

日本住血吸虫症の補体結合反応および 沈降反応抗原について

松 山 栄

群馬大学医学部寄生虫学教室

(1968年2月3日 受領)

緒 言

すでに沢田 (1967) らは、日本住血吸虫体より、等電点沈澱, sephadex の gel 濾過, イオン交換体を用いた column chromatography によって分画して得た数種の抗原について、赤血球凝集反応の抗原活性物質を追究し、抗原 SSCD 2 および SSCD 3 に最も強いことを報告したが、今回、著者はこれらの分画抗原を作成して、補体結合反応および沈降反応の抗原活性物質の分布を究明しようと試み、日本住血吸虫感染家兎血清および感染人血清を用いて検討し、2, 3 の知見を得た。

実験材料および方法

感作血球：溶血素 5 単位/0.25 ml の溶血素で感作した羊赤血球の 2% 浮遊液を使用した。即ち、羊赤血球の浮遊液の 2% の中に 0.25 ml 溶血素単位/0.25 ml の割合に含んだものである。

補体：モルモットの心臓穿刺によって採血し氷室に 2～3 時間放置してから分離した血清を、ただちに 1 ml に対し、羊血球を 0.2 ml の割合に加えて寒冷飽和し、アンブルに分注後凍結乾燥し、 -20°C に保存した。実験に供した補体は 2 単位 /0.25 ml を用いた。

抗血清：1) 感染家兎血清一家兎に *Cercaria* 200 隻 per kg を人工的に経皮感染して、56 日後に全採血を行って分離した血清を凍結乾燥して氷室 ($2-3^{\circ}\text{C}$) に保存した。

実験には、 56°C 、30 分間加温して非働化した後、5 倍に稀釈し、これに 1/5 量の羊血球を加えて、羊血球に対する異種凝集素を除去し、20 倍稀釈液にして標準血清とした。使用時には常に 56°C 、10～15 分間加温して用いた。

