

## 肺吸虫症の皮内反応に関する研究 (IV)

## 抗原の透析及び超遠心処理

横川 宗雄\*

千葉大学医学部寄生虫学(医動物学)教室

大島 智夫\*\*

国立公衆衛生院衛生微生物学部寄生虫室

(昭和 32 年 9 月 12 日受領)

## まえがき

著者等はさきに肺吸虫症の皮内反応を肺吸虫症の流行地及び非流行地の集団に実施した結果と、これと同時にを行った寄生虫学的検査(虫卵検出)及び臨床的諸検査の結果とを比較し、本反応は肺吸虫症の診断法として極めて信頼性の高いことを報告(横川他, 1955)したが、更に本反応の抗原の製法に改良を加えると共に、その材料についての検討、或いは抗原の安定性についても報告(横川他, 1955a, 1955b)した。又本症患者の血清を用いて人体に、Prausnitz-Küstner 反応を実施し、抗原と抗体との定量或いは中和の現象等も証明(横川他, 1957)し、又補体結合反応及び凝集反応(Rapid Flocculation Test)と本皮内反応との関係等も明らかにした(横川, 1956, 横川・栗野, 1956)

著者等は更に本皮内反応の抗原の分析に関する研究をなしつつあるが、本論文では V. S. B. 抗原のセロファン膜透析及び超遠心分析による影響について報告する。

## 実験材料

## V.B.S.-stock antigen:

本 Stock antigen を透析及び超遠心の材料とした。その製法は横川他(1955b), 横川(1956)に詳述してあるのでここには簡単に記す。

肺吸虫成虫を凍結乾燥後、エーテル可溶性物質を除去したものに、ベロナール緩衝食塩水(Veronal buffered saline—以下 V. S. B. と略す)を最初の乾燥虫体重量

の 100 倍量になるように加えて 5°C で 48 時間抽出する。これを 1 万回転 30 分間遠心沈澱し、上清をとつたものが V. B. S.-stock antigen である。これを更に 100 倍に稀釈したものが皮内反应用的 V. B. S. 抗原(×10,000)である。

## 実験方法

## 透析法:

セロファン膜を紫外線照射により滅菌した後に、V.B.S.-stock antigen 3.0cc を内液とし、滅菌再蒸留水(pH 6.5) 900cc を外液として時々振盪し乍ら 2°C ~ 4°C に 5 日間透析後、内液は滅菌生食水を加えて 15cc とし、これを更に 20 倍に稀釈して 1 万倍液とした。外液は 10cc 前後減圧濃縮(40°C 以下)した後凍結乾燥し、乾燥重量の 1,000 倍及び 5,000 倍の兩種稀釈液を滅菌生食水によつて作製した。内液及び外液の最終稀釈液には何れも 1 万倍の割にマーズオンを加えた。

## 超遠心法:

V.B.S.-stock antigen 3.0cc を Spinco により 30,000 回転(5 ~ 8 × 10<sup>4</sup> G) 30 分間遠心してその上清をとり、滅菌食塩水にて 100 倍に稀釈して 1 万倍の割にマーズオンを加えた。

## 抗原性の検討法:

肺吸虫症の皮内反応の抗原の力価を比較する方法としては、人体実験以外には未だ適当な方法は見当らない。然かも抗原の信頼性を比較検討するには、流行地の多数の人々について実施してみる必要があると云うことは既に著者等が屢々述べて来た所である。そこで本研究においても、肺吸虫症の流行地として知られている新潟県直江津市及び高田市周辺の小、中学生 1,473 名を選び、これらの人々に V. B. S. 抗原と上記各種の抗原とを同時に皮内に注射し、これらの抗原によつて、ひき起された

\*MUNEO YOKOGAWA & \*\*TOMOO OSHIMA: Intradermal test for paragonimiasis. IV. Analysis of the antigenicity of the V. B. S. antigen with dialysis and ultracentrifugation. (\*Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba University, Chiba, \*\*Division of Parasitology, Institute of Public Health, Tokyo)



膨疹の腫脹差について比較検討した。

皮内反応術式：

被験者の左上膊屈側部に約5cmの間隔をおいて上記試験抗原及び対照として V. S. B. 抗原を0.01乃至0.02cc 宛皮内に注射し、直ちに皮内注射によりひき起された膨疹の径を測定する。(この場合通常 4.0mm前後である。)

