

鉤虫免疫に関する研究

(1) 経口感染家兔幼虫体並びに成虫体免疫家兔血清の沈降反応

河野 恵 沢田 利 貞

群馬大学医学部衛生学教室

(昭和36年1月31日受領)

緒言

沢田ら(1954)は犬鉤虫成虫体抽出液を硫酸分画して2種の抗原(P, C)を調製し犬鉤虫罹患犬血清並びに鉤虫症患者血清につき沈降反応を行い、罹患犬血清に対してはP抗原(蛋白質を主体とする)は抗原稀釈10,000倍迄反応陽性、C抗原(多糖体を主体とする)は62,000倍迄反応陽性で、健康犬血清に対してはP, C抗原共100倍陽性であつたが、鉤虫症患者と健康者血清との沈降反応の結果P抗原, C抗原両者の間に差異を認めなかつた。森(1955)は鉤虫体成分を抗原として同抗原で免疫した家兔血清と沈降反応を行い特異的反応を示すことを認め、古山(1956)は鉤虫体成虫生理的食塩水抽出液を以て家兔に静注免疫して得た血清は鉤虫成虫抗原に対して沈降価は最高500倍であつたと述べている。柳沢(1956)はツビニ鉤虫, アメリカ鉤虫につき夫々鉤虫体成虫抗原で免疫した家兔血清と同抗原との沈降反応の結果からツビニ鉤虫とアメリカ鉤虫との間には抗原性の差異がある様に考えられると報告している。山中(1959)は鉤虫体生理的食塩水抽出液を抗原として鉤虫症患者血清と沈降反応を行つたところ鉤虫症患者血清の沈降価は90%以上が6,400倍以上陽性(抗原稀釈)であつたが、鉤虫卵陰性者血清との反応は大部分3,200倍以下で陽性或は全く陰性であつたと述べている。

大角(1959)は犬鉤虫成虫生理的食塩水抽出液を抗原として感染犬血清について沈降反応を行い抗原稀釈6,400倍陽性であつたと述べている。著者は犬鉤虫を用い感染型幼虫(幼虫)を経口感染した場合、幼虫体皮下免疫並びに成虫体皮下免疫した場合の家兔血清につき幼虫抗原, 成虫抗原を用いて沈降反応を行い2, 3の知見を得た。

実験材料ならびに方法

犬鉤虫幼虫の経口感染, 同幼虫体乳剤皮下注射(幼虫

体免疫)および同成虫体乳剤皮下注射(成虫体免疫)の3方法によつて家兔を免疫し、免疫による体重の変化および家兔免疫血清中の抗体を沈降反応(幼虫抗原, 成虫抗原使用)により追求した。

鉤虫幼虫の経口感染は鉤虫卵含有便を瓦培養(28°C, 8日)して得た幼虫を用い、幼虫数は一定容量中の幼虫数を3回数えて平均値を算出して決定した。幼虫体免疫に使用した幼虫体乳剤は犬鉤虫乾燥幼虫体(幼虫約20,000隻の乾燥量は1mgであつた)に生理的食塩水を加えながらPotter-Elvehjem型ホモチナイザーで磨細して調製した。成虫体免疫に使用した成虫体乳剤は罹患犬腸管より得た犬鉤虫成虫を生理的食塩水および蒸留水で洗滌後、凍結乾燥し以下幼虫の場合と同様に調製した。家兔は動物商より購入した雄(平均体重2.2kg)を用い1群を7匹宛として実験を行つた。

経口感染家兔の免疫には幼虫を初回は10,000隻, 第2回は20,000隻, 第3回は30,000隻, 第4回は40,000隻および第5回は50,000隻夫々10日目毎に駒込ピペットで予め所定の幼虫を混入した幼虫濃厚懸濁水を自然に嚥下する様にして行つた。幼虫体免疫家兔は幼虫体を第1回は5mg/ml液を0.2ml, 第2回は10mg/ml液を0.2ml, 第3回, 第4回, 第5回は夫々10mg/ml液を0.3ml, 0.4ml, 0.5ml宛10日目毎に家兔背部皮下に注射して免疫を行つた。成虫体免疫家兔は成虫体乳剤を幼虫体免疫の場合と同様に行つた(第1表)。

沈降反应用幼虫抗原は幼虫体乾燥幼虫体をM/15磷酸緩衝液(pH 7.2)と共に乳鉢で磨細し、次に首波処理(10kc, 30分間)を行つた後、遠心して上清液をとり透析後凍結乾燥して得た。沈降反応にはこの乾燥抗原を生理的食塩水で稀釈して200倍液(5mg/ml)を調製し(この時再び不溶部が若干生ずるので遠心して上清を用いた)之を順次倍々稀釈して400倍, 800倍……12,800倍液としたものを使用した。沈降反应用成虫抗原および抗原液

