

Rhabditis elongata の研究 (1) 抗原性

篠 田 寛

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1968年12月14日 受領)

すでに各種線虫の抗原性について多くの報告がみられ森下 (1961) はニワトリ, イヌ, ブタ回虫間に共通抗原性の存在することを指摘している. 又谷口 (1966) はアニサキス幼虫とイヌ及びブタ回虫間に共通抗原の存在することを報告している. 著者はラブジチス (*Rhabditis elongata* (南株) で免疫したウサギ血清に対して, アニサキス I 型幼虫, イヌ回虫 (*Toxocara canis*), ドロレス顎口虫 (*Gnathostoma doloresi*), ネズミ蟯虫 (*Syphacia obvelata*), イヌ鉤虫 (*Ancylostoma caninum*), イヌ糸状虫 (*Diriofilaria immitis*), ブタ回虫 (*Ascaris suum*) 条虫幼虫 (*Cysticercus fasciolaris*), 肝蛭 (*Fasciola hepatica*) の各抗原について, 沈降反応を行なった. そして定量沈降反応, 免疫電気泳動法などによって, その性質をしらべた. ラブジチス抗血清との間に各種線虫類はある程度共通抗原がみとめられ, 吸虫類, 条虫類には存在しないことがわかった. 又各種線虫によるサーレス現象について多くの報告があり, 古山 (1956) は鉤虫について報告している. 著者はラブジチス免疫血清中での, ラブジチス虫体のサーレス現象の存在も証明出来たので併せてここに報告する.

材料及び方法

ラブジチス抗原の作り方はつぎのようである. K20培地 (桑葉 20g, 寒天 2g, 水150ml) で培養したラブジチスの培養7日目の虫体を集め, 虫体 1g 当り 1ml の生理食塩水を加えて, テフロンホモゲナイザーで磨砕したのち, 真空凍結乾燥した. このようにしてえた試料を pH 7.2 の生理食塩水 100 倍量で抽出し, 11,000rpm 20分遠心した上清を抗原とした. アニサキス I 型幼虫, ドロレス顎口虫, イヌ回虫も前記と同様の方法で抗原を作製した. ブタ回虫抗原は岐阜市屠場で採取した. 新鮮な回虫を用い, 虫体 1g 当り pH 7.2 の生理食塩水 3ml を加え, テフロンホモゲナイザーで磨砕したのち 11,000rpm 20分間遠心し (冷凍遠心機で), その上清を抗原液とした. ネズミ蟯虫, イヌ鉤虫, 条虫幼虫からの抗原の

作製も前記と同様である. イヌ糸状虫は野犬から, 肝蛭は屠場でウシから採取したものを用い, ブタ回虫抗原液作製の方法に準じて各々の抗原液を作製した.

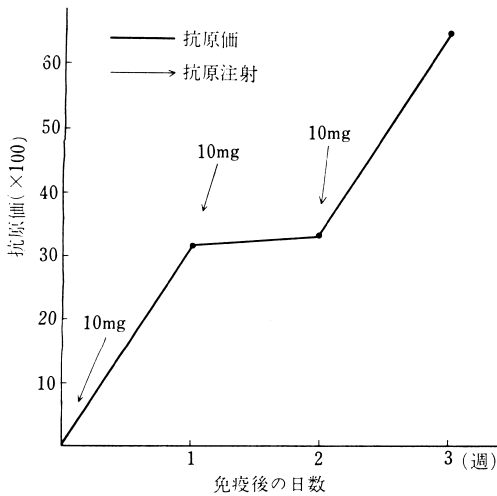
免疫方法はつぎのようである. ラブジチスの真空凍結乾燥末 10mg を 2ml の蒸留水に懸濁し, これを complete adjuvant (Freund) 2ml とよく混和し, 週 1 回の割合に 3 回ウサギの腿部に注射した.

採血は各注射前に行ない 3ml とした. 各々の沈降反応を重層法によって行なった. 抗血清の稀釈には 1.5% アラビアゴム生理食塩水を用い, 抗原の稀釈は生理食塩水を用いた.

抗原, 抗体の定量法はつぎのようである.

