

# 螢光抗体法による豚肺虫 *Metastrongylus apri* (Gmelin, 1790) 成虫より分離 した抗原の起原の検討

吉 原 忍

日本獣医畜産大学家畜寄生虫学教室

(昭和48年9月5日 受領)

近年、寄生性蠕虫類の成虫に由来する抗原性物質の分離、精製には各種の液体クロマトグラフィーが応用されている。しかし、これらの方法を応用した Norman ら (1966), Jeska (1967) 等の成績によれば抗原性物質を単離することはきわめて困難であるようである。

このような目的には抗原-抗体結合物を用いる方法が非常に効果的であるといわれる (Kabat, 1961)。

著者は豚肺虫 *Metastrongylus apri* の抽出液中に存在する抗原性物質をゲル内沈降反応で分析し、各抗原-抗体結合物で家兎を免疫することによって、純度の比較的高いそれぞれの抗血清を作製し、さらに、これらの抗血清を用い、それらに対応する抗原性物質の成虫内における局在部位について間接螢光抗体法を用いて検討した。さらに、豚肺虫と牛肺虫 *Dictyocaulus viviparus* および豚回虫 *Ascaris suum* の抗原性について検索をおこなったので報告する。

## 材料および方法

### 1. 豚肺虫抗原

抗原としての豚肺虫抽出液は Chaffee ら (1954) の方法に準じて作製した。

成虫を滅菌生理食塩水ならびに蒸留水で洗滌し、凍結乾燥した。乾燥材料は脱脂のため、その1.0g に冷却したエーテル100 ml を加え、ポーター型ホモジナイザーで磨砕したものを他の容器にうつし、これに50 ml のエーテルでホモジナイザー壁をあらったものに加え、 $-20^{\circ}\text{C}$  で48時間放置した。ついで、低温下で10,000 rpm, 30分間遠心、上清を除去後、吸引ポンプでエーテルを除いた。残渣に pH 7.2, 0.15 M のペロナール緩

衝液 (以後 VBS と略す) を25 ml 加え、ホモジナイザーで磨砕し、これを他の容器にとり、さらに同量の VBS でホモジナイザーを洗滌したものを加えた。これについて、マグネチックスターラーで $4^{\circ}\text{C}$ 、48時間の抗原抽出操作を行なった。その後、10,000 rpm, 30分間遠心し、上清を抗原として使用時まで $4^{\circ}\text{C}$  に保存した。この抗原は蛋白質 (フォリン法) 9800 r/ml, 糖 (アンシロン法) 4200 r/ml を含有していた。他の蠕虫の抗原も同様に作製した。

### 2. 豚肺虫抗原に対する抗血清

抗原に等量の Freund の不完全アジュバント (バイオール F9: アラセル A1) を加えたものを免疫に使用した。まず、この4.0 ml を2.5 kg 前後の家兎の背筋に、さらに、4週後に同量を大腿筋に注射し、2回目の免疫後4週目に抗原1.0 ml を耳静脈に注射した。最終免疫後10日目に沈降素価 (重層法) を測定し、16倍以上の力価を示した家兎は2日以内に全採血し、この血清を使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### 3. ゲル内沈降反応

寒天平板は Ouchterlony (1953) の方法に準じて作製した。0.01%の割合にマーズニンを含む1%寒天を作り、まず数 ml を直径8.5 cm のシャーレにそそぎ、寒天平板とした後、中心部と中心から0.7 cm 離して等間隔に6個の計7個のペニシリンカップを寒天上に配置し、20 ml の寒天をそそぎこみ、7個の穴を作った。それぞれの穴に抗原もしくは抗血清をそそいだ後、室温で5日間反応させた。水分の蒸散をさけるため、反応は密閉した大形シャーレ内で実施した。

