

肺吸虫症の皮内反応に関する研究

(VI) 硫安および低温メタノール分画法による 蛋白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

(昭和33年8月1日受領)

まえがき

著者等は第Ⅱ報(横川・他:1955)において肺吸虫症の皮内反応抗原(V.B.S. 抗原)(註1.)は耐熱性であり、長期の保存に耐えることからきわめて安定なものであることを報告した。第Ⅳ報(横川・大島:1958)では、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超遠心3万回転30分間では沈澱しないことを報告した。更に第Ⅴ報(横川・大島:1958)においては、石炭酸分画法により本抗原の活性因子は石炭酸不溶部分即ち多糖体分画には証明されず、石炭酸可溶部分、即ち蛋白分画、に強い活性物質のあることを報告し、肺吸虫症の皮内反応の活性因子は、蛋白質或いは蛋白質を主体とした物質よりなるしことを明かにした。

然し前回用いた石炭酸法は蛋白部分の分別法としては必ずしもすぐれた方法とは云えないので、本実験では、硫安分画法および低温メタノール分画法により得られた蛋白分画抗原を用いて、肺吸虫症流行地の集団に皮内反応を実施し、V.B.S. 抗原との比較を試みた。

MUNEO YOKOGAWA* & TOMOO OSHIMA** :

Intradermal test for paragonimiasis (VI) Analysis of the antigenicity of the V.B.S. antigen with ammonium sulfate and cold methanol fractionation. (*Department of Parasitology, School of medicine, Chiba University, **Division of Parasitology Institute of Public Health, Tokyo)

