

イヌ回虫の研究

1. 成虫 ES 抗原

細井 達夫

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (主任 森下哲夫教授)

(1968年12月23日 受領)

Beaver *et al.* (1952) は hepatomegaly をともなう著明な eosinophilia の患者 (1~5歳) をしらべ、これらがイヌ回虫 (*Toxocara canis*) の幼虫によつてひき起されたものであると発表した。Dent *et al.* (1956) は小児のイヌ回幼虫症につき報告し、つづいて Schacher (1957) はイヌ回虫仔虫卵の摂取により体内に迷入した幼虫が肝、腎、心臓および中枢神経系の諸組織に多く存在することを発表した。しかし、イヌ回幼虫症であるとの適確な診断は肝その他の biopsy により虫体を発見することが必要であるが、これは容易でないし、しばし危険をとまなう。Kagan (1957), Sadun *et al.* (1957) および Huntley & Moreland (1963) は補体結合反応、赤血球凝集反応、Ouchterlony 法などの免疫学的な方法で患者の血清を用いて診断することを試みた。Soulsby (1957) や Kagan (1957) は double diffusion 法でしらべ ethanol 処理したブタ回虫の polysaccharide antigen に 4~8種の抗原成分があるといつた。Kagan *et al.* (1959) はヒトおよびブタの回虫からの抗原が、イヌ回虫感染の子供に皮膚反応陽性であつたと報告した。Huntley *et al.* (1963) はイヌ回虫感染者が hypergammaglobulinemia を示すと述べている。Crandall & Crandall (1967) はブタ回虫体成分をエーテルで抽出し、Sephadex G-100 で分画した第1分画にこの hypergammaglobulinemia の血清に強い活性を示す macroglobulin が存在すると述べている。しかし、一般に感染に対する特異的免疫診断は感染により生ずる抗体のみに特異的な抗原が存在することが望ましいし、また本来これを前提としなければならない。

著者は感染により人体に迷入したイヌ回虫の排泄物および分泌物 (以下 ES 抗原と呼ぶ) の抗原性に着眼し、この ES 抗原の特性と、イヌ回虫の全虫体組織から抽出した物質 (以下 SOM 抗原と呼ぶ) との相関性を免疫学的に究明した。

実験材料と方法

1. 抗原の作製

a) 実験材料

生後1週間から1カ月の雑種犬の腸から採取したイヌ回虫の幼、成虫を用いた。

b) ES 抗原の作製法

虫体を数回水洗しさらに蒸留水で洗つたうえ、濾紙で水分を除去し 0.85% 生食水 (pH 7.2) にペニシリン 30 i.u./ml およびストレプトマイシン 300 γ /ml を加えた液に虫体 (約20虫体/100 ml) を入れて、温度は 27°C に一定して飼育し12時間毎に飼育液をかえ、3~4日間継続し全飼育液を東洋濾紙で濾過し、セロファンチューブに入れて 4°C の低温室で12時間透析しこれを減圧濃縮し、凍結乾燥して三角コルベンに入れて密封し -20°C に保存した。

c) SOM 抗原の作製法

前記のごとく虫体を水洗し、水分を除去し細かく切つて、10倍容の生食水を加え、ホモジナイザーにかけ、さらに24時間放置し、充分に抽出したものを 1,000 rpm、60分遠心し、上清をセロファンチューブに入れて 4°C、12時間透析し、凍結乾燥して三角コルベンに入れ密封して -20°C に保存し、用いの際のみ必要量だけ取り出して実験に供した。

2. 抗血清の作製法

a) 免疫動物

体重 2,000 g 前後のウサギ4羽 (ES, SOM 抗原各々2羽宛) を用いて、抗原を注射して抗血清を作製した。

b) 免疫方法

保存した凍結乾燥抗原 5~30 mg に 1 ml の生食水を加え Waring blender でよく混和し、これに等量の Freund の complete adjuvant (Freund *et al.*, 1948) を加えて potter-Elvehjem homogenizer でよく混和し、

2 ml 宛ウサギの腋窩、背部の皮下または筋肉内に注射した。注射免疫間隔は1週間毎に行ない、その都度抗体価を測定し、5週間経過後5回免疫し、最後の注射免疫後1週間目にさらに抗体価を測定し、上昇したことを確かめてから24時間絶食して、頸動脈から全血採取して血清を分離し、56°C、30分で、この血清を非動化してアンプルに1 ml ずつ分注し熔封し -20°C に保存し、免疫泳動法および Ouchterlony 法に使用した。

c) 抗体価の測定

1) 赤血球凝集反応

ヒツジの頸動脈から採血した赤血球を生食水で3回洗滌し、これを同量の Alsever 液(Bunkantz *et al.*, 1946) に入れ冷所に保存し、用に応じて必要量の血球を生食水で3回洗滌し、赤血球凝集反応に供した。赤血球凝集反応は Boyden(1951) 法を用い、洗滌したヒツジ血球を1:20,000タンニン酸生食水の50倍容で室温10分間放置し遠心洗滌して、2.5%の血球浮遊液にし、さらに1,200 rpm, 30秒間ミキサーで血球を遊離させ、これに同量の抗原(10mg/ml)を加え、室温で15分間感作させ、1,000 rpm, 10分間遠心分離洗滌し、さらに自家凝集を防ぐ目的で1:250の非動化した正常ウサギ血清(NRS)で2回洗滌し(西岡・岡田, 1966)、2.5%の感作血球浮遊液とし、0.2 ml 宛を抗体階段希釈液に加えて、1時間値、2時間値を判定し、抗体価を測定した。