### 4. 結合物に対する抗血清

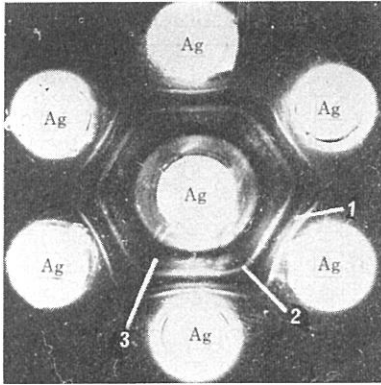


図1 抗原と免疫血清によるゲル内沈降反応

抗原とその抗血清を寒天内で反応させると、図1にみられるように4本の沈降線が形成された。そのうち、抗原側の2本はきわめて近接して分れ難いので、あわせて沈降線1、つぎを2そしてつとも抗血清に近いものを3と名付けた。

反応終了後、10枚の寒天板を流水で洗滌し、ついで4°Cの生理食塩水、さらに、蒸留水に入れ、洗滌した。それぞれの寒天板からおのおのの沈降線を切り出し、10枚分の沈降線を5mlの注射筒に入れ、最終的に5mlになるまで生理食塩水を加えた。注射器内で圧出、吸引をくり返し、寒天を細かくし、さらに、ツベルクリン用の二段針を注射筒につけて圧出し、より微細な寒天にした。これを抗原として、さきと同様な方法で家兎を免疫した。最終免疫後10日以内に全採血をおこない、沈降素価が8倍以上の抗血清を実験に供した。沈降線1、2、および3に対する抗血清をそれぞれ1'、2'ならびに3'と名付けた。

#### 5. 蛍光抗体法

蛍光抗体法に関するすべての技法は浜島・京極(1968)の方法に準じた。

成虫切片：豚肺虫が寄生している気管支を中心にした肺臓実質を適当な大きさに切り出し、それをドライアイスで凍結させ、10×10×2mmの大きさに切り出した。これを-70°Cのエタノールに3-4時間入れ、固定した。無水エタノールでの脱水およびキシロールによる透徹の全操作を4°Cの冷蔵庫内で実施した。56°Cのパラフィンに5-8分間ずつ3回通し、包埋した。4-5μの切片を薄手のスライドグラスにとり、22°Cで3-4時間乾燥した。切片を使用時まで4°Cに保存した。他の蠕虫の切片も同様にして作製した。

標織血清：農林省家畜衛生試験場細菌第2研究室より

分与されたもので、抗家兎血清山羊血清に蛍光色素FITCを標織し、DEAEセルロースで非特異反応性物質を除去したものである。使用前に豚肺虫の抽出残渣で2回吸収した。

染色方法：切片をキシロールで処理し、無水、90%、70%および45%のエタノールに通し、0.005 M、pH 7.0のリン酸緩衝液(PBS)で洗滌した。切片を37°Cで30分間一次感作し、遊離している抗体を除くためにPBSで洗滌した。ついで、一次感作と同様な条件下で切片を二次感作し、PBSで再三洗い、グリセリン緩衝液で封入した。

#### 6. 豚肺虫の不溶性物質による免疫血清の吸収方法

それぞれの免疫血清をPBSで5倍に稀釈し、それに等量の豚肺虫抽出残渣を加え、よく混合したのち、37°Cに1時間、ついで、4°Cに24時間おき、3,000 rpm、15分間遠心した。この遠心上清について同じ操作をもう1度実施した。豚肺虫の残渣による吸収も同様にしておこなった。

#### 実験成績

##### 1. 沈降線による抗血清

図2は切り出した沈降線で家兎を免疫して作製した抗血清1'、2'および3'と抗原により形成された沈降線とよとの沈降線の関連性を示したものである。それぞれの沈降線は元来の沈降線に一致する状態を示した。

