

肺吸虫症の皮内反応に関する研究

V. 石炭酸分画法による各分画特に多糖体分画の抗原性について

横川 宗雄*

千葉大学医学部寄生虫学教室

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 13 日受領)

まえがき

著者等は第 IV 報において、肺吸虫症の皮内反応の V. B. S. 抗原の活性因子はセロファン膜を透過しないこと及び、30,000 回転 30 分間の超遠心沈澱では沈澱しないことを明らかにした。

本篇では肺吸虫成虫 (ウエエステルマン肺吸虫, *Paragonimus westermani*) 乾燥虫体から、石炭酸抽出法により得られた 2 つの分画即ち石炭酸不溶部分 (多糖体分画) と石炭酸可溶部分 (蛋白体分画) の 2 種の抗原を用いて肺吸虫症流行地の集団に皮内反応を実施し、その抗原性について検討した。その結果は後者の蛋白分画抗原には V. B. S 抗原 (横川ら, 1955) 註 1 と略々同様な抗原性が認められたが、前者の多糖体分画には、皮内反応の活性因子は証明出来なかつた。以下その成績について報告する。尙著者等がこゝに用いた石炭酸抽出法では蛋白部分は殆んど溶解され、多糖体部分是不溶解部分として残るので両者の分離が比較的容易で、多糖体の精製法としてはすぐれたものとされている。然し蛋白体の精製法としては必ずしもすぐれたものとは云えないので、著者等も蛋白体分画法としては、別の方法により検討しているので、本篇では主として多糖体分画における皮内反応の抗原性の有無についての検討に重点をおいた。

実験方法

石炭酸抽出法:

石炭酸抽出法としては主として Palmer 及び Gerlough (1940) の方法によつたが、Mayer (1955) 註 2 の肺炎双

* MUNEO YOKOGAWA & ** TOMOO OSHIMA : Intradermal test for paragonimiasis. V. Analysis of the antigenicity of the V. B. S. antigen (Veronal Buffered Saline extract of adults of *P. westermani*) with phenol method. (*Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba University & **Division of Parasitology, Institute of Public Health, Tokyo.)

球菌の多糖体製法をも参照した。

虫体乾燥粉末 564 mg に 10 cc の冷エチル・エーテルを加え -10°C で 10 分間 tissue grinder で磨砕した後遠心沈澱し上清を凍結乾燥し 553 mg の虫体乾燥粉末を得た。これに蒸溜精製した 90% 石炭酸 10 cc を加え 24 時間室温で振盪器にかけて抽出後、5,000 回転 20 分間遠心沈澱しその上清 (石炭酸可溶部分) と、沈澱物 (石炭酸不溶部分) とに分ける操作を 2 回反復した。以下は Table に示す如くである。

沈澱物 (石炭酸不溶部分):

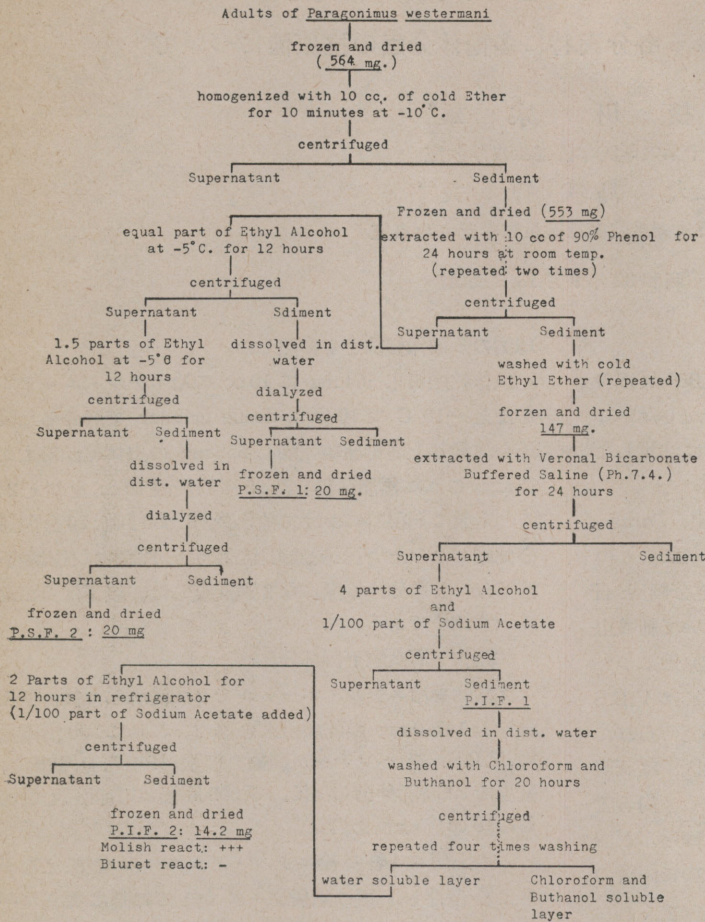
沈澱物を冷エチル・エーテルで 2 回洗滌した後、減圧乾燥し 147.0 mg の乾燥粉末を得た。これに 200 倍重量の V. B. S. 液 (ペロナール緩衝食塩水) (Ph 7.4) を加え、室温で 24 時間抽出した後、5,000 回転 20 分間遠心沈澱し、18 cc の上清を得た。

