

原虫細胞の免疫原性の解析 26

Trichomonas foetus の ribosomal protein および membrane structure の抗原的役割と complete adjuvant 添加の意義

岡 好 万

徳島大学養護教諭養成所

新 里 仁 達 尾 崎 文 雄

徳島大学医学部寄生虫学教室

(1970年3月12日 受領)

緒 言

細胞構成物質個々の高次構造と生化学的活性は、それらがタンパク合成系で何を分担しているかを中心に検討されてきた。この分野で microsome および ribosome (polycosome を含む) は polypeptide の組立て工場であることがすでに明らかにされた。しかし細胞内高分子物質の免疫学的機能に関する実験的提案はわずかに限られている。われわれは“防御免疫”分析のモデルとしてマウス実験トリコモナス症(マウスT症)を扱ってきた。この系列実験で効果判定の基準となつたのは、1) *Trichomonas foetus* ($1 \sim 2$) $\times 10^7$ 生細胞の (i.p.) 接種は常に致命的であるが、2) ($1 \sim 5$) $\times 10^5$ の感染を経過した動物の約80%は致命的再感染から生残し、3) 死虫免疫によりどれほど体液抗体の上昇をみても致死感染から免れられない点である(岡・尾崎, 1963)。

上記の基礎実験からマウスT症に対する特異抵抗性は感染によつて生ずる“防御免疫”——“細胞性免疫”——と推定した。そこで *T. foetus* 細胞の「何」が“防御抗原”であるかを求めるため遠心分画物につき追跡を進めた結果、microsome 画分に活性が局在していることがたびたびの測定から確認できた(岡・尾崎, 1963; 岡ら, 1967a, 1967b)。

ここに述べる内容は、*T. foetus*-microsome を細分画し、1) 防御抗原情報所在の極限を明らかにすることと、2) 抗原活性を表すために必要な最小単位を求めることに主眼をおいた。

実験材料と実験方法

供試株：10%牛血清加 F-bouillon 36時間培養の *T. foetus* 乾株を遠心集虫し、細胞分画素材及びマウス攻撃(免疫能力判定のため)用として使用した。

実験動物：恒温状態で系統管理、自家繁殖した CF#1 マウスの体重20g 前後を選び、又実験中の妊娠を避けるため雄を使用した。

分画に使用した溶媒と試薬：0.001M Mg⁺-0.25M sucrose (0.25M sucrose のなかに0.001M 濃度に MgCl₂ を含む) は、*T. foetus* より cell-homogenate の調製に、0.001M Mg⁺-PBS pH 7.2 (0.006N phosphate buffer pH 7.2 のなかに0.001M 濃度に MgCl₂ を含む) は microsome, ribosome 及び免疫処置に用いた分画抗原の溶媒として使用した。0.001M Ng⁺-tris buffer pH 7.7 (0.001M 濃度に MgCl₂ を含む tris buffer pH 7.7) は分画を Na-deoxycholate (DOC) で処理する際の溶媒として用いた。この程度の Mg⁺ 濃度は DOC 処理に影響を及ぼさなかつた。RNase は Sigma 社の pancreatic RNase を、DOC は Difco 社の製品を用い、前者の1 mg/ml で、又後者は0.8%濃度で作用させた。

分画法：すでに様々の処理を加味した遠心分画を試みたが、一度に2種以上の画分を質、量ともに満足に得ることは困難であつた(岡・尾崎, 1966; 古谷ら, 1969)。このたびは比較的精製された membrane structure と ribosomal protein を量的に収獲することを主眼とし