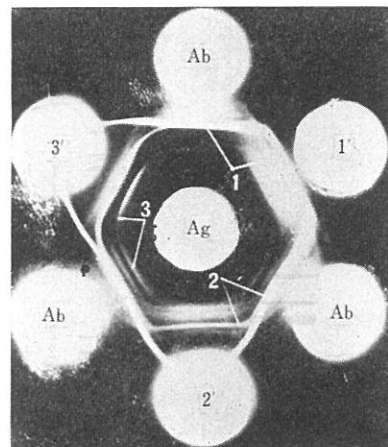


図2 免疫血清と沈降線に対するそれぞれの抗血清により形成された沈降線の関係を示すゲル内沈降反応

##### 2. 各抗原物質の由来部位

免疫前血清およびそれぞれの免疫血清と豚肺虫の虫体

表 1 豚肺虫切片と各抗血清を用いた蛍光抗体法における虫体の各部位の反応状態

虫体部位	血清		免疫前				免疫				1'				2'				3'			
	稀釈倍数		10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
クチクラ	-	-	-	-	+	+	-	-	+	±	-	-	±	±	-	-	+	±	-	-	-	-
筋層	±	-	-	-	+	+	+	-	+	+	±	±	±	±	-	-	+	±	-	-	+	±
消化管	±	-	-	-	+	+	+	-	+	+	±	-	±	-	-	-	-	±	±	-	-	-
卵胚細胞	-	-	-	-	+	+	±	-	+	±	-	-	+	+	+	-	+	+	±	-	-	-
卵殻表面	±	-	-	-	+	+	±	-	+	±	-	-	+	±	±	-	+	+	±	±	-	-
卵巣	-	-	-	-	+	±	-	-	±	-	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	-	-