2) 感染人血清—日本住血吸虫感染者 (虫卵陽性) 26 名より採血して得た血清を混ぜ合せ、 56°C 、30 分間加

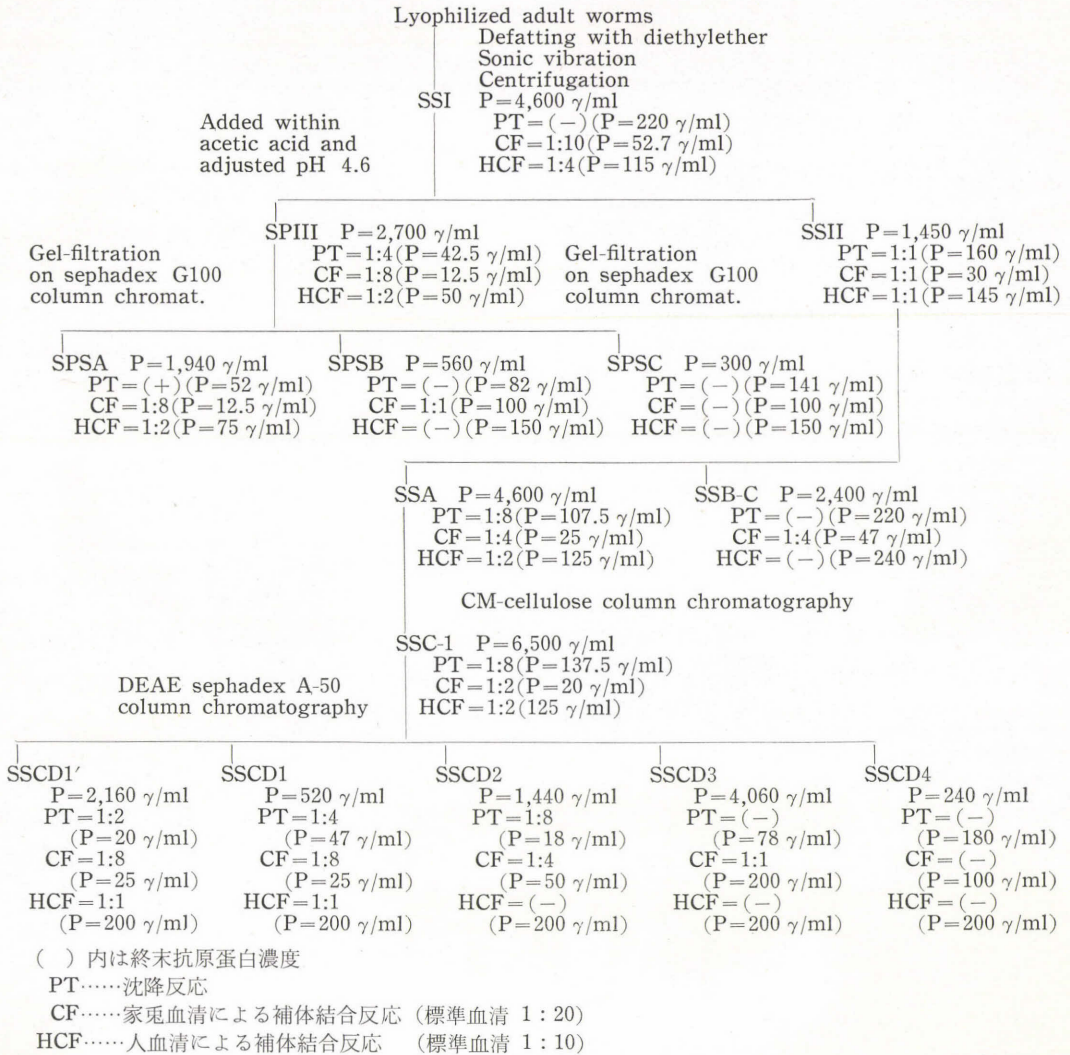
温して非働化した後、5 倍に稀釈して、1/5 量の羊血球を加えて、羊血球に対する異種凝集素を除去し、次に 10 倍稀釈液にして標準血清とした。使用時には常に 56°C 、15 分間加温して使用した。

Mg 食塩水の作成：緒方氏法により、生理食塩水に Mg イオン 200 γ /ml の割合にふくませたものであり、食塩 (特級) 8.5 g, 塩化マグネシウム ($\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.167 g を蒸留水 1,000 ml にといて使用した。以下 MgS と称する。

粗抗原の抽出調整：あらかじめ diethyl ether で処置 (-20°C 5 日間) した脱脂虫体を、0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) によって懸濁し、sonic vibration (10 KC, 30 分間) を行い、次に遠心沈澱 (14,000 rpm, 15 分間, 5°C) して、上清より粗抗原 SSI を得た。この抗原を氷水中で 1N-acetic acid を加えて pH 4.6 に修正し、1 時間放置したのち更に遠心沈澱 (14,000 rpm, 15 分間, 5°C) して上清と沈澱に分けた。上清部分は 1N-NaOH で pH 7.0 に修正し、遠心沈澱して沈澱部分を除去し、抗原 SS II を得た。沈澱部分は 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) に浮かべて、sonic vibration (10 KC, 5 分間) を行い、溶解したのち、遠心沈澱によって不溶部分を除き抗原 SP III を得た。(Diagram 1)

Sephadex G-100 の gel 濾過法による抗原 SS II の分画精製：Column は sephadex G-100 約 25 g (2.7×54 cm) を使用した。流速は、25 ml/hr に調整し、fraction collector を用いて各試験管に 5 ml 宛採取した。充分に buffer で膨潤 (0.05 M NaCl, 0.05 M phosphate buffer pH 7.0) した column に抗原 SS II 25 ml を添加し、次いで同一 buffer で溶出した。各溶出液について Folin 法により protein を、Anthrone 法により carbohydrate を測定し、それらの optical density を図示した。この溶出像によって抗原 SSA, SSB-C を得た (Diagram 1, Fig. 1)。