2) 試験管内沈降反応

抗体希釈法および抗原、抗体希釈法により、室温で30分間値、1時間値をしらべ、抗体価の推移および最適比をみた。

3. 実験方法

a) 免疫泳動法(松橋, 1958) および Ouchterlony 法による抗原分析

免疫泳動法の実験条件は電源 100~200 volt (5~30 mA), 電極 白金線電極, 緩衝液 Veronal-Veronal Na. pH 8.9, 電流 0.6 mA/cm, 抗原量 0.05 mg~0.1 mg, 抗血清量 0.01 μ l, セルローズアセテート膜 (Millipore 製) とした。

前記の泳動条件で ES, SOM 抗原, SOM 抗原の分画したものと体腔液を60分間展開後、中央溝に抗血清0.01 μ l 注入し、室温に24時間静置して、ニグロシン酸液(ニグロシン 10 ml, サク酸 2 ml, 蒸留水 100 ml)で12時間染色して、沈降線を観察した。

Ouchterlony 法は Feinberg (1957) の方法を用い、Petri 皿, セルローズアセテート膜 Veronal 緩衝液を使

用して、抗原、抗体間隔は5~10 mm で適度の湿気のあるところに室温(26°~28°C)で4日間反応させ、ニグロシン酸液で12時間染色した。

b) 電気泳動分析

ES および SOM 抗原の pH 7.2 生食水可溶性物質およびイヌ回虫の体腔液について、acetate 膜をたん体とした電気泳動分析を Densitometer(OZUMOR 82)を用いて、電気泳動学会標準規約(佐瀬・島尾, 1967)に準じ施行した。

c) 総N量の測定

抗原の総N量の測定はマイクロキエルダール法(Kabat & Mayer, 1948)を用いて測定した。

d) 交叉吸収試験

抗 ES, SOM 血清中の ES, SOM 抗原と反応する共通抗体を除去するために、抗原および抗血清を階段希釈し、試験管内沈降反応で最適比を決定し、最適比より約20%多量の抗原を用いて、

10%抗 ES 血清 1 ml に SOM 抗原 7mg/ml を加えたもの (No. 1)

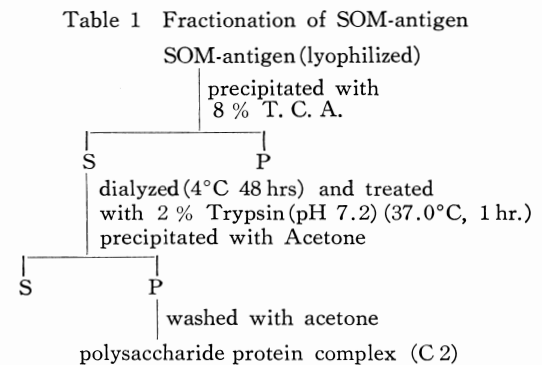
10%抗 ES 血清 1 ml に ES 抗原 5 mg/ml および SOM 抗原 7 mg/ml を加えたもの (No. 2)

10%抗 SOM 血清 1 ml に ES 抗原 5 mg/ml を加えたもの (No. 3)

10%抗 SOM 血清 1 ml に ES 抗原 5 mg/ml および SOM 抗原 7 mg/ml を加えたもの (No. 4) の各々を充分に混和し、37°C 2時間、4°C 12時間放置後、3,000 rpm, 15分間遠心し、4グループの上清を吸収抗血清 (No. 1, No. 2, No. 3, No. 4) とし、ES 抗原と No, 1, No. 4 および SOM 抗原と No. 2, No. 3 とについて免疫泳動法を行つた。

e) 特異抗原分離の試み

1) Polysaccharide protein complex の分離

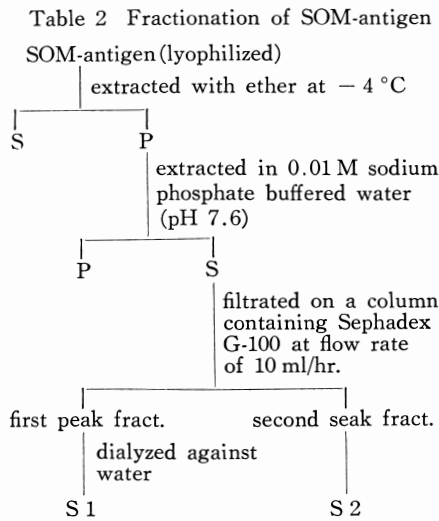


Kagan *et al.* (1958)の方法にしたがつて、SOM 抗原を30%水酸化カリウムで15分間加熱し、これを4°C、24時間透析し、95%エタノールで沈澱分離したもの(C1)および Table 1 のごとく SOM 抗原を8%三塩化酸(T.C.A.)で沈澱する蛋白を10,000 rpm、30分間遠心で除去し、上清を4°C、24時間透析し37°C 1時間2% Trypsin (pH 7.2)処理し、これをアセトンで沈澱分離したもの(C2)を試料にした。

2) 硫酸分画法

蛋白質の分画法として、一般に広く用いられている塩析法によつて、SOM 抗原中の蛋白の分離を試みた。硫酸アンモニウム(25°C 飽和溶液は76.7 g/100 ml)の1/3、1/2および全飽和で分画した各沈澱物(S4, S5, S6)および上清(S3)を4°C、24時間透析し、それぞれ免疫泳動法に用いた。

