

## 鉤虫免疫に関する研究

### (3) 免疫血清の沈降物形成について

河野 恵 沢田 利貞

群馬大学医学部衛生学教室

(昭和36年2月24日受領)

#### 緒言

Sarles(1938)はラッテに *Nippostrongylus muris* の幼虫感染を行なつて得た免疫血清に同幼虫を入れ 37°C におくと虫体の開口部(口, 排泄腔, 肛門等)に沈降物を形成することを認め、この沈降物の形成は宿主動物の血清中に虫の分泌物および排泄物によつて抗体が生じたために起る抗原抗体反応であると説明しこの沈降物形成は幼虫の活動を抑え、発育を遅らせるであろうと考え、翌年(1939)抗血清注射による受働性免疫の成立することを報告した。Otto(1940)は高度に免疫した犬血清について犬鉤虫幼虫で沈降物形成を認め、Mauss(1940), Oliver(1940), Roth(1941), Mauss(1941)等は種々の動物免疫血清について *Trichinella spiralis* においても同様の現象が起ることを認めた。Otto(1942)は始めて人血清につきアメリカ鉤虫症患者血清による幼虫の沈降物形成を認めた。次いで Oliver(1943)は *Ascaris lumbricoides* var. *suum* を用い沈降物形成を認め全成虫体物質で免疫した抗血清は虫体の各組織抗原に対しての抗体を産生し各組織抗原は同質の抗体を吸収すること、抗虫卵血清は幼虫と反応し沈降物を形成することならびに虫卵抗原は免疫血清の試験管内活性因子を吸収すること等を認め、さらに Wright(1943)と共に *Trichinella spiralis* 家兎感染血清につき幼虫と沈降物形成を起す抗体はその  $\gamma$ -globulin 分画にあることを詳細に報告した。また Sudun(1949)は *Ascaridia galli* について“ひなどり”を用い受働性免疫の成立を認めた。Thorson(1953)は *Nippostrongylus muris* の幼虫から分泌物排泄物をとり出し、これをラッテに注射して部分的防禦を示す抗体の産生を認め、かつ、この幼虫の代謝産物は脂肪溶解能を有し免疫血清によつて中和されることを認め、酵素-抗酵素の概念から寄生虫の免疫を新たに考え、また同氏(1954)はこのことを感染実験によつて確めた。一方 Weinstein(1955)は沈降物形成現象は幼虫の分泌物、排泄物は培

地の化学的条件によつて支配されると報告した。永井(1955)は免疫血清中における幼虫の沈降物形成をサーレス現象と呼ぶことを提唱し、サーレス現象を幼虫感染により得た抗血清ならびに幼虫の血清飼育液で免疫した抗血清においてのみ認め、かつこの抗血清より  $\gamma$ -globulin を塩析法により精製し、ここにサーレス現象発現に与る抗体の存在することを認め、この  $\gamma$ -globulin によりマウスの鉤虫感染防禦を行ない、陽性の結果を得た。古山(1956)は犬鉤虫成虫体抗原で免疫した家兎血清にサーレス現象を認め、稲泉ら(1958)は *Trichostrongylus orientalis* について Chute(1956), Chipmann(1957)等は *Trichinella spiralis* について、大角(1959)は犬鉤虫についてそれぞれサーレス現象に言及している。著者は犬鉤虫幼虫を経口的に感染した場合、同幼虫体乳剤ならびに同成虫乳剤を皮下注射して免疫した場合の家兎血清について沈降物形成現象を観察した。

#### 実験材料ならびに方法

実験材料は犬鉤虫幼虫および家兎免疫血清(第1報, 第2報)を用い、幼虫を免疫血清に入れ、37°C に8日間おいた後、その血清中の沈降物の形成状態を観察した。なお犬鉤虫自然感染犬血清(犬 D-1 は鉤虫 87 隻, 犬 D-2 は鉤虫 341 隻, 蛔虫 7 隻, 犬 D-3 は鉤虫 40 隻をそれぞれ剖検の結果腸管より検出したが犬糸状虫成虫および *microfilaria* は陰性であつた)についても同時に行なつた。