(註1.) ウェステルマン肺吸虫成虫のペロナル緩衝食塩水抽出抗原

(註2.) 乾燥虫体よりエーテル可溶性物質を除いた後、Veronal Bufferd Saline を用いて抽出し、最初の乾燥重量の100倍稀釈液としたもの。

実験材料及び実験方法

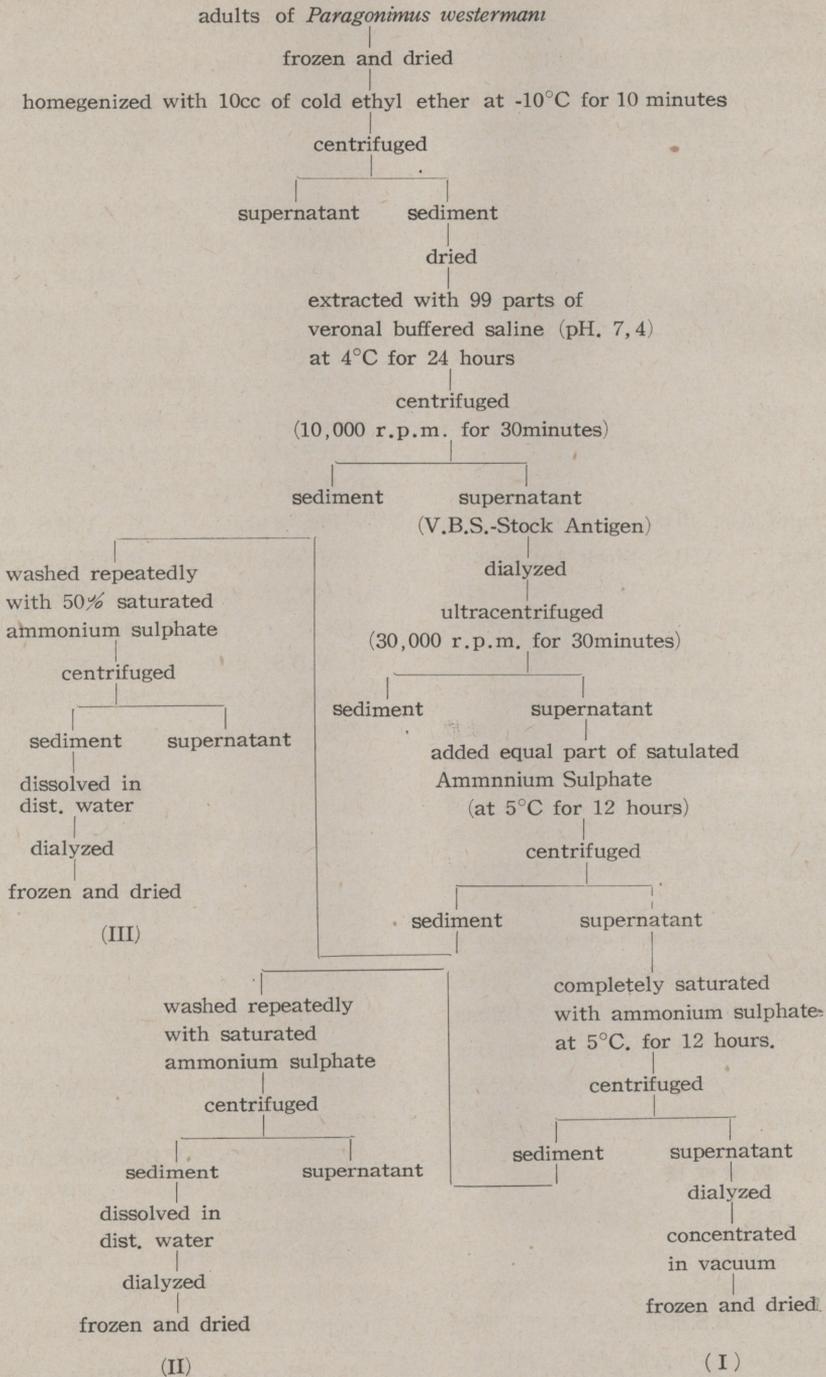
乾燥虫体：ウェステルマン肺吸虫メタセルカリアをイヌ或いはネコに与えて、6ヶ月以上経過してから剖見し、その肺臓より無菌的に成虫を採取し、これを凍結乾燥した。

i) 硫安分画法

乾燥虫体 469mg よりV.B.S. 抗原作製法に従い、V.B. S.-Stock Antigen (註2.) 47ccを得、この中の36ccを以下の実験に用いた。

まず、V.B.S. 原液中の塩類を除去するため透析を行った。即ち、紫外線照射せるセロファン膜により5°Cにおいて、外液としてpH 7.0の蒸留水2lを1日3回交換して透析した。この透析内液を3万回転、30分間Spincoにより遠心し、その遠心上清29ccを直接分別の原材料とした。硫安分別法はTable 1のように型の如く行つた。硫安はその800grを1lの蒸留水に加熱溶解せしめて、たぎちに濾過し、一応中性で塩析するためアンモニアでpHを修正してpH 7.0とし、放置冷却せしめて結晶の析出するのを確かめ、その上清を飽和溶液として使用した。先ず等量の飽和硫安液を加え、1夜5°Cに放置し、遠心して上清と沈澱物とにわけた。沈澱物は更に数回半飽和硫安液に浮遊させて遠心洗滌する操作をくり返した後、最後に少量の中性蒸留水に溶かし、中性の蒸留水を用いてセロファン膜による透析を行った。即ち内液および外液から5%塩化バリウムにより硫酸イオンが検出できなくなるまで1日数回外液を交換して透析を続けた。透析終了後透析内液を凍結乾燥し、黒褐色粉末18.3mgを得た。これを硫安半飽和沈澱物とした(Table 1. の(III))。

