初の流出部分を取り、1 ml ずつ分注し4°Cに保存した。この蛍光抗体の染色価を決めるために、コトナラットグロブリンを0.5ml マウスの尾静脈に注射し、3時間後に肝臓を取り、-70°Cのn-ヘキサン中で急速凍結し、クリオスタットで5 $\mu$ 厚の切片をつくり、95%エタノールで10分間前処理をしたのち、調製した蛍光抗体を希釈して反応させた処、8倍希釈迄反応を認めた。

蛍光抗体染色の手技は、抗原切片を95%エタノールで前処理したのち、検査血清を生食水で系列希釈してこれにかぶせ、湿潤箱に入れて蒸発を防ぎつつ、37°C 40~60分間反応させる。この1次反応終了後PBSで5分間ずつ3回、時折振動させて洗い、反応物以外を流し、乾燥させる。次に蛍光抗体を2~4倍希釈してかぶせて同様に37°C 40~60分間又は4°C 1晩反応させる。2次反応後PBSで同様に洗い、緩衝グリセリン液に包埋し、薄手無蛍光のスライドグラス(松浪製)にのせ、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光顕微鏡は千代田社 FM-200A型を使用し、結果の判定は0~3の4段階で行い、2を終点とした。1次血清をPBSにおきかえたもの、又2次血清をPBSにおきかえた対照を用いて、非特異反応の有無を検査した。写真撮影はアンスコスーパフィルム(ASA 200)のものをを用い、露光時間を20秒、40秒の2段階で行つ

た。

## 成 績

コトナラットフィラリア成虫の切片抗原に対して、固有宿主である感染コトナラット血清は最高3,125倍希釈迄反応し、非感染コトナラットは最高625倍希釈迄反応した。これらについての詳しい成績は別に報告した(石井ら, 1968年)。Mfの切片抗原に対して上記感染コトナラット血清は最高64倍希釈迄反応を呈したが、いずれの場合にも成虫に対するより反応価は低かつた。非感染コトナラットでも反応がみられたが、すべて16倍以下であつた。感染幼虫に対しては、いずれも5倍希釈で反応を認めなかつた。以上の成績をまとめてTable 1に示した。コトナラットフィラリア感染11週間後すなわち感染が確立しMfを産出し始めて少したつた時期では、成虫が抗原として一番有効である事が判明した。

フィラリア成虫の切片を抗原に用いた場合に、クチクラ下の筋肉層、それも内皮に特に強い特異蛍光が観察された。次いで側腺が光り、時に消化管内腔に特異蛍光を認めた。食道部の筋肉層にも特異蛍光を認めた。卵巣は特異蛍光を呈さず、クチクラは青白い非特異蛍光を呈し、側腺部の外周に細い特異蛍光をみる場合があつたが、全体が特異蛍光を結合した事はなかつた。グロブリ

Table 1 Indirect fluorescent antibody staining test in cotton rat filaria infections

Cotton rat number	Number of adult worms recovered	Number of microfilariae in 2.5mm <sup>3</sup> of blood	Antigen		
			Adult worm	Microfilaria	Infective larva
208	45	625	625*	5*	<5*
183	57	418	125	< 1	<5
151	24	224	625	64	—
175	56	641	3,125	64	<5
177	46	941	625	16	<5
185	18	295	625	< 1	<5
213	16	327	50	1	—
246	47	361	1,024	1	—
327	3	89	—	5	—
152	0	0	—	1	—
231	0	0	125	5	—
232	0	0	32	16	—
233	0	0	25	< 1	—
226	0	0	25	5	<5

\* x-fold serum dilution.