犬鉤虫幼虫は鉤虫卵含有便を瓦培養(28°C, 7日)して得た幼虫を集め、さらに瓦培養(28°C, 24時間)によつて幼虫を再分離して可及的に夾雑物を除き、清洗して滅菌試験管内に保存用意した。この幼虫を滅菌水で1回洗滌後滅菌駒込ピペットで滅菌シャーレ中の滅菌瓦上におき、シャーレに滅菌水を入れ、2時間・37°C に放置して幼虫を水中に遊出させた。この操作をさらに1回繰返して可及的に雑菌を除去した。

次に抗生物質液(生理的食塩水 1 ml 中にペニシリン G

1,000 単位 およびジヒドロストレプトマイシン 10 mg 含有) で 1 回洗滌し、一定容量中の幼虫数を計数して抗生物質液 1 ml 中に幼虫 15,000 隻を含むように幼虫濃厚懸濁液を調製した。血清は原則として第 1 報、第 2 報の実験に使用した残りの免疫血清および感染犬血清を非働化せずに使用した。

実験方法はペニシリン瓶(容量約 7 ml)に 1 ml の血清ならびに抗生物質含有幼虫懸濁液 0.1 ml を入れ、ゴム栓をして 8 日間 37°C においた。8 日目顕微鏡検査を行なうにさいし、軽く容器を振盪して、その 0.1 ml 宛雑菌試験のためにサブロー寒天斜面培地ならびに普通寒天斜面培地に接種して前者は 28°C に後者は 37°C に培養して雑菌混入の有無を確かめるようにした後、残液につきスライドガラス上に 1 滴づつおき顕微鏡で沈降物の形成状態を観察した。

### 実験成績

本実験では主として血清中の虫体と遊離した沈降物について観察した。雑菌混入による疑わしき反応(沈降物形成)については十分に注意し、顕微鏡検査時、培養検査を行なつた結果、雑菌の混入が認められたものは全て実験結果から除外した。

#### 沈降物形成と判定の基準

幼虫と免疫血清を 37°C においた時に生ずる沈降物の形成の程度は多様であつたので判定の基準を便宜上次のごとく定めた。すなわち著明な沈降物の凝塊がはつきり認められるものを強陽性(卅)、沈降物の大きな凝塊が認められるものおよびやや小さいがかなり散在して沈降物の凝塊が認められるものを中等度陽性(卍)、また微細な顆粒状の沈降物が視野全体に認められるものを弱陽性(+), 沈降物の形成を認められなかつたものを陰性(-)と判定した。

免疫前の家兎血清について沈降物形成の有無を家兎 8 匹の血清について観察を行なつたところ全て陰性であつた。

第 2 回免疫後の血清についての沈降物形成状態を観察したところ経口感染家兎 4 匹(家兎 Nos. 11, 12, 13, 14)においては中等度陽性 1 例(家兎 No. 11)、弱陽性 1 例(家兎 No. 13)および陰性 2 例(家兎 Nos. 12, 14)であつた。幼虫体免疫家兎 5 匹(家兎 Nos. 5, 15, 16, 17, 18)においては全て陰性であつた。成虫体免疫家兎 5 匹(家兎 Nos. 8, 9, 19, 20, 21)においては弱陽性 1 例(家兎 No. 8)の他は全て陰性であつた。

第 3 回免疫後の血清についての沈降物形成の状態を観

察したところ、経口感染家兎 3 匹(家兎 Nos. 2, 12, 14)においては強陽性 1 例(家兎 No. 2)、中等度陽性 1 例(家兎 No. 14)および陰性 1 例(家兎 No. 12)であつた。幼虫体免疫家兎 5 匹(家兎 Nos. 4, 5, 6, 16, 18)においては弱陽性 2 例(家兎 Nos. 5, 18)および陰性 3 例(家兎 Nos. 4, 6, 16)であつた。一方成虫体免疫家兎 3 匹(家兎 Nos. 8, 9, 22)においては弱陽性 2 例(家兎 Nos. 8, 22)および陰性 1 例(家兎 No. 9)であつた。