抗原は 3 倍稀釈し, 抗血清は 4 倍稀釈したのものを用いた. 各抗原 0.5ml に抗血清 0.5ml を加え, 氷室中に 48 時間放置し反応させたのち遠心し (2,000rpm 20分), 生理食塩水で 2 回洗浄し, 沈降物に 12.5% の無水炭酸ソーダ溶液 3ml を加え, よく沈降物を溶解したのち 0.1% 硫酸銅 0.5ml を加え, 室温で 1 時放置した. これに 3 倍稀釈した Folin 試薬 0.5ml を加え, 30分放置したのち波長 650m μ で比色測定し, 全沈降物の N 量を求めた. 抗原 N 量は, Folin 法及びミクロキエルダール法により求めた. すなわち全沈降物 N 量および抗原 N 量をもとめ, その差から抗体 N 量を求めた.

免疫電気泳動法はつぎの術式によつた. 抗原及び抗血清は前述のものを用いた. 支持体はセルローズアセテート膜 (セパラックス) を用い, 幅 6cm とし, これをペロナール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 $\mu=0.05$) にひたした後, 陽極側から 1.8cm の位置に, 陰極に向つて右側にラブジチス抗原, 左側に各種抗原を塗付し (この間隔は 1.2cm) 0.8mA/cm 100V で 60分通電し, 終了後, 幅 2mm, 長さ 5cm の濾紙に抗血清をしませ, 試料の展開と平行に中央部分にはりつけ, 膜を静かに流動パラフィンの入った反応箱に入れ, 室温で 24 時間反応させた. その後流動パラフィンから取出し, 水道水で附着した流動パラフィンを充分洗い流し, 流水中に 20分つけ,



第1図 ラブジチス免疫における抗原価の変動
 * 週1回の割でラブジチス抗原 10mg を3回注射し、3週間後抗原価 6,400 倍の抗血清を得た

第1表 沈降反応によるラブジチス抗原に対するラブジチス抗血清反応の場

抗血清 稀 釈	抗原 稀 釈 (× 100)									
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
1	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
4	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
8	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
16	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
32	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
64	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
128	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
256	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
512	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1024	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
2048	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

* 沈降反応による1時間値で抗血清は 1,024 倍、抗原は 6,400 倍まで陽性であった。

未反応の蛋白を除去し、濾紙で水分をとり、ニグロシン染色液 (ニグロシン10mg, 氷醋酸 2 ml, 蒸留水100ml) に1晩つけた。ついで脱色液 (2%醋酸溶液) を用いて4回とりかえながら洗い、沈降線をえた。

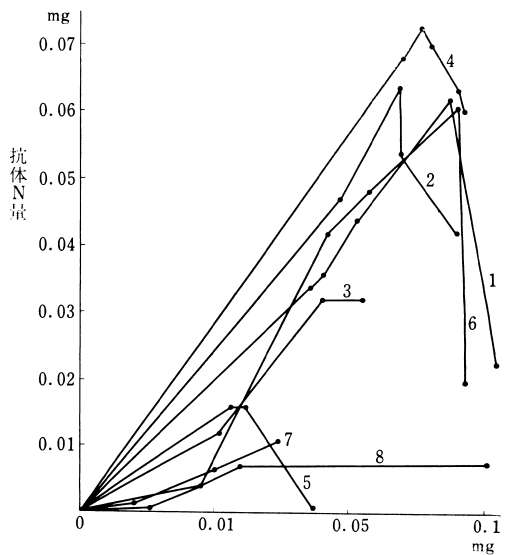
実験成績

1. ラブジチス抗原の抗体生産能及び各種抗原のラブジチス抗血清に対する反応
 Adjuvant 2 ml とラブジチスの真空凍結乾燥末10mg

を蒸留水 2 ml に懸濁したものをよく混和し、週1回の割に3回、ウザギの腿部に注射した。注射前に採血し、各々の沈降反応を重層法によつて行なつた。結果は第1図に示すようで、3週間後抗原価 6,400 倍の抗血清をえた。ラブジチス抗原に対するラブジチス抗血清の反応の場は第1表に示したが、これは1時間後の値である。抗原稀釈は6,400倍まで、抗血清稀釈は1,024倍まで陽性であつた。ラブジチス抗血清にに対する各種抗原の沈降反応による抗原価の1時間値は、ブタ回虫25,600、ドロレス顎口虫およびアニサキス1型幼虫、イヌ回虫は4,800、ネズミ蟯虫9,600、イヌ鉤虫8,000、イヌ糸状虫16,000倍まで陽性であつた。反応の強弱の差はあるが何れもラブジチス抗血清に対し Adjuvant を用いての抗血清では、共通抗原の存在することを認めた。条虫幼虫、肝蛭は反応陰性であり、共通抗原の存在しないことがみとめられた。

