

トリパノソーマの免疫学的研究, 特に exoantigen の特異性について

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45年5月4日 受領)

トリパノソーマの免疫学的研究は凝塊反応, 感染防御反応による抗原型に関する研究 (Inoki 1952; Inoki *et al.*, 1959; Inoki *et al.*, 1960; Seed, 1963; Miller, 1965; Seed & Gam, 1966) と寒天内沈降反応による抗原分析 (Gray, 1961) があり, 特異抗原と共通抗原が認められ報告されている. 原虫細胞内にある抗原, いわゆる bound antigen (以下BAと略) の他に感染動物の血中にみとめられる原虫より遊離した抗原, いわゆる exoantigen (EAと略) があることが *T. brucei* と *T. vivax* で発見され, 両種の出すEAは種特異抗原であることが報告された (Weitz, 1960a, b, 1963).

我々は長期間研究室に保存されている2種のトリパノソーマを用いて蛍光抗体法及び寒天内沈降反応により抗原の特異性について観察した.

材料および方法

用いたトリパノソーマは *T. gambiense* (T.g と略) と *T. evansi* (T.e と略) である. これらの原虫はいずれもマウスに継代保存され, 実験に使用された.

T.g の抗原型変異株: R₁ 型原虫はO型原虫の感染したマウスに正常人血清0.3mlを注射し, 7日後に再発したものである. 再発株は顕微鏡下で一原虫を分離しそれをマウスに注射して R₁ 型株を作った. R₂ 型の原虫は上記再発マウスに再び正常人血清0.3mlを注射し, 7日後に再発したもので R₁ 型同様に一原虫を分離し株を作った.

BA: 原虫を多量に集めるため, マウスに継代している原虫を5匹のラットに移植し, その後96時間して感染極期に達した時期にエーテル麻酔を施し心臓から全採血した. 抗凝固剤として0.5%クエン酸ナトリウム加生食水を用い3000rpm 10分遠心し原虫層をピペットで分

離した. この原虫を音波破壊し, 10000rpm 60分遠心し上清を-20°Cに保存した.

EA: 感染ラットの血液を5000rpm 10分遠心して原虫を完全に除去した上清をEAとし-20°Cに保存した.

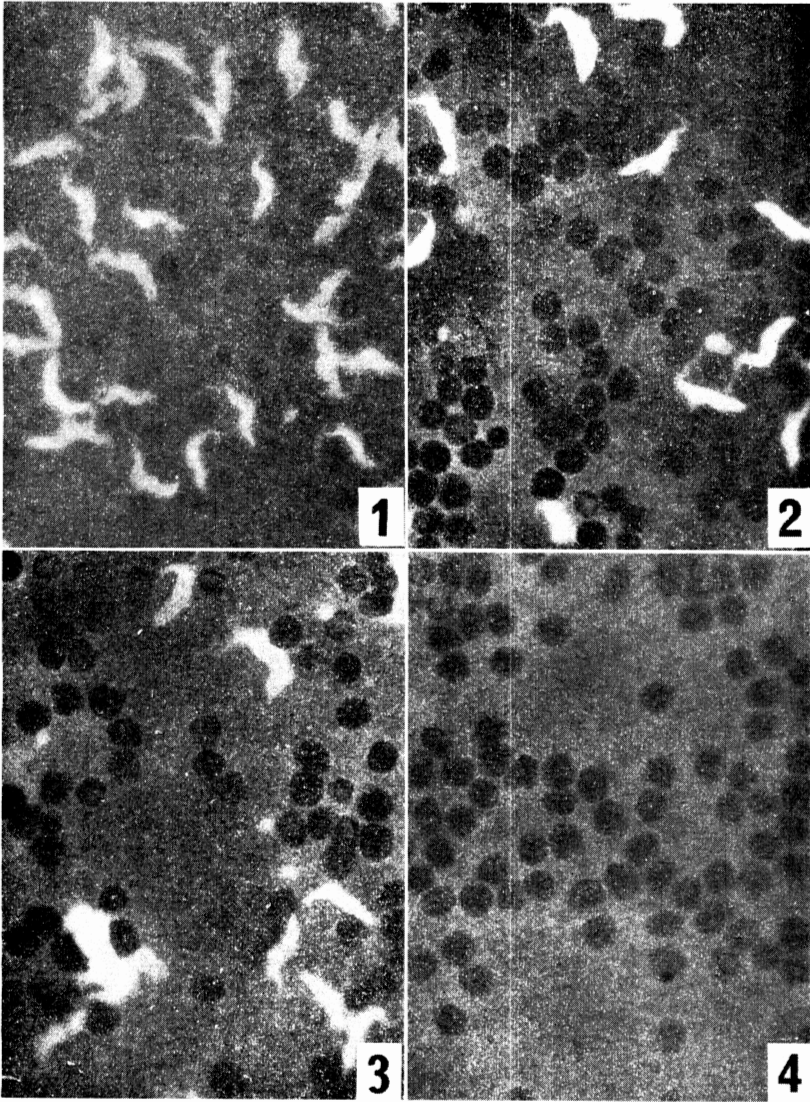
抗血清: 抗原を10mg フロインド・アジュバントと共にラットに筋注した. 30日して更に抗原を10mg, 5日間隔で3回筋注した. 最終筋注後10日してブースターを注入し3日目に心臓より全採血した. 得られた抗血清は56°C 30分非働化後0.1%アジ化ナトリウムを加えて-20°Cに保存した.

