

寒天ゲル内沈降反応による *Toxoplasma gondii* 4株の抗原構成

高柳 坦 神原 広二
猪木 正三 吉川 勝美

(大阪大学微生物病研究所 原虫学部門)

(昭和44年9月11日 受領)

Toxoplasma gondii は分類上の位置づけがまだ不確であるが一属一種と言われている。本原虫は宿主に対する特異性がすくないので人間をはじめ多くの動物から分離され、様々な性質をもった株が採集されている。性質上で顕著なものはマウスに対する病原性である。免疫分野よりすると、株間の交叉反応は極めて普通であると思われるが現在血清学的診断においては株の免疫学的相違は一応問題にしていない。感染防御についてはマウスにはじめ弱毒株を接種し適当な時期になつて強毒株を接種するとマウスは強毒株にある程度の抵抗性を示す。これらのことから強毒・弱毒を問わず株間には、抗原構成にかなりの類似性が暗示されている。

本実験は RH 株、Beverley 株、HS 株及び HS45株の抗原構成について行つたものである。

材料および方法

この実験に用いられた *T. gondii* の4株 (RH, Beverley, HS および HS45) は高田季久・井関基弘両博士(大阪市立大学医学部) から恵与され当教室で ddO 系マウスに継代保存している。

抗原：多量の抗原を集める必要があるためもつぱら抗原としては RH を用いた。RH 以外は腹水より多くの原虫を集めるのが困難であるので抗原としては用いていない。(1) 抗原1 (bound antigen, Weitz 1960) : マウスで継代されている RH 約 2×10^8 個をモルモットの腹腔に注射し、96時間後にエーテル麻酔により、腹腔より原虫を含む腹水を採取した。抗凝固剤として0.01%ヘパリンを使用し、3,000rpm 10分間の遠心で原虫を集めた。集めた原虫は滅菌生食水で2回洗滌し3分間超音波で破

砕し、10,000rpm 60分間遠心した、この上清を抗原1とし、0.1%アジ化ナトリウムを加えて -23°C に保存した。(2) 抗原2 (exoantigen, Weitz 1960) : モルモットの腹水細胞及び浮遊している原虫を除去するため腹水を5,000rpm 20分間遠心し、その上清をとり0.01Mリン酸緩衝液 pH 7.0に24時間透析後、凍結乾燥し抗原2とした。

抗血清：(1) 抗 RH 血清：感染したマウスの腹水をとり遠心(3,000rpm 10分間)により滅菌生食水で2回洗滌し、生原虫(2×10^8 個)をラット(ウイスター系)に筋注した。この処置は15日間隔で4回行なわれ最終注射後30日してエーテル麻酔し、心臓より全採血した。血清は非働化後、0.1%アジ化ナトリウムを加え -23°C に保存した。(2) 抗抗原2血清：感染したマウス腹水を5,000rpm 20分遠心し原虫のない上清を0.01Mリン酸緩衝液 pH 7.0に24時間透析し凍結乾燥した粉末10mgを0.5mlの生食水に溶解しフロインドアジュバントと共にラットに14日間隔で3回筋注した。最終注射後30日して採血し非働化後、0.1%アジ化ナトリウムを加え -23°C に保存した。(3) Beverley, HS, HS45に対する抗血清：マウスの脳内のシスト(200コ)を脳組織と一緒に15日間隔で4回ラットに筋注した。最終注射後30日して全採血し上記同様保存した。

吸収：(1) ラットより得た抗血清は交叉成分除去のためアセトン固定した正常モルモットの腹水細胞で 37°C 30分ずつ2回吸収した。(2) 抗原2と株の特異成分をみるために抗血清は抗原2及びシストを用いて同様吸収した。

寒天ゲル内沈降反応：原則として Preer の方法(1956)に従つた。用いた試験管は内径0.7mm 長さ10cmである。試験管の底部に8mmの厚さに抗血清を入れ、そ

本研究の一部は昭和44年度文部省科学研究費補助金(No. 87542)の援助によりなされた。ここに厚く感謝致します。

の上に5mmの寒天層を作り、更に8mmの厚さに抗原を重層した。寒天は1%で0.01Mペロナル緩衝液(pH 8.6)に溶解した。試験管は37°C 5日間放置し、沈降線を判読した。平衡点(equivalence position)の測定はKoizumi(1966)に従った。