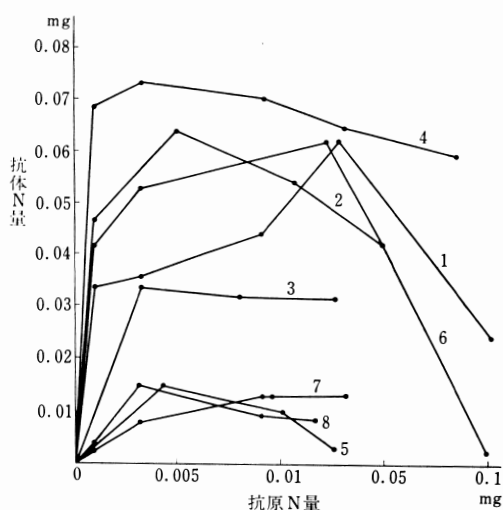
2. 定量沈降反応

第2図は前述の方法によつて求めた沈降体N量と、抗体N量の関係を示したもので、ラブジチス、ブタ回虫、アニサキスI型幼虫、ネズミ蟯虫のように抗体N量の多い時に沈降体全N重の高値を示すものと、ドロレス顎



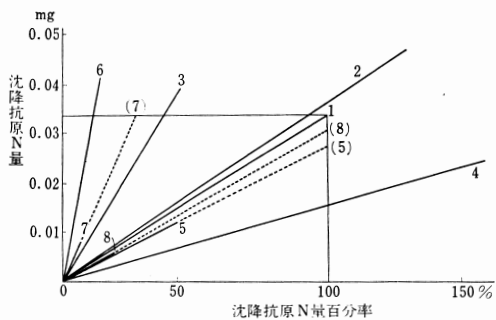
第2図 抗体N量と沈降体全N量の関係

* 反応する蛋白の組成の差により抗体N量の多い時沈降体全N量の高値を示すものと、抗体N量が少ない時その高値を示すものがある。
 1. ラブジチス 2. ブタ回虫 3. ドロレス顎口虫 4. アニサキスI型幼虫 5. イヌ回虫 6. ネズミ蟯虫 7. イヌ鉤虫 8. イヌ糸状虫



第3図 抗体N量と抗原N量の関係

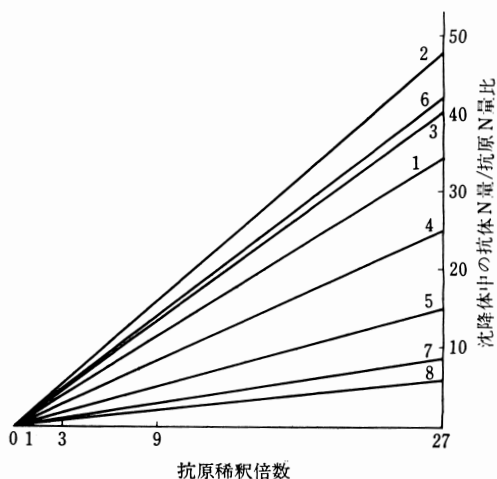
* 抗体N量の高値を得る為に添加すべき抗原N量が求められる。1. ラブジチス 2. プタ回虫 3. ドロレス顎口虫 4. アニサキスI型幼虫 5. イヌ回虫 6. ネズミ蟻虫 7. イヌ鉤虫 8. イヌ糸状虫



第5図 各種沈降抗原N量とラブジチスの沈降抗原N量に対する百分率

* ラブジチス抗原N量を100として各種抗原N量と比較したもの。……高濃度の抗原を添加した場合の予想値。1. ラブジチス 2. プタ回虫 3. ドロレス顎口虫 4. アニサキスI型幼虫 5. イヌ回虫 6. ネズミ蟻虫 7. イヌ鉤虫 8. イヌ糸状虫