15分後に再び皮内注射部位の腫脹の縦横の径を測定し、この平均値から注射直後の腫脹の縦横径の平均値を減じたものを腫脹差とした。この腫脹差が5mm以上の場合を陽性、4mmを凝陽性、3mm以下を陰性とする。

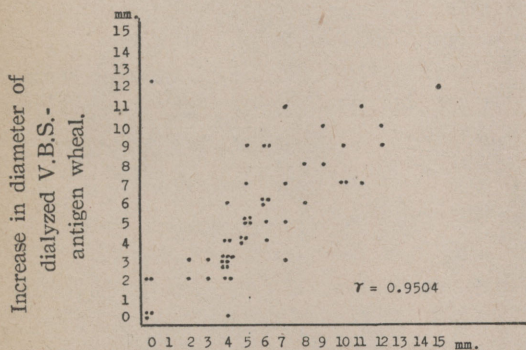
被験者：

肺吸虫症の流行地である新潟県直江津市及び高田市周辺の小中学生1,743名には、全員に V. B. S. 抗原を皮内注射したが同時に、各種の試験抗原をこれら被験人員の中から無作意に抽出した80名乃至70名の各群毎に皮内注射した。

実験成績

1) 透析内液と V. S. B. 抗原との比較：

透析内液と V. S. B. 抗原との両者を同一人の左上膊屈側部に皮内注射し、15分後のそれぞれの腫脹差をとつてその相関を示したのが Fig. 1 である。

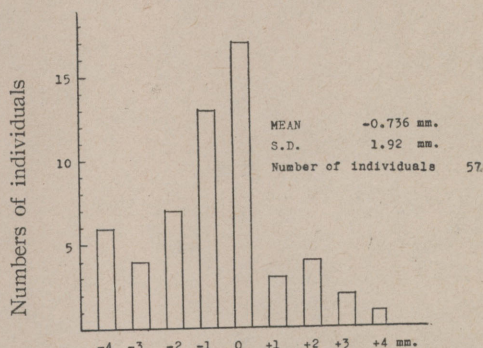


Increase in diameter of V.B.S.-antigen wheal.

Fig. 1 Correlation of the results of the intradermal test with the V.B.S.-antigen and the dialyzed V.B.S.-antigen on the 54 individuals in the endemic area of paragonimiasis.

即ち V. S. B 抗原と V. S. B. 抗原の透析内液の両者の腫脹差は  $r=0.9504$ ,  $\sigma_r=0.0128$  と云う強い相関を示しており、内液の Activity の減少は殆どみられなかった。透析内液の V. B. S. 抗原に対する回帰直線を算出すれば  $y = 0.910x - 0.005$  で透析内液が少々小さめに出る傾向がある。

個人個人の V. B. S. 抗原による反応の大きさと、透析内液抗原の反応の大きさとの関係を対応のある二変数の場合として、両者の差を求めてその分布を検討してみた。その結果は Fig. 2 に示す如く、透析内液の方が、V. B. S. 抗原よりも平均 0.736mm (S.D. 1.92mm) 小さく出ることが明かになった。母平均を 0 として検定した場合のこの差は 5%以下の危険率で有意であつた。



Difference of the diameter of wheals between V.B.S.-antigen wheal and dialyzed V. B. S.-antigen wheal.

Fig. 2 Histogram of the number of the individuals in endemic area of paragonimiasis classified by the difference of the diameter of wheal caused by intradermal injection of V.B.S.-antigen and dialyzed V.B.S.-antigen.

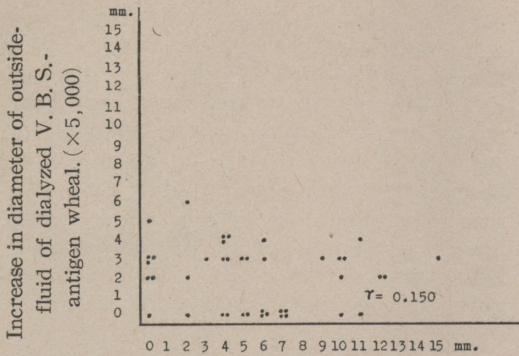
以上透析により、反応の大きさは多少小さくなる事は認められたが、全体として皮内反応活性物質は殆ど失はれていないことが明かにされた。