CM-cellulose column chromatography による抗原

Diagram 1 Fractionation of antigen *S. japonicum* adult worms

SSA の分画精製: Column は CM-cellulose 約 3g (1.5×20 cm) を使用した. 流速は 25 ml/hr に調整し, 3°C の下で fraction collector を用いて 5 ml 宛採取した. 0.005M phosphate buffer (pH 7.0) で平衡化した column に, 同一 buffer であらかじめ透析を行った 6 ml の抗原 SSA を添加した. 次に同一 buffer, 0.07M NaCl (pH 7.0), 0.14M NaCl (pH 7.0), 0.28 M NaCl (pH 7.0) および 0.56M NaCl (pH 7.0) で, stepwise elution を行った. 各溶出液の一定量について Folin 法で protein, Anthrone 法で carbohydrate を測定した. 溶出像によって抗原 SSC1 を得た (Dia-

gram 1, Fig. 2),

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography による抗原 SSC1 の分画精製: Column は DEAE-Sephadex A-50 約 3g (1.5×18 cm) を使用した. 流速は 25 ml/hr に調整し, 各試験管に 5 ml 宛採取した. 0.02M phosphate buffer (pH 6.0) で平衡化した column に同一 buffer で透析を行った抗原 SSC1 の 5 ml を添加した後, 同一 buffer, 0.07M NaCl, 0.14M NaCl 0.28 M NaCl 0.56M NaCl および 0.1N NaOH で各々 stepwise elution を行った. この溶出液の各一定量について, Folin 法により protein, Anthrone 法により

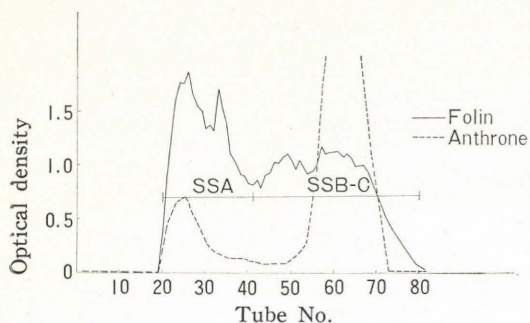


Fig. 1 Gel-filtration on Sephadex G-100 column chromatography of antigen SSA II

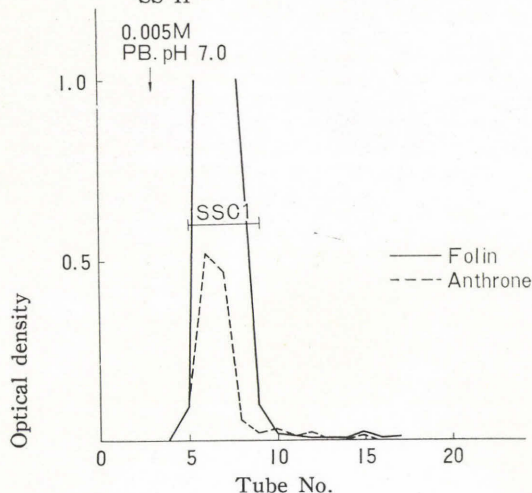


Fig. 2 CM-cellulose column chromatography of antigen SSA

carbohydrate を測定した。この溶出像によって、5種の抗原 SSCD 1' SSCD 1, SSCD 2, SSCD 3 および SSCD 4 を得た (Diagram 1, Fig. 3)。

Sephadex G-100 gel 濾過法による抗原 SP III の分画精製: Column は sephadex G-100 約 25 g (2.7×54 cm) を使用した。流速は 25 ml/hr に調整し, fraction collector を用いて各試験管に 5 ml 宛採取した。充分 buffer で膨潤 (0.05M NaCl, 0.05M phosphate buffer PH 7.0) した column に抗原 SP III 25 ml を添加し, 次いで同一 buffer で溶出した。各溶出像について, Folin 法により protein を, Anthrone 法により carbohydrate を測定し, それらの optical density を図示した。この溶出像によって, 抗原 SPSA, SPSB, および SPSC を得た (Fig. 4)。