螢光色素標識: 抗血清は硫酸アンモニウムで分画しγグロブリンを精製した後, 生食水に透析し1%蛋白溶液に調整した. 炭酸緩衝液(0.5M)でpH 9.0にし, 螢光色素(fluorescein isothiocyanate)を加えて4°Cに保ち6時間攪拌した. 次いで0.15M PBS (pH 7.1)に24時間4°Cで透析した. 未反応色素および非特異物質を除去するためにセファデックス G25及びDEAE・セファデックスを用いた. 純化した標識血清は2.5%溶液(蛋白質量)に濃縮し0°C~4°Cに保存した.

原虫塗抹標本: 感染マウス末梢血をスライド上に塗抹し, 空気乾燥後3分間メチルアルコールで固定した.

染色: 標識γグロブリンと原虫との反応は37°C 30分行われた. 反応完了後0.15M PBS (pH 7.1)で十分に洗滌後, PBでpH 7.1にしたグリセリン中に封入した. 光源はAHL-250でBG-12フィルター, FY 5フィルターを用いて観察した.

寒天ゲル内沈降反応: オヒテルロニー法 (Ouchterlony, 1949)を用いた. 寒天ゲルは1%寒天(Difco-bactoagar)でイオン強度0.05, pH 8.6のペロナール緩衝液を用いた. 抗原および抗体池の直径は4mm, 間隔



Figures 1-4 show the result of the fluorescent antibody test using fluorescein isothiocyanate.

Fig. 1 *Trypanosoma gambiense* with homologous antibody. All trypanosomes show fluorescence.

Fig. 2 *T. evansi* with *T. gambiense* antibody. All trypanosomes show fluorescence.

Fig. 3 *T. gambiense* with antibody against *T. gambiense* exoantigen. Fluorescence of all trypanosomes is shown.

Fig. 4 *T. evansi* with antibody against *T. gambiense* exoantigen. No fluorescence.