口虫, イヌ回虫, イヌ鉤虫, イヌ糸状虫のように, 抗体N量が少なく, 沈降体全N量の高値を示すものがある。これは, 抗体, 抗原の沈降反応の反応する場での反応する蛋白の組成の差であると考えられる。第3図は抗体N量と抗原N量の関係を示し, その最適比を示すものである。プタ回虫, ネズミ蟻虫は抗原N量が多い時, 抗体N量のピークを示し, ラブジチス, ドロレス顎口虫, アニサキスI型幼虫, イヌ回虫, およびイヌ糸状虫は抗



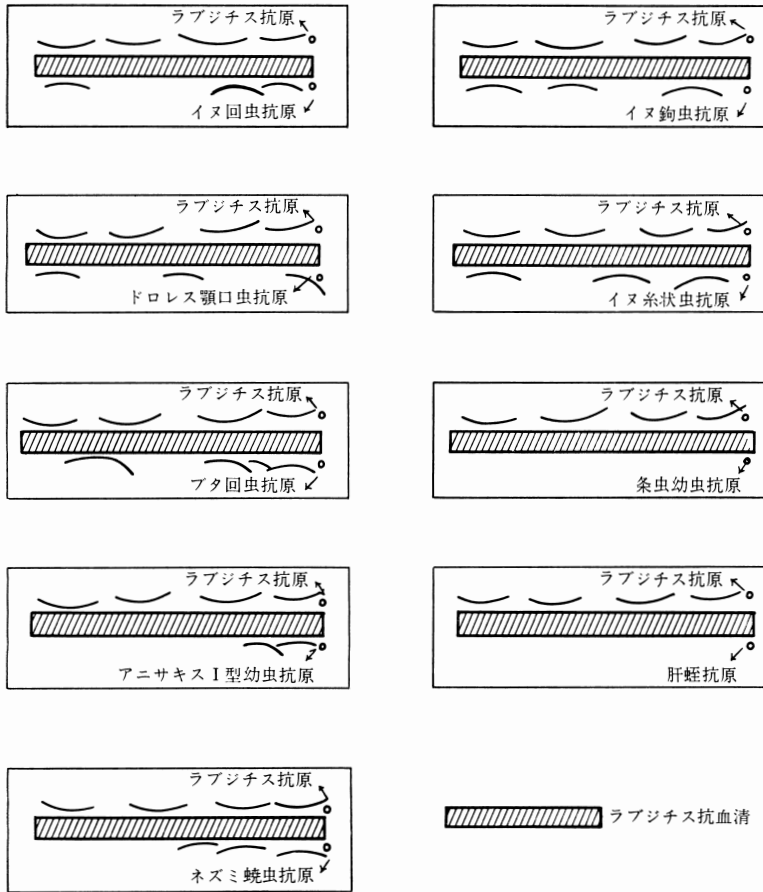
第4図 沈降体中の抗体抗原N量比

* 2倍稀釈の抗原を添加したときの沈降体中の抗体N量と抗原N量の割合で抗体N量を抗原N量で除したものである。1. ラブジチス 2. プタ回虫 3. ドロレス顎口虫 4. アニサキスI型幼虫 5. イヌ回虫 6. ネズミ蟻虫 7. イヌ鉤虫 8. イヌ糸状虫

原N量の少ない時抗体N量のピークを示している。これは前記第2図の沈降体全N量と抗体N量と同様の傾向を示し, やはり反応する蛋白の組成の差によるものと考えられる。第4図は沈降体中の抗体N量と抗原N量の比を示すもので, 抗原液27倍稀釈のとき, ラブジチス 1:34, プタ回虫 1:47, ドロレス顎口虫 1:40, アニサキスI型幼虫 1:24.3, イヌ回虫 1:15, ネズミ蟻虫 1:41, イヌ鉤虫 1:9, イヌ糸状虫 1:6である。第5図は前記第4図の抗体, 抗原N量比直線から求めた抗原N量である。ラブジチス抗原N量に対し, プタ回虫130%, アニサキスI型幼虫160%, ドロレス顎口虫35%, イヌ回虫44%, ネズミ蟻虫1.4%, イヌ鉤虫0.6%, イヌ糸状虫1.7%である。点線部分は高濃度の抗原を添加した場合の予想値である。

