

蛔虫駆虫効果判定に関する基礎的研究

(2) T. M. 反応の濾紙電気泳動法による抗原及び抗体の検討

岡 田 周 子

東京大学伝染病研究所附属病院 (北本治教授指導)

(昭和33年11月10日受領)

緒 言

T. M. 反応は糞便の酸熱処理濾液を抗原とし、豚蛔虫体腔液で免疫した家兎血清を抗体として行う沈降反応であるが、蛔虫寄生を考慮される人尿では、蛔虫卵の有無にかかわらず、可成り高率に陽性になることは、既に T. M. 反応(1)(岡田, 1959)において検討した。

この場合、家兎免疫血清の抗体価は、豚蛔虫体腔液を抗原とした沈降反応価をもつて算定しているが、豚蛔虫体腔液の抗原的要素は複雑で、人尿酸熱処理によつて得た抗原とはおのずから差がある事は想像される。

先に、越智(1957)は蛔虫体腔液と蛔虫飼育液について免疫学的追求を行い、体腔液中には酸、熱によつても沈澱しない抗原性をもつた蛋白分屑のあることを認め、かつ飼育液中にはこの蛋白分屑の他に、他の抗原性をもつた非蛋白性物質を得て、前者を体腔液型抗原、後者を飼育液型抗原と名づけた。

T. M. 反応における糞便酸熱処理抗原が、蛔虫体腔液抗原の中に存在する分屑であるとするれば、越智の所謂蛔虫体腔液型抗原によるものとなるし、又、蛔虫の新陳代謝産物によるものならば、蛔虫飼育液型抗原に由来するものであるかもしれない。

私は、濾紙電気泳動的に、蛔虫体腔液、飼育液および虫卵(+), T. M. 反応(+)の糞便について、原液および酸熱処理液を比較し、抗原的差異について検討すると共に、蛔虫体腔液免疫家兎血清の電気泳動的分屑上の抗体の所在についても実験したので、第1報につづいて

Kaneko OKADA: Fundamental studies on the anthelmintic effect on ascaris (2) Analysis by means of paper electrophoresis of the antigen and antibody of T. M. Reaction (Department of Clinical Research, Institute for Infectious Disease, University of Tokyo)

報告する。この点について検討することは、T. M. 反応を批判する上に意味があるものと考えられる。

実験方法

実験材料の作製

I. 体腔液の作製に新鮮な成熟雌豚蛔虫から体腔液をとり58号フィルターでザイツ濾過し、この体腔液原液に容積比 1/ 10000 の割合にマーゾニンを加え4°Cの氷室に保存した。

また、酸熱処理体腔液は、上記保存体腔液を2%塩酸で pH 3.5 とし水浴中で 100°C 1 時間加熱する。その後東洋濾紙No. 5 で濾過し、濾液を2%水酸化ナトリウムで pH 7.0 にしたものを、遠心分離(3000回/分)5分間でその上清をとり、これを実験に用いた。

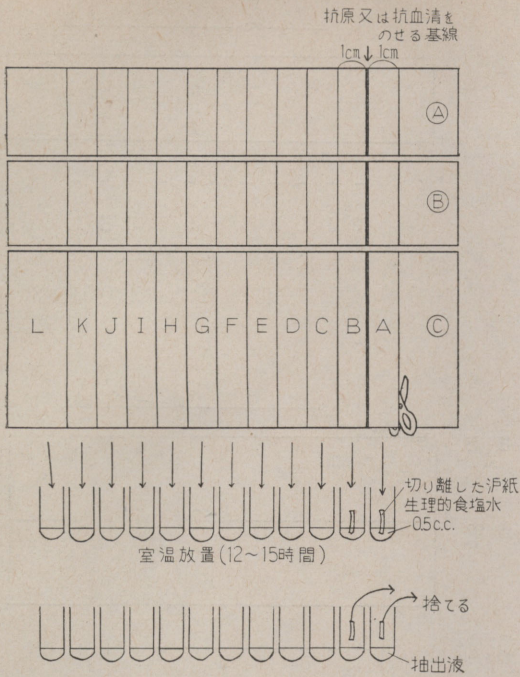
II. 飼育液の作製: 0.95%生理的食塩水 200ccに容積比 1/ 10000 の割合にマーゾニンを加え、新鮮な成熟雌豚蛔虫10隻を入れ32°Cの孵卵器中で48時間飼育した。この得た飼育液を58号フィルターでザイツ濾過し、50%アラビアゴム液中で容積を約 1/50 に濃縮した。また、前記酸熱処理体腔液と同様の操作を加えた酸熱処理濃縮飼育液をも作製した。