第1表 家兎の免疫方法

	免疫前採血	第1回免疫	→	→	第2回免疫	以下同方法	第3回免疫	第4回免疫	第5回免疫
経口感染家兎		10,000隻			20,000隻		30,000隻	40,000隻	50,000隻
幼虫体免疫家兎		1 mg	7日採目血	3日免目疫	2 mg		3 mg	4 mg	5 mg
成虫体免疫家兎		1 mg			2 mg		3 mg	4 mg	5 mg

は幼虫の場合と同様に調製した。

家兎血清は実験開始前および各回免疫日より1週目に採血して得た血清を56°C, 30分加温非働化を行った後沈降反応に使用した。

沈降反応は家兎血清に抗原液を重層して行い室温において5時間迄観察し沈降反応の陽性, 陰性を各管について判定し陽性反応を示す抗原最高希釈倍数を以て沈降価とした。

実験成績

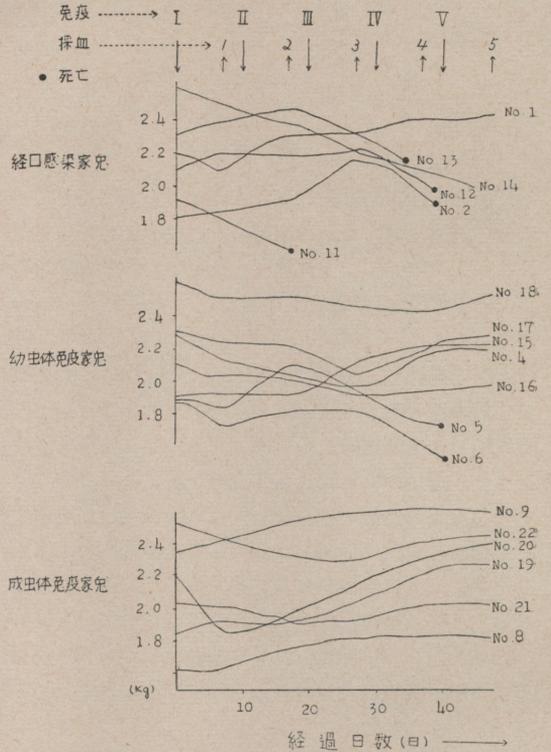
免疫による家兎体重の変化

幼虫を経口感染した家兎 (No. 1, 2, 3, 11, 12, 13, 14...平均体重 2.1 kg) は実験予定した第5回感染免疫後1週目の採血日迄生存したものは6匹中1匹 (No. 1) のみであった。即ち第2回感染後8日目に家兎 No.11は死亡, 更に第4回感染後家兎 No. 1を除いて他は何れも体重は減少し, 家兎 No.13は第4回感染後5日目, 家兎 No. 2, 12は第4回感染後9日目に死亡した。家兎 No.14は体重の減少が著明であったので第4回感染後10日目に予定していた第5回感染を行わなかったが, 第4回感染後14日目に死亡した。但し家兎 No. 3は第1回感染後2日目に死亡したので実験結果より除外した。

幼虫体乳剤を背部皮下に注射して免疫した家兎 (No. 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18...平均体重 2.1kg) には免疫による著明な体重の減少を認めなかったが, 第4回免疫後家兎 No. 5, 6には体重減少の傾向を認め第4回免疫後11日目に何れも死亡した (第5回免疫は行われなかった)。他の家兎 No. 4, 15, 16, 17, 18にはほとんど免疫による体重の減少を認めなかった。

成虫体乳剤を背部皮下に注射して免疫した家兎 (No. 8, 9, 10, 19, 20, 21, 22...平均体重 2.3kg) においては全て体重の減少或は死亡等の変化は認められず免疫注射による影響は認められなかった。但し家兎 No.10は第1回免疫後2日目に死亡したので実験結果より除外した (第1図)。