この上清に 4 容の冷エチル・アルコールを加えながらよく攪拌し、更に醋酸ソーダを 1% の割に加えて一夜低温に放置し、その沈澱物を取り、20 cc の蒸溜水に溶解させた。本溶液は、Biuret 反応土、Molish 反応卅を呈し、10 倍稀釈液の紫外線吸収をみると 250~260 μ に強い吸収帯が認められた。(Fig. 1 : a) 即ち本溶液には尙少量の蛋白部分が含まれていることが明らかとなつたので更に本溶液 16 cc に蒸溜水 14 cc, クロロホルム 10 cc 及びブタノール 2 cc を加え振盪器に 20 時間かけて蛋白部分を除去しようと試みた。この混合液を遠心沈澱するときは、クロロホルム及びブタノール層と水溶液との間に薄い白色の中間層が現われるが、この薄い白色の中間層がみられなくなる迄、尙反復クロロホルムと

註 1 Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health における Microbiology の実習教材 (1953) による。

註 2 肺吸虫 (成虫) の乾燥虫体をエーテル処理後ペロナール緩衝生理食塩水で抽出する。

Table 1 Method of fractionation with phenol



ブタノールで前回と同様の操作で洗滌することが必要である。即ち2回反復洗滌したものでは Fig. 1 の b における如く尚 250~260 m μ に吸収帯がみられる。そこで更に2回反復洗滌し、最後の水溶部分に2容の冷エチルアルコールと1%の割に醋酸ソーダを加え一夜低温に放置した後遠心沈澱し、その沈澱物を凍結乾燥した結果14.2 mg の乾燥粉末を得た。本物質は Molish 反応 \oplus , Buret 反応は陰性であった。然し紫外線吸収では Fig. 1 の c の如く 250~260 m μ に吸収帯が僅かに認められた。従つて本物質は尚極めて少量の蛋白質が含まれてはいるが、多糖体がその主成分であると考えられる。

上清 (石炭酸可溶部分) :

蛋白質の精製には Morgan 及び King (1943) 及び久保田 (1955) の方法を参照した。上清にこれと等量のエチルアルコールを加えて沈澱をおこさせ、これを50%沈

澱物とした。この際の上清に更に1.5倍量のエチルアルコールを加えて再び沈澱をおこさせ、これを50~80%沈澱物とした。この各々の沈澱物を蒸留水に溶解させ、それぞれの水溶部分をセロファン膜で透析した後凍結乾燥した。エチルアルコール50%沈澱物には石炭酸に可溶な多糖類も多少は含まれていると考えられるが、50~80%沈澱物は主として蛋白質よりなると考えられる。従つてこれらをさきの多糖体分画に対して蛋白質分画と考えた。

多糖体分画と蛋白質分画との抗原性の比較 :

抗原性の比較には少くとも10名以上からなる V.B.S. 抗原による肺吸虫症皮内反応陽性者群或いは陰性者群について行つた。即ち V.B.S. 抗原及び試験抗原を被験者の同側の上膊屈側部の皮内に同一量宛 (0.01~0.02 cc) 注射し、直後及び15分後のそれぞれの腫脹の大きさを計測して、その腫脹差をとり、その相関関係を検討した。即ち相関係数並びに ρ_0 とした場合の仮説棄却の危険率をもとにして吟味した。