抗血清の力価：抗原1を用いた羊赤血球凝集反応(Jacobs & Lunde, 1957)によるといずれも力価は1:5,000以上であった。

結 果

抗原1とそれに対応する抗血清で展開すると、濃く優勢な2本の沈降線を中心にそれらより抗原側に2本の沈降線を認め、抗体側にはすぐ下に極めてうすい1本の沈降線とそれより更に抗体側に2本の沈降線がみられた(Figs.1a, 3)。判別出来た沈降線を便宜上抗原側よりa~

gとした(Fig. 3)。抗原の倍数稀釈による平衡点を測定すると沈降線 a は0.08, b は0.25, c 0.30, d 0.43, e 0.50, f 0.73, g は0.79であった。次に抗原2について抗RH血清と反応させると、寒天層の中央近くに、2本の沈降線が認められた(Figs. 1b, 3)。平衡点は抗原側のものは0.28であり抗血清側のものは0.42であった。Fig. 1aの沈降線と比較すると平衡点よりして抗原側のものはcに、抗血清側のものはdに相当していると推測された。抗原1と抗抗原2血清、及び抗原2と抗抗原2血清との展開を行うと、両者共に2本の沈降線が認められた(Figs. 1c, 1d)。これらについてみると抗原側の沈降線はcに相当し、下側のものはdに相当している思われた。これよりしてRHは7抗原のうち2抗原がその宿主腹水中にあることが判った。

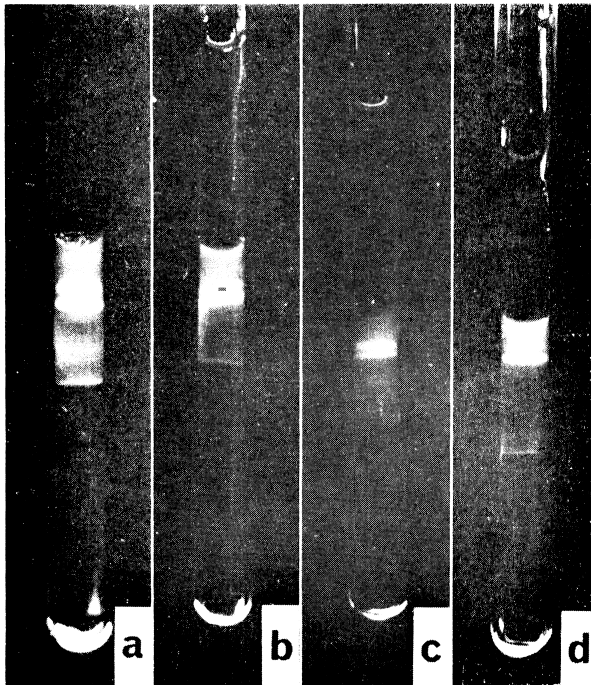


Fig. 1. Precipitin patterns between antigenic extract from RH strain and the homologous antiserum. (a) RH antigen against homologous antiserum. Precipitin lines a, b, c, d, e, f, g from top to bottom may be seen. (b) RH exoantigen against anti-RH serum. Precipitin lines c and d are seen. (c) RH antigen against anti-RH exoantigen serum. Precipitin lines c and d are seen. (d) RH exoantigen against homologous antiserum. Precipitin lines c and d are seen.

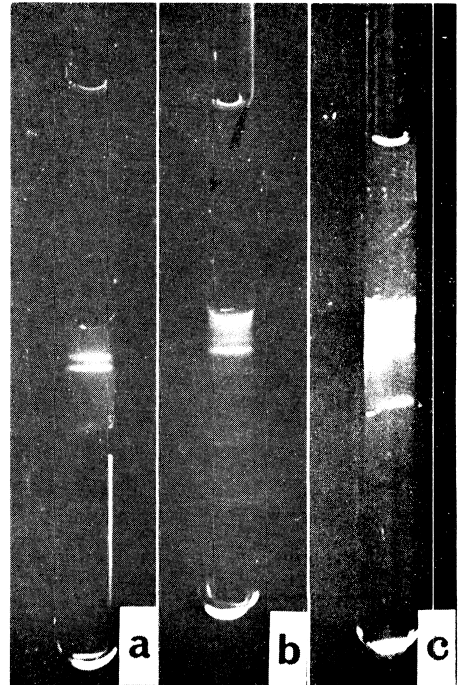


Fig. 2. Precipitin patterns of RH strain set against antisera from each of the other 3 strains, Beverley, HS45 and HS. (a) anti-Beverley serum, (b) anti-HS45 serum, (c) anti-HS serum.