III. 糞便からの抗原作製: 虫卵(+), T. M. 反応(+)の糞便からT. M. 反応用の抗原を作製し、50%アラビアゴム液を用いて容積を約 1/50 に濃縮した。

IV. 抗血清: 豚蛔虫体腔液で免疫した家兎血清で体腔液に対し 50000 倍の力価を有するものを用いた。

実験手技

濾紙電気泳動法には Grassmann-Hannig 式の小林式濾紙電気泳動装置を用いた(小林, 1956)。濾紙は東洋濾紙 No. 51 (12.5cm×15.5cm)でヴェロナール緩衝液($\mu=0.05$, pH=8.6)を使用、定電流(7.5mA)で泳動し、泳動時間は6時間とした(電圧は三枚並列



第 1 図 濾紙電気泳動法による抗原及び抗体の分析方法

で初圧 600V である)。

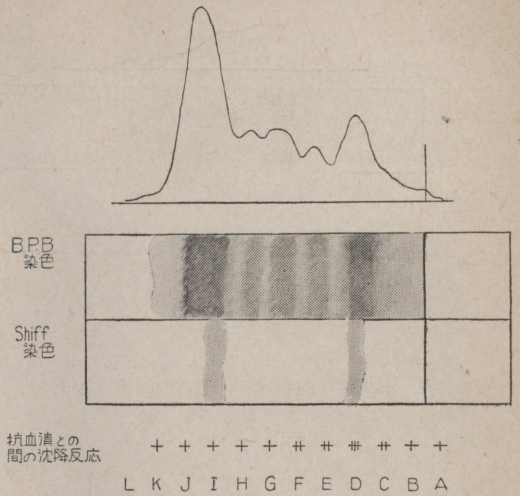
沈降反応の抗原及び抗体の分析には Panyne *et al* (1954) の血液型凝集素分析の方法にならい、先づ第 1 図に示す様に予め濾紙上に鉛筆で 1cm の間隔で縦線を入れ、同濾紙を二つの 3cm 巾のもの、残りのものと三本の濾紙とし、三本とも同一縦線の部分に抗原又は抗血清を塗り、同時に泳動される様にした。

図の如く A 及び B は各々 Brom-phenol-blue 染色及び Shiff 染色を行つて対象とし、C の大巾の部分は鉛筆の縦線に従つて個々の切片に切離し、予め 0.85% 生理的食塩水 0.5cc を入れた小試験管内に投入する。そして 12~15 時間室温放置後その抽出液について前報に示した如き方法及び手技によつて沈降反応を実施した。

実験成績

抗原として泳動したものは、1) 豚蛔虫体腔液、2) 同酸熱処理濾液、3) 豚蛔虫飼育液、4) 同酸熱処理濾液、5) 酸熱処理糞便濾液の 5 つであり、抗血清として泳動したものは豚蛔虫体腔液免疫家兎血清である。

説明の都合上第 1 図の如く、抽出液を基線前の 1cm 濾紙から順に A, B, C, D, E, ……とした。



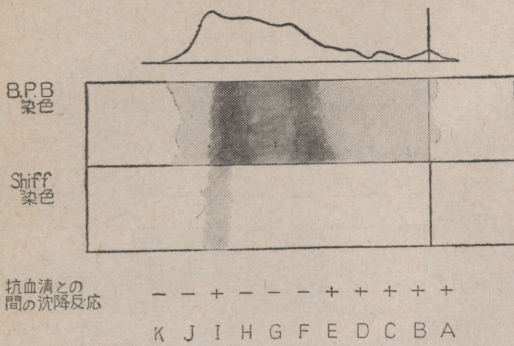
第 2 図 豚蛔虫体腔液の濾紙電気泳動像と、その各分層の体腔液免疫血清に対する沈降反応