V.B.S. 抗原は抽出前の乾燥虫体重量の1万倍稀釈液を使用しているが、各分画抗原の濃度については未だその基準とす

べきものがないので、先ずその乾燥重量の1万倍の稀釈液における抗原性を検討し、本濃度で活性のみられない場合は更に乾燥重量の1,000倍稀釈液を試みた。

実験成績

1) 多糖体分画抗原 (石炭酸不溶部分) と V.B.S. 抗原の比較 :

多糖体分画の1万倍稀釈液と V.B.S. 1万倍稀釈抗原とを肺吸虫症流行地の小中学生135名の被験者の同側の上膊屈側部の皮内に注射し、15分後のそれぞれの腫脹差をとつて、その相関関係を調べた。その結果は Fig. 2 にみられる如く、多糖体分画抗原と V.B.S. 抗原との間に相関は認められなかつた。多糖体抗原の濃度を高くし1,000倍稀釈液を用いても Fig. 3 に示す如く V.B.S. 抗原との相関は全く認められなかつた。このことは Fig. 4 の如く、V.B.S. 抗原と1万倍稀釈多糖体分画抗

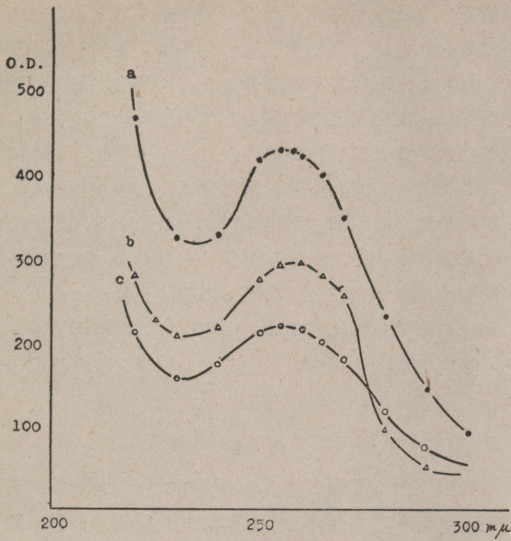


Fig. 1 Ultraviolet absorption curves of phenol soluble substance of *Paragonimus westermani*
 a —●—●— P. I. F. 1
 b —△—△— washed two times with chloroform and buthanol
 c —○—○— P. I. F. 2 washed four times with chloroform and buthanol

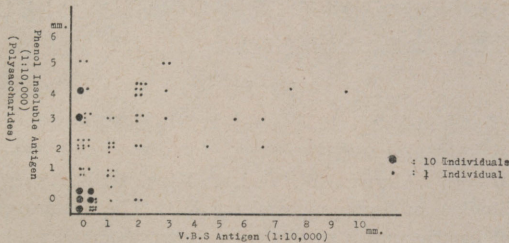


Fig. 2 Comparison of the increase of the diameters of the wheals caused by intradermal injections of V. B. S. antigen and phenol insoluble antigen.

原、及び 1,000 倍稀釈多糖体分画抗原による反応結果を腫脹差別に頻度分布をとると尙明らかになる。即ち V. B. S. 抗原では既に報告した如く、特異反応と非特異反応を呈する群のあることが、2 峰性を呈することにより証明されるが、多糖体抗原では 1,000 倍稀釈液でも 10,000 倍稀釈液でも、この 2 峰性の曲線は全く認められない。従つて石炭酸不溶部分より精製した多糖体分画には肺吸虫症皮内反応の活性因子は全く含まれていないと云える。

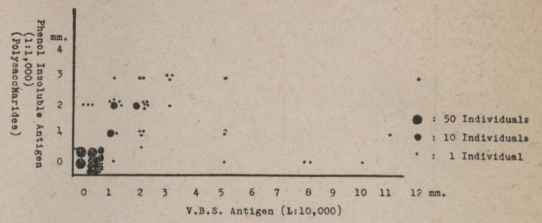


Fig. 3 Comparison of the increase of the diameters of the wheals caused by intradermal injections of V. B. S. antigen and phenol insoluble antigen.