Table 1. Method of fractionation with ammonium sulphate



次に最初の上清に結晶硫酸を一定量加えて飽和せしめ、5°Cにて1夜放置して遠心し、上清と沈澱物に分けた。沈澱物は飽和硫酸液にて数回洗滌後、少量の中性蒸留水に溶かし、半飽和沈澱物同様に透析後凍結乾燥して茶褐色の粉末11.1mgを得た。これを半飽和—全飽和沈澱とした〔Table 1. の(II)〕。最後に得られた飽和硫酸の上清99ccは、大量の中性蒸留水に対しセロファン膜により透析し、内液の硫酸濃度が0.1%以下となったことを硫酸バリウムで確認するまで外液を交換し、内液188ccを得た。この内液60ccを40~50°Cにて減圧濃縮して1.5ccとし、これを凍結乾燥して白色粉末15.0mgを得てこれを飽和硫酸上清に移行した成分とした〔Table 1. の(I)〕。

以上の分画された物質のうち、半飽和沈澱物は比較的等電点が高く、pH 5.8で殆んど沈澱した。

ii) 低温メタノール分画法

主として Pillemer (1946, 1949) の方法を参照した。凍結乾燥虫体 616mg より V.B.S.-Stock Antigen 61cc を得てこれを分別の原材料とした。操作はすべて、温度-5°Cの冷凍室および冷凍遠心器によつて-5°Cで行つた。pHは一応7.2~7.4に調製し、低等電点による沈澱を防いだ。先ずメタノールをV.B.S.原液を攪拌しつつ徐々に滴下し、所定の濃度に達したら、一夜そのまま放置した後遠心沈澱して上清と沈澱物に分け、上清は更にメタノールを一定量加えた後、前回と同様にして、上清と沈澱物に分ける。本操作をくり返して、メタノールの種々の濃度による沈澱物を得た。沈澱物はたぎちに凍結乾燥した。

以上の操作によりメタノール濃度0~30%沈澱物として淡黄色微粉末163.7mg, 30~45%沈澱物として淡緑色微粉末10mg, 45~60%沈澱物として黄緑色微粉末20mg, 60~80%沈澱物として褐色船状物質30mg計223.7mgの沈澱を得た。従つてメタノールによる沈澱物の大部分はメタノール濃度30%以下で得られたことになる。

実験成績

各種分画抗原とV.B.S.抗原との比較

i) 硫酸分画抗原とV.B.S.抗原との比較

皮内反応の抗原性の比較はこれまでの実験と同様に肺吸虫症流行地において、V.B.S.抗原による皮内反応陽性で虫卵も陽性の者に対しこれら各種の抗原の稀釈液とV.B.S.抗原とを同時に同側の上膊屈側部に皮内注射し、15分後の腫脹差について比較した。即ち半飽和沈澱物お

よび半飽和—全飽和沈澱物は乾燥重量の1万倍稀釈液を、飽和硫酸の上清は乾燥重量の1千倍稀釈液を抗原として70名の肺吸虫症患者に皮内反応を行った。その結果はFig. 1~Fig. 4に示した如くであつた。

即ち硫酸による沈澱物とV.B.S.抗原による腫脹差を比較すると、その相関係数は半飽和沈澱では $r=0.58$ 、半—全飽和沈澱では $r=0.47$ で何れもV.B.S.抗原のそれと有意の相関が認められた。半飽和沈澱物と半—全飽和沈澱物との両者の間にも同様な有意の相関が見られた($r=0.64$)。然し乍ら全飽和硫酸の上清を用いた抗原では $r=0.265$ で有意の相関は認められなかつた。

ii) 低温メタノール分画

メタノールの各種濃度別沈澱物は、すべて生食水により乾燥重量の10万倍に稀釈したものを抗原として、1万倍V.B.S.抗原との抗原性を比較した。被検者は矢張り前回同様肺吸虫症流行地の学童であつた。その結果はFig. 5~Fig. 8に示した。即ちV.B.S.抗原とメタノールの各種濃度の沈澱物よりの抗原との相関係数は、0~30%沈澱物： $r=0.78$ 、30~45%沈澱物： $r=0.60$ 、45~60%沈澱物： $r=0.69$ 、60~80%沈澱物： $r=0.71$ となり何れもV.B.S.と強い相関を示すことが明かとなつた。然も各種メタノール濃度別抗原相互には、著しい抗原性の差異は認められなかつた。