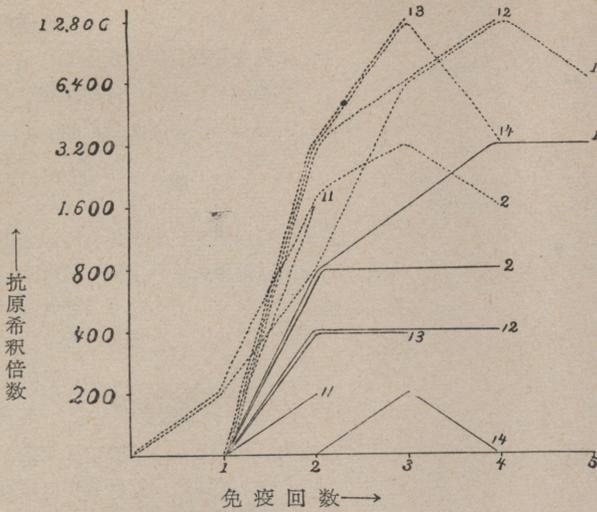
沈降反応



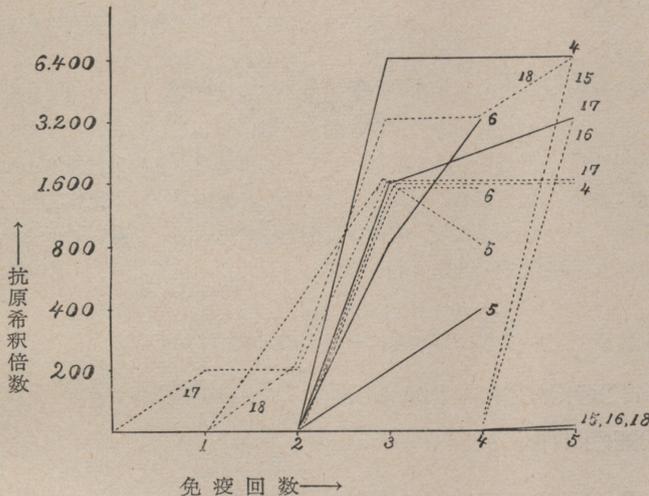
第1図 免疫による家兎体重の変化

幼虫経口感染家兎血清 (No. 1, 2, 11, 12, 13, 14) 幼虫体免疫家兎血清 (No. 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18) および成虫体免疫家兎血清 (No. 8, 9, 19, 20, 21, 22) について幼虫抗原, 成虫抗原を用いて沈降反応を行った。

幼虫経口感染家兎免疫血清 (No. 1, 2, 11, 12, 13, 14) では幼虫抗原による反応は何れも成虫抗原による反応より強く現れ, 沈降価は高く, 第2回感染家兎血清では何れも 800倍~3,200倍, 第3回感染家兎血清では 3,200倍~12,800倍と上昇したが, 第4回感染家兎血清では家兎 No. 1, 12の沈降価は 12,800倍と上昇したが家兎 No. 2, 14の沈降価は却つて低下し夫々1,600倍, 3,200倍であった。成虫抗原による反応は何れの場合でも幼虫抗原による沈降価より低く, 第2回感染家兎血清



第2図 幼虫を経口的に感染した家兎血清の沈降反応
幼虫抗原, ——成虫抗原, 数字は家兎 No.



第3図 幼虫体乳剤を背部皮下に注射して免疫した家兎血清の沈降反応
幼虫抗原, ——成虫抗原, 数字は家兎 No.

では沈降価 200倍~800倍であつたが、以後家兎 No. 1のみ第3回感染後の沈降価は1,600倍、第4回感染後の沈降価は3,200倍であつたが他の家兎は全て800倍以下の沈降価であつた(第2図)。

幼虫体免疫家兎血清(No. 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18)では幼虫抗原による沈降反応は家兎 No. 5, 15, 16およびNo.18では沈降価は最高1,600倍~6,400倍であつたが成虫抗原による沈降価は400倍以下であつて、

成虫抗原より幼虫抗原による沈降反応の方が強く現れた。家兎 No. 6およびNo.17の沈降価は第3回感染血清では各々幼虫抗原により1,600倍、成虫抗原により800倍および1,600倍であつた。家兎 No. 6の第4回感染血清では幼虫抗原による沈降価は1,600倍であつたが、成虫抗原では、却つて3,200倍と上昇した。又家兎 No.17の第5回感染血清では幼虫抗原による沈降価は1,600倍であつたが成虫抗原による沈降価は3,200倍に上昇した。家兎 No. 4については第3回乃至第5回感染血清の沈降価は幼虫抗原により1,600倍で成虫抗原では6,400倍とすべて成虫抗原による沈降反応の方が幼虫抗原による反応より強く現れた(第3図)。

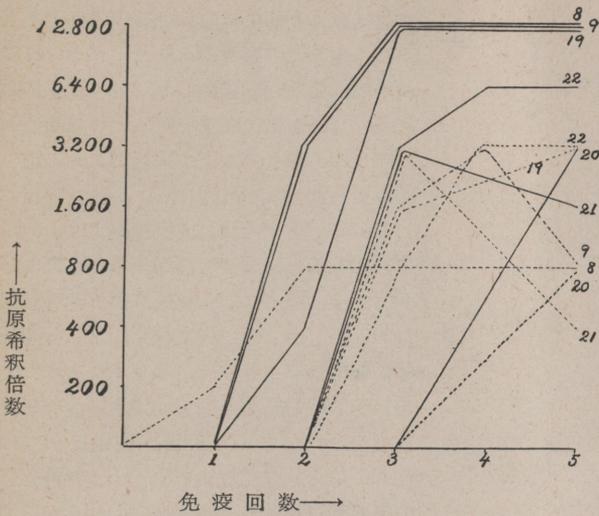
成虫体免疫家兎血清(No. 8, 9, 19, 20, 21, 22)は経口感染免疫家兎血清の沈降反応結果と逆に何れの場合でも幼虫抗原より成虫抗原による反応が強く現れ沈降価は高く、第3回乃至第4回免疫血清は成虫抗原により沈降価は最高3,200倍~12,800倍を示したが幼虫抗原では800倍~3,200倍であつた(第4図)。

