

# 日本住血吸虫感染動物にみられる循環抗原について

## 2. 感染マウスにおける循環抗原の出現状況

平 田 瑞 城

久留米大学医学部寄生虫学教室

(昭和51年8月13日 受領)

Berggren and Weller (1967), Gold *et al.* (1969), Bawder and Weller (1974) 等によりマンソン住血吸虫感染動物の血液中に虫体由来の抗原物質 (CA) が存在することが報告されている。著者等 (平田・阿久沢, 1975) も先に日本住血吸虫感染ウサギにおいてマンソン住血吸虫で報告されている CA と極めて類似する物質を認めて報告した。しかし、その検出率は低く、セルカリア1,000~2,000隻を感染させたウサギ27羽中わずか5羽(18.5%)に陽性であった。

CA の宿主体内における機能はまだ明らかでなく、von Lichtenberg *et al.* (1974), Medwar and Voller (1975), Carlier *et al.* (1975) 等によつて住血吸虫性腎炎との関連が示唆されているにすぎない。Gold *et al.* (1969), Bawden and Weller (1974) は CA の検出を免疫学的診断に利用することを考慮している。いずれにしても CA の宿主体内における変動をしらべることは CA の意義を追究する上に基本的に重要なことと思われる。

そこで今回は CA の検出に用いる抗血清にはフェノール抽出抗原を免疫原として作製した抗血清を使用し、日本住血吸虫感染マウスにおける CA の出現状況を検討した。

### 実験材料および方法

#### 1. 感染マウス血清

CA の検索には計35頭のマウス (dd 系, 体重20~25g) を使用し、2群に分けて、1群は日本住血吸虫セルカリア200隻ずつを尾浸法により経皮感染させ、他の1群は100隻ずつ感染させた。

感染1週より7週までは各週毎に、その後13週までは2週間隔に Riley (1960) の方法に従い眼窩静脈より採血し、分離した血清について CA の有無をしらべた。100隻感染群については寄生していた虫体数をしらべ回収虫体数とした。

なお、感染マウス由来の CA と前報 (平田・阿久沢, 1975) の感染ウサギのそれとの異同について検討したが、それには前報の No. 14 の感染ウサギ血清を用いた。

#### 2. CA の検索

感染マウス血清と抗血清を用いてオクタロニー法によつて CA の検索を行なつた。その方法は前報と同様に、3ml の寒天液を7.6×2.6cm のスライド上に流し、孔の直径および孔間の距離は3mmとした。原液の抗血清および感染マウス血清 (各、約15 $\mu$ l) をそれぞれの孔に入れた後3日間反応させ、その後 Comossie brilliant blue で染色して反応の有無を判定した。さらに免疫電気泳動法も随時使用し、抗原物質の易動度をみることによつて CA であることを再確認した。その方法は前報に準じた。

#### 3. 抗血清

感作には前報で述べた80%フェノール抽出抗原を用いた。このものは全虫体抽出液を80%フェノールで3回処理後、その水層を生理的食塩水に透析して得られた。この抗原液 (15mg/ml) と Freund's complete adjuvant を等量に混じ、ウサギ (2.5kg) の足蹠部および殿筋に1週間毎に12回注射し、最終注射後10日目に全採血した。分離して得られた血清を抗フェノール処理全虫体抗血清 (以下抗血清 WPh とする) として使用した。抗血清 WPh と比較のため全虫体抽出液で感作して作製した抗全虫体抗血清 (以下抗血清 W) も用いた。

#### 4. 吸収試験

抗血清 WPh の特異性について検討するため吸収試験を行なつた。すなわち、抗血清 WPh 1ml に80%フェノール処理虫体抽出液および正常マウス10頭分の血清の凍結乾燥粉末をそれぞれ5, 10mg 加え、37C に3時間おき、その後7C 下でときどき攪拌しながら2日間

放置した。以上の様に処理した抗血清 WPh を遠心後、上清を吸収抗血清として用いた。

#### 5. マンソン住血吸虫感染マウス血清

マンソン住血吸虫感染マウス血清中の CA と日本住血吸虫感染マウスにみられる CA との異同について検討した。このマンソン住血吸虫感染マウスは長崎大学の熱帯病研究所より供与されたものの中 1 頭で感染経過日数は 58 日、回収虫体数は 204 隻であった。