—: 反応を認めない場合 ±: フィルター2枚で不可視になる場合 +: フィルター2枚で可視である場合

切片を用いて間接蛍光抗体法を実施した結果は表1の通りである。

免疫前血清では10倍稀釈まで微弱な反応を示したが、それ以上の稀釈倍数では反応はまったく消失した。

免疫血清では虫体のほぼ全部に反応を認めた。血清の100倍稀釈におけるその強さの順位は腸管、筋層、卵細胞、クチクラ、卵殻および卵巣であった。

沈降線で免疫した抗血清の100倍稀釈において、もつとも強い反応を示した部位は抗血清1'の場合は腸管と筋層、2'においては卵細胞そして3'にあつては卵殻であった。

図3 抗原の再分画

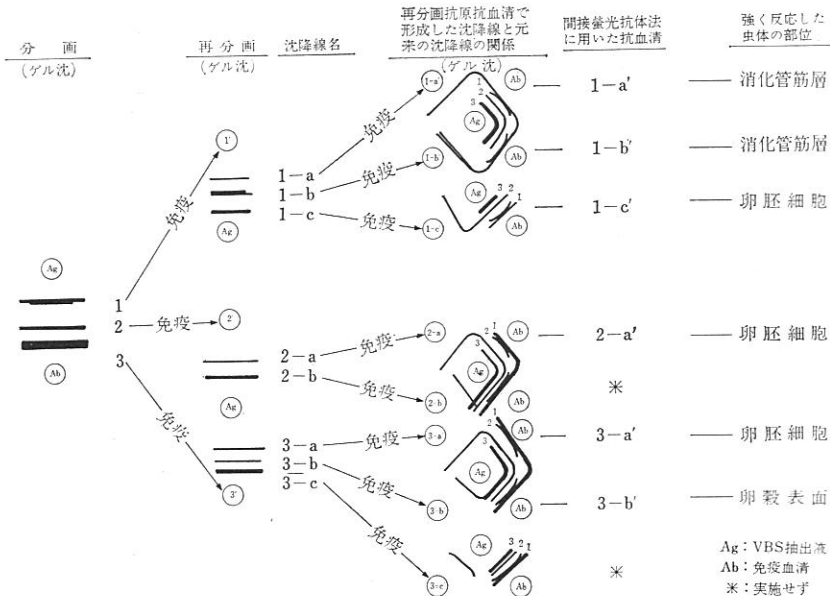


図3 再分画抗原の抗原性の検討

図2に示したように、抗原とそれぞれの抗血清1', 2' および3'により形成された沈降線は元来の沈降線すなわち、抗原と免疫血清により形成された沈降線の位置に一致していたが、その他の沈降線の混在をも示した。そこで、抗原と沈降線に対する抗血清により形成されたそれぞれの沈降線を切り出し、それぞれに対する抗血清を再度作製して、それらの抗血清と抗原により形成された沈降線と元来の沈降線との関連性ならびにそれらの抗血清を用いてそれぞれの再分画抗原の由来部位をより明白にすることを試みた。その結果は図3に示した通りであった。

抗原と抗血清1'により形成された沈降線は3本で、そ

れぞれを切り出し、家兎をそれで免疫して作製した抗血清と抗原を用いゲル内沈降反応を実施したところ、3種の抗血清のうち2種により形成された沈降線は元来の沈降線1に一致していたが、他の1種の抗血清により形成されたものは沈降線2に一致していた。抗血清2'では2本の沈降線が形成され、同様にして作製した2種の抗血清による沈降線のうち、1本は沈降線2に一致していたが、他の1本に一致する沈降線は元来の沈降線のうちには存在しなかった。抗血清3'により形成された沈降線は3本であり、それぞれに対する抗血清により形成された沈降線のうち、1本は元来の沈降線3に、他の1本は沈降線2に一致していたが、残りの1本に一致する沈降線は元来の沈降線のうちに存在しなかった。

上記の6種類の再分画抗原で免疫した抗血清（元来の沈降線に無関係な沈降線を形成した2種の抗血清は除去した）と豚肺虫切片を用い、間接蛍光抗体法を実施し、それぞれの抗原の由来部位を検討した。その結果、より単一にした再分画抗原に対する抗血清を用いても、強い反応を示す部位は抗血清1'、2'および3'の場合と同様であった。また、反応は非常に弱いものであった。

#### 4. 豚肺虫、牛肺虫および豚回虫の抗原的関連性

図4は豚肺虫 (Ma)、牛肺虫 (Dv) および豚回虫 (As) の抽出液と豚肺虫抽出液の免疫血清を用い、ゲル内沈降反応を実施した結果である。

牛肺虫により4—5本の沈降線が形成され、そのうちの強い1本の沈降線は沈降線3に、さらに、弱い沈降線が束となり沈降線2に一致していたが、沈降線1に該当するものは形成されず、沈降線3に一致する沈降線に隣接する弱い沈降線は牛肺虫に特有なものであった。

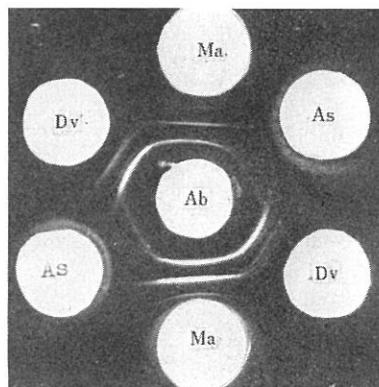


図4 豚肺虫 (Ma)、牛肺虫 (Dv) および豚回虫 (As) の抗原的関係を示すゲル内沈降反応

豚回虫により形成された沈降線は1本で、沈降線3に部分的な一致を示した。

#### 5. 吸収試験

ゲル内沈降反応において、豚肺虫と豚回虫は抗原的にみた場合、異種な部分が多いということが判明したので、この事実をさらに吸収試験で検討した。すなわち、免疫血清を豚回虫の抽出残渣で吸収し、その血清を用いて、間接蛍光抗体法を実施し、反応の状態を観察した。その成績を示したものが表2である。この成績から、免疫血清は豚回虫の抽出残渣によって十分に吸収されないことが分った。