考 察

犬鉤虫幼虫を経口的に感染した家兎および幼虫体並びに成虫体乳剤を皮下注射した家兎血清について幼虫抗原、成虫抗原を用いて沈降価の消長を観察した。

幼虫経口感染を行つた場合、一般的に沈降価の上昇は早く、幼虫抗原による反応は常に成虫抗原による反応より沈降価は高く、又成虫体で免疫した場合は成虫抗原による反応は何れも幼虫抗原による反応より

沈降価は高く最高何れも12,800倍陽性を示したが幼虫感染の場合は宿主体内では幼虫の代謝産物が主として感作原として作用しているものと考えられるが、感染免疫血清は成虫抗原にも弱いながら反応すること並びに成虫体免疫を行つて得た成虫体免疫血清は幼虫抗原も弱いながら反応することから幼虫と成虫の間に共通抗原の存在することが考えられる。一方幼虫体で免疫して得た幼虫体免疫血清は特に幼虫抗原成虫抗原との間に沈降価の優



第4図 成虫体乳剤を背部皮下に注射して免疫した家兎血清の沈降反応
 ----- 幼虫抗原, —— 成虫抗原, 数字は家兎 No.

劣は認められないが、概して幼虫抗原による反応の方が成虫抗原による反応より強く現れた。即ち幼虫抗体の産生が成虫抗体の産生にやや優っている傾向が認められた。これは幼虫体には成虫の抗原因子と共通する部分が含まれていることを示唆するものであり、先にも述べた様に幼虫体には幼虫抗体産生と同時に成虫抗体の産生も認められ、成虫体には成虫抗体の産生が主体で幼虫抗体の産生は少ないものと考えられる。

免疫による家兎体重の減少並びに死亡状況は幼虫感染

家兎において最も著明であつたが、乾燥量にして生幼虫感染免疫量が幼虫体免疫量の約半量であることから幼虫の代謝産物が有毒に作用しているものと考えられる。

結論

犬鉤虫幼虫経口感染、幼虫体乳剤、成虫体乳剤の皮下注射等により家兎を免疫し、家兎血清と幼虫抗原、成虫抗原との沈降反応を行つて得た結果をまとめると次の様である。

- 1) 免疫中幼虫経口感染家兎には著明な体重の減少が認められ、大多数の家兎が死亡することから幼虫の代謝産物中には有毒性物質が存在するものと考えられる。
- 2) 幼虫感染家兎血清の沈降反応は幼虫抗原で 12,800 倍～3,200 倍陽性、成虫抗原では 3,200 倍以下で陽性で何れも成虫

抗原より幼虫抗原による反応が強く現れた。

- 3) 成虫体免疫家兎血清は成虫抗原に対して 12,800 倍～3,200 倍陽性、幼虫抗原に対しては 3,200 倍～400 倍陽性で各血清についても幼虫抗原より成虫抗原による反応が強く現れた。幼虫抗原、成虫抗原は幼虫体乳剤免疫家兎血清、成虫体乳剤免疫家兎血清とお互いに弱く交叉的に沈降反応を示すことから共通抗原の存在も認められた。

(文献は第3報に一括して記載)

STUDIES ON HOOKWORM IMMUNITY

I. PRECIPITIN TEST

MEGUMI KONO & TOSHISADA SAWADA

(Department of Hygiene, School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan)

Studies on hookworm (*Ancylostoma caninum*) immunity using precipitin test were carried out.

Rabbits were immunized with following antigens: 1) living larvae, 2) homogenate of larvae, and 3) homogenate of adult worms.

Experimental results obtained were as follows:

Precipitin tests antisera of rabbits immunized with living larvae showed marked higher titer (12,800 to 3,200 folds) with larval antigen than with adult antigen (3,200 folds or low) and most antisera of rabbits immunized with homogenate of larvae showed also the same result.

On the other hand, antisera of rabbits immunized with homogenate of adult worms showed higher titer (1,800 to 3,200 fold) with adult antigen than with larval antigen (3,200 to 400 fold positive).