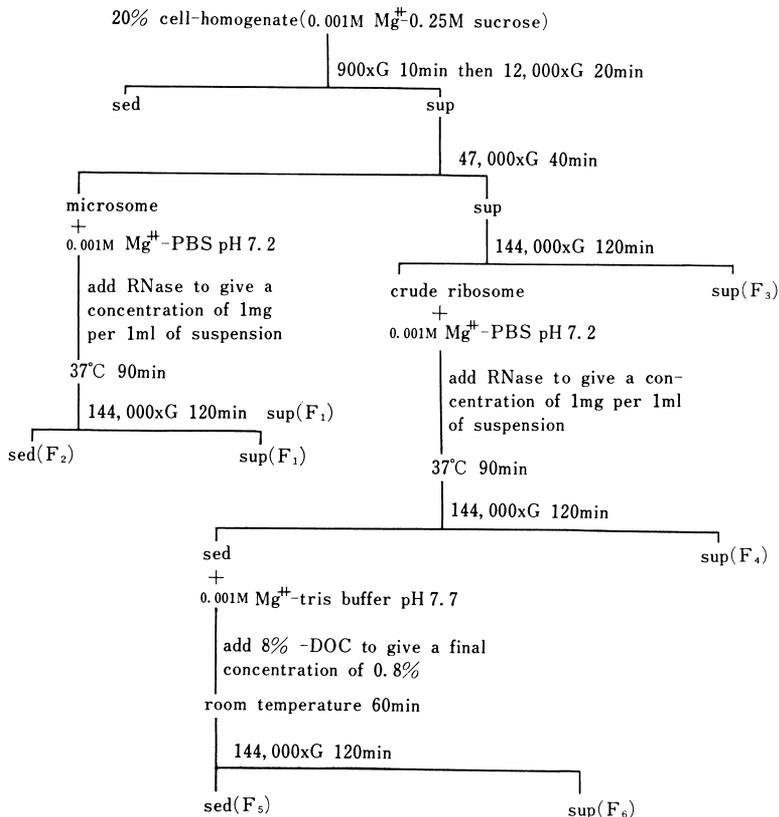


Fig. 1 Fractionation procedure of cell homogenate.

Fig. 1 の法を考案した。

湿潤量約14gより調製した20% homogenateより microsome と crude ribosome を differential centrifugation 法により分画した。microsome は RNase 処理後 F_1 (上清) と F_2 (沈渣) に区別し、他方 crude ribosome は RNase 次いで DOC 処理により F_5 (沈渣) と F_6 (上清) に分画した。防御抗原性を検討したのは F_2 と F_5 の2分画のみである。なお分画法の詳細は実験成績の項で述べる。

RNA の測定：0.001M Mg^{2+} -PBS pH 7.2に RNA (Warthington 社製) を5, 10及び15 μ g/ml に溶解し、そのおのおのについて210~300 $m\mu$ にわたり標準吸収曲線を作製し、それと各画分の吸収曲線を対比さすことから RNA 値を測定した。

免疫及び攻撃法： F_2 を2等分し、一方は素材として用いた湿潤虫体量1g 当たり1ml の割に0.001M Mg^{2+} -PBS pH 7.2を加え均一な浮遊液とし、他方は虫体量1g 当たり0.5ml ずつの0.001M Mg^{2+} -PBS pH 7.2と complete adjuvant を添加し emulsion とした。 F_5 につ

いても F_2 と全く同一の操作により2種の抗原液を調製した。これらの0.5ml をマウスに i.p.-接種し、3週間の後 *T. foetus* 10^7 生虫を i.p.-攻撃して判定を行なった。

実験成績

1 各画分と RNA の関係

いわゆる postmitochondrial fraction に該当する部を、Fig. 1のごとく47,000 \times G 40分遠心することにより microsome を得た。これから ribosome を除くため37°C 90分 RNase で処理し、次いで144,000 \times G 120分の遠心で F_1 と F_2 を得た。紫外部吸収曲線を得るために F_1 は1:250, F_2 は1:100に希釈した。 F_1 の吸収極大は258 $m\mu$ (吸光度=0.810), 吸収極小は238 $m\mu$ (吸光度0.560), 吸光度比 (258/238 $m\mu$) は1.44であつた (Fig. 2)。更に標準曲線との対比から F_1 は5.892mg/ml の RNA を含むことがわかつた。