#### 6. 豚肺虫由来の煮沸抽出液の抗原性

豚肺虫の煮沸抽出液は牛肺虫症の補体結合反応用抗原として応用されている。この抗原について検討をおこなった。免疫血清と本抽出液により1本の沈降線が形成さ

表2 吸収血清と豚肺虫切片を用いた蛍光抗体法の成績

虫体部位	吸収材料		吸 収 前				豚 肺 虫				豚 回 虫			
	血清 稀釈 倍数	血清	免 疫 前		免 疫 *		免 疫 前		免 疫 *		免 疫 前		免 疫 *	
			100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
ク	チ	ク	ラ	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—
消	化	管	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—	±	—
筋		層	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	±
卵	胚	細	胞	—	—	+	±	—	—	—	—	—	±	—
卵	殻	表	面	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—	—
卵		巢	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—

\* 豚肺虫の VSB 抽出液で免疫した血清

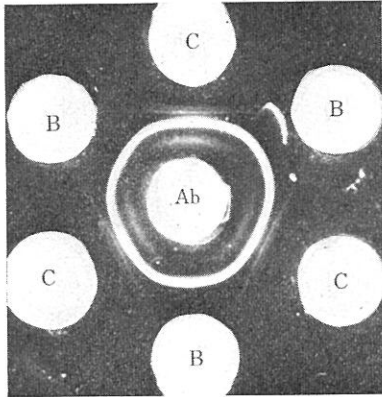


図5 低温抽出液(C)と煮沸抽出液(B)の抗原的關係を示すゲル内沈降反応

れ、これは抗原(VBS抽出液)とその免疫血清により形成された沈降線のうちの2一致していた(図5)。

### 考 察

ある抗原材料中に存在する抗原物質のそれぞれの由来部位を検討する場合、まず、それらの抗原物質をできるだけ単一にする必要がある。その方法のうちの1つに液体クロマトグラフィーを利用する法があり、著者もこの方法を応用して、豚肺虫抗原を分析したところ、抗原物質を可及的単一分けするという目的を十分に達成することはできなかった。

抗原-抗体結合物の抗原性について、Kirk (1932) はナタメ由来のウレアーゼを抗原として、また、Smithら (1964) は卵白、人血清ならびにリゾチムを抗原として、抗原-抗体結合物の抗原性を検討した結果、それに強い抗原性が存在することを確認している。

著者は液体クロマトグラフィーよりも操作が簡単で、一般に抗原物質の解析に応用されているゲル内沈降反応で抗原物質を分析し、各抗原-抗体結合物で家兔を免疫することにより、比較的純度の高い抗血清を作製することをこころみた。その結果、沈降線で免疫した抗血清1'、2'および3'と抗原により形成された沈降線の主体をなすものは元来の沈降線に一致していた。

以上のように、ゲル内沈降反応で抗原を分析する技法は物理、化学的に抗原物質を分離、精製したのち、その由来部位を追求する技法の適応が困難な場合きわめて有効であると考えられ、さらに、抗体を固化化し、それに結合する抗原を再分離する技法を採用すれば、抗原の性質をも明らかにすることができるであろう。

ただ、著者の利用した分析方法で問題となる点は元来

の沈降線と交叉するものの出現と元来、不在であつたものの出現である。この要因について、カエル *Rana rana* の卵管を抗原として、抗原-抗体結合物の抗原性を検討した Shiver and James (1966) は反応の実施期間中に抗原-抗体結合物を構成している分子に変性が生じるものと推定している。もし、このことが要因の1つであるとするならば、反応の実施をできるかぎり低温でおこなうことも、1つの方法であろう。

問題とすべきつぎの点は1本の沈降線を切り出す際の他の線の混在であろう。ゲル内沈降反応により抗原物質を可及的単一分離することはいかにして他の線の混在を防ぐかにあるといえる。著者の成績で沈降線2は沈降線1および3に混在していた。これは多分、形成された沈降線の六角形の頂点を切り出す時に生じたものと推定される。この原因を除くためには抗原を入れる穴を6つから3つに減らし、頂点の部分の切り捨て、直線的に切り出せば、若干なりとも混在を減少させることができるものと推定される。この点に関して、Smithら(1962)は沈降線の切り出しに特殊なセルと凍結マイクロームを利用し、沈降線の混在を減少させることに成功している。