RH と Beverley の抗原の関係を知る為に抗原 1 と抗 Beverley 血清とで展開を行った。その結果 2 本の沈降線を認めた (Fig. 2a)。平衡点は 0.30 及び 0.43 の値を示し、それぞれ c と d に相当していると推測した。RH と HS45 の抗原的関係を知る為に抗原 1 と抗 HS45 血清とで展開した結果、2 本の沈降線を認めた (Fig. 2d)。平衡点は 0.32 及び 0.42 であった。抗原 2 で展開するときの系に於ても 2 本の沈降線が示された。平衡点は 0.32 及び 0.43 であった。これより沈降線は c と d にそれぞれ相当していると思われた。RH と HS の関係をみるために抗原 1 と抗 HS 血清とで展開すると 2 本の沈降線を認めた (Fig. 2c)。平衡点は 0.31 及び 0.42 であった。抗原 2 を用いて展開すると同様 2 本の沈降線を認めた。平衡点は 0.31 及び 0.42 であった。従って c と d に相当していることが判った。抗原 2 で上記の各抗血清を吸収することにより c と d の消失を認めた。一方、Beverley, HS45, HS のシストによる吸収では c と d の消失は明瞭であったがそれら以外の弱い沈降線は吸収による c と d の消失後も極めてうすい沈降線ではあるがしばしば認められた。従ってこれらの沈降線は Beverley, HS45, HS にはごくまれな成分ではなかろうかと推測した。

考 察

T. gondii は宿主への特異性が少ないので多くの動物から採集されているがすべて一種に包含されている。しかし株によつては宿主動物に対する病原性などかなりの相違が認められる。沈降線に関して RH は対応する抗血清との反応で 7 本沈降線を認めた。沈降線は c と d が優勢で太くて濃く、他の 5 本はうすいものであった。用いられた 4 株 (RH, Beverley, HS45, HS) の間では 2 本の共通の沈降線を認めた。沈降線を判読するのに、用いられた方法では多少の困難を伴うが平衡点の測定及び沈降線の濃淡よりこれらの沈降線は c と d であると判断した。RH 以外の 3 株は原虫収集上の理由で抗原の展開を行っていない。吸収により RH との共通成分が 2 本の沈降線として示されたが、他の劣勢な沈降線については共通成分かどうか結論は得られなかった。沈降線の c と d は抗原 1 から検出されると同時に抗原 2 にも検出されることが判った。Beverley, HS45, HS も RH のように c と d が宿主腹水中に検出出来るかどうかは検討中である。

RH の抗原分析の報告は若干ある。しかし株間の相違にふれているものはみあたらないようである。Stranne-

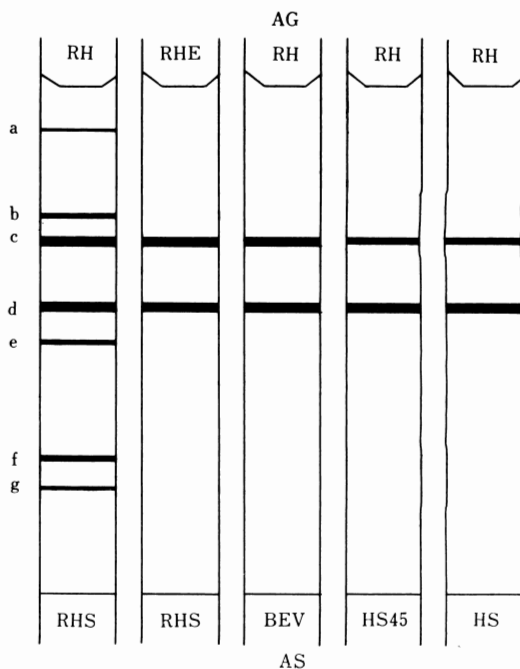


Fig. 3. Diagram illustrating the 7 antigenic components of the RH strain, bands c and d being exoantigenic. The same bands c and d are shown to be common to all the 4 strains. AG: antigen, AS: antiserum, RH: antigen of RH strain, RHE: exoantigen of RH. RHS: anti-RH serum, BEV: anti-Beverley serum, HS 45: anti-HS 45 serum, HS: anti-HS serum.