### 実験成績

#### 1. 抗血清 WPh の特異性

フェノール処理全虫体抽出物に対する抗血清、すなわち抗血清 WPh の特異性について検討した。免疫電気泳動法によつて (Fig. 1), 抗血清 W(A) が全虫体抽出液 (100mg/ml) と非常に複雑な泳動パターンを示すのに対し、抗血清 W Ph(B) は陽極側に 1 本の沈降線と陰極側に 2 本の沈降線を形成した。80%フェノール処理全虫体抽出液による抗血清 WPh の吸収試験 (C) では陽極側の沈降線は消失し、陰極側のものはそのまま残存した。正常マウス血清による抗血清 WPh の吸収 (D) では陽極側および陰極側の沈降線に全く変化が認められなかった。

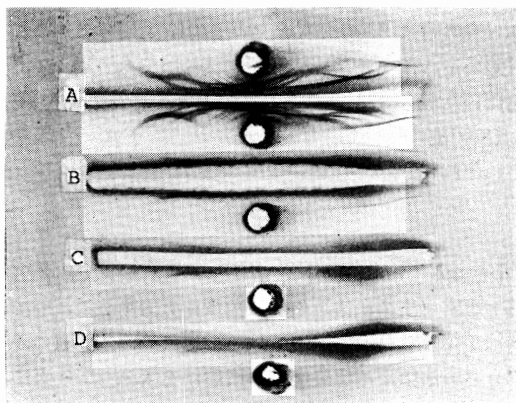


Fig. 1 Immunoelectrophoretic pattern of homogenates of adult worms developed by antiserum W (A), antiserum WPh (B), antiserum WPh absorbed by 80% phenol extract from adult worms (C) and antiserum WPh absorbed by normal mouse serum (D).

オクタロニー法によつて (Fig. 2), 抗血清 WPh(B) は感染ウサギ血清 (IRS) および感染マウス血清 (IMS) と明瞭な沈降線を形成し、両者は完全に融合していた。抗血清 W(A) の場合、Fig. 3 にもみられるように抗

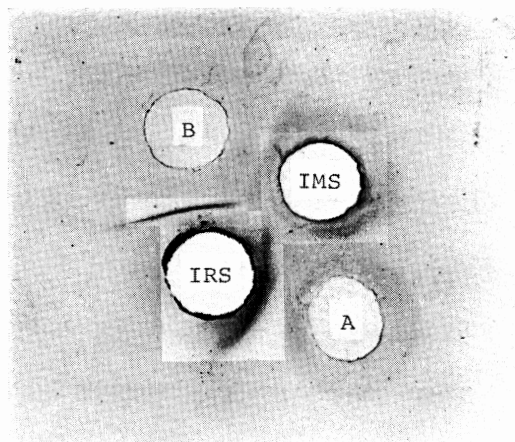


Fig. 2 Ouchterlony analysis of CA in sera of infected mouse (IMS) and infected rabbit (IRS) developed by antiserum W (A) and antiserum WPh (B).

血清 WPh が感染マウス血清と明らかな沈降線を形成するのに対し、陰性であった場合が認められた。抗血清 WPh と正常マウス血清 (50例) との反応は全く認められなかった。

抗血清 WPh は感染マウス血清 (IMS), 感染ウサギ血清 (IRS) およびフェノール処理全虫体抽出液 (WPh) と免疫電気泳動法によつて全く同一の位置に沈降線を形成した。その沈降線は前報でも述べた如く、2本に認められることもあつた (Fig. 3)。

#### 2. マンソンおよび日本住血吸虫感染マウス血清中の CA の同一性

マンソン住血吸虫と日本住血吸虫感染マウス血清中の抗原物質の異同をオクタロニー法によつてしらべた。その結果、抗血清 WPh によつて形成されたそれぞれの沈降線は完全に融合していた (Fig. 4)。

#### 3. 感染マウスにおける CA の出現状況

感染マウスにおける CA の検索には、抗血清 WPh の CA との特異性が認められたので本抗血清を使用した。200隻のセルカリアを感染させたマウスでは Table 1 に示すように 10 例中 7 例に CA の出現を認めた。最初にその出現を認めた週は第 2 週に 1 例 (No. 5) で他の 6 例では第 5, 第 6 週であつた。感染マウスは第 7 週までに全例死亡し、以後の検討はできなかつた。