は5 mmであつた。展開は室温で行ない沈降線の判定は3日後に行つた。

結 果

T.g と T.e は媒介昆虫と宿主を異にするがいずれも分類上ブルーセイ群に属し近縁な種類とされている。蛍光色素標識抗 T.g 血清で両種原虫を染色すると対応する

る T.g は極めて鮮明に染色された (Fig. 1)。T.e もこれに劣らずよく染色され (Fig. 2)、両種原虫の染色性に差異はみられなかつた。次に蛍光色素標識抗 T.e 血清で両種を染色すると T.g および T.e がよく染まり両種の交叉反応が認められた。従つて BA に関しては種間共通成分があることが判つた。

T.g の E A に対する標識抗血清で染色すると対応する

Table 1. FA test on trypanosomes and antisera derived from exoantigens of the different antigenic variants

antiserum against exoantigen of:	T. gambiense variants		
	0	R ₁	R ₂
0	+(1)	-	-
R ₁	-(2)	+	-
R ₂	-	-	+

(1) + : fluorescence
 (2) - : no fluorescence

E A は種に特有な抗原であり T.g, T.e の共通成分ではないことが判った。

T.g の変異型 (R₁ および R₂ 型) について同様な手技による染色でそれぞれの変異型よりの E A の特異性を調べた (Table 1). 原虫は互に対応する標識抗血清によつてのみ染色され, 対応しない抗原型の原虫は染色されなかつた. これよりして E A は抗原型特有の抗原であることが示された.

T.e と T.g O 型 R₁ 型 R₂ 型の出す E A について寒天ゲル内沈降反応によつて抗原の解析を行つた. (Fig.

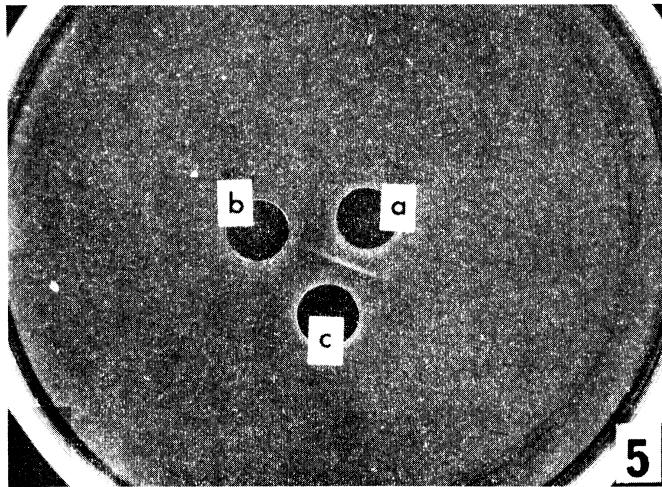


Figure 5 shows the precipitin line between the antiserum and exoantigen of the antigenic variants of *T. gambiense*. O type antiserum (c) against exoantigens O (a) and R₁ (b). Precipitin line between O type antiserum and O exoantigen may be observed.

Table 2. Number of precipitin line between exoantigens and homologous antisera. The table shows that there is only 1 exoantigen present in infected rat serum

Antiserum against:	T. evansi	Exoantigen		
		T. gambiense		
		0 type	R ₁ type	R ₂ type
T. evansi	1	-	-	-
0	-(1)	1	-	-
R ₁	-	-	1	-
R ₂	-	-	-	1

(1) - : No precipitin line.

T.g は非常によく染色されるが (Fig. 3), T.e は全く染色されなかつた (Fig. 4). また, T.e の E A に対する標識抗血清で染色すると T.e はよく染色されたが, T.g は染色されなかつた. 従つて感染宿主血中に認められる

5 と Table 2). Table 2 は抗原抗体の組合せに於ける沈降線の数を示した. それによつて E A は各型について 1 種類の抗原であることがわかつた. そして標識抗血清による染色の結果と一致して互に交叉しないことがわかつた.

考 察

トリパノソーマには寒天ゲル内沈降反応で 5 ~ 6 抗原が認められる (Gray, 1961). 抗原型変異よりみると, 24 抗原型が報告され (Osaki, 1959) ているので常時原虫内に存在する抗原と特殊な条件下で作られる抗原を考えると数種の抗原と更に多くの潜在抗原が考えられる.