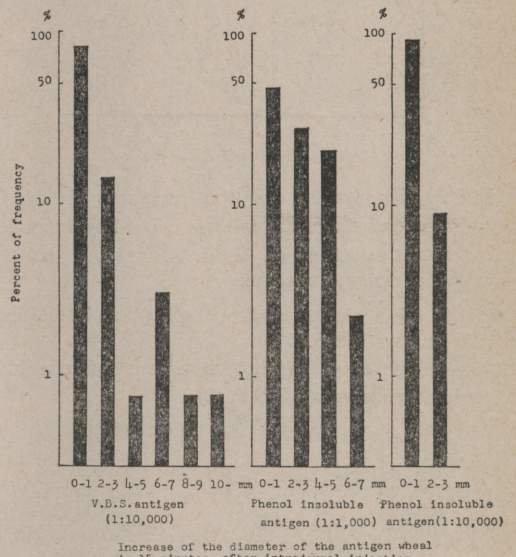


Fig. 4 Comparison of the increase of the diameters of the wheals caused by intradermal injections of the three kinds of antigen on the 581 individuals in the endemic areas of paragonimiasis Takata city, Niigata Prefecture, Japan.

石炭酸可溶部分(蛋白質分画)と V. B. S. 抗原の比較：
 石炭酸可溶部分をエチル・アルコールで沈澱させた 50% 沈澱物と 50%~80% 沈澱物の 1 万倍稀釈液を作製しこれらの抗原と V. B. S. 抗原の 1 万倍稀釈液とを、前回と同様流行地の被験者 18 名の皮内に注射し、その腫脹差を比較した。その結果は Fig. 5 に示す如く 50% 沈澱物及び 50~80% 沈澱物共に V. B. S. 抗原と強い相関関係のあることが明らかにされた。即ち V. B. S. 抗原による反応陽性者とそれぞれの抗原との相関関係数及び ρ_0 と仮定したときのそれぞれの危険率を計算すると、

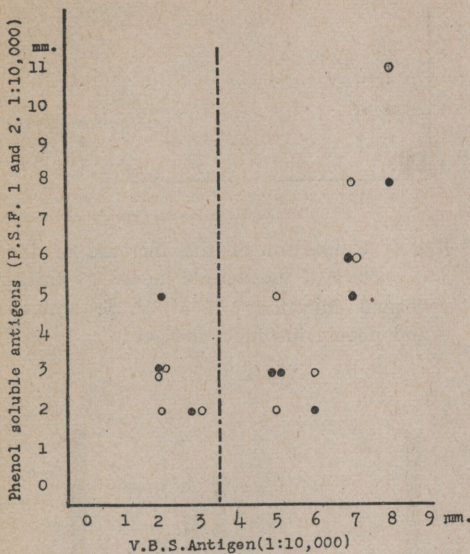


Fig. 5 Comparison of the increase of the diameters of the wheals caused by intradermal injection of V. B. S. antigen and phenol soluble antigen.

- 50% ethyl alcohol sediment of phenol soluble substance (P.S.F. 1)
- 50—80% ethyl alcohol sediment of phenol soluble substance (P.S.F. 2)

50%沈澱物 $\gamma: 0.78$ 50~80%沈澱物 0.84

危険率: $\Pr\{t > 2,132\} = 0.10$ $\Pr\{t > 3,182\} = 0.05$ となり、何れも V.B.S. 抗原との強い相関があることが分るが、50~80%沈澱物の方が50%沈澱物より更に V. B.S. 抗原と強い相関を示すと云える。

考察

菌体或いは虫体の多糖体抽出法としては、その目的やその性状に応じて、三塩化醋酸、石炭酸、尿素、グリシン、ヂエチレングリコール、ホルマリン等を用いる方法或いは加熱法等があり、Per Oeding (1954) はこれらの方法を詳しく比較検討している。

著者らが石炭酸分画法を選んだ理由は原材料が比較的少量であつたこと、及び前述した如く石炭酸は蛋白部分を殆んど溶解し、多糖体は不溶解部分として残るので、両者の分離が比較的容易であると言う点にある。然し本法は多糖体の精製には秀れた方法でも蛋白分画法としては蛋白体が石炭酸により或る程度変性を受けるおそれのあること及び蛋白体をアルコールにより沈澱せしめるときその大部分がゴム状の沈澱物としてあらわれ、不溶性な