F_2 では RNA 特有の吸収曲線は全く見られなかつた (Fig. 2)。このことから RNase 処理により microsome

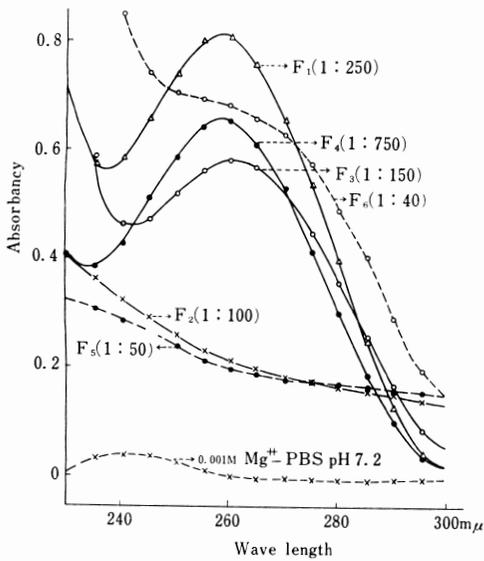


Fig. 2 Absorption curve of fractions.

画分に存在した RNA のすべては可溶性部 (F_1) に移動し、 F_2 の主部は lipoprotein で構成された membrane structure であることが明らかになった。

Microsome を除いた上清を $144,000 \times G$ 120分処理により crude ribosome と F_3 (上清) を得た。Crude ribosome を RNase $37^\circ C$ 90分処理後、 $144,000 \times G$ 120分の遠心により F_4 (上清) と crude ribosomal protein を得た。後者の画分内にはなお微細な破片として膜質の混在が予想されるので、これを除く目的から室温 ($15 \sim 17^\circ C$) で2時間 DOC 処理を施し、次いで $144,000 \times G$ 120分遠心を行ない F_5 (沈渣) と F_6 (上清) を分画した (以上 Fig. 1)。紫外外部吸収測定のため F_4 , F_4 , F_5 及び F_6 はそれぞれ $1:150$, $1:750$, $1:50$ 及び $1:40$ に希釈した。

F_3 の吸収極大は $260 m\mu$ (吸光度 0.575)、吸収極小は $242 m\mu$ (吸光度 0.460)、吸光度比は 1.25 であり、 F_4 の吸収極大は $258 m\mu$ (吸光度 0.660)、吸収極小は $233 m\mu$ (吸光度 0.380)、吸光度比は 1.73 であつた。又 F_3 及び F_4 の RNA mg/ml はそれぞれ 2.35 及び 13.672 であつた。すなわち crude ribosome 画分の RNase 処理により ribosomal RNA はほとんど完全に F_4 に移行したことを示した。この際の沈殿部を Fig. 1 のごとく DOC で処理すると、明らかではないが F_6 にタンパクが含まれている可能性を暗示した吸収曲線が得られた。このことは crude ribosome 画分に微量ではあるが lipoprotein が混在したことを示唆していると思う。

F_2 及び F_5 の主要組成が理論的にはタンパクでありながら、その特異吸収曲線を示さなかつたことは、不溶性の状態では測定したことに基づく。

2. F_2 及び F_5 の防御抗原性

「実験材料と方法」の項目で述べたごとく F_2 及び F_5 画分は、この分離に用いた元の湿潤虫体量と等容量の $0.001 M$ Mg^{++} -PBS pH 7.2 に浮遊したものを、湿潤虫体量と等容量に戻すため $0.001 M$ Mg^{++} -PBS pH 7.2 と complete adjuvant を等量に添加し emulsion としたものの両者を抗原として用いた。免疫接種はそれぞれ $0.5 ml$ を i.p. 1回とした。対照群を含め各実験群は16匹からなり、免疫3週間後に $10^7 T. foetus$ の攻撃 (i.p.) を受けた。