第 4 回免疫後の血清についての沈降物形成の状態を観察したところ、経口感染家兎 4 匹(家兎 Nos. 1, 2, 12, 14)においては強陽性 1 例(家兎 No. 2)中等度陽性 1 例(家兎 No. 1)および弱陽性 2 例(家兎 Nos. 12, 14)であつた。幼虫体免疫家兎 5 匹(家兎 Nos. 4, 5, 6, 15, 16)においては中等度陽性 2 例(家兎 Nos. 5, 6)、弱陽性 1 例(家兎 No. 16)および陰性 2 例(家兎 Nos. 4, 15)であつた。成虫体免疫家兎 3 匹(家兎 Nos. 8, 9, 19)においては弱陽性 2 例(家兎 Nos. 8, 19)および陰性 1 例(家兎 No. 19)であつた。

第 5 回免疫後の血清についての沈降物形成の状態を観察したところ、経口感染家兎は 1 匹(家兎 No. 1)のみであつたが強陽性であつた。幼虫体免疫家兎 5 匹(家兎 Nos. 4, 15, 16, 17, 18)においては中等度陽性 1 例(家兎 No. 4)、弱陽性 1 例(家兎 No. 16)、陰性 3 例(家兎 Nos. 15, 17, 18)であつた。成虫体免疫家兎 6 匹(家兎 Nos. 8, 9, 19, 20, 21, 22)、においては弱陽性 1 例(家兎 No. 19)で他は全て陰性(家兎 Nos. 8, 9, 20, 21, 22)であつた。

感染犬 3 匹(犬 Nos. D-1, D-2, D-3)においては 2 例(犬 Nos. D-1, D-2)が強陽性、1 例(犬 No. D-3)が中等度陽性であつた。この中の 1 例(犬 No. D-1)では幼虫の口端に風船球状の巨大な沈降物が付着しているのを観察した。この場合幼虫はなお活潑に運動を続けていた(第 1~8 図、第 1 表)。

#### 沈降物形成と血清 $\gamma$ -globulin 値との関係

血清の沈降物形成の強さと  $\gamma$ -globulin 値との関係を検討した。

実験開始前沈降物の形成を認めなかつた血清の  $\gamma$ -globulin 値は 8 例について平均  $15.7 \pm 3.19\%$  であつた。免疫方法の如何に拘らず沈降物形成強陽性および中等度陽性であつた血清の  $\gamma$ -globulin 値は平均  $24.4 \pm 3.09\%$  (9 例)であつた。また沈降物形成弱陽性であつた血清の  $\gamma$ -globulin 値は平均  $19.8 \pm 0.58\%$  (13 例)、沈降物形成陰性であつた血清の  $\gamma$ -globulin 値は平均  $18.2 \pm 1.58\%$



写真説明

沈降物形成様態並びに判定基準

1)	卍	犬血清	5)	卍	〃
2)	卍	〃	6)	卍	〃
3)	卍	家兎血清	7)	+	〃
4)	卍	〃	8)	-	〃

第 1 表 免疫血清の沈降物形成の強弱及び  $\gamma$ -globulin 値 (%)

家兎 No.	免疫回数					犬	D-1 D-2 D-3	冊 冊 冊 冊
	0	2	3	4	5			
1				冊(22.7)	冊(30.6)			
2	-(8.6)		冊(24.6)	冊(28.9)				
11	-(13.7)	冊(20.3)						
12	-(14.5)	-(16.8)	-(26.9)	+(25.7)				
13	-(16.7)	+(10.0)						
14	-(16.7)	-(18.8)	冊(20.6)	+(19.6)				
4			-(11.8)	-(15.7)	冊(20.1)			
5		-(19.2)	+(21.0)	冊(23.5)				
6			-(18.1)	冊(28.2)				
15		-(16.6)		-(18.9)	-(12.5)			
16	-(17.2)	-(19.0)	-(18.9)	+(17.9)	+(20.9)			
17	-(16.7)	-(15.1)			-(19.7)			
18	-(21.6)	-(21.6)	+(20.6)		-(18.4)			
8		+(17.9)	+(22.2)	+(11.2)	-(24.2)			
9		-(20.0)	-(16.9)	-(12.6)	-(18.7)			
19		-(15.3)		+(19.6)	+(19.6)			
20		-(15.9)			-(19.2)			
21		-(17.9)			-(16.0)			
			+(21.0)		-(21.0)			