考 察

以上の成績から、まず飽和硫酸の上清には皮内反応抗原としての活性因子は移行しないことが明かとなつたが、これは本上清への移行物質は通常多糖体分画であるとされていることを考えれば当然のことと云えよう。又硫酸或いはメタノールによる沈澱物に活性因子の認められたことは、肺吸虫症皮内反応の活性因子が蛋白分画にあることを明かにしたもので、これは第V報において石炭酸分画法で石炭酸可溶部分即ち、蛋白分画にあることを明かにした成績と一致している。然し、蛋白分画法として原材料であるV.B.S.-Stock Antigenからの最終分画の収量を比較してみると、石炭酸分画法では、原材料55ccより34.2mg、硫酸分画法では36ccより44.4mg、メタノール分画法では61ccより223.7mgとなり(註)、石炭酸分画法に比較して、硫酸及びメタノール分画は収量の点ではきわめて良好なことを示している。

(註) 収量の点から見れば30%メタノール沈澱は全沈澱の72%をしめ、しかも相関係数も10万倍で $r=0.78$ で最も高いから最も多く活性物質を含むことになる。

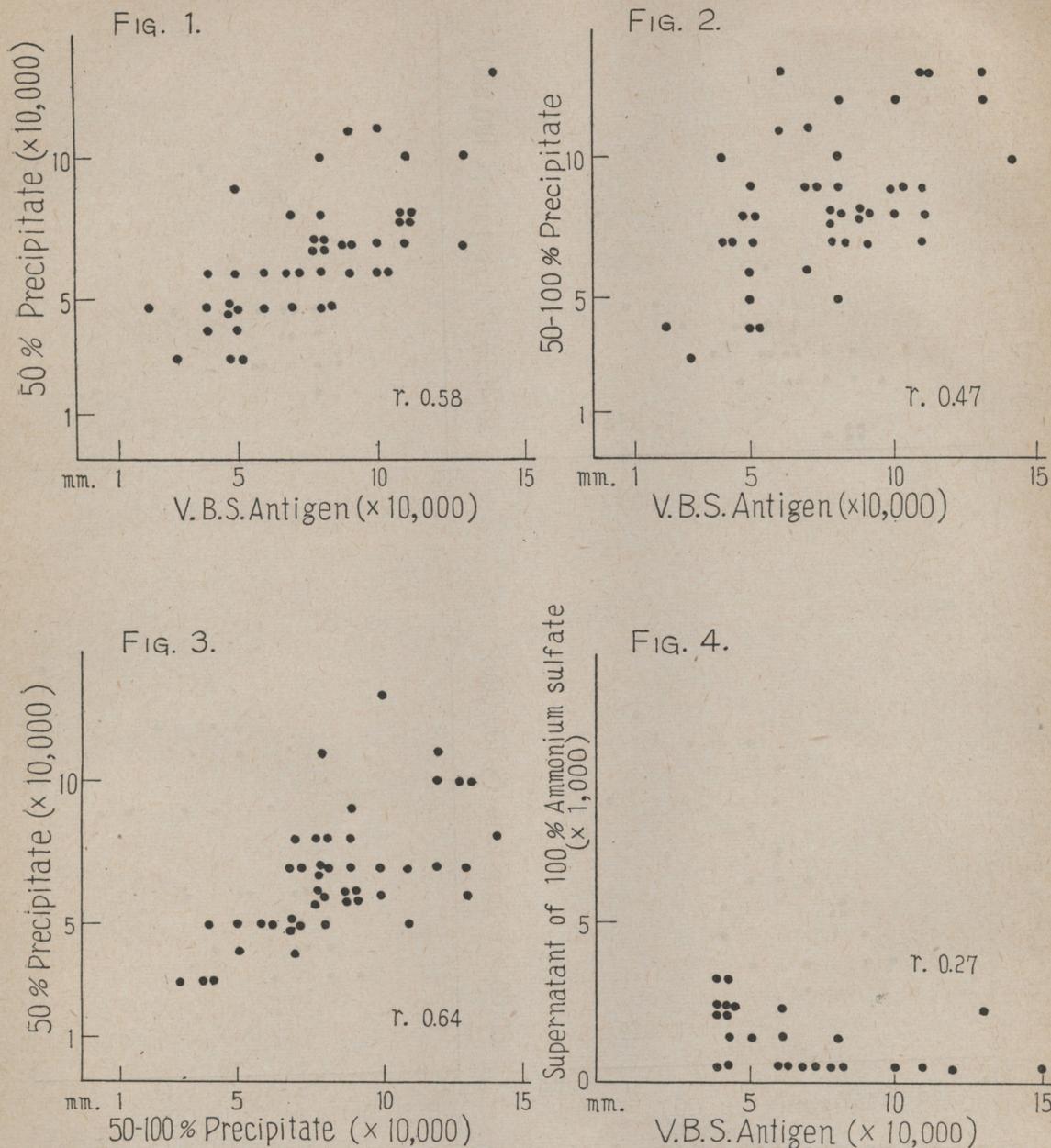


Fig. 1-4 Comparison of the activities of ammonium sulfate fractionated antigens with crude antigen (V.B.S.-antigen) comparing the increase of diameter of wheal on the same individuals of positive skin test