攻撃6日までに対照群は15例死亡 (死亡率94%) し、腹水中におびただしい数の活動原虫を証明した。30日の観察期間に耐えた1例だけは、その時点で原虫は証明できなかつた (Fig. 3)。 $0.001 M$ Mg^{++} -PBS pH 7.2 に浮遊した F_2 抗原接種群では、攻撃後2週間までに13例が死亡 (81.2%) し、すべての腹水中に活動原虫を多数認めた。生残した3例のなか2例は慢性症状を呈し、色々の程度に変形した中等数の生原虫を認めたが、他の1例は外見的に健康であり、全く原虫はみられなかつた。

F_2 +adjuvant 接種群の死亡は2例 (12.5%) にすぎず、それも上記2群に比べてかなり長期 (12~17日) を要した。しかし2例とも腹水中に活動原虫を多数認めた。この実験群で興味あることは生残した14例のなか約半数 (6例) は慢性症状を呈し、変形した生原虫が余り多くない程度に観察されると同時に、著しく発達した mast cell の多くが腹水中に存在した。他の8例は外見的に全く健康であり、もちろん生原虫はみられなかつた。

F_5 の $0.001 M$ Mg^{++} -PBS pH 7.2 浮遊液を接種免疫した実験群の感染防御成績は、同一条件の F_2 免疫群と非常に類似した。すなわち14例 (約83%) は19日までに感染死を来し、腹腔内に多数の活動原虫を認めた。しかしこれら死亡例においても2週間以上生存した3~4例では原虫数の減少とともに、変形した原虫数が多くみられる傾向があつた。又生残した2例は腹部が著しく膨満し、腹水で充満しているにもかかわらず原虫数は予想外に少なく、変形も顕著であつた。又発達した mast cell の多くを認めた。

最後に complete adjuvant を添加した F_5 で免疫したマウス群の防御効果について述べる。これは他のいず

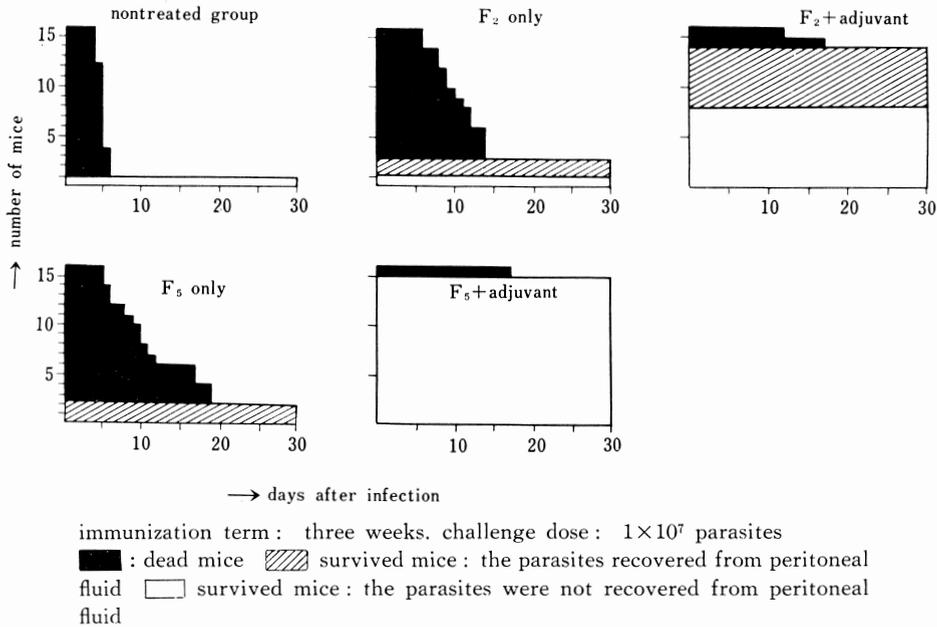


Fig. 3 Protective antigenicity of F_2 and F_5 fractions.