沈降物形成……冊 強陽性 冊 中等度陽性 + 弱陽性 - 陰性 ( )  $\gamma$ -globulin 値

第 2 表 沈降物形成と  $\gamma$ -globulin 値との関係

沈降物形成	対象 標本数	$\gamma$ -Globulin (%)
冊, 冊	9	24.4±3.09
+	13	19.8±0.58
-	27	18.2±1.58
免疫後の血清		
免疫前の血清	8	15.7±3.19

$\alpha=0.05$

(27 例)であつた。

以上の結果について“t-test”を行つて見たところ、沈降物形成を著明に認めた血清(強陽性、中等度陽性)と沈降物形成の程度が弱かつた血清および沈降物形成を認めなかつた血清(弱陽性、陰性)との間の  $\gamma$ -globulin 値の差は 5%の危険率で有意の差が認められ、一定程度以上の  $\gamma$ -globulin 値を有する血清に沈降物形成が強く現われる傾向を認めた(第 1 表, 第 2 表)。

考 察

幼虫を免疫血清中に入れた時に幼虫の口、肛門、排泄腔等に沈降物が形成されることは Sarles (1938) によつて、発見された寄生虫の免疫反応の一種であり、永井 (1955) は、この現象をサーレス (Sarles) 現象と呼んだが、これ等は虫体に付着した沈降物について殆んど観察して居り、免疫血清中に虫体と無関係は位置に認められる沈降物については Wright & Oliver (1943) が記載しているのみである。

著者も永井(1955)の方法に従つて実験も行つたが、虫体に付着している沈降物は、その虫体に付着する部位が多様であつて典型的なサーレス現象と観察される沈降物形成と同時に一見汚物様の小顆粒の塊りが排泄腔、肛門部等に密接して存在し、あるいは虫体より遊離して認められる場合があり、免疫血清中に遊離した沈降物と虫体に付着した沈降物の間に区別し難い場合のあることをしばしば経験した。大狗虫感染犬血清における実験では古山(1956)の陰性成績に反し、著者の実験では 3 例に沈降物の形成を明らかに認め、その中 1 例においては極めて著明な風船球状の沈降物が口端に付着した幼虫を認めた。また家兎における実験では経口感染した家兎血清において沈降物の形成を最も著明に認め、次いで幼虫体家兎免疫血清にも沈降物形成を認めたが、成虫体家兎免疫血清では、前 2 者に比べ、さらに沈降物形成の程度は弱かつた。このことは永井(1955, 1956)が幼虫感染免疫によつてのみサーレス現象が陽性に現われるといつているのと部分的に一致する。しかし古山(1956)が家兎における実験で成虫体免疫血清によつて感染の場合よりも強いサーレス現象を認めたとする成績とは逆の結果であつた。

永井(1956)は詳細な実験成績から免疫血清の  $\gamma$ -globulin 分画中にサーレス現象を起す抗体の存在を強調しているが、著者が家兎免疫血清について同時に行つた血清蛋白分層像の変動と沈降物形成の強さとの関係を再検

討すると、かなり著明な沈降物形成(強陽性, 中等度陽性)を示した血清の  $\gamma$ -globulin 値は沈降物形成の程度の弱いもの、あるいは沈降物形成を示さなかつた、(弱陽性陰性)血清の  $\gamma$ -globulin 値よりも明らかに高く、沈降物形成が  $\gamma$ -globulin の増加と密接な関係を有する傾向を認めた。しかし、幼虫体免疫の場合に  $\gamma$ -globulin 値の高かつた血清も幼虫感染した家兎血清の場合と同じように沈降物形成を認めたことは幼虫の代謝産物のみが沈降物形成を起す血清抗体( $\gamma$ -globulin)を産生するとは断定できないように考えられた。