ン分画に抗体があるとして、成虫に対する抗体結合部位としては、筋成分が最も強い部位であった。以上の結果を写真撮影したものの一部を示す。

コトナットフィラリア成虫に対して人血清が間接蛍光抗体法と間接赤血球凝集反応において交叉反応し、犬フィラリア *Dirofilaria immitis* 成虫に対して人血清およびコトナット血清が同様に交叉反応した事を既に報告したが(石井ら, 1968年), これらの場合でも, ほぼ同様の結果が観察された。

コトナットフィラリア感染に対する宿主の免疫反応は, 感染が確立した時期で, 体性抗原 somatic antigen としては, 成虫に対する反応が最も強く, その組織では筋肉成分に最も強く抗体グロブリンが結合することが知られた。

### 考 察

寄生虫に対して蛍光抗体染色法を用いた研究は, Jackson (1959, 1960)が *Trichinella spiralis* と *Nippostrongylus muris* に用いて以来, いくつかの報告がでている。我々の研究においてコトナットフィラリア感染11週前後即ち成虫感染確立期では, 成虫が最も有力な抗原であることが判つたが, Coudert *et al.* (1967)は *Schistosoma mansoni* の成虫の凍結切片を用いて間接蛍光抗体法を行い, 特異性が良く, 抗原と血清が少量で足り診断上有用であることを報告している。フィラリア症については Lucasse (1962) がオンコセルカ症について報告を出し, Mf を抗原として種々の処理法を試みて10%ホルマリン固定がよく, 患者血清1:4で強陽性, 1:100で弱陽性の結果を得たが, 象皮腫患者では微弱な反応しか得られなかつた事を報告している。山本・林 (1964)は *Litomosoides carinii* の Mf を用いて, Mf 血中出現時期に対応した抗体を追跡した。Chowdhury & Schiller (1962)は *Wuchereria bancrofti* の Mf と感染幼虫を抗原に用いた蛍光抗体法で, 弱い反応を得たが, 幼虫の破れ口は蛍光をとるも, 無きずの Mf には反応がなかつたとしている。我々の成績では, Mf は切片で反応を呈したが, 反応価は低く, 感染幼虫は丸のままでは反応がなく, この感染時期では成虫に抗原性が一番高いことが判つた。

フィラリア成虫について, その抗体結合部位を追跡して, 我々は筋肉層に最も強い反応性を認め, クチクラには, さしたる反応を認めなかつた。Oliver-Gonzalez (1943)は *Ascaris lumbricoides* の組織を分けて, その

抗原性を沈降反応で調べて, クチクラと卵に対して反応価が高かつたとしている。Crandall *et al.* (1963)は同じく *Ascaris* に蛍光抗体法を応用して, 幼虫ではクチクラが染まるが, 成虫では切片でもクチクラは染まらず, 筋肉組織の周辺が染まつたと報告している。*Ascaris* の幼虫については, Taffs & Voller (1963) も口, 肛門などの沈着物が染まり, クチクラも染まつたが消化管は光らなかつたとしている。さきの Jackson (1959, 1960)は成虫の切片でクチクラは光らず消化管, 生殖器が染まつたと述べている。一方 Soulsby (1962)は免疫附着反応を用いて, *Ascaris* と *Nippostrongylus* のクチクラが抗原性を持つとし, Coombs *et al.* (1965)も *Turbatrix aceti* を用いグロブリンがクチクラにつくと報告している。これらの報告は虫体そのままを観察したものであるが, 切片でみた場合に我々はクチクラに比べて, はるかに大きい抗体結合性を筋肉層に認めたわけである。

寄生虫々体を磨砕し, あるいはその抽出物より蛋白質化学の手法を用いて抗原物質を精製することが多く行われているが, これらの抗原性を有する分画が, どの組織に由来するかについて, 直接証明するには組織を分離する必要があるが, 微細な点で困難がある。蛍光抗体法は組織化学上間接的にも裏づける手段として有用である。又いわゆる stage specific 抗原の問題について, 我々はコトナットフィラリア感染で成虫感染が確立し Mf を産出し始めた時期では, 成虫の抗原性が最も強いことを知つたが, 抗原を多量に集めることが困難な幼虫などに対して蛍光抗体法は少量の抗原で追跡できる点が有用であつた。