れの実験群とも全く結果を異にした。攻撃後17日で1例だけ死亡したけれども、15例(約94%)は外見的に健康状態で生残した。もちろん腹水中に生原虫を発見することは出来なかった。

総括および考案

“細胞性免疫”の解析を分子レベルで進めるために現在次の2つの手段が選ばれている。

1) 免疫—macrophage, —lymphoid cell から分離した RNA あるいは RNA 様物質によつて特異抵抗性が伝達可能であること。この場合に Fong *et al.* (1962, 1963a, 1963b) は免疫血清(対応した抗血清である必要はない)の補助が必要であることを力説しているが、三橋(1966)はこれを否定し、更に秋山(1967)は細胞を破壊したり、生菌を含まない macrophage の使用は伝達能力を消失することを公表している。2) “細胞性免疫”獲得の初段階としてどのような抗原分子が関与するかについては Murakami *et al.* (1959a, 1959b) が結核菌及び *Salmonella typhi* について、Kanai & Youmans (1960), Youmans & Youmans (1964a, 1964b) が結核菌の実験から病原細胞内の微細顆粒を公表し、その後、岡ら(1967)は *T. foetus* の実験から microsome, ribosome に防御抗原性が局在することを記録した。最近 Youmans & Youmans (1965) も結核菌から分離した

ribosome に防御抗原性を認めているが、彼らは ribosome を RNase, DNase あるいは trypsin で処理した場合、RNase によつてのみ抗原活性の消失をみ、“防御抗原”の本態が ribosomal RNA であることを示唆した。しかし、かかる化学処理の後どのような状態で抗原性を検討したか明らかでない点にわれわれは疑問をいただいている (Youmans & Youmans, 1966)。

われわれもマウス実験T症に対する“防御抗原”を *T. foetus* の ribosome に認めながらも、その特異活性基(特異情報)が ribosomal RNA, ribosomal protein のいずれに存在するか説得性に欠けていた。又 membrane structure に無視できない抗原性が示されたが、それに対し十分な根拠の準備もなく否定の方向に考えてきた。これらの点についてある程度解決の道を開いたと思う。

F_1 及び F_4 の RNA mg/ml はそれぞれ5.892及び13.672であり、これはすべて ribosome に由来している。すなわち細胞質内の free ribosome は、microsome 画分に含まれる ribosome の約2.3倍量となる。しかし電顕観察の結果(伊藤, 1968)では *T. foetus* の membrane-bound ribosome は核周辺にわずかに観られるにすぎないことから考えると、microsome 画分の RNA 値はむしろ多いように示された。これは47,000×G 40分の処置により相当量の polyribosome が microsome 画分に沈殿したためである。又 F_3 の RNA 値は ribo-

some 由来の RNA の約 $1/10$ 量 (2.35mg/ml) にすぎず、この主たる由来は t-RNA である。

F₂ は microsome を RNase 処理し、選択的に membrane structure を回収したもので、主成分は lipoprotein であるが、上述のごとく相当量の ribosome が前段階で混在したため当然 ribosomal protein が混入していると予想される。動物実験による F₂ の防御抗原性の判定は複雑であり、おのずから推論的解釈になる。F₂ のみ (adjuvant なし) による免疫群の 81% は死亡した。平均生存日数は約 12 日であり、対照群の 5 日であったのに比して著しく延命である。これは F₂ に混在する ribosomal protein が抗原原活性基として作用し、membrane structure (lipoprotein) がこれを補助したが、活性基の絶対量が不足のため十分に効果をあげ得なかったものと思う。F₂+complete adjuvant 免疫群は上記免疫群とは逆に約 87% が生残した。ただし生残例の約半数は慢性 T 症を表わし活動原虫を保有した。なぜ adjuvant の添加が F₂ 抗原の効果を高めたかは、membrane structure よりも adjuvant の方が腹腔内に macrophage をすみやかに集め、少量の ribosomal protein も抗原として最高度に捕捉利用されたためではなかったろうか。この仮説にたつと完全耐過及び慢性症の生残動物の存在を解釈するのに好都合である。