永井(1956)はマウスにおける実験でサーレス現象を強く示す血清は感染防禦作用を有すると述べて居るが、免疫血清と生きた幼虫との反応において虫体に付着して沈降物が生じ、これが幼虫の活動、發育に直接的に影響を与え、感染防禦に重要な役割を演ずると仮定すると沈降物を付着しない虫体は免疫血清により、感染防禦的な影響を受けないものと解釈される。この点において免疫血清中における沈降物の形成についての観察は虫体に密接したものに限らず、むしろ虫体と遊離した沈降物の形成状態も考察されるべきではないかと考える。

### 結 論

犬鉤虫幼虫経口感染、幼虫体乳剤の皮下注射、成虫体乳剤の皮下注射により免疫した家兎血清および犬鉤虫自然感染犬血清に犬鉤虫幼虫を入れ、37°C においた時に生ずる沈降物の状態を観察し、次の所見を得た。

(1) 沈降物の形成は幼虫体の開口部よりもむしろ中体と遊離して、血清中に認められる。

(2) 沈降物の形成は犬鉤虫自然感染犬血清において著明に認められた。家兎血清では幼虫を経口感染を行って得た免疫血清に沈降物形成は最も強く認められ、次に幼虫体で免疫した血清であつたが、成虫体で免疫した家兎血清では沈降物の形成は最も弱かつた。

(3) 沈降物の形成は免疫血清中の  $\gamma$ -globulin 値の高い程強く現われる傾向を認めた。

以上論文の要旨は、第28回日本寄生虫学会総会にて発表した。

### 文 献

- 1) Chipmann, P. B. (1957): The antigenic role of the excretions and secretions of adult *Trichinella spiralis* in the production of immunity in mice. *J. Parasitol.*, 43, 593-598.
- 2) Chute, R. M. (1956): The dual antibody response to experimental trichinosis. *Proceed. Helminthol. Soc. Wash.*, 23, 49-58.
- 3) 稲泉武男・伊藤淳一・会田恵(1958): 東洋毛線虫の仔虫に見られたサーレス現象ならびに凝塊反応について。 *寄生虫誌*, 7, 116-120.
- 4) 石原国・森納(1956): 鉤虫感染時に於ける血漿蛋白像。 *寄生虫誌*, 5, 227-228.
- 5) 石崎達・佐藤澄子・久津見晴彦・小林昭夫・安田一郎・小宮義孝(1956): 鉤虫 Carrier の臨床的研究(2), 一般症状貧血, 血清蛋白  $\gamma$ -globulin 及び焦性ブドウ酸の消長。 *寄生虫誌*, 5, 201.
- 6) 石崎達・久津見晴彦・萩野淑郎・小宮義孝・高山久郎・有松清一郎(1958): 鉤虫 Carrier の臨床的研究(5), 出血素因, 末梢血管抵抗, 血清蛋白分画, 血清肝機能検査について。 *寄生虫誌*, 7, 227.
- 7) 石塚達(1959): 鉤虫症の血清蛋白に関する研究。 *寄生虫誌*, 8, 406.
- 8) 古山幸男(1956): 鉤虫免疫の研究。 *岐阜医大紀要*, 4, 51-74.
- 9) Leland, S. E. Jr., Lindquist, W. D. & Lillevik, H. A. (1955): An electrophoretic and chemical fractionation study of sera from rats immunized against the *Nippostrongylus muris*. *Exp. Parasitol.*, 4, 208-225.
- 10) Mauss, E. A. (1940): The *in vitro* effect of immune serum upon *Trichinella spiralis* larvae. *Am. J. Hyg.*, 32, 80-83.
- 11) Mauss, E. A. (1941): The serum fraction with which antitrchinella (*Trichinella spiralis*) antibody is associated. *Am. J. Hyg.*, 34 (Sec D), 73-80.
- 12) 森納(1955): 鉤虫アレルギーの実験的研究。 *米子医誌*, 6, 343-389.
- 13) 永井光(1955): ツビニ鉤虫に於ける「サーレス現象」について。 *東京医事新誌*, 72(1), 20.
- 14) 永井光(1951): ツビニ鉤虫に於けるサーレス現象に関する研究, 第2篇 ツビニ鉤虫仔虫によるサーレス現象の免疫学的追求, 全篇総括。 *寄生虫誌*, 5, 26-39.
- 15) Oliver, G. J. (1940): The *in vitro* action of immunized serum of the larvae and adults of *Trichinella spiralis*. *J. Infect. Dis.*, 67, 292-300.
- 16) Oliver, G. J. (1943): Antigenic analysis of the isolated tissues and body fluids of the round worm. *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. *J. Infect. Dis.*, 72, 202-212.
- 17) 大角正明(1959): 鉤虫免疫に関する研究(1), 後感染抵抗性について(II), サーレス現象について。 *日本衛生誌*, 14, 872-877.
- 18) Otto, G. F. (1940): A serum antibody in dogs active immunized against the hookworm. *Ancylostoma caninum*. *Am. J. Hyg.*, 31, 23-21.
- 19) Otto, G. F., Shugan, N. J. & Groover, M. E. (1942): A precipitin reaction resulting in