### 総 括

コトナットフィラリア *Litomosoides carinii* をイエダニを中間宿主に用いてコトナットに実験感染させた。感染11週前後の成虫寄生確立期で血清をとり, 抗コトナットグロブリン蛍光抗体を用いて間接蛍光抗体染色法を行つた。この時期では, フィラリア成虫切片を抗原に用いた場合に最も反応価が高く, ミクロフィラリア切片に対しては反応はしたが, 反応価は低く, 感染幼虫に対しては反応を認めなかつた。フィラリア成虫切片では, クチクラ下の筋肉層特に内皮に最も強く抗体(グロブリン)結合を検出し, 側腺, 消化管内腔などがこれに次ぎ, 卵巣, クチクラには特異蛍光を認めなかつた。

この研究を指導された寄生虫研究部長佐々学教授, 田中寛助教授, 御協力下さつた寄生虫研究部諸氏, 蛍光抗

体法実施に指導と便宜を与えられた医科研免疫学研究部, 病理学研究部, 加藤幸一氏に感謝する。

#### 引用文献

1. Chowdhury, A. B. and Schiller, E. L. (1962) : Preliminary observations on the application of the fluorescent antibody technique in the laboratory diagnosis of filariasis. Bull. Calcutta School Trop. Med., 10(3), 97-99.
2. Coombs, R. R. A., Pout, D. D. and Soulsby, E. J. L. (1965) : Globulin, possibly of antibody nature, combining with the cuticle of live *Turbatrix aceti*. Exptl. Parasitol., 16, 311.
3. Coudert, J., Garin, J. P., Ambroise-Thomas, P. and Pothier, M. A. (1967) : Premier résultats à propos du diagnostic sérologique de la bilharziose par immuno-fluorescence sur corps à la congélation de *Schistosoma mansoni*. Ann. Parasit. Hum. Comp., 42, 483-492.
4. Crandall, C. A., Echevarria, R. and Arean, V. M. (1963) : Localization of antibody binding sites in the larvae of *Ascaris lumbricoides* var. *suum* by means of fluorescent technics. Exptl. Parasitol., 14, 296-303.
5. 石井明・田中寛(1968) : コンラット糸状虫などにおける間接蛍光抗体染色法と間接赤血球凝集反応の研究. 寄生虫誌, 16, 509-515.
6. Jackson, G. J. (1959) : Fluorescent antibody studies of *Trichinella spiralis* infections. J. Inf. Dis., 105, 97-117.
7. Jackson, G. J. (1960) : Fluorescent antibody studies of *Nippostrongylus muris* infections. J. Inf. Dis., 106, 20-36.
8. Kagan, I. G. (1963) : A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. J. Parasit., 49, 773-798.
9. 川村明義(1966) : 微生物検査必携, 蛍光抗体法. 日本公衆衛生協会, 695-771.
10. Lucasse, C. (1963) : Fluorescent antibody test for onchocerciasis. Ztschr. Tropenmed. u. Parasit., 13, 404-408.
11. Oliver-Gonzalez, J. (1943) : Antigenic analysis of the isolated tissues and body fluids of the roundworm, *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. J. Inf. Dis., 72, 202-212.
12. Scott, J. A. (1958) : The early induction in cotton rats of immunity to their filarial worms. J. Parasit., 44, 507-511.
13. Soulsby, E. J. L. (1962) : The antigenicity of the nematode cuticle. Parasitol., 52, Proc. 5.
14. Taffs L. F. and Voller, A. (1963) : In vitro fluorescent antibody studies on *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 57, 353-358.
15. 山本久・林滋生(1964) : フィラリア症における免疫学的研究, 蛍光抗体法の応用について. 寄生虫誌, 13, 334-335.