なお本実験で硫酸及びメタノール各濃度別に得られた各分画にはその何れにも皮内反応活性因子が同じ様に認められたことは極めて興味深い。このことは本皮内反応

抗原の活性因子が蛋白に無差別的に結合しているものか、またはこの方法で分別しえない低分子の蛋白であると、想像される。これはさらに他の蛋白分別法、例えば

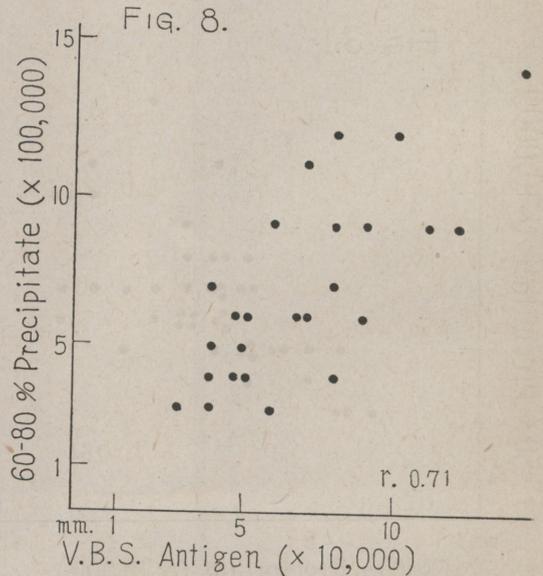
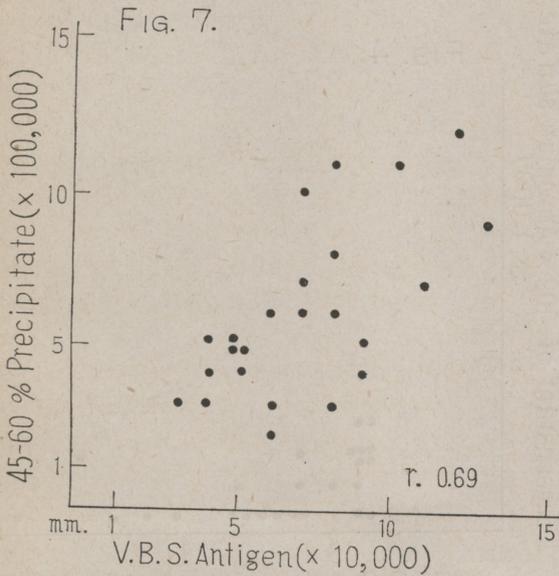
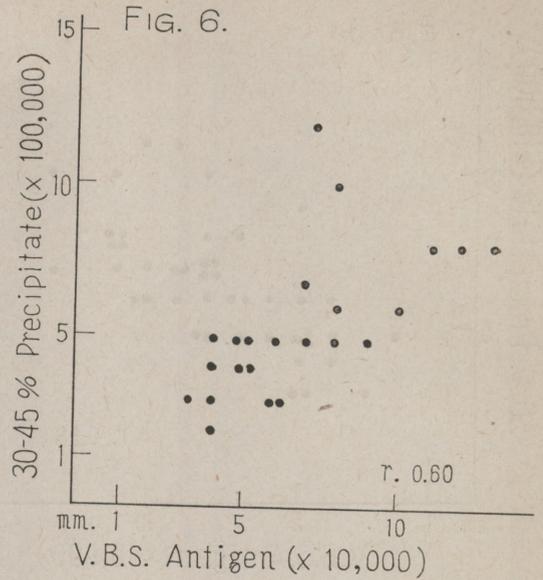
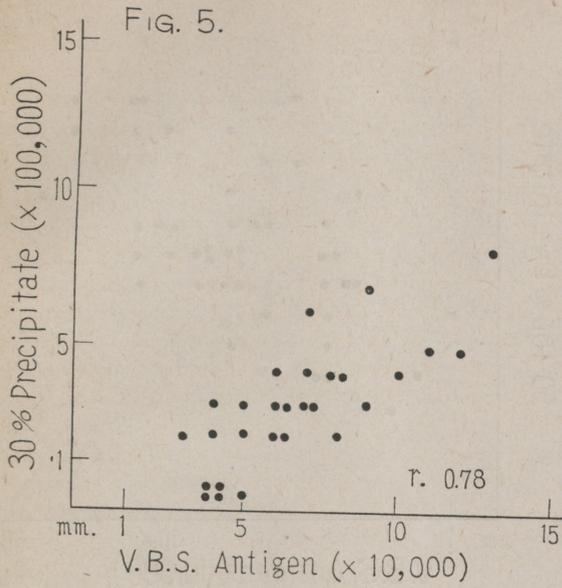


Fig. 5-8 Comparison of the activities of cold metanol fractionated antigens with crude antigen (V.B.S.-antigen) comparing the increase of diameter of wheal on the individuals of positive skin test

電気泳動法、クロマトグラフ法、吸着法、溶剤法などで種々の角度から検討した上で明かにしたい。なおこれまでの実験では皮内反応抗原の分析に当つて定性的な面からのみ検討したが、その活性因子が、蛋白分画に

あることが明かとなつたので、今後は定量的な面からも更に検討し、さらにその本態を明かにしたい。

結論

ウエステルマン肺吸虫成虫より作製した V.B.S.--Sto-

ck Antigen を硫酸および低温メタノールにより分別し、各種濃度別の分画抗原として肺吸虫症流行地の多数の患者に皮内反応を実施し、V.B.S. 抗原との抗原性の比較を試みた。その結果次のことが明かとなった。

1) 飽和硫酸の上清部分には皮内反応の活性因子は認められなかつた。

2) メタノールおよび硫酸分画には強い活性を認めたが、各濃度別の分画の活性に著差がなく、活性因子は蛋白に無差別に結合しているものか、または低分子の蛋白と思われる。

文 献

- 1) 横川宗雄・大島智夫・勝 呂毅 (1955): 肺吸虫症の皮内反応に関する研究 (I) 寄生虫学雑誌, 4 (3), 282-289. —2) 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) 抗原の透析および超遠心処理, 寄生虫学雑誌, 7 (2), 131-134. —3) 横川宗雄・大島智夫 (1957): 肺吸虫症の皮内反応に関する研究, (V) 石炭酸分画法, 寄生虫誌 7