次に 100 隻のセルカリア感染群についてしらべた結果 (Table 2), CA の出現週は第 4 ~ 第 7 週で、主に第 5, 第 6 週であつた。その後 CA 陽性のマウスは大部分第 7 週に死亡し、第 8 週までに全例死亡した。第 9 週以後

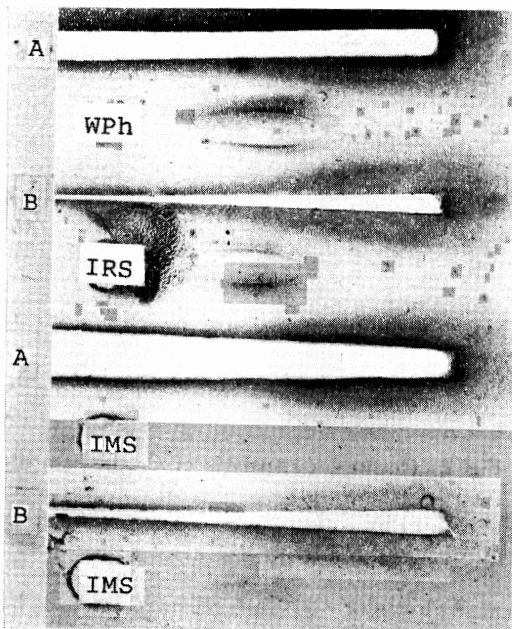


Fig. 3 Comparative immunoelectrophoretic pattern of phenol extract from adult worm (WPh), CA in infected rabbit serum (IRS) and infected-mouse sera (IMS) developed by antiserum W (A) and antiserum WPh (B).

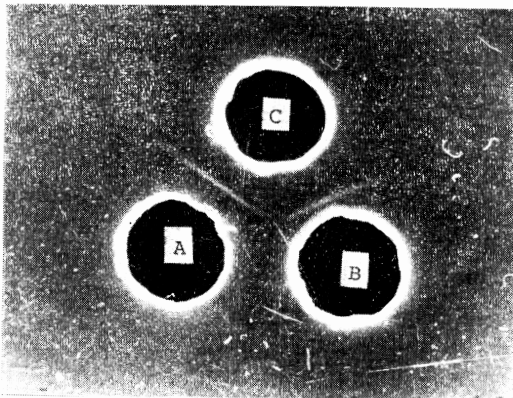


Fig. 4 Ouchterlony analysis of CA in sera of infected mice with *S. japonicum* (A) and *S. mansoni* (B) developed by antiserum WPh (C).

の検索は2週間隔に行なつたが、新たなCAの出現を認めなかつた。CAの持続期間については実験途中に死亡したマウスが多いため充分検討出来なかつたが、最も長くCA陽性が認められたものはNo. 5で第4週より第7週までの期間連続して出現した。一方、No. 2, 10, 11, 18の4例については1回のみ認められ、その後

Table 1 Appearance of CA in mice infected with cercariae of *S. japonicum*

Mouse No.	Weeks after infection							CA
	1	2	3	4	5	6	7	
1	-	ND	-	ND	+	D		+
2	-	D						N
3	-	ND	-	ND	+	+	D	+
4	D							N
5	-	+	D					+
6	-	-	-	-	+	+	D	+
7	-	-	-	-	+	+	D	+
8	-	-	-	-	+	D		+
9	-	-	D					N
10	-	-	-	-	ND	+	D	+

ND: not done, D: dead, N: neglected  
CA: circulating antigen

陰転化した。CA陽性であつたマウスの回収虫体数は8~102隻で、その中1例(No. 7)は雄の単性寄生であつた。85隻寄生のマウス(No. 6)でもCA陰性であつた場合がみられた。

感染マウスにおけるCAの出現が大部分第4週以降であることを考慮すると、感染第3週前の早期に死亡したマウスはCAの出現率をみるのに適当でなくこれらは除外された。また感染経過中に1回でもCAの出現を認めた場合CA陽性と判断した。その結果、200隻および100隻のセルカリア感染群におけるCAの出現率はそれぞれ100%、54.2%とみなされた。