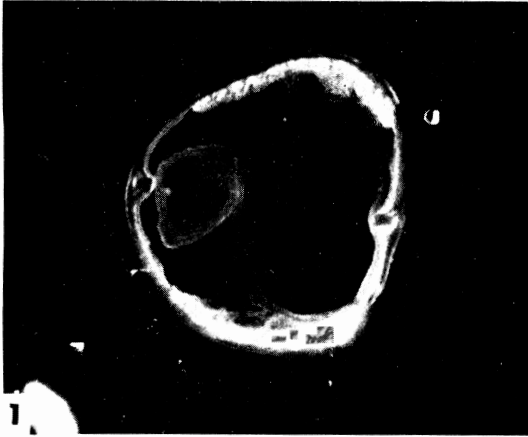


Photo 1 and 2. Adult worm of *Litomosoides carinii* reacted with 5-fold dilution of infected cotton rat serum (no. 151).  
200 $\times$ , 15 seconds exposure.

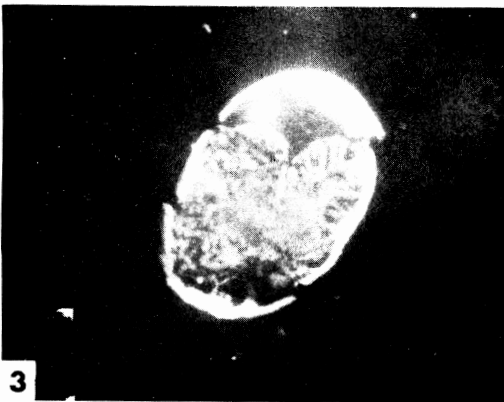
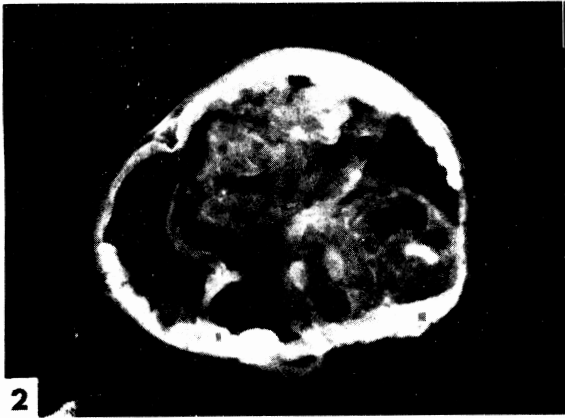


Photo 3 : Adult worm of *Litomosoides carinii* reacted with 256-fold dilution of infected cotton rat serum (no. 246).  
100 $\times$ , 15 seconds exposure.



Photo 4 : Adult worm of *Litomosoides carinii* reacted with 625-fold dilution of infected cotton rat serum (no. 207). 200 $\times$ , 40 seconds exposure.



Photo 5 : Adult worm of *Litomosoides carinii* reacted with 256-fold dilution of infected cotton rat serum (no. 246). 200 $\times$ , 15 seconds exposure.

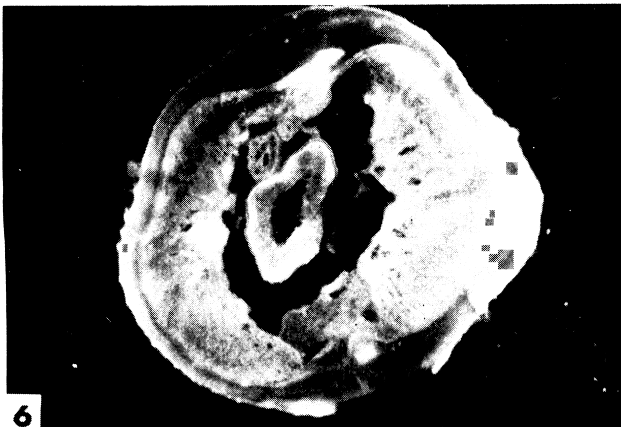


Photo 6 : Adult worm of *Dirofilaria immitis* reacted with human serum collected from a case who spent several years in a filariasis endemic area, and also had a history of infection for strongyloidiasis. 100 $\times$ , 15 seconds exposure.