トリパノソーマの抗原には種間で共通のものがあるが (Gray, 1961), 宿主血液中の E A は *T. brucei* と *T. vivax* で相違し, それらが互に種特異抗原であることが報告された (Weitz, 1960a). Ormerod (1966) によると

E Aは粗面小胞体のリボゾームで作られ小胞体に貯えられている。但し原虫外に遊離する個所についてふれた報告はない。

今回の結果よりすると T.g と T.e がそれぞれ E A を産生し、それらの E A は種特異抗原であることが判った。従つてトリパノソーマでは多くの種でこのような E A が産生され、しかもそれらはそれぞれ特異抗原であると考えられる。抗原型の変異株による結果よりすると E A は種特異的であるばかりか同一種内でも抗原型に特異的であり、各抗原型で別々の単一抗原が分泌されていることがわかつた。

要 約

T.g と T.e について 螢光色素標識抗血清によつて B A と E A に関して、種間共通性および種特異性について研究した。B A には両種に共通な抗原が認められた。一方 E A に対する 螢光色素標識抗血清によれば両種には共通抗原は認められなかつた。T.g の抗原型変異株についてみると E A は各抗原型に特異的であつた。寒天ゲル内沈降反応によると E A は 1 抗原型につき 1 抗原であつた。

文 献

- 1) Gray, A. R. (1961) : Soluble antigens of *Trypanosoma vivax* and of other trypanosomes. *Immunology*, 4, 253-261.
- 2) Inoki, S. (1952) : A new experimental methods and genetical interpretation of the antigenic variation in *Trypanosoma gambiense*. *Med. J. Osaka Univ.* 3, 81-86.
- 3) Inoki, S., Nakabayashi, T., Fukukita, S. and Osaki, H. (1959) : Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense*. IV. Further considerations on the screening methods. *Biken's J.* 2, 277-283.
- 4) Inoki, S., Nakabayashi, T., Fukukita, S. and Osaki, H. (1960) : Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense*. V. Antigenic constitution of the relapse type strain in respect to its reversibility to the original type. *Biken's J.*, 3, 339-350.
- 5) Miller, J. K. (1965) : Variation of the soluble antigens of *Trypanosoma brucei*. *Immunology*, 9, 521-528.
- 6) Ormerod, W. E. (1966) : The trypanosome as a secretory cell. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60, 117.
- 7) Osaki, H. (1959) : Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense* (serotypes and the mode of relapse). *Biken's J.*, 2, 113-127.
- 8) Ouchterlony, O. (1949) : Antigen-antibody reactions in gels. *Ark. Kemi.*, B26, 1-19.
- 9) Seed, J. R. (1963) : The characterization on antigens isolated from *Trypanosoma rhodesiense*. *J. Protozool.*, 10, 380-389.
- 10) Seed, J. R. and Gam, A. A. (1966) : The properties of antigens from *Trypanosoma gambiense*. *J. Parasit.*, 52, 395-398.
- 11) Weitz, B. (1960a) : A soluble protective antigen of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, Lond., 185, 788-789.
- 12) Weitz, B. (1960b) : The properties of some antigens of *Trypanosoma brucei*. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 589-600.
- 13) Weitz, B. (1963) : The specificity of trypanosomal antigens by immuno-fluorescence. *J. Gen. Microbiol.*, 32, 145-149.



IMMUNOLOGICAL STUDIES ON TRYPANOSOMES, WITH SPECIAL
REFERENCE TO THE SPECIFICITIES OF THE ANTIGENS

TAN TAKAYANAGI, HIROJI KAMBARA, SHOZO INOKI AND KATSUMI YOSHIKAWA

*(Department of Protozoology, the Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Osaka, Japan)*

This report deals with the bound antigens and exoantigens of two different species of trypanosomes, *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma evansi*. The specificity of these antigens was examined by use of the antisera coupled with fluorescein isothiocyanate. From this study, it has been found that some of the bound antigens are common to both species, while the exoantigens are species-specific. The exoantigens derived from original strain and variants (R₁ and R₂) of *T. gambiense* are shown to be specific to their serotypes and each one consists of a single antigenic substance as shown by the Ouchterlony method.