2) 透析外液と V. B. S. 抗原との比較：

前実験により、V. B. S. 抗原の活性物質はセロファン膜透析を行つても、透析内液の抗原性には変化がないことが明かになったが、念の為に、透析外液に抗原性物質の移行があるかどうかを検討してみた。即ち透析外液乾燥物質の5,000倍稀釈液及び対照として V. B. S. 抗原を用いて、41名の肺吸虫症流行地の被験者に皮内反応を実施し、両者の比較を試みた。その結果は Fig. 3 の相関が示している如く、両者の相関係数  $r=0.157$ 、 $P=0$  として t 検定した場合の P は 20%以上で両者の間には全く相関はみられないと云える。更に透析外液の 1,000倍液を用いた場合の相関図が Fig. 4 に示してあるが、この場合も  $r=0.137$   $P=0$  としての t 検定法による P は 50%以上で両者の相関は全くみられなかった。

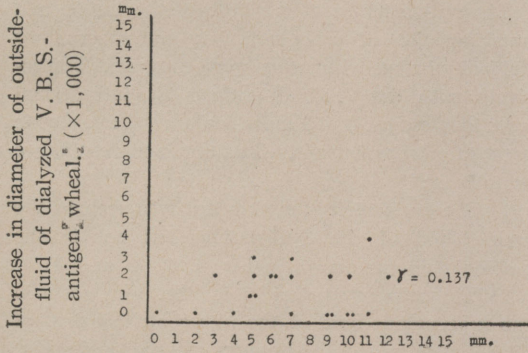


以上の成績からも V. B. S. 抗原の活性物質は、セロファン膜を透過しないことが明かにされた。



Increase in diameter of V.B.S.-antigen wheal.

Fig. 3 Correlation of the Results of the intradermal test with the V.B.S.-antigen and the outside-fluid of the dialyzed V.B.S.-antigen. ( $\times 5,000$ ).



Increase in diameter of V.B.S.-antigen wheal.

Fig. 4 Correlation of the results of the intradermal test with the V. B. S.-antigen and the outside-fluid of the dialyzed V.B.S. antigen. ( $\times 1,000$ )

3) Spinco 遠心上清と V. B. S. 抗原との比較：

Spinco 遠心上清と V. B. S. 抗原の両者を肺吸虫症流行地の73名の被験者に実施し、両種抗原による腫脹差を比較したのが Fig. 5である。即ち両者の相関係数は  $r = 0.915$ ,  $\sigma_r = 0.054$  で強い相関々係を示していることが明となった。

次に被験者の個人別に対する両種抗原の腫脹の大きさを比較してみると、Fig. 6の如く Spinco 遠心上清抗原

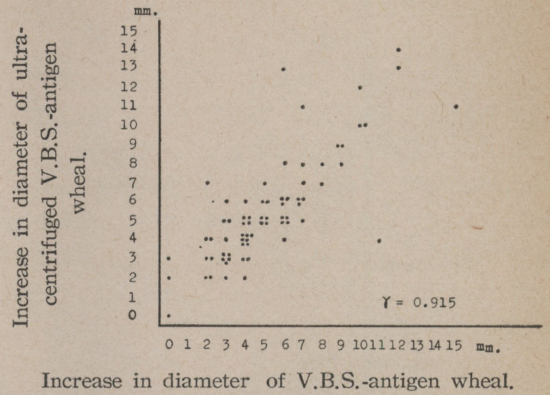


Fig. 5 Correlation of the results of the intradermal test with the V. B. S.-antigen and the ultracentrifuged V. B. S.-antigen. (Supernatant, 30,000 r.p.m. for 30 m.)

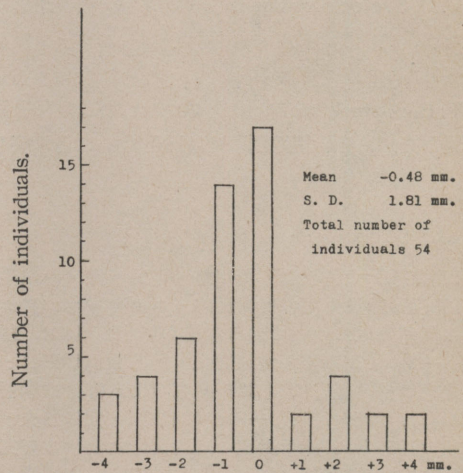


Fig. 6 Histogram of the numbers of the individuals in endemic area, of paragonimiasis classified by the difference of the diameter of wheal caused by intradermal injection of V.B.S.-antigen and ultracentrifuged V.B.S.-antigen.