3) Crandall & Crandall (1967)の方法にしたがつて Table 2 のごとく SOM 抗原(50 mg/ml)を4°Cで



エーテル抽出し、濾紙で減圧分離した沈澱物を常温水(リン酸緩衝液でpH 7.6に修正したもの)で2~3回抽出し、10,000 rpm、60分遠心して、上清液を約5 mlに25°Cで濃縮し、Sephadex G-100を充てんしたColumn(2.5×60.0 cm)で濾過分画(flow rate: 10 ml/hour)して得た無色透明の第1分画を4°C、24時間透析し、それぞれをS1, S2として試験管内沈降反応、赤血球凝集反応および免疫泳動法に供した。

実験成績

1. 感作ウサギの抗体産生推移

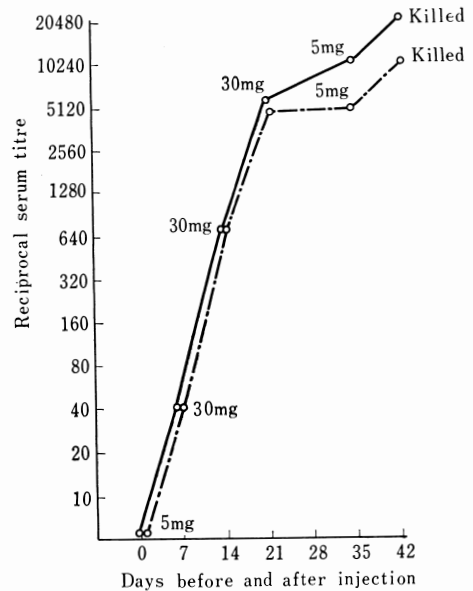


Fig. 1 Antibody response of rabbits (injected with *T. canis* ES-antigen) Antibody response determined by hemagglutination test.

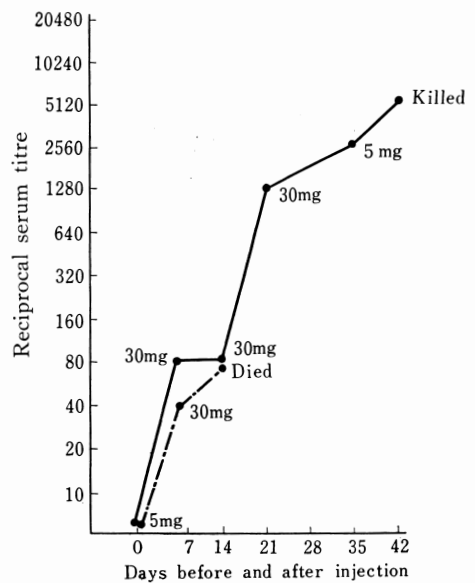


Fig. 2 Antibody response of rabbits (injected with *T. canis* SOM-antigen) Antibody response determined by hemagglutination test.

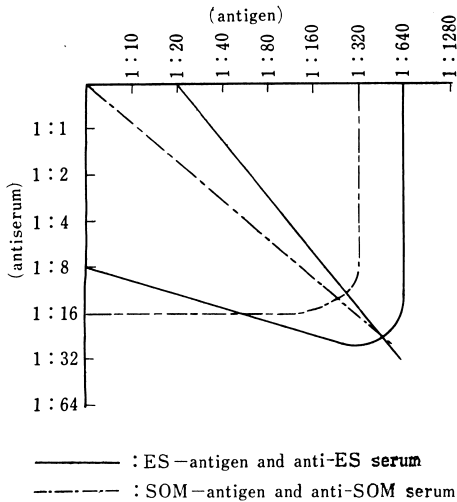


Fig. 3 Optimal proportions of ES-, anti-ES or anti-SOM serum with ES- or SOM-antigen.

ES 抗原を2羽のウサギに初回 5 mg 以後、30 mg ずつ皮下に毎週注射免疫したところ Fig. 1 のごとく、赤血球凝集反応における抗体価は急上昇し、5 週後には 5,120 倍~10,240 倍となった。さらに 5 mg の追加免疫で 10,240~20,480 倍の抗体価を示した。

SOM 抗原による抗体価の推移は Fig. 2 のごとくで、ES 抗原と同じ条件で注射免疫したところ、抗体価の上昇は、抗原にくらべて緩徐で5 週の終りの抗体価は2,560 倍、6 週間後には 5,120 倍を示した。

Table. 3 は前記の ES, SOM 抗原を注射免疫後6 週目の全採血時の試験管内沈降反応の成績結果である。ES 抗原による抗 ES 血清は 1,600 倍、SOM 抗原による抗 SOM 血清も同じく 1,600 倍の抗体価を示したが、交叉試験の ES 抗原と SOM 感作免疫血清では 200 倍、SOM 抗原と ES 感作免疫血清では 400 倍であった。

Table 3 Precipitin test

Test antigen	Anti-serum	200×	400×	800×	1600×	3200×
ES	ES 1	+	+	+	+	-
	ES 11	+	+	+	±	-
	SOM	+	-	-	-	-
SOM	ES 1	+	+	-	-	-
	ES 11	+	+	-	-	-
	SOM	+	+	+	+	-

The readings were made after 60 minutes.