分画抗原で免疫した抗血清と豚肺虫の成虫切片を用いて間接蛍光抗体法を実施した結果、抗血清1'、2'および3'ではそれぞれ消化管と筋層、卵の胚細胞および卵殻にもつとも強い蛍光を認めた。このことから、それぞれの沈降線を形成する抗原物質の多くはもつとも強い蛍光を発現した部位より由来するものと推定された。Duwe (1967) は拡張条虫 *Moniezia expansa* の成虫の乳剤で家兔を免疫し、その抗血清と乳剤を用いたゲル内沈降反応で1ないし2本の沈降線を認め、その抗血清と成虫のパラフィン切片を用いて間接蛍光抗体法を実施したところ、頭節のクチクラと成熟片節のクチクラおよびその下層部に蛍光を認めている。この成績は前述の両部位は抗原的にほぼ同一なものであることを示唆するものであろう。

Conwell (1963) は豚肺虫抽出液と牛肺虫感染牛血清を用い、補体結合反応をおこない、その結果、反応に陽性を認め、豚肺虫と牛肺虫の成虫における共通抗原の存在を指摘している。そこで、牛肺虫と豚肺虫の抗原性をゲル内沈降反応で検討したところ、抗原的にほぼ同一であることがわかった。そして、特に共通性が認められた部位は卵であつた。しかし、豚肺虫の豚回虫との間には共通するものはほとんどなく、このことは免疫血清と豚

回虫切片を用いた蛍光抗法における反応や吸収試験によってもうらづけられた。

豚肺虫の沸煮抽出液と免疫血清を用いたゲル内沈降反応で単一の沈降線が形成されたが、それは抗原とその免疫血清により形成された沈降線2に一致していたことから、抗原と免疫血清により形成された4本の沈降線のうち、1つは耐熱性であり、その多くは卵より由来するものと推定された。

以上のように、豚肺虫と牛肺虫の卵の共通性はニワトリとアヒルの卵アルブミンにみられる共通抗原性のように、原始的な卵由来の蛋白のほうが分化した成虫の組織蛋白よりも共通性が強いものであると考えられた。

### まとめ

1. 豚肺虫抽出液とその免疫血清を寒天内で反応させたところ、最少4本の沈降線が形成された。
2. 沈降線で免疫した抗血清と豚肺虫抽出液により形成された沈降線はもとの沈降線に一致していた。
3. 4つの抗原物質のうち、2つは消化管と筋層、1つは卵の胚細胞そして他の1つは卵殻に主に由来していた。
4. 豚肺虫と牛肺虫は抗原性において、同様であり、その共通抗原は卵物質より多く由来し、そのうちの多くは耐熱性であった。
5. 豚肺虫と豚回虫は抗原的に異種な部分が多かった。このことはゲル内沈降反応、蛍光抗体法および吸収試験で明らかにされた。

終わるにあたり、終始、御指導と御校閲をたまわった渡辺昇蔵教授、藤田澗吉教授ならびに農林省家畜衛生試験場須藤恒二部長に深謝する。また、種々の御教示にあづかった家畜衛生試験場鈴木恭技官および竹内正太郎技官ならびに材料の採取に御便宜いただいた東京都三鷹屠場の各位に感謝する。