#### 考 察

Berggren and Weller (1967)によれば抗全虫体抗血清と正常マウス血清との間に免疫電気泳動法によつて沈降線が認められると述べている。それ故、本実験のオクタロニー法による感染マウスにおけるCAの検索には80%フェノール処理全虫体抽出液を抗原として作製した抗血清WPhを用いた。本抗血清の特異性についてしらべた結果、全虫体抽出液との間に抗CA抗体以外に陰極側の抗原と反応する2種類の抗体を含むことを認めしたが、正常マウス血清(50例)との反応は全く陰性であつた。正常マウス血清と抗血清WPhとの反応が陰性であることは吸収試験によつても確認された。このことから得られた抗血清WPhは感染マウスとの反応系ではCAに対し特異的抗血清であると考え、CAの検索に使用した。

Table 2 Appearance of CA in mice infected with cercariae of *S. japonicum*

Mouse No.	Weeks after infection											No. of worms recovered	CA
	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13			
1	-	-	-	D								0	-
2	-	-	-	-	+	-	-	D				27	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
4	-	-	-	+	D							NC	+
5	-	-	-	+	+	+	+	D				102	+
6	-	-	-	-	-	D						85	-
7	-	-	-	-	-	+	D					8*	+
8	-	-	-	+	+	+	D					56	+
9	-	-	D									0	N
10	-	-	-	+	-	-						33	+
11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		24	+
12	-	-	-	-	+	+	D					28	+
13	-	-	-	-	+	+	D					48	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	19*	-
16	-	-	-	-	+	+	D					17	+
17	-	-	-	-	+	D						63	+
18	-	-	-	+	-	-	-	D				15	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		5	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		5*	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		22	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		3	-
24	-	-	-	+	+	+	D					NC	+
25	-	-	-	D								16	-

D; dead, NC; not counted, N; neglected, \*; male only  
CA; circulating antigen

なお, Bawden and Weller (1974) は澱粉ゲル電気泳動法によつて分離した CA とメチル化ウシ血清アルブミンと混ぜて CA に対する抗血清を作製しているが, このものはヒト血清アルブミンと交叉反応するためヒトの場合に利用できないと述べている. 著者の場合, フェノール抽出抗原で感作したウサギ3羽の中2例に抗体の産生を認めた. しかし, 実験に十分な抗体価を得るために8~12回の感作が必要であつた. 一方全虫体抽出抗原液による感作では CA に対する抗体は4~6回で8例中全例に十分な抗体産生の増加を認めている. このことから, CA の感作抗原としては精製すればする程抗体産生能が低下するように考えられ, 本実験のフェノール抽出で得られた抗原はまだ未精製であることを暗示しているが, 感染マウスとの反応系では CA 以外の物質との

非特異反応はないことを確認した. また, CA の化学的性質については, Nash *et al.* (1974) は TCA 処理によつて分離した CA について分子量10万以上の多糖類であると報告している. Hillyer (1971, 1976) は Manson 住血吸虫感染ハムスターで循環核酸の存在を報告し, 日本住血吸虫感染チンパンジーにはそれを認めていない. 循環抗原の性質については多糖類および核酸の両面から考慮すべきかもしれない.

感染マウスにおける CA の出現率は200隻感染群で100%, 100隻感染群で54.2%とみなされたが, この出現率は前報における感染ウサギで18.5%であつたことに比べ相当高くなつた. その理由として用いた抗血清の感度が高いことと多数感染(感染ウサギの場合に比べ体重比で約10倍の感染量に相当)によるものと考えられる. な

お、Bawden and Weller (1974) は補体結合反応による CA の出現率について、800隻のマンスン住血吸虫セルカリアを感染させたハムスターで96%、200隻感染群で38%に陽性であつたと報告している。動物種は異なるが、体重比で比較することが許されるならば、マンスン住血吸虫と日本住血吸虫における CA の出現率は非常に類似した値となつた。

CA の認められた感染週は主として第5、第6週で、前報の感染ウサギの場合と同様の傾向を示した。しかし特殊な場合として感染14日目のマウス (Table 1, No. 5) や回収虫体数が8隻で雄のみの単性寄生であつた例 (Table 2, No. 7) にも CA が認められた。このことは CA が虫卵によるのではなく虫体に由来することを支持していると考えられる。また、Bawden and Weller (1974) もマンスン住血吸虫感染ハムスターで感染18日目に CA を認めている。このような所見から、CA は微量ながら非常に早期から血液中に放出され、第5～第6週にピークになるものと思われる。その後の変動は CA 陽性であつた感染マウスがほとんど第7週に死亡したため充分検討できなかつた。なお、感染経過中に4例 (Table 2) において陰転化が認められたが、このことは前報の感染ウサギの場合や Hillyer (1976) によつても観察されている。