F₃ はタンパクの吸収値を測定していないが crude ribosome を RNase, DOC で処理して得た画分であるから、ribosomal protein であることに誤りはなからう。F₃ のみで免疫した実験群は 87% の死亡率を示し、これらの平均生存日数は 11 日であった。これは F₃ のみによる免疫群とほぼ一致した成績であった。しかし解釈の上では著しく異なってくる。すなわち F₃ は抗原活性基 (ribosomal protein) は十分であるが、これが防御反応に組み込まれる過程を補助する物質の欠損と考えたい。F₃+complete adjuvant 免疫群では約 94% が生残し、実験群のうち最高の防御反応を示し、これら生残例には慢性症を呈するものは 1 例も認めなかった。これは adjuvant により誘導された macrophage により、抗原情報の十分量が捕捉され、免疫活動に利用されたためと判読した。

防御実験成績に対し推論的な解釈を進めたことは、membrane structure 及び ribosome の免疫学的立場を確立するための作業仮説を設定する意味を含めてのことである。

結 論

Trichomonas foetus を素材とし遠心分画法により microsome, ribosome 及び supernatant fluid に分画し、これらの RNA 値を測定すると同時に F₂ (membrane structure) 及び F₃ (ribosomal protein) の防御抗原性を検討した。

1. *T. foetus* 湿潤重量 1g 当たりより microsome, ribosome 及び supernatant fluid に回収された RNA 値は、それぞれ 5.892, 13.672 及び 2.35mg/ml であった。前二者の RNA は ribosome に、後者は t-RNA に由来する。

2. F₁, F₃ 及び F₄ (supernatant fluid) の吸光度比は 1.4, 1.26 及び 1.66 を示し、RNA 純度は F₄ が最も高い。

3. F₂ のみで防御抗原性は認めたいが、complete adjuvant を添加すると 87% のマウスは生残できる。ただし生残例の約半数は慢性丁症を表わし、腹水中に生原虫を認めた。

4. F₃ のみではマウスに防御抗原性は認めたい。しかし complete adjuvant を添加するとマウスの 94% は生残し、外見的に健康であり、生原虫も証明されなかった。

文 献

- 1) Fong, J., Chin, D. and Elbers, S. S. (1962): Studies of tubercle bacillus-histiocyte relationship. V Passive transfer of cellular resistance. J. exp. Med., 115, 475-489.
- 2) Fong, J., Chin, D. and Elbers, S. S. (1963): Studies of tubercle bacillus-histiocyte relationship. VI Induction of cellular resistance by ribosomes and ribosomal RNA. J. exp. Med., 118, 371-386.
- 3) Fong, J., Chin, D. and Vickrey, H. M. (1963): Studies of tubercle bacillus-histiocyte relationship. VII Homologous and heterologous transfer of cellular resistance. J. exp. Med., 118, 727-742.
- 4) 古谷正人・伊藤義博・尾崎文雄・前田宣子・岡好万 (1969): 原虫細胞の免疫原性の解析 (23), *Trichomonas foetus* 滑面小胞体の分離。医学と生物学, 78, 201-205.
- 5) 伊藤義博 (1968): 遠心分析法による *Trichomonas foetus* 細胞構造物の分離と化学的性状。寄生虫誌, 17, 494-507.
- 6) Kanai, K., and Youmans, G. P. (1960): Immunogenicity of intracellular particles and cell