(本報告の要旨の1部は第72回日本獣医学会(鳥取、1972)において発表した)。

### 文 献

- Chaffee, E. F., Bauman, P. M. and Shapilo, J. J. (1954) : Diagnosis of shistosomiasis by complement-fixation. *Am. J. Trop. Med.*, 3, 905-913.
- Cornwell, R. L. (1963) : Complement fixing antibody response of calves to *Dictyocaulus viviparus* IV. A comparison of antigens. *J. Com. Path.*, 73, 297-307.
- Duwe, A. E. (1967) : Antigen of *Moniezia expansa* : Fluorescent antibody localization. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 86(2), 126-131.
- 浜島義博・京極方久 (1968) 免疫組織学, 64-100頁, 医学書院, 東京.
- Jeska, E. L. (1967) : Antigenic analysis of a metazoan parasite, *Toxocara canis*. *J. Immunol.*, 98, 1290-1300.
- Kabat, E. A. (1961) : Experimental immunochimistry, 2rd ed., Charles C. Thomas Publisher, Illinois, 384 pp.
- Kirk, J. S. (1932) : Antiurease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 29, 712-721.
- Norman, L., Kagan, I. J. and Aelain, D. S. (1966) : Preparation and evaluation of antigens for use in the serologic diagnosis of human hydatid disease. *J. Immunol.*, 96(5), 822-828.
- Ouchterlony, O. (1953) : Antigen-antibody reaction in gels IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 32(2), 231-240.
- Shivers, C. A. and James, J. M. (1966) : Specific antibodies produced against of ager-gel. *Immunology*, 13, 547-554.
- Smith, H., Tozer, B. T., Gallop, R. C. and Scanes, F. S. (1962) : Separation of antigens by immunological specificity. *Biochem. J.*, 84, 74-80.
- Smith, H., Gallop, R. C. and Tozer, B. T. (1964) : The production of specific rabbit antibodies by injecting individual antibody complexes separated from mixed antigen. *Immunology*, 7, 111-117.

**Abstract**

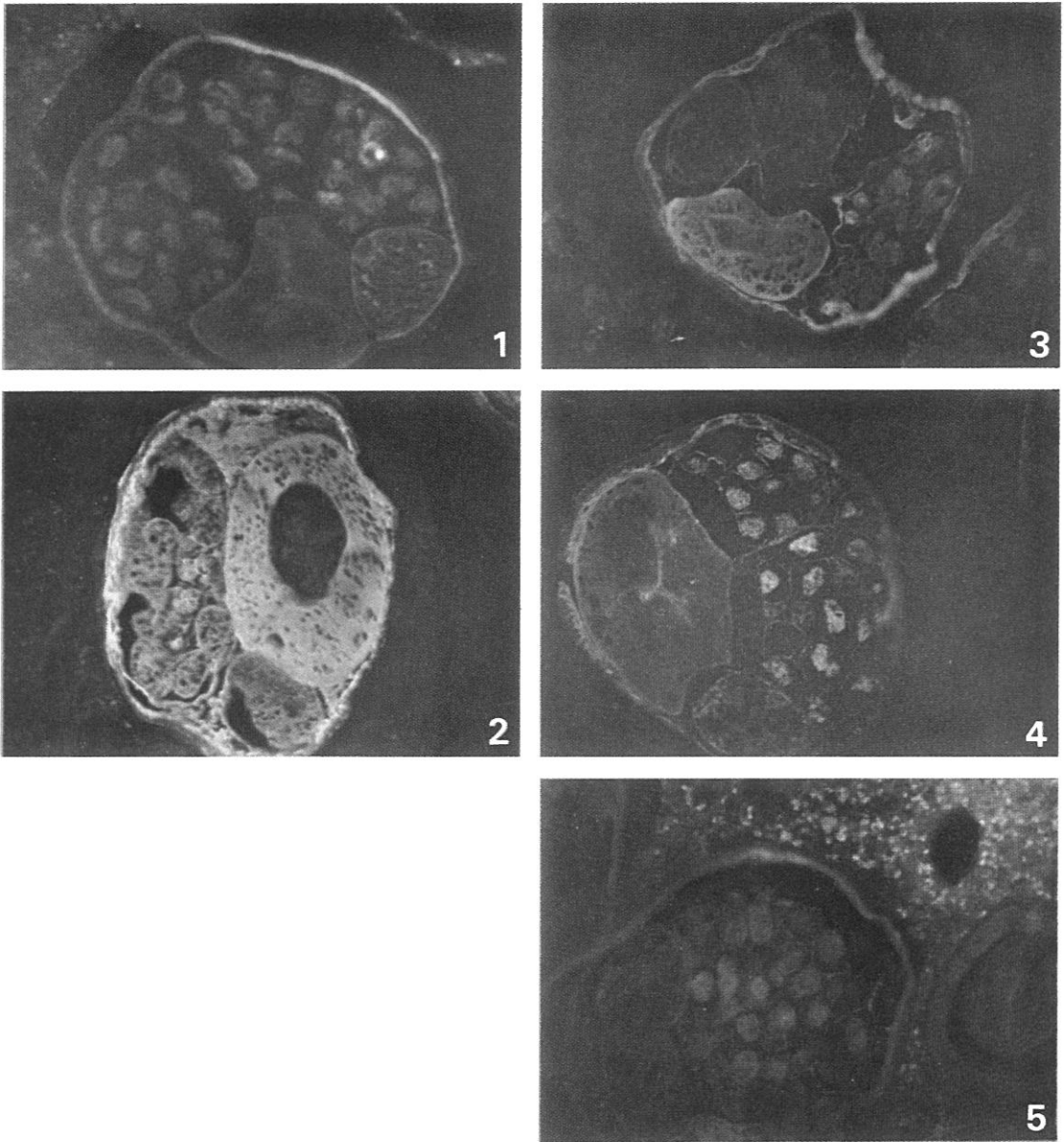
ORIGIN OF ISOLATED *METASTRONGYLUS APRI* ANTIGENS IN THE  
TISSUE OF ADULT WORM DETECTED BY FLUORESCENT  
ANTIBODY STAINING