2. 抗原の性状について

マイクロキエールダール法による総N量は、イヌ回虫の体腔液 6.93%, ES 抗原 6.84%, SOM 抗原 10.91% であった (Table 4). 体腔液, ES, SOM 抗原の蛋白分画

Table 4 Chemical nature of hemolymph, ES and SOM antigen (*T. canis*)

Antigen	Total N	Electrophoresis	%
hemolymph	6.93%	A 1	52.1
		G 1	47.9
ES	6.84%	A 1	61.7
		G 1	38.3
SOM	10.91%	A 1	18.7
		G 1	81.3

Electrophoresis : Acetate membrane (Millipore) Veronal-Veronal Na. pH 8.7

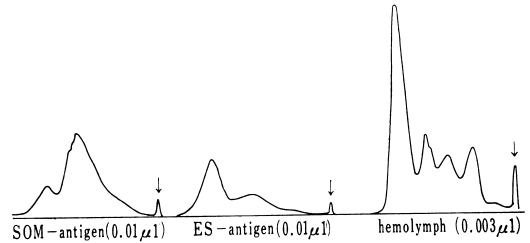


Fig. 4 Electrophoretic Patterns of ES-, SOM-antigen and hemolymph.

は Tiselius の電気泳動で Fig. 4 に示すごとく、体腔液は5 峰を有しアルブミン52.1%, グロブリン47.9% で、ES 抗原は易動度の早いアルブミン部位に大きな峰を有して、アルブミン61.7%, グロブリン38.3% で体腔液蛋白の易動度に似ている。SOM 抗原は約4 峰を有し、主成分は中間の易動度を示すグロブリン部位にその大部分が存在し、アルブミン18.7%, グロブリン81.3% の割合であった (Table 4).

すなわち、ES 抗原は体腔液に似てアルブミン系がやや多いのに比して、SOM 抗原はグロブリン系が多く、両抗原の構成成分の量的差異のあることは判然としている。

3. 免疫泳動法による ES, SOM 抗原の比較

前記泳動条件で ES および SOM 抗原を分析した結果は Fig. 5 に示したごとく ES 抗原は抗 ES 血清に対してアルブミン分画位に強い1 本の沈降線を示し、この沈降線に並んで α_1 位に糖タンパクと考えられる1 本の沈降線を示し、さらに α_2 位に macroglobulin と考えら

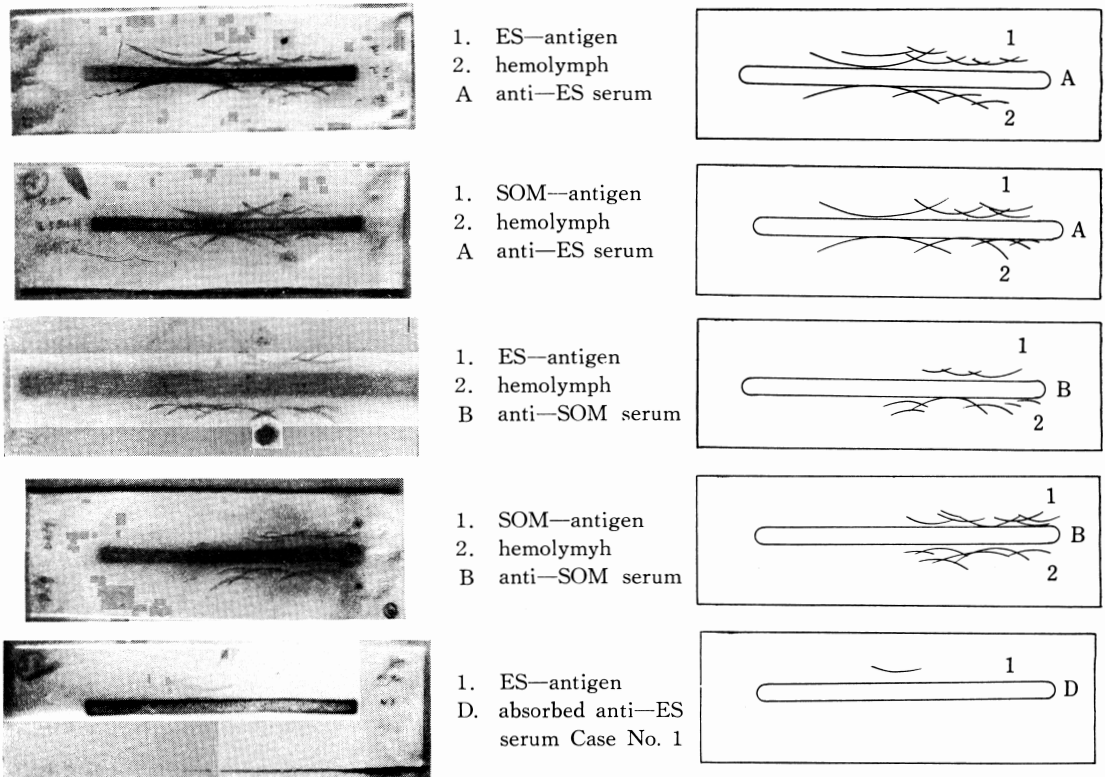


Fig. 5 Immunoelectrophoretic patterns.

れる沈降線1本, β 位に2本, γ 位に2本それぞれ認める. 体腔液と抗 ES 血清との間ではやはり, アルブミンの泳動範囲に1本, β 位に2本, γ 位に1本の沈降線をそれぞれ認める. SOM 抗原と抗 ES 血清の間ではアルブミン位に1本, β 位に2本, γ 位に2本の沈降線を認めた. ES 抗原と抗 SOM 血清の間には γ -グロブリンの泳動範囲に3~4本の沈降線を認めた. SOM 抗原と抗 SOM 血清の間には β 位に4~5本, γ 位に2~3本の沈降線を認めた. 体腔液と抗 SOM 血清の間には α_2 位に2本, β 位に1本, γ 位に3本沈降線を認めた. すなわち, 抗 ES 血清はアルブミン系の強い抗体と α_1 -グロブリン分画の抗体とさらに β , γ -グロブリン系の弱い抗体を産生しているが, 抗 SOM 血清は β , γ -グロブリン系のみ強く示す抗体を産生している.