### 結 語

前報において日本住血吸虫感染ウサギの血液中に CA が認められることはすでに報告したが、今回はフェノール処理全虫体抽出液を抗原として作製した抗血清を用い、感染マウスにおける CA の出現状況をしらべた。得られた結果を要約すると以下の通りである。

1. CA の出現率は200隻感染マウスで100%、100隻感染で54.2%であつた。その出現した感染週は主に第5、第6週であつた。
2. CA は虫体が幼若 (感染後14日目) の時期の場合や雄の単性寄生であつた場合にも認められた。
3. 日本住血吸虫感染マウスにみられる CA は日本住血吸虫感染ウサギやマンスン住血吸虫感染マウスのそれと同一であることを認めた。

稿を終るに当り、種々の御指導、御校閲を賜つた塘普教授、並びにマンスン住血吸虫感染マウスを提供下された長崎大学熱帯医学研究所寄生虫部に深謝の意を表す。なお、本報告の要旨は第44回日本寄生虫学会総会 (1975) において報告した。

### 文 献

- 1) Bawden, M. P. and Weller, T. H. (1974) : *Schistosoma mansoni* circulating antigen: Detection by complement fixation in sera from infected hamsters and mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23, 1077-1084.
- 2) Berggren, W. L. and Weller, T. H. (1967) : Immunoelectrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, 606-612.
- 3) Carlier, Y., Bout, D., Bina, J. C., Camus, D., Figueiredo, J. F. M. and Capron, A. (1975) : Immunological studies in human schistosomiasis 1. Parasitic antigen in urine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 949-954.
- 4) Gold, R., Rosen, F. S. and Weller, T. H. (1969) : A specific circulating antigen in hamsters infected *Schistosoma mansoni*. Detection of antigen in serum and urine and correlation between antigenic concentration and worm burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18, 545-552.
- 5) Hillyer, G. V. (1971) : Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of hamsters and man infected with schistosomes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136, 880-883.
- 6) Hillyer, G. V. (1976) : Schistosome antigens in the chimpanzees infected with *Schistosoma japonicum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 432-436.
- 7) 平田瑞城・阿久沢実 (1975) : 日本住血吸虫感染動物にみられる循環抗原について。1. 実験的感染ウサギにおける循環抗原の検出及び性状。寄生虫誌, 24, 250-254.
- 8) Lichtenberg, F. v., Bawden, M. P. and Shealey, S. H. (1974) : Origin of circulating antigen from the schistosome gut. An immunofluorescent study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23, 1888-1091.
- 9) Medwar, M. A. and Voller, A. (1975) : Circulating soluble antigens and antibody in schistosomiasis. *Br. Med. J.*, 1, 435-436.
- 10) Nash, T. E., Prescott, B. and Neva, F. A. (1974) : The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *J. Immunol.*, 112, 1500-1507.
- 11) Riley, V. (1960) : Adaptation of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104, 751-754.

**Abstract**CIRCULATING ANTIGEN IN ANIMALS INFECTED  
WITH *SCHISTOSOMA JAPONICUM*

## 2. APPEARANCE OF CIRCULATING ANTIGEN IN INFECTED MICE

MIZUKI HIRATA

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

In the previous study, we reported that circulating antigen was found in sera of the rabbits infected with *Schistosoma japonicum* (Hirata and Akusawa, 1975). The present paper describes the appearance of the antigen in infected mice. The antigen was detected by Ouchterlony test using the specific antiserum. The results were summarized as follows:

1. The circulating antigen was found in 100% and 54.2% of mice infected with 200 and 100 cercariae, respectively, and the period of appearance was mainly between the 5th and 6th week of infection.
2. As unusual cases, the circulating antigen was found on the 14th day of infection in one mouse and also found in another mouse which had 8 male only.
3. The circulating antigens demonstrated in rabbits and mice infected with *S. japonicum* were proved to be identical with that in the mouse infected with *S. mansoni*.