gard (1962) は RH について 2 本の沈降線を報告している。Chordi *et al* (1964) は 4 ~ 6 本の沈降線を報告している。宿主動物の体液中に認められる抗原“exoantigen”は *T. gondii* で沈降線と認めた報告がある (Strannegard, 1962; Bosco *et al.* 1965)。Bosco *et al.* はこの抗原は補体結合反応に利用出来ると指摘している。しかしこの“exoantigen”が感染中、あるいは実験のための処理の過程で原虫がこわれたものか、あるいは原虫の代謝によるものかは明らかでない。

要 約

Toxoplasma gondii の 4 株 (RH, Beverley, HS45, HS) を用い、沈降反応により抗原分析を行ない株の抗原構成について研究した。

抗原 1 は対応する抗血清に対し 7 本の沈降線を示した。抗原 2 は 2 本の沈降線として示された。抗原 2 の 2

本の沈降線は c と d に相当していた。他の 3 株 (Beverley, HS45, HS) に対する抗血清で展開すると抗原 1 との間に 2 本の沈降線が示され、これらはそれぞれ c と d に相当していることがわかった。RH に認めた c と d 以外の沈降線については Beverley, HS45, HS ではこれらは極めてまれな成分ではなかろうかと推測した。

謝 辞

本研究にあたり貴重な *T. gondii* の株を恵与された高田季久・井関基弘両博士(大阪市大医学部)に深くお礼申し上げます。

本研究の一部は第10回熱帯医学会総会(1968)で発表した。

文 献

- 1) Bosco, G. and Zardi, O. (1965) : Osservazione relative al trattamento di *Toxoplasma gondii* con vibrazioni ultrasonore. *Nuovi Annali Ig. Microbiol.*, 16, 675-682.
- 2) Chordi, A., Walls, K. W. and Kagan, I. G., (1964) : Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by agar diffusion methods. *J. Immunol.*, 93, 1034-1044.
- 3) Gray, A. R. (1961) : Soluble antigens of *Trypanosoma vivax* and of other trypanosomes. *Immunology*, 4, 253-261.
- 4) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitology*, 43, 308-314.
- 5) Koizumi, S. (1966) : Serotypes and immobilization antigens in *Paramecium caudatum*. *J. Protozool.*, 13, 73-76.
- 6) Preer, J. R. (1956) : A quantitative study of a technique of double diffusion in agar. *J. Immunol.*, 77, 52-60.
- 7) Strannegard, O. (1962) : Studies of *Toxoplasma* precipitinogens and their corresponding antibodies by means of diffusion-in-gel methods. *Brit. J. Exp. Path.*, 43, 600-613.
- 8) Weitz, B. (1960) : The properties of some antigens of *Trypanosoma brucei*. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 589-600.

Abstract

ANTIGENIC ANALYSIS OF FOUR STRAINS OF *TOXOPLASMA GONDII* BY MEANS OF AGAR GEL DIFFUSION

TAN TAKAYANAGI, HIROJI KAMBARA, SHOZO INOKI AND KATSUMI YOSHIKAWA
(Department of Protozoology, the Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Osaka, Japan)

The report deals with the antigenic heterogeneity of four strains of *Toxoplasma gondii*, RH (high virulence), Beverley (low virulence), HS45 (low virulence) and HS (low virulence), studied by the double diffusion technique. In agar gel layer set with homologous antiserum, whole saline extract of RH strain showed 7 precipitates, which were designated as bands a to g, respectively, from top to bottom. Both bands c and d appeared to be the major antigenic components of RH strain. Whole saline extract of RH strain showed 2 precipitin lines with each of the 3 heterologous antisera employed here. It has been found that the 2 precipitin lines correspond with bands c and d. No conclusion has been made as regard the remaining 5 bands.