(4), 333-337. —4) Pillemeier, L. & Robins, K. C. (1949): Chemistry of Toxin Ann. Rev. Microbiol., 3, 265. —5) Pillemer, L., Wittler, R. G. & Grossberg, D. B. (1946): The isolation and crystallization of tetanal toxin, Science, 103, 615

summary

Analysis of the antigenicity of the V.B.S. antigen for intradermal reaction of paragonimiasis was carried out by the methods of ammonium sulfate and cold methanol fractionations. Active substances for skin reaction were precipitated by ammonium sulfate and no activity was found in the supernatant of ammonium sulfate saturated antigen. But it was difficult to find any difference in the activity between the precipitates of half saturated and half to complete saturated ammonium sulfate solution. All the four precipitates which were separated by adding cold methanol (0-30%, 30-45% 45-60% and 60-85%) showed undistinguishable activities of skin reaction.

寄 贈 文 献 目 録 (14) つづき

571. 磯田好康 (1958): 長野県 1 農村における全村駆虫に関する研究 第 1 編 鉤虫の予防撲滅対策について, 通信医学, 10 (3), 197-208.
572. 磯田好康 (1958): 長野県 1 農村における全村駆虫に関する研究 第 2 編 蛔虫の予防撲滅対策について, 通信医学, 10 (4), 308-313.
573. 内田昭夫 (1958): 農村における鉤虫および蛔虫の予防, 撲滅に関する研究 第 1 報 群馬県一農村部落における鉤虫撲滅の野外試験, 日本衛生学雑誌, 13 (4), 499-509.
574. 柳沢利喜雄・内田昭夫・荒木武雄・田畑猛行・近藤武男・熊谷中・大橋平治・大森謙三・熊谷睦・武田正治 (1958): 農村の寄生虫症—特に鉤虫症について—, 日本農村医学会雑誌, 7 (1), 29-44.
575. 本保秀一 (1958): 鉤虫卵の発育に関する知見補遺, 千葉医学会雑誌, 34 (2), 471-493.
576. 小宮義孝・小林昭夫・久津見晴彦・児玉威・原田文雄・武藤暢夫・柳沢利喜雄・矢島ふき・内田昭夫 (1958): いわゆる殺卵剤とくに二硫化炭素および揮発性芥子油の蛔虫卵殺滅効果の不安定性に関する研究, 日本公衛誌, 5 (2), 66-72.
577. 大野俊雄 (1958): 鉤虫卵及び東洋毛様線虫卵の培養法に関する研究, 千葉医学会雑誌, 34 (1), 71-85.
578. 大野俊雄 (1958): 鉤虫卵及び東洋毛様線虫卵の培養法に関する研究, 千葉医学会雑誌, 33 (6), 1285-1293.
579. 藤縄和聰 (1958): Stoll 氏の稀釈虫卵算定法に於ける鉤虫卵検出に関する研究 第 2 編 大試験管内鉤虫卵数の母平均値と標本平均値との関係について, 千葉医学会雑誌, 33 (5), 1078-1883.
580. 藤縄和聰 (1958): Stoll 氏の稀釈虫卵算定法に於ける鉤虫卵検出に関する研究 第 3 編 虫卵の検出洩れと検査回数について, 千葉医学会雑誌, 34 (2), 422-425.
581. 水野哲夫・本保秀一・方波見重兵衛・長井和行・平川勇 (1958): Dubini 鉤虫とイヌ鉤虫各仔虫の鑑別について, 医学と生物学, 47 (5), 195-198.
582. 梅谷勇一 (1958): 鉤虫 Carrier の循環器に関する研究 第 2 編 心臓実大像に就いて, 千葉医学会雑誌, 33 (5), 1048-1052.