SHINOBU YOSHIHARA

*Department of parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo*

Antigenic substance contained in the extract of adult *Metastrongylus apri* were isolated Ouchterlony's technique of the immunodiffusion method. Original sites of these antigens in the tissue of the adult worm were detected by fluorescent antibody staining using the rabbit antisera against those substances and the location of a few substances was successfully revealed as follows:

- 1) In the immunodiffusion gel, the crude VBS extract of the adult worm showed 4 major precipitation bands in the reaction with its antiserum.
- 2) Antisera were prepared by immunizing rabbits with each of 3 precipitation bands removed from the gel base. The bands formed between each of 3 antisera and crude extract of adult worm showed coalescence with the corresponding precipitation bands used for immunization.
- 3) Using 3 antisera, the location of the corresponding antigens in the tissue of adult worm was detected by fluorescent antibody staining. Antigenic substances in the two bands close to the antigen well of the immunodiffusion gel were found mainly in the digestive tracts and muscle layers and those in the 3rd and 4th ones were in germinal cells and in the egg-shell surface, respectively.
- 4) Antigenicity of adult of *Metastrongylus apri* and *Dictyocaulus viviparus* was almost the same. The common antigens distributed mainly in the eggs, and their majority was heat resistant.
- 5) The antigens of *Metastrongylus apri* were mostly heterologous to those of *Ascaris suum*. This was demonstrated by gel diffusion test, immunofluorescent antibody staining and those combined with absorption test.



- 写真 1 免疫前血清と豚肺虫切片を用いた間接蛍光抗体法 (血清100倍, 倍率×70)  
 写真 2 免疫血清と豚肺虫切片を用いた間接蛍光抗体法 (血清100倍, 倍率×70)  
 写真 3 抗血清1'と豚肺虫切片を用いた間接蛍光抗体法 (血清100倍, 倍率×70)  
 写真 4 抗血清2'と豚肺虫切片を用いた間接蛍光抗体法 (血清100倍, 倍率×70)  
 写真 5 抗血清3'と豚肺虫切片を用いた間接蛍光抗体法 (血清100倍, 倍率×70)