術式: 補体結合反応は緒方氏法 (標準法) に準じて行

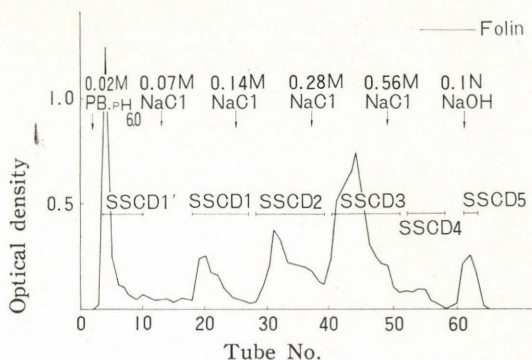


Fig. 3 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of antigen SSC1

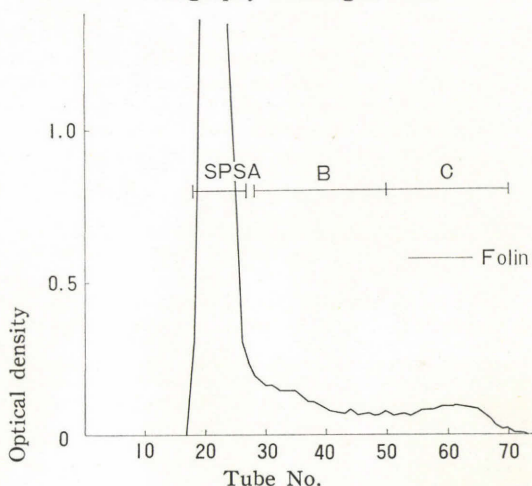


Fig. 4 Gel-filtration on sephadex G100 column chromatography of antigen SP III

った。

各試験管に抗血清 (標準血清) を 0.25 ml 宛入れ, ついで補体 (2 単位) を 0.25 ml 加えた。更に各種濃度の抗原を段階的に 2 倍稀釈して 0.25 ml 宛加えた。以後, 4°C に 3 時間放置して反応を促進させたのち, 37°C の恒温槽にて 15 分間加温し, 感作血球 (溶血系統) を同じく 0.25 ml ずつ加え, 37°C の恒温槽に 30 分間放置して, 直ちに結果を判定した。

反応結果は, 緒方氏 (1956) の判定基準に準じて, 完全な不溶血を [0], 完全な溶血を [3] とし, その間の種々の程度の不完全溶血を, [1], [2] の如く記録した。完全溶血の判定は, かならず試験管をよくふってから行った。[2] は中等度溶血 (溶血はかなりおこっていて液をすかしてむかいがわのものがぼんやり見える程度) であ

る。溶血の程度を観察し、[2]以下のものを陽性とした。陽性をしめす抗原の最高稀積度をもって抗原価とした。対照には抗原を入れず、MgS 0.25 ml を入れて完全溶血をおこすことを確めた。

沈降反応は抗原稀積による重層法により行い、室温に放置して2~3時間めに判定し記録した。

実験成績

1. 3種の抗原 SS I, SS II, および SP III について

1) 抗原 SS I について

感染家兎血清による補体結合反応は抗原濃度 $P=527 \gamma/ml$ (P は protein 量をあらわす) を階段稀積して10倍まで陽性をしめし、その終末抗原蛋白濃度は $p=52.7 \gamma/ml$ であった。

感染人血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=460 \gamma/ml$ を2倍階段稀積して24倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=115 \gamma/ml$ であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原蛋白濃度 $P=220 \gamma/ml$ を用いて陰性であった。

2) 抗原 SS II について

感染家兎血清では、補体結合反応は抗原原液 $P=30 \gamma/ml$ のみ陽性であった。

感染人血清では、抗原原液 $P=145 \gamma/ml$ のみ陽性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原濃度 $P=160 \gamma/ml$ で陽性であった。