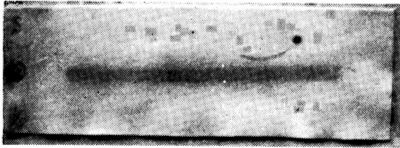
Ouchterlony 法で ES および SOM 抗原と抗 ES, SOM 血清を反応させたところ, Fig. 6 に示すごとく center cup の抗 ES 血清に対して ES 抗原も SOM 抗原も共に強い1本の沈降線とさらに抗原側に3本の弱い沈降線をそれぞれ認めた. 両抗原に認めた沈降線は相互に末端が

彎曲し, 連なった. いわゆる looping 現象を示して, 両者が明らかに共通した同一成分であることを示している. 抗 SOM 血清に対しては ES 抗原は細い3本の沈降線を認め, SOM 抗原の間には4本の細い沈降線を認めた. また, 両抗原, 抗体の量的関係を知るために, Ouchterlony 法のセルローズアセテート膜内の center cup に抗 ES, SOM 血清をおき, その囲りに ES, SOM 抗原の倍量希釈液をおき, 反応させたところ, 抗 ES 血清に対して ES 抗原は243倍まで4本の沈降線を認めたが, 抗 SOM 血清に対して SOM 抗原は9倍希釈までが限度でそれ以上の希釈では沈降線を認めることは不可能であった.

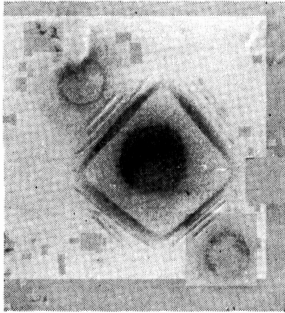
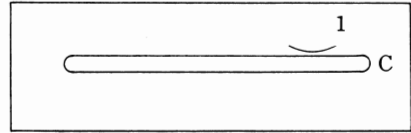
すなわち, 両抗原には抗体産生能の差からくる抗体価の相異および抗原抽出の難易からくる成分濃度の相異などの量的相異を排除出来ないが, SOM 抗原には ES 抗原と共通したいわゆる飼育液型抗血清に強く産生される抗アルブミン系物質に強く反応する抗原成分を有している.

4. 抗血清の吸収試験について

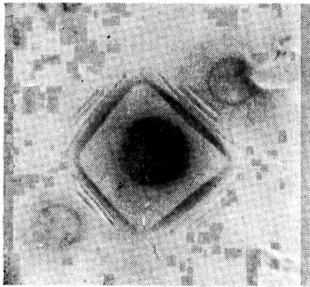
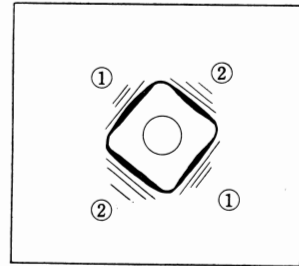
Immunoelectrophoretic patterns



1. SOM—antigen
C. absorbed anti—SOM serum Case No. 3



Center cup :
anti—ES serum
1. ES—antigen
2. SOM—antigen



Center cup :
anti—SOM serum
1. ES—antigen
2. SOM—antigen

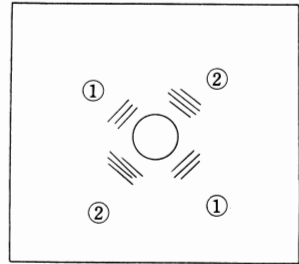


Fig. 6 Double diffusion precipitin reaction.

沈降反応による抗原、抗体希釈法から得られた最適比は、Fig. 3 に示すごとくで、実線は ES 抗原と抗 ES 血清で、点線は SOM 抗原と抗 SOM 血清の反応の場をあらわした曲線である。この沈降曲線から実験方法で記した吸収抗 ES 血清 No. 2 と SOM 抗原および吸収抗 SOM 血清 No. 4 と ES 抗原との吸収試験では抗体は完全に吸収されて、免疫泳動法で沈降線は消失したが、吸収抗 SOM 血清 No. 3 と SOM 抗原との間には、 γ -グロブリンの泳動範囲に 1 本の沈降線が残存し、吸収抗

ES 血清 No. 1 と SOM 抗原との吸収試験の結果では、 α_1 -グロブリンに相当する範囲に 1 本の沈降線の残存を示した(Fig. 5)。

5. 多糖体抗原について

さらにこの SOM 抗原の種々の分画について検討して得た結果は次の通りである。実験方法で記したごとく、まず Kagn *et al.* (1958) の方法により分離した polysaccharide protein complex (C1) および T.C.A., Trypsin 処理で得た (C2) はいずれもニンヒドリン定性反応陰性、

Table 5 Hemagglutination titers of anti-ES, anti-SOM sera with SOM-extracted antigen

		anti-ES serum	anti-SOM serum
first peak fractured extract	(S1)	1280	1280
second "	(S2)	320	80
polysaccharide complex	(C1)	0	0
"	(C2)	0	0
supernatant of ammonium sulfate fraction	(S3)	5120	1280

Controls for the test

- (a) phosphate buffer saline and tanned, sensitized cells.
- (b) antiserum and tanned, unsensitized cells.
- (c) normal serum and tanned, sensitized cells.