- walls from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 80, 607-614.
- 7) 三橋進(1966) : 細胞性免疫とその伝達因子. *日本細菌誌*, 21, 312-328.
 - 8) Murakami, S., Oka, Y., Matsuura, Y. and Yoshioka, T. (1959a) : Studies on prevention of infection (1) Antigenic capacity of enzymatically active fractions isolated from tubercle bacilli against tuberculosis of mouse. *Acta Med. Okayama.*, 13, 1-14.
 - 9) Murakami, S., Yoshioka, T. Oka, Y. and Matsuura, Y. (1959b) : Studies on prevention of infection (2) The enzymologic traits and protective ability of the fractions obtained from *Sal. typhi* by high speed centrifugation. *Acta Med. Okayama.*, 13, 15-16.
 - 10) 岡好万・尾崎文雄(1963) : 原虫細胞の生理機能に関する研究(6) 実験トリコモナス症と生虫及び死虫免疫の解析. *医学と生物学*, 66, 279-282.
 - 11) 岡好万・尾崎文雄(1968) : 原虫細胞の生理機能に関する研究(7) *Trichomonas foetus* 細胞の微細構造物の防御抗原性. *医学と生物学*, 66, 331-334.
 - 12) 岡好万・伊藤義博・尾崎文雄(1967a) : 原虫細胞の免疫原性の解析(19) *Trichomonas foetus* の大粒子と microsome の防御抗原性. *医学と生物学*, 74, 333-336.
 - 13) 岡好万・伊藤義博・新里仁達・尾崎文雄(1967b) : 原虫細胞の免疫原性の解析(20) : *Trichomonas foetus* の microsome から分離した膜構造と ribosome の防御抗原性. *医学と生物学*, 75, 17-20.
 - 14) 岡好万・尾崎文雄(1966) : 原虫細胞の免疫原性の解析(17) : *Trichomonas foetus* の intracellular components の遠心分析. *医学と生物学*, 73, 16-19.
 - 15) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. (1964a) : Nature of the labile immunogenic substance in the particulate fraction isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 88, 1030-1037.
 - 16) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. (1964b) : Further studies on a labile immunogenic particulate substance isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 87, 278-284.
 - 17) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. (1965) : Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 89, 1291-1298.
 - 18) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. (1966) : Effect of trypsin and ribonuclease on the immunogenic activity of ribosomes and ribonucleic acid isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 91, 2139-2145.

AbstractANTIGENICITY OF RIBOSOMAL PROTEIN AND MEMBRANE STRUCTURE IN
TRICHOMONAS FOETUS AND ROLE OF COMPLETE ADJUVANT
IN PROMOTION OF THE ACTIVITY

YOSHIKAZU OKA

(Training School for Nurse Teachers, Tokushima Univerity, Tokushima)

JINTATSU SHINZATO AND HUMIO OSAKI

(Department of Parasitology, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima)

The cell homogenate of *Trichomonas foetus* was fractionated into microsomes, ribosomes and the final supernatant fluid by differential centrifugation. Quantitative analyses of RNA in the fractions and evaluations of protective antigenicity of the membrane structure and ribosomal protein were carried out.

1. The recovery of RNA from microsomes, ribosomes and the final supernatant fluid per 1 g (wet weight) of *T. foetus* was 5.892, 13.672 and 2.35 mg/ml, respectively, and the former two are originated in ribosomes and the latter one believably in t-RNA.

2. The ultraviolet absorption density of the 144,000 × G supernatant of treated microsomes with RNase, the final supernatant fluid and the 144,000 × G supernatant of treated ribosomes with RNase was 1.4, 1.26 and 1.66, respectively, and RNA was purest in the latter one.

3. Protective antigenicity was not assumed in the membrane structure unless it was along with complete adjuvant where as high as 87 per cent of the immunized mice survived from reinfections. However, approximately one half of the survived mice developed chronic clinical signs and a number of the parasites were recovered from the peritoneal exudate.

4. Ribosomal protein itself was not able to exhibit protective activity and the presence of complete adjuvant gave a noticeable increase in the results enabling 94 per cent of the immunized mice to overcome reinfections for a considerably long term without either clinical signs or recoveries of the parasites from the peritoneal fluid.