3) 沈澱部分である抗原 SP III について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=100 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、8倍まで陽性で、その終末抗原蛋白濃度は $P=12.5 \gamma/ml$ であった。

感染人血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=100 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、2倍まで陽性で、その終末抗原蛋白濃度は $P=50 \gamma/ml$ であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=170 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、4倍まで陽性で、その終末抗原蛋白濃度は $P=42.5 \gamma/ml$ であった。

2. 抗原 SSA, SSB-C についての補体結合反応および沈降反応

抗原 SS II を sephadex G-100 の gel 濾過によって分画して得た抗原 SSA, および SSB-C について試みた。

1) 抗原 SSA について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=100 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、4倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=25 \gamma/ml$ であった。

感染人血清についての補体結合反応は、抗原原液 $P=250 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、2倍まで陽性であり、終末抗原蛋白濃度は $P=125 \gamma/ml$ であった。

感染家兎血清についての沈降反応は、抗原原液 $P=860 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、8倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=107.5 \gamma/ml$ であった。

2) 抗原 SSB-C について

感染家兎血清についての補体結合反応は、抗原原液 $P=188 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、4倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=47 \gamma/ml$ であった。

感染人血清については、抗原原液 $P=240 \gamma/ml$ で陰性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=220 \gamma/ml$ で陰性であった。

3. 抗原 SSC I について

抗原 SSA を更に CM-cellulose column chromatography によって分画し、0.005M phosphate buffer (PH 7.0) で吸着されないで溶出される部分、抗原 SSC I についてこころみた。

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=40 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、2倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=20 \gamma/ml$ であった。

感染人血清については、抗原原液 $P=250 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、2倍まで陽性でその終末抗原蛋白濃度は $P=125 \gamma/ml$ であった。

感染家兎血清での沈降反応は、抗原原液 $P=1100 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、8倍まで陽性で、その終末抗原蛋白濃度は $P=137.5 \gamma/ml$ であった。

4. 抗原 SSCD1', SSCD1, SSCD2, SSCD3 および SSCD4 について

上記の実験結果から、SSC1 に抗原活性を示したので、更に DEAE-sephadex A-50 column chromatography によって分画して得た5種の抗原についても同様にこころみた。

1) 抗原 SSCD I' について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ を2倍階段稀積し、8倍まで陽性で、その終末抗原蛋白濃度は $P=25 \gamma/ml$ であった。

感染人血清については、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ のみ

陽性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=40 \gamma/ml$ を 2 倍稀釈し、2 倍まで陽性で終末抗原蛋白濃度は $P=20 \gamma/ml$ であった。

2) 抗原 SSCD 1 について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ を 2 倍階段稀釈し、8 倍まで陽性で、その終末抗原蛋白濃度は $P=25 \gamma/ml$ であった。

感染人血清については、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ のみ陽性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=188 \gamma/ml$ を稀釈し、4 倍まで陽性であり終末抗原蛋白濃度は $P=47 \gamma/ml$ であった。

3) 抗原 SSCD 2 について

感染家兎血清についての補体結合反応は、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ を 2 倍階段稀釈し、4 倍まで陽性で、終末抗原蛋白濃度は $P=50 \gamma/ml$ であった。

感染人血清については、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ で陰性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=148 \gamma/ml$ を 2 倍階段稀釈し、8 倍まで陽性で、終末抗原蛋白濃度は $P=18.5 \gamma/ml$ であった。

4) 抗原 SSCD 3 について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ のみ陽性であり、感染人血清については、抗原原液 $P=200 \gamma/ml$ で陰性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=78 \gamma/ml$ で陰性であった。

5) 抗原 SSCD 4 について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=100 \gamma/ml$ で陰性であり、感染人血清による沈降反応は、抗原原液で $P=180 \gamma/ml$ 陰性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=180 \gamma/ml$ で陰性であった。

5. 3 種の抗原 SPSA, SPSB および SPSC についての補体結合反応および沈降反応

1) 抗原 SPSA について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=100 \gamma/ml$ を 2 倍階段稀釈し、8 倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=12.5 \gamma/ml$ であった。