Fig. 6 Histogram of the numbers of the individuals in endemic area, of paragonimiasis classified by the difference of the diameter of wheal caused by intradermal injection of V.B.S.-antigen and ultracentrifuged V.B.S.-antigen.

の方が、V. B. S. 抗原に比較して平均 $-0.48m$  ( $S \cdot D = 1.81mm$ ) 小さく出るようである。然しこれは5%以下の危険率では有意の差は認められなかつた。以上の成績から V. S. P. 抗原の活性物質は Spinco による遠



心沈澱では殆ど影響を受けないと云える。

### 考 察

以上の実験成績から肺吸虫症の皮内反応抗原の活性因子は非透析性であり、又30,000回転30分間の超遠心沈澱を行つても活性物質は沈澱しないことが明かとなつた。

以上の諸事実は、抗原の分画或いは精製の研究を行うに際して、その精製過程において透析或いは、超遠心沈澱等の諸操作を行つても、皮内反応抗原の活性物質は失われないと云う根拠を示したもので、今後この方面の諸研究に大きな進歩をもたらすものと考えられる。

又皮内反応抗原の活性因子が、30,000 廻転 (5~8  $\times 10^4 G$ )、30分間では沈澱しないと云うこと及び、セロファン膜を透過し得ないと云う事実は皮内反応抗原の活性因子の本態の追求、特にその大きさを推定する上の一つの重要な参考資料となると思われる。

### 結 論

1) V. B. S.-stock antigen をセロファン膜を用いて透析したが、皮内反応抗原の活性因子はセロファン膜を殆ど通過しないことを明かにした。

2) V. B. S.-stock antigen を30,000 廻転、30分間超遠心沈澱したが、その活性因子は沈澱しないことを明かにした。

### 文 献

- 1) 横川宗雄・大島智夫・須川豊・平野多聞・中川晃子 (1955) : 肺吸虫症の皮内反応 : スクリーニングテストの実用価値について, 日本医事新報, 1634, 19~23. —2) 横川宗雄・大島智夫・勝呂毅 (1955a) : 肺吸虫症の皮内反応に関する研究 (I) 寄生虫学雑誌, 4 (3), 276~281. —3) 横川宗雄・大島智夫・勝呂毅 (1955 b) : 肺吸虫症の皮内反応に関する研究 (II), 寄生虫学雑誌, 4 (3), 282~287 : —4) 横川

宗雄・吉村裕之・大島智夫・木畑美知江 (1957) : 肺吸虫症の皮内反応に関する研究 (III), Passive-Transfer (P-K, Reaction) に関する実験, 寄生虫学雑誌, 6 (5), 449~457. —5) 横川宗雄 (1956) : 肺吸虫症の皮内反応, 補体結合反応及び凝集反応 (Rapid Flocculation Test) について, 臨床病理, 4 (3), 224~230. —6) 横川宗雄・栗野林 (1956) : 肺吸虫症の補体結合反応, 皮内反応と補体結合反応との関係, 日本医事新報, 1703, 27~35. —7) Chaffee, E. F., Bauman, P. B. & Shapiro, J. T. (1954) : Diagnosis of schistosomiasis by complement fixation. Amer. Jour. Trop. Med. Hyg., 3 (6), 905~913. —8) Kabat, E. A. & Mayer, M. M. (1948) : Experimental Immunochemistry. Charles C. Thomas.

### Summary

Analysis of the antigenicity of the V. B. S.-antigen for skin test of paragonimiasis were conducted by the methods of dialysis using cellophane membrane and ultracentrifugation. The V. B. S.-antigen used in these experiments was prepared from the adults of *Paragonimus westermani* by the method of Chaffee (1954).

The antigenicities of the both of the inside and outside fluids of cellophane bag and supernatant fluid of ultracentrifugation were compared respectively with the V. B. S.-antigen by intradermal injections on the 1,473 individuals in the endemic area of paragonimiasis. The obtained results are as follows :

- 1) The antigenicity for skin test was seen in the inside fluid of the dialysis bag, but not in the outside fluid, as shown in Fig. 1, 2, 3, and 4.
- 2) The antigenicity for skin test was seen in the supernatant fluid of the ultracentrifugation of 30,000 r. p. m. for 30 minutes as shown in Fig. 5. and was not seen in the sediment.