A 抗原の分析

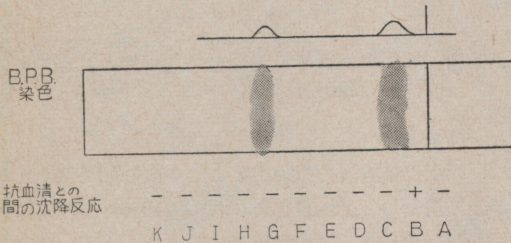
1. 豚蛔虫体腔液を泳動すると第 2 図の如く濾紙上に 5 つの分層として表現された。若松 (1956) の推定に従えば人及び他動物血清との比較において、Albumin, α -Globulin, β -Globulin, γ -Globulin の各分層になる。この各抽出液を抗原として、豚蛔虫体腔液免疫家兎血清 (10000×のもの) と沈降反応を行つと、第 2 図泳動像下に示された様に、各分層抗原の何れもが沈降反応陽性を示したが、特に D, C, E の各抽出液において陽性度は高く、この部分は蛔虫体腔液分層の γ -Glob. 及び β -Glob. の領域にわたつていた。Shiff 試薬による染色法で糖蛋白質の染色像を表現させ、之と抽出液の沈降反応を比較してみると、糖蛋白として染色される部分は、蛋白の B. P. B. 染色上の γ -Glob. の一部と、Albumin と α -Glob. の中間に相当し、之等の分層と抽出液沈降反応度との関係は殆んど認められなかつた。

2. 豚蛔虫体腔液を酸熱処理した濾液についてみると、蛋白の泳動像は Albumin より β -Glob. にわたる境界不鮮明な山形を画き、 γ -glob. に相当する部分は山の麓の如くなだらかな Tailing を示すのみで分層としては証明されない。又、Shiff 染色でみると酸熱処理をしない蛔虫体腔液分層のそれに比べると Albumin と α -Globulin の中間に相当する部分の分層のみが染色されている。

これらの分層と抽出液の沈降反応と比較すると、B. P. B. 及び Shiff の染色とは関係なく、非酸熱処理体腔液の γ -Glob. より β -Glob. に相当する部分に強く沈



第3図 酸熱体腔液の濾紙電気泳動像と、その各分層の体腔液免疫血清に対する沈降反応



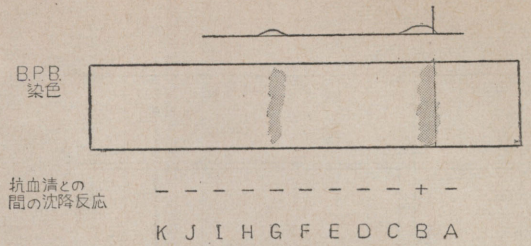
第4図 飼育液の濾紙電気泳動像と、その各分層の体腔液免疫血清に対する沈降反応

降反応が現れ (A, B, C, D, E) 又, Shiff で染色された Alb. と α -Glob. の中間に相当する部分に淡い沈降反応陽性 (I の部分) を示した (第3図)。

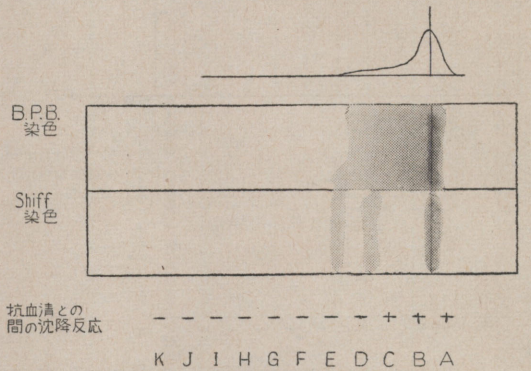
3. 蛔虫飼育液の泳動像は B. P. B. 染色では、基線から 1 cm 程泳動された部分と、蛔虫体腔液の Alb. と α -Glob. の中間に相当する部分とに極めて淡く染色される分層を認め Shiff 染色では (飼育液の濃度の不足かもしれぬが) 全く染色されなかつた。

抽出液に於ける免疫血清との沈降反応は、この基線の殆んど泳動されない分層の部分 (B) にのみ沈降反応陽性が示されたのみで他の B. P. B. 染色で染色された部分 (抽出液 I に相当する) では沈降反応陰性であつた (第4図)。