アンスロン定性反応陽性であつた。この物質と ES および SOM 抗血清との沈降反応の結果は、Table 5 のごとく C1, C2 いずれも抗 ES, SOM 血清に対して沈降を認めなかつた。また、免疫泳動法でも沈降線は1本も認めなかつた (Table 6)。

Table 6 Immuno-electrophoretic band number of anti-ES, anti-SOM sera with ES-, SOM-and fracted antigen.

antigen	anti-ES serum		anti-SOM serum	
	A 1- α_1	α_2 - γ	A 1- α_1	α_2 - γ
ES	1	5-6	0	3-4
SOM	1	4-6	0	6-8
S1	0	0	0	0
S2	0	0	0	0
S3	1	1	0	0
S4	1	1-2	0	1-2
S5	2(1?)	4-6	0	0
S6	1	3	0	4-6
C1	0	0	0	0
C2	0	0	0	0
hemolymph	1	3-4	0	6

Al- α_1 : Albumin, fraction.

α_2 - γ : α_2 , β_1 , β_2 , γ fraction.

S1: first peak fracted extract.

S2: second "

S3: supernatant of ammonium sulfate.

S4: 1/3 saturated "

S5: 1/2 " "

S6: saturated "

C1: polysaccharide protein complex (boiled with 30% potassium hydroxide)

C2: " (treated with 2% Trypsin)

Crandall & Crandall (1967) の方法で抽出分画して得た S₁ と S₂ は抗 ES, SOM 血清に対して、Table 5 に示すごとく、赤血球凝集反応で S₁ は抗 ES 血清、抗 SOM 血清とも1,280倍まで陽性を示し、S₂ は抗 ES 血清に対して320倍、抗 SOM 血清に対しては80倍まで陽性を示したが、免疫泳動法では、Table 6 のごとく沈降線は認めなかつた。

硫酸分画法で得た SOM 抗原の各分画 (S₃, S₄, S₅, S₆) の免疫泳動の結果、抗 ES 血清と S₃ との間にはアルブミン分画位に強い1本の沈降線と β 分画位に弱い1本の沈降線を認め、S₄ (euglobulin 分画) との間には ES 抗原と抗 ES 血清との間に示した、 α_1 -グロブリン位の沈降線に一致した易動度の早い1本の沈降線を認めた。S₅ との間にはアルブミン位に非常に弱い1本の

沈降線を認めたが、S₆ との間には β -グロブリン位に1本、 γ -グロブリン位に2本の沈降線を認めた。抗 SOM 血清と S₃ との泳動では沈降線を認めなかつた。(Table 6)

S₄ との間には γ -グロブリン分画位に2本の沈降線を認めた。S₅ との間には沈降線を認めなかつたが、S₆ との間には β , γ -グロブリン位に4本の沈降線を認めた。

考 案

Campbell (1936, 1937) は、ブタ回虫から分離したポリサッカライドはイヌ回虫免疫血清に対して沈降反応を示さないことから、種特異抗原の存在を報告した。

Kagan (1957, 1958) はイヌ回虫の体腔液、虫体組織、受精卵および虫体から抽出したポリサッカライドは種族特異性があると報告した。Kent (1960) はブタ回虫から抽出した糖蛋白に種特異抗原の存在することを報告した。Fernando (1968) はイヌ回虫の仔虫期卵について、検討を加え、仔虫期卵から抽出した物質にかなり高い抗原性のあることを報告している。

以上のような諸実験は免疫抗原の抽出にさまざまな方法を用い、その抗原の特性を議論しているところに問題があり、反応系を単一化していないので相互の研究を比較することは困難である。また虫体から抽出した各種の成分を動物に免疫して得た抗血清に対する各種の免疫反応の中で特異な系が見出されたとしても、それがただちに感染症における特異抗原抗体反応系を示すとは考えられない。Huntley & Moreland (1963) は visceral larva migrans (V. L. M.) の症状を示す3人の患者血清についてイヌ回虫の抽出抗原と gel diffusion 法で免疫反応を行い、そのうち2人の患者にそれぞれ1本ずつの沈降線を認めたと報告している。しかしこのものがイヌ回虫に特異的なものかははつきりしない。Kagan (1957) の綜説によれば各種寄生虫体の中にはそれぞれに極めて高い非特異性の交叉反応抗原を有することが報告されている。

すなわち、免疫反応を適用して寄生虫診断を行なう場合には免疫反応の系をどのように選択するか、またその抗原の特異性をどのような範囲に設定するかが問題となる。いいかえればイヌ回虫の感染症での免疫抗原の追跡と、これに対する試験抗原の決定である。たしかに従来多数の研究者によって行なわれて来た全虫体免疫による種特異抗原の研究も重要であるが、寄生虫体の寄生の場における抗原物質の追求もまた重要な問題である。この

ような問題に関して、小宮・小林 (1965) は寄生虫感染に対する免疫学的研究で、ES 抗原 (excretion and secretion antigens) の有用性について報告している。また小林ら (1968) はアニサキスの ES 抗原を作製しその特異性について、ES 抗原は SOM 抗原と異なる免疫学的特性を有する抗原であると報告している。