- sera from hookworm infected individuals. Proceed. Helminthol. Soc. Wash., 9, 25-26.
- 20) Roth, H. (1941): The *in vitro* actions of *Trichinella spiralis* larvae in immune serum—a new precipitin test in Trichinosis. Acta. Path. & Microbiol. Scand., 18, 160-167.
- 21) Sarles, M. P. (1938): The *in vitro* action of immune rat serum on the nematode, *Nippostrongylus muris*. J. Infect. Dis., 62, 334-348.
- 22) Sarles, M. P. (1939): Protective and curative action of immune serum against *Nippostrongylus muris* in the rat. J. Infect. Dis., 65, 183-195.
- 23) Sawada, T., Suzuki, I., Oka, T. & Sano, M. (1954): Diagnosis of ancylostomiasis by means of intradermal and serological tests. Gumma. J. Med. Sci., 4, 29-38.
- 24) Sudun, E. H. (1949): The antibody basis of immunity in chickens to the nematode, *Ascaridia galli*. Am. J. Hyg., 49, 101-116.
- 25) Thorson, R. E. (1953): Studies on the mechanism of immunity in the rat to the nematode, *Nippostrongylus muris*. Am. J. Hyg., 58, 1-15.
- 26) Thorson, R. E. (1954): Effect of immune serum from rats on infected larvae of *N. muris*. Exp. Parasitol., 3, 9-15.
- 27) Weinstein, P. P. (1955): Chemical evidence of an excretory function for the so-called excretory system of the filaria form larvae of *Nippostrongylus muris*. Exp. Parasitol., 4, 226-243.
- 28) Wright, G. G. & Oliver, G. J. (1943): Electrophoretic studies on antibody basis of immunity in chickens to the nematode, *Ascaris galli*. Am. J. Hyg., 49, 101-116.
- 29) 山中直之 (1959): 鉤虫症の免疫学的研究(続報). 寄生虫誌, 8, 403-405.
- 30) 柳沢利喜雄・水野哲夫・片桐優 (1956): 鉤虫体抗原で免疫せる家兔血清と該抗原との沈降反応. 寄生虫誌, 5, 230.

## STUDIES ON HOOKWORM IMMUNITY

### III. THE *IN VITRO* ACTION (PRECIPITATE FORMATION) OF IMMUNE SERUM OF HOOKWORM

MEGUMI KONO & TOSHISADA SAWADA

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

The actions of antiserums of rabbits and dogs immunized with hookworm (*Ancylostoma caninum*) antigens were tested *in vitro* on larvae of hookworm.

The *in vitro* test of precipitate formation were carried out by putting the suspensions of larvae into sera and the results were observed after 8 days incubation at 37°C.

The following results were obtained:

- 1) A noticeable precipitate appeared in the medium containing antiserums of rabbits immunized with living larvae and dogs infected with *Ancylostoma caninum*.
- 2) The effect of the serum of rabbits immunized with homogenates of larvae or adult worms was not so marked as that of the serum of rabbits immunized with living larvae.
- 3) In the serum of high  $\gamma$ -globulin content, the reaction was observed stronger than in the serum of low  $\gamma$ -globulin.