3. 免疫電気泳動法によるラブジチス抗血清と各種抗原の抗原性の比較

前述の方法により, 第6図および第2表に示すようにラブジチス抗血清に対する各種抗原の沈降線がえられ, これを比較検討した。条虫幼虫, 肝蛭を除き, 各種線虫抗原は2~4本の沈降線がえられた。ラブジチス抗原は4本えられ, これに比較して, イヌ回虫は同種(免疫抗原と免疫抗血清との間に出来た沈降線と同位置にあるもの)2本, 異種(前者と位置的に異なる所に出現した



第6図 ラブリチス抗血清に対する各種抗原の免疫電気泳動

第2表 ラブリチス抗血清に対する各種抗原の免疫電気泳動像の比較

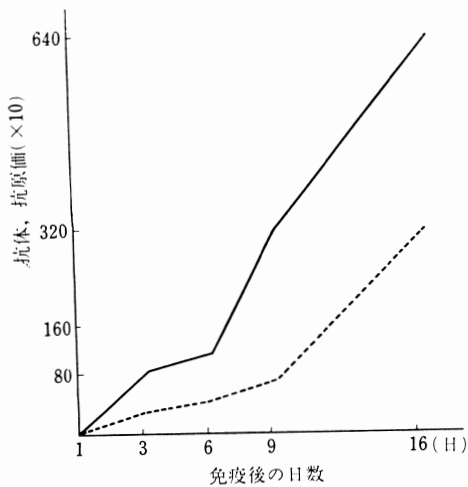
抗原	*同種沈降線	異種沈降線	計
イヌ回虫	2	1	3
ドロレス顎口虫	1	2	3
フタ回虫	2	2	4
アニサキス型幼虫	1	1	2
ネズミ蟻虫	1	2	3
イヌ鉤虫	2	1	3
イヌ糸状虫	1	2	3
糸虫幼虫	0	0	0
肝蛭	0	0	0
ラブリチス	4	/	4

* 同種沈降線とはラブリチス抗原とラブリチス抗血清との間に出来た沈降線と同位置にあるものをいい、異種沈降線とは前者と位置的に異なる所に出現した沈降線をいう。

もの) 1本, ドロレス顎口虫は同種1本, 異種2本, フタ回虫は同種2本, 異種2本, アニサキスI型幼虫は同種1本, 異種1本, ネズミ蟻虫は同種1本, 異種2本, イヌ鉤虫は同種2本, 異種1本, イヌ糸状虫は同種1本, 異種2本の沈降線がえられた。各々差はあるが, ラブリチス抗血清に対し共通抗原性のあることを認めた。

4. サール現象

前述のように K20培地で培養したラブリチスの虫体 1g 当り pH7.2 の生理食塩水 1ml を加え, テフロンホモゲナイザーで磨碎し, 11,000rpm 20分遠心し, 上清を生理食塩水で10倍に稀釈し, 0.2% にフェノールを加えてそのまま, ウサギの静脈に注射した。更に沈渣は原量の10倍の生理食塩水を加え, 0.2% の割にフェノールを加え同時に腹腔内に注入した。即ち免疫法は抗原の静脈注射と腹腔内注入を併用した。3日目毎に4回免疫後1週間おいて頸動脈から全採血し, 冷却後 3,000 rpr.



第7図 ラブジチス免疫に於ける抗体、抗原価の変動

* 3日目毎に4回免疫し1週間後抗原価6,400倍、抗体価3,200倍の抗血清を得た

第3表 ラブジチス抗血清中のサーレス現象

抗血清稀釈倍数	2	3	4	5	6	7 (日)
1	-	-	-	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-

* 抗血清原液に入れたもののみ5日目からサーレス現象がみられた。

第4表 ブタ回虫体腔液抗血清中のサーレス現象

ブタ回虫体腔液抗血清稀釈倍数	2	3	4	5	6	7 (日)
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-

* ブタ回虫体腔液抗血清に入れたものではサーレス現象がみられなかった。

10分間遠心して抗血清をえた。

第7図のように抗原価6,400倍、抗体価3,200倍の力価であった。この adjuvant を用いない抗血清を倍数稀釈して、ホールオブジェクトグラスに一滴づつ入れ、虫体約100隻を加え、カバーグラスをかけ周囲をワセリンで封じた。このオブジェクトグラスを十分に湿度の保てるようにした容器中で室温に放置し観察した。別にブタ回虫