著者はイヌ回虫の ES 抗原と SOM 抗原の関連性について免疫学的に検討した結果、まず ES 抗原と SOM 抗原の構成蛋白に明らかに差異を認め、ES 抗原ではアルブミンおよび α_1 -グロブリンが主であるのに対し、SOM 抗原ではアルブミンを欠除し、 α_2 - γ -グロブリンにその電気泳動像が認められる。この2種抗原を用いてウサギに adjuvant 法で免疫した場合の抗体産生の状態を沈降反応とタンニン酸処理ヒツジ赤血球凝集反応でしらべたところ ES 抗原免疫では SOM 抗原免疫より抗体価が急上昇し、adjuvant 法による ES 抗原の力価の高さを思わせる結果を得た。しかし、この抗血清と ES および SOM 抗原との間の相互の免疫泳動像を比較してみると抗 ES 血清に対して ES 抗原 SOM 抗原の沈降線は α_1 -グロブリンに相当する ES 抗原のみに出現する沈降線を得た。さらにこの抗 ES 血清と SOM 抗原で吸収し、いわゆる吸収抗 ES 血清 (No. 1) と ES 抗原との免疫泳動像ではやはり α_1 -グロブリンに相当する沈降線の残存を得た。このものは Kent (1960) の仔虫卵感染による免疫抗体に対する特異抗原として分離した糖蛋白に相当するかも知れない。因みに人血清の免疫泳動像の α_1 -グロブリン中 α_1 -グルコプロテインに一致する位置に沈降線は認められた。他の5本の沈降線は全く一致した。また抗 SOM 血清に対する ES 抗原と SOM 抗原の沈降線は ES では β_2 および γ -グロブリン位に特異的に、SOM では β_2 - γ_2 -グロブリン位にそれぞれ沈降線を認め、抗 ES 血清に出現したアルブミン位および α_1 -グロブリン位の沈降線を全く認めなかった。このような現象は複合抗原で免疫した場合、抗原性の程度により産生される抗体に差を生じたことで、この2種抗原の間には構成抗原物質に質的な差を求めることはむしろ困難で、構成抗原成分の量的な差が抗体産生に影響を与え、その結果免疫反応の系に2者の差を招来したものと解すべきである。このような結果から、感染の場における免疫抗体を捕捉する目的で抗原を分画する場合には、全虫体および飼育液の両者ともに ES 型に合せなければならないと考えられる。著者の実験で得た飼育型抗原の中での抗原物質の主体はその沈降線の強度と分布からみ

てアルブミンおよび α_1 -グロブリンに相当するとみなされる。そこで硫酸分画でこれに相当するものを取り沈降反応を抗 ES 血清について試みたところ、硫酸 1/3 飽和分画で ES 型に特異の α_1 -グロブリン位に1本の沈降線を認めた。

Kagan *et al.* (1959) の方法によるポリサツカライド、Crandall & Crandall (1967) の方法による第1および第2分画はともに抗 ES 血清に対して免疫泳動による沈降線は認められなかった。しかし、第1分画は赤血球凝集反応で1,280倍まで反応が陽性に認められ、沈降反応の抗原、抗体系と異なる赤血球凝集反応系の存在がうかがわれた。このことは Sawada *et al.* (1965) の肝吸虫における所見と一致するかも知れない。

以上総括すると沈降線反応系における ES 抗原の主体はタンパクであり、それはアルブミンおよび α_1 -グロブリンに免疫抗原性が認められた。

結 語

イヌ回幼虫感染症に対する免疫学的診断を行なうために必要な抗原の吟味を行なった。イヌ回虫感染の飼育液中からの ES 抗原と虫体抽出による SOM 抗原の比較をした結果を報告する。

1. ES 抗原でウサギを免疫したところ、抗体価は赤血球凝集反応で10,240~20,480倍、SOM 抗原による抗体価は5,120倍を示し、ES 抗原免疫では SOM 抗原に比し、抗体価が遙かに高かった。
2. 免疫泳動法で、ES 抗原による産生抗体はアルブミンおよび α_1 -グロブリン位に強い沈降線を示し、これは ES 抗原に特異であつた。SOM 抗原による産生抗体は α_2 - γ -グロブリン位に強く示し、アルブミンおよび α_1 -グロブリン位には沈降線を示さなかった。
3. SOM 抗原で吸収した抗 ES 血清 (No. 1) の ES 抗原に対する免疫泳動では α_1 -グロブリン位に ES 抗原特異の沈降線の残存を示し、ES 抗原で吸収した抗 SOM 血清 (No. 3) の SOM 抗原に対する免疫泳動は γ -グロブリン位に1本弱い沈降線の残存を示した。
4. SOM 抗原の硫酸 1/3 飽和分画と抗 ES 血清との免疫泳動像で ES 抗原に特異な α_2 -グロブリン位に沈降線を示した。硫酸分画の上清は抗 ES 血清との間のみ、アルブミン位に沈降線を示した。硫酸 1/2 飽和および全飽和では α_1 - γ -グロブリン位に4~6本の沈降線を両者に示した。
5. Kagan *et al.* (1958) の方法で SOM 抗原より抽出した polysaccharide protein complex は ES, SOM

両抗血清ともに沈降線を認めなかった。また、Crandall & Crandall (1967)の方法で、SOM 抗原より抽出分画した第1および第2分画も両抗血清に対して免疫泳動法で沈降線を認めなかったが第1分画は赤血球凝集反応で1,280倍まで反応が陽性であった。