感染人血清についての補体結合反応は、抗原原液 $P=150 \gamma/ml$ は 2 倍階段稀釈で 2 倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=75 \gamma/ml$ であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=52 \gamma/ml$ のみ陽性であった。

2) 抗原 SPSB について

感染家兎血清にての補体結合反応は、抗原原液 $P=100 \gamma/ml$ のみ陽性であり、感染人血清では、抗原原液 $P=150 \gamma/ml$ で陰性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=860 \gamma/ml$ を 2 倍階段稀釈し、8 倍まで陽性であり、その終末抗原蛋白濃度は $P=107.5 \gamma/ml$ であった。

3) 抗原 SPSC について

感染家兎血清による補体結合反応は、抗原原液 $P=100 \gamma/ml$ で陰性であり、感染人血清にては、抗原原液 $P=150 \gamma/ml$ で陰性であった。

感染家兎血清による沈降反応は、抗原原液 $P=114 \gamma/ml$ で陰性であった。

総括ならびに結語

S. japonicum の虫体より等電点沈澱, sephadex G-100 による gel 濾過, CM-cellulose および DEAE-sephadex A-50 column chromatography を順次組合せ、抗原の分画精製を行って赤血球凝集反応抗原活性物質を追求したが、今回は、これと平行して、補体結合反応および沈降反応の、抗原活性物質を追究した。

Diethylether で脱脂した乾燥虫体を 0.02M phosphate buffer (pH 7.0) で抽出して得た粗抗原 SS 1 を等電沈澱 (pH 4.6) により分画して、その上清より抗原 SS II, 沈澱より抗原 SP III を得た。更に抗原 SS II を sephadex G-100 の gel 濾過, column chromatography により分画精製した抗原 SSA, SSB-C についてころみたところ、早期に溶出される抗原 SSA が補体結合反応および沈降反応ともに強かった。さらに、CM cellulose column chromatography によって分画したところ、0.005M phosphate buffer (pH 7.0) で吸着されないで溶出される部分抗原 SSC 1 を得たが、補体結合反応および沈降反応ともに陽性であり、抗原 SSC 1 の終末抗原濃度は、感染家兎血清では $P=20 \gamma/ml$ 感染人血清では $P=125 \gamma/ml$ であった。感染家兎血清での沈降反応は、 $P=137.5 \gamma/ml$ であった。

抗原 SSC 1 を更に DEAE-sephadex A-50 column chromatography によって分画して得た 5 種の抗原 SSCD 1', SSCD 1, SSCD 2, SSCD 3, および SSCD 4 について補体結合反応および沈降反応をころみたところ、

文 献

抗原 SSCD 1', SSCD 1 および SSCD 2 は感染家兎血清 (1:20) に終末抗原蛋白濃度 25 γ /ml~50 γ /ml で強い抗原活性を認め、感染人血清 (1:10) では SSCD 1' および SSCD 1 に終末抗原蛋白濃度 200 γ /ml で陽性を示し最も強かった。

沈澱部分である抗原 SP III を、更に sephadex G-100 による gel 濾過で得た分画抗原 SPSA, SPSB, SP SC について補体結合反応および沈降反応を行ったところ、早期に溶出する抗原 SPSA が補体結合反応および沈降反応ともに最も強かった。おくらで溶出する抗原 SPSC では補体結合反応および沈降反応とも、この濃度での反応は陰性であった。

赤血球凝集反応では抗原活性が上清部分より得た抗原 SSCD 2 および SSCD 3 に最も強いことを報告してきたが、補体結合反応および沈降反応においては、早期に溶出する側 SSCD 1', SSCD 1 および SSCD 2 に強い抗原活性を現したが、これらの相違については沈澱部分より得た抗原 SPSA に強い抗原活性を現したことより、反応機構の相違と思われる。補体結合反応および沈降反応抗原は、等電点沈澱 (PH 4.6) により得た SPS III および sephadex G-100 column chromatography により分画精製抗原 SPSA が最も高い抗原活性を現した。