状態となり収量が少なくなるので、必ずしも適当な方法とは思われない。然し本実験の結果は、著者らが予想していた如く、石炭酸不溶部分よりの精製分画即ち多糖体分画には、皮内反応の抗原としての活性因子は全く含まれていないことが明らかにされたことは興味ある点である。これに反して石炭酸可溶部分よりのアルコールによる精製分画では、50%沈澱物及び50~80%沈澱物の何れにも活性因子のあることが認められたが、特に50~80%沈澱物の方が V.B.S. 抗原との相関が強かつた。

以上の事実から肺吸虫症の皮内反応の活性因子は、恐らく蛋白体或いは蛋白質を主とした物質よりなるものと考えて間違いないと思われる。

結論

肺吸虫成虫の乾燥虫体から石炭酸抽出法を行い、石炭酸可溶部と、不溶部分とから精製した物質、即ち多糖体分画抗体と蛋白体分画抗原とを用いて多数の肺吸虫症流行地の被験者に皮内反応を実施し、その抗原性について V.B.S. 抗原と比較した結果次のことが明らかとなつた。

- 1) 石炭酸不溶部分、即ち多糖体を主成分とする物質には皮内反応の活性因子はみとめられなかつた。
- 2) 石炭酸可溶部分、即ち蛋白自体よりなると考えられる分画には、V.B.S. 抗原と強い相関関係がみられた。即ち皮内反応の活性因子は蛋白体或いは蛋白質を主とした物質よりなることが明らかとなつた。

文献

- 1) 久保田憲太郎 (1955) : 破傷風菌培養濾液中の非毒素性耐熱成分の本態について. アレルギー, 4, 29-37. —2) Morgan, W. T. J. & King, H. K. (1943) Studies in Immunochemistry VII) The isolation of gastric mucin of the polysaccharide-amino acid Complex possessing blood group A Specificity. Biochem. J., 37, 640-651. —3) Palmer, J. W. and Gerlough, T.D.: A simple method for preparing antigenic substance from the typhoid bacillus. Science, 92, 155-156. —4) Per Oeding (1954) : Immunochemical study of staphylococcal Polysaccharide. 1) Method for extraction and Purification. Acta Path. et microbiol. Scandinav., 35, 484-494. —5) 横川宗雄 (1956) : 肺吸虫のアレルギー, 寄生虫学雑誌, 5(2), 298-299. —6) 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について, 臨床病理, 4(3), 224-230. —7) 横川宗雄, 大島智夫, 勝呂毅 (1955) : 肺吸虫の皮内反応に関する研究 (I) 及び (II), 寄生虫学雑誌, 4(3), 276-281 及び 282-289. —8) 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)

人体における Pransnitz-Küstner に関する実験, 寄生虫学雑誌, 6(5), 449-457. —9) 横川宗雄, 大島智夫 (1956): 肺吸虫の皮内反応に関する研究, 各種分画抗原の比較, 第 16 回日本寄生虫学東日本支部大会記事, 8-9. —10) 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. —11) 横川宗雄, 栗野林 (1956): 肺吸虫症の補体結合反応, 日本医事新報, 1703, 27-35. —12) 横川宗雄, 大島智夫 (1957): 肺吸虫症の皮内反応に関する研究 (IV). V.B.S. 抗原の透析及び超遠心処理, 寄生虫学雑誌, 7(2), 131-134.

Summary

Polysaccharide (Phenol insoluble) and protein (Phenol soluble) antigens were prepared from the adults of *Paragonimus westermani* by Palmer and Gerlough's Phenol method as shown in Table 1.

The antigenicities of the both of the antigens were compared respectively with those of the V.B.S. antigen by intradermal injection on the individuals in the endemic area of paragonimiasis. The antigenicity for skin test was found in the phenol soluble substances (Protein Antigen), P.S.F. 1 and P.S.F. 2, as shown in Fig. 5, but not found in the phenol insoluble substance (Polysaccharide antigen), P.I.F. 2 as shown in Fig. 2, 3, and 4.