文 献

- 1) Beaver, P. C. Snyder, C. H., Carrera, G. M., Dent, J. H. and Lafferty, J. W. (1952) : Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics*, 9, 7-19.
- 2) Boyden, S. V. (1951) : The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exper. Med.*, 93, 107-120.
- 3) Bunkantz, S. C., Rein, C. R. and Kent, J. F. (1946) : Studies on complement fixation. 11 preservation of sheep's blood in citrate-dextrose mixtures (modified) *J. Lab. Clin. Med.*, 31, 394-399.
- 4) Campbell, D.H. (1936) : An antigenic polysaccharide fraction of *Ascaris lumbricoides* suum. *J. of Inf. Dis.*, 59, 266-280.
- 5) Campbell, D. H. (1937) : The immunological specificity of a polysaccharide fraction from some common parasitic helminths. *J. Parasit.*, 23, 348-353.
- 6) Crandall, C. A. and Crandall, R. B. (1967) : Macroglobulin antibody response to *Ascaris suum* infection. *Exp. Parasit.*, 391-402.
- 7) Dent, J. H., Nicholds, R. L., Beaver, P. C., Carrera, G. M. and Staggers, R. J. (1956) : Visceral larva migrans with a case report. *Am. J. Path.*, 32, 777-803.
- 8) Feinberg, J. J. (1957) : Identification, discrimination and quantification in Ouchterlony gel plates. *Int. Arch. Allergy*, 11, 129.
- 9) Fernando, S. T. (1968) : Immunological response of rabbits to *Toxocara canis* infection. *Parasit.*, 58, 91-103.
- 10) Freund, J., Thomson, K. J., Hough, H. B., Sommer, H. E. and Pisai, T. M. (1948) : Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvant. *J. Immunol.*, 60, 393-398.
- 11) Huntley, C. C. and Moreland, A. (1963) : Gel diffusion studies with *Toxocara* and *Ascaris* extracts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 12, 104-210.
- 12) Kabat, E. A. and Meyer, M. M. (1948) : *Experimental Immunochemistry*, Charles C., Thomas, Springfield, U.S.A., 905 pp.
- 13) Kagan, I. G. (1957) : Serum-agar double diffusion studies with ascaris antigen. *J. Infect. Dis.*, 101, 11-19.
- 14) Kagan, I. G., Jeska, E. L., and Gentzkow, C. J. (1958) : Serum-agar double diffusion studies with ascaris antigens. 11. Assay of whole worm and tissue antigens complexes. *J. of Immunol.*, 80, 400-406.
- 15) Kagan, I. G., Norman, L., and Allain, D. S. (1959) : Studies on the serology of visceral larva migrans. 1. Hemagglutination and flocculation tests with purified ascaris antigens. *Journal of Immunology*, 83, 297-301.
- 16) Kent, N. H. (1960) : Isolation of specific antigens from *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. *Exp. Parasit.*, 10, 313-323.
- 17) 小林昭夫・熊田三由・石崎達・勝呂毅・小糸賢太郎 (1968) : アニサキス幼虫抽出液ならびに同虫体の排泄物・分泌物抗原による皮内反応(I). 一般人における皮内反応成績. *寄生虫誌*, 17, 407-413.
- 18) 小宮義孝・小林昭夫 (1965) : 寄生虫症の免疫現象. *日本臨床*, 23, 1537-1541.
- 19) 松橋直 (1958) : 免疫電気泳動法. *日新医学*, 45, 162-167.
- 20) 西岡久寿弥・岡田英親 (1966) : 凝集反応. *蛋白質核酸酵素*, 11, 100-102.
- 21) Sadun, E. H., Norman, L. & Allain, D. (1957) : The detection of antibodies to infection with the nematode *Toxocara canis*, a causative agent of visceral larvae migrans. *Am. J. Trop. Med and Hyg.*, 6, 562-568.
- 22) 佐瀬民雄・島尾和男 (1967) : 電気泳動実験法, Tiselius 電気泳動法. 361頁文光堂.
- 23) Sawada, T., Takei, K., Williams, J. E. and Moose, J.W. (1965) : Isolation and purification of antigen from adult *Chlonorchis sinensis* for complement fixation and precipitin tests. *Exp. Parasit.*, 17, 340-349.
- 24) Schacher, J. F. (1957) : A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. *J. Parasit.*, 43, 599-612.
- 25) Soulsby, E. J. L. (1957) : Antigenic analysis of ascaris tissues by the double diffusion precipitin test. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 51, 9-10.

Abstract

STUDIES ON *TOXOCARA CANIS*
1. ES ANTIGEN FROM ADULT WORMS

TATSUO HOSOI

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

Excretion and secretion (ES) antigen was prepared from culture medium of *Toxocara canis* adults and somatic antigen was lyophilized and extracted with saline.

(1) Hemagglutination titre for ES antigen, when tested with ES antiserum, was approximately 1 : 10,240-20,480, while for SOM antigen with anti-SOM serum was about 1 : 5,120.

(2) By immunoelectrophoretic analysis, with homologous antigen-antibody system of ES antigen, were recognized two clear precipitin bands at the positions of albumin and α_1 -globulin (euglobulin) fractions, especially the latter precipitin band was specific for ES antigen. In the case of somatic antigen were recognized several precipitin bands at the positions of $\alpha_2\sim\gamma$ -globulin fractions. Precipitin band at the γ -globulin fraction was specific for SOM antigen.

(3) When the fraction of somatic extract, 1/3 saturated with ammonium sulfate, was tested for anti ES serum, a single specific precipitin band appeared at the position of α_1 -globulin. In the reaction with supernatant of ammonium sulfate fractionation of SOM antigen, using anti ES serum, was recognized clearly a single precipitin band at the position of albumin fraction.

Using the precipitate fraction at the half saturation with ammonium sulfate as the antigen, several precipitin bands appeared at the positions of $\alpha_2\sim\gamma$ -globulin fractions.

(4) Polysaccharide protein complex extracted from SOM antigen by the procedure of Kagan *et al.* (1959) was recognized no precipitin band for both anti-SOM and anti-ES sera.

(5) The first and second peak fraction extracts from SOM antigen by the procedure of Crandall & Crandall (1967) were given positive reaction in 1 : 1,280 by hemagglutination test, while no precipitin band was recognized by immunoelectrophoresis.