4. 酸熱処理飼育液では、泳動像は更に淡く B. P. B. で染色されるが分層上の位置は不明瞭ながら非酸熱処理飼育液の場合よりやや基線側に染色される分層が認められるが Shiff 染色では殆んど不明である。これらの沈降反応との比較では非酸熱処理の場合と同様、抽出液 (B) の所に淡い反応陽性が認められるのみで他は陰性であつた (第5図)。



第5図 酸熱処理飼育液の濾紙電気泳動像と、その各分層の体腔液免疫血清に対する沈降反応



第6図 酸熱糞便の濾紙電気泳動像と、その各分層の体腔液免疫血清に対する沈降反応

5. 酸熱処理糞便濾液の泳動像は、基線即ち濾液を塗布した線を頂点として殆んど泳動されない山をもつた分層と、泳動はするが殆んど山をなさない泳動像 (抽出液の B, C, D に相当する) が認められた。Shiff 染色では基線を中心にした泳動されない分層と、B. P. B. 染色の泳動像終末部の易動度の高い部分と、そのすぐ後に二つの分層 (抽出液の B-C 間と、D の部分) が認められた。

沈降反応は、基線の前から C の部分にまで同程度の陽性反応が示されたが、Shiff 染色における易動度の高い部分 D においては陰性であつた (第6図)。

B. 抗体の分析

豚蛔虫体腔液免疫家兎血清は泳動上 5 つの分層にわけられるが、この分層は最も早い泳動を示した分層から Albumin, α_1 -Glob., α_2 -Glob., β -Glob. 及び γ -Glob. と命名される。

これらの各抗体分層と抗原 (1) 蛔虫体腔液, (2) 酸熱処理体腔液, (3) 蛔虫飼育液, (4) 酸熱処理飼育液, (5) 酸熱処理糞便濾液) との沈降反応を行うと第7図の如くで、何れも免疫家兎血清における γ -Glob. 分層に一致し

豚蛔虫体腔液免疫家兎血清を分析し、沈降反応によつて抗原物質の所在、抗体物質の所在について究明した。

而して、T. M. 反応抗原は蛔虫体腔液及び飼育液中にも存在するが、蛔虫体腔液中及び飼育液中の蛋白分屑には関係のない、泳動性の少い物質でおそらく非蛋白性抗原が大部分であろう事がわかつた。越智の所謂飼育液型の抗原の一部を含んでいることも考えられる。

この稿を終るに当り、終始御指導、御校閲を賜りました北本教授、石崎博士、高山博士に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 岡田周子 (1959) : 蛔虫駆虫効果判定に関する研究 (1), 寄生虫誌, 8(1), 115. —2) 越智基 (1957 a) : 蛔虫の免疫化学的研究 I, 岐阜医大紀要, 5(6), 642. —3) 小林茂三郎 (1956) : 濾紙電気泳動法の実際, 南江堂, 東京. —4) Payne *et al*, (1954) : Electrophoretic mobility in paper isoagglutinins, *J. Immunol.* 73, 81. —5) 若松 (1956) : 鹿児島医学雑誌, 63, 越智 (1957 a) より引用 : —6) 越智基 (1957 b) : 蛔虫の免疫化学的研究, II, 岐阜医大紀要, 5(6), 652. —7) Middlebrook & Dubos (1948) : Specific

serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of *Tubercle bacilli*, *J. Exp. Med.*, 88, 521. —8) Middlebrook & Dubos (1950) : A hemolytic modification of the hemagglutination test for antibodies against tubercle bacillus antigens, *J. Clin. Invest.*, 29, 1480.

Summary

The antigen and antibody of T. M. Reaction were analyzed by means of paper electrophoresis. As antigens, the body cavity fluid, the metabolite excreted into culture medium from the pig ascaris their acid soluble components which were not precipitated by heating, and the filtrate of stools treated with heating, under acid were used. The rabbit antiserum which had been immunized against the body cavity fluid of the pig ascaris was analyzed by above said antigens.

The results were the followings: The antigen of T. M. Reaction was a less mobile element, which was considered to be a nonprotein antigen, and was indifferent from the protein fraction of the body cavity fluid and the metabolite of the pig ascaris.

The antibody of T. M. Reaction was found in the γ -globulin fraction of the rabbit antiserum.