擱筆にあたり、沢田教授および武井助手の御懇切な御指導を深謝いたします。

- 1) 武井一利 (1968) : 日本住血吸虫症の赤血球凝集反応抗原について. 寄生虫誌, 17, 36-41.
- 2) 緒方富雄 (1956) : 梅毒の新しい血清学的検査法, 増補第3版, 南山堂, 東京.
- 3) 永田泰之助 (1964) : 肝吸虫皮内反応抗原に関する研究. 日本衛生誌, 19, 41-49.
- 4) Lowry, O.H. and Rosebrough, N.J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chemist., 193, 265-275.
- 5) Williams, J. E., Moose, J. W., Sawada, T., Takei, K. and Sato, S. (1965) : Studies on immunodiagnosis of schistosomiasis. J. Infect. Dis., 115, 382-386.
- 6) Morris, D. L. (1948) : Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthyone reagent. Science, 107, 254-255.
- 7) Sawada, T., Takei, K., Williams, J. E. and Moose, J. W. (1965) : Isolation and purification of antigen from adult *Clonorchis sinensis* for complement fixation and precipitin tests. Exp. Parasit., 17, 340-349.
- 8) 好本 節 (1909) : 日本住血吸虫病患者の血清反応について. 京都医誌, 6, 77-83.
- 9) 岡部浩洋・山口富雄 (1952) : 日本住血吸虫症の免疫学的研究(第1報). 久留米医会誌, 15, 139-142.
- 10) 岡部浩洋・山口富雄 (1952) : 日本住血吸虫症の免疫学的研究(第2報). 久留米医会誌, 15, 663-664.
- 11) 村瀬乾也 (1956) : 日本住血吸虫症の免疫学的研究(日本住血吸虫症の免疫学的研究第V報). 久留米医会誌, 19, 1891-1941.
- 12) Sawada, T., Suzuki, I., Oka T. and Sano, M. (1954) : Studies on the diagnosis of schistosomiasis japonica. The Gunma J. Med. Sciences, 4, 39-47.

Abstract

COMPLEMENT FIXATION AND PRECIPITIN TESTS WITH FRACTIONATED ANTIGENS
OBTAINED FROM *SCHISTOSOMA JAPONICUM* ADULT WORMS

SAKAE MATSUYAMA

*(Department of Parasitology, School of Medicine, Gumma
University, Maebashi, Gumma, Japan)*

The fractionation and the purification of antigens were conducted by gel-filtration on sephadex G-100 column, CM-(carboxymethyl)-cellulose column chromatography and sephadex A-50 column chromatography to obtain purified antigen and to study the substance responsible for the complement fixation and hemagglutination tests.

Antigen SP III obtained from the sediment was more reactive in both complement fixation and precipitin tests than SS11 obtained from the supernatant.

Antigen SPSA was most reactive in both complement fixation and precipitin tests among the 3 antigens which were prepared from antigen SP III by gel-filtration on sephadex G-100 column chromatography.

Antigen SS II showed the positive reactions with rabbit antiserum (protein concentration of the antigen was 30 gamma per ml), with the human antisera (protein concentration of the antigen was 145 gamma per ml) in the complement fixation test.

Antigen SSA obtained from antigen SS II by gel-filtration on sephadex G-100 column chromatography was more reactive than SSB-C in both complement fixation and precipitin tests.

Antigen SSC1 obtained from antigen SSA by CM-cellulose column chromatography was very reactive in both complement fixation and precipitin tests. With rabbit antiserum, the protein concentration of the antigen SSC1 was 20 gamma per ml, with human antisera it was 125 gamma per ml.

The 3 antigens SSCD1', SSCD1 and SSCD2 were very reactive in both complement fixation and precipitin tests among the 5 antigens which were obtained from SSC1 by DEAE-sephadex A-50 (diethylamino ethyl) column chromatography.