体腔液で免疫した抗血清中にラブジチスを同様な方法においてサーレス現象を観察した。その結果は第3表および第4表のように虫体を血清に移してから4日目までは虫体が運動活発であり、サーレス現象の出現はみられなかった。5日目から虫体の周辺部に虫体の活動がにぶるにつれて血清原液に入れたものだけ、サーレス現象による沈降物が頭端にみられた。血清を稀釈した場合と、対照の回虫抗血清中ではこのような現象はみられなかった。

結 語

ラブジチスで免疫したウサギ血清を用い、各種抗原について、沈降反応、定量沈降反応、免疫電気泳動法によりその性質をしらべてつぎのような結果をえた。

1. ラブジチス抗血清に対し各種線虫を抗原として沈降反応による交叉免疫実験を行なったところ、反応の強さには差があつたが共通抗原の存在が認められた。吸虫類、条虫類との間には沈降反応を示さず、共通抗原は存在しないことを認めた。

2. 定量沈降反応によりN量を求め、抗体、抗原のN量、全沈降体N量の関係を検討したところ、抗体、抗原の蛋白の組成の差によつて重量的に沈降体N量の差がみられた。

3. ラブジチス抗血清に反応する各種抗原の蛋白量はラブジチスに比較して、ブタ回虫、アニサキスI型幼虫は多く、イヌ回虫、ネズミ蟯虫、イヌ糸状虫、イヌ鉤虫は少ないことがわかつた。

4. 免疫電気泳動法によると、ラブジチス抗血清とその抗原の間には沈降線が4本えられた。これを対照として他の抗原を比較すると、イヌ回虫は同種2本、異種1本、ドロレス顎口虫は同種1本、異種2本、ブタ回虫は同種2本、異種2本、アニサキスI型幼虫は同種1本、異種1本、ネズミ蟯虫は同種1本、異種2本、イヌ鉤虫は同種2本、異種1本、イヌ糸状虫は同種1本、異種2本の沈降線がえられ、共通抗原の存在することを認めた。条虫幼虫抗原及び肝蛭抗原は1本もえられず共通抗原の存在しないことを認めた。

5. ラブジチスのサーレス現象をしらべ抗血清原液に入れたラブジチス虫体の頭端に5日目から沈降物形成がみとめられた。

文 献

1. 古山幸男(1956)：鉤虫免疫の研究。岐阜医大紀要, 4, 51-74.
2. 森下哲夫(1961)：回虫の免疫。日本に於ける寄

生虫学の研究 I, 279-306, 目黒寄生虫館.

性. 寄生虫誌, 15, 502-506.

3. 谷口正明(1966): *Anisakis* の研究, (1) 抗原

Abstract

STUDY ON *RHABDITIS ELONGATA* (1) ANTIGENICITY

HIROSHI SHINODA

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

An immune serum to *Rhabditis elongata* produced by the adjuvant method, was proved to react against antigens from *Toxocara canis*, *Ascaris suum*, *Ancylostoma caninum*, *Gnathostoma doloresi*, *Dirofilaria immitis* and *Syphacia obvelata* by precipitation test, but not against antigens from *Fasciola hepatica* and *Gysticercus fasciolaris*.

According to the immuno-electrophoresis, 4 bands were observed between *Rhabditis* antigen and the antiserum to the same species. When used with antigens from different worm species the reaction appeared differently from the homologous antigen antibody system; *Toxocara canis* had 2 homogenous and 1 heterogeneous bands; *Gnathostoma doloresi* 1 homo. and 2 hetero.; *Ascaris suum* 2 homo. and 2 hetero.; *Anisakis* 1 homo. and 1 hetero.; *Syphacia obvelata* 1 homo. and 2 hetero.; *Ancylostoma caninum* 2 homo. and 1 hetero.; and *Dirofilaria immitis* 1 homo. and 2 hetero.

These results are suggestive of the existence of common antigens between *Rhabditis* and other nematode parasities just mentioned. In contrast, *Cysticercus fasciolaris* and *Fasciola hepatica* gave not even a single band, indicating the non-existence of common antigen.

An occurrence of precipitation (the Sarles' phenomenon) was observed around the head of *Rhabditis* after immersed in the non-diluted immune serum for more than 5 days.