

広東住血線虫症の免疫診断に関する研究

4. Immunoabsorbent を用いた抗原の精製

佐藤 良也 鈴木 俊夫 山下 隆夫
関川 弘雄 大鶴 正満

新潟大学医学部医動物学教室

陳 秀男 李 松玉 劉 国輝

台湾省マラリア研究所

(昭和48年11月29日 受領)

緒言

広東住血線虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 成虫の全抽出液について抗原分析を行なうことによつて, Bouthemy *et al.* (1972)は, それと他寄生虫, 特に線虫類の全抽出液との間に多くの共通抗原成分が存在することを認めた. Cheng *et al.* (1973)も抗原の精製を目的として本線虫の全抽出液の抗原分析を行ない, それには同感染ラットの血中抗体と反応する抗原成分が少なく, 抗原性を示す成分の多くは感染時の産生抗体とは反応しない虫体構成物質または宿主由来の成分であつたと述べた.

本実験は, 上記の抗原分析成績を参考とし可及的に他種線虫感染によつて産生される抗体と反応する成分を除去し, しかも広東住血線虫感染によつて産生される抗体と特異的に反応する抗原成分のみを取り出すことを目的として実施された.

材料, 方法

1) 実験材料

a) 各種寄生虫体の採取

広東住血線虫成虫は, 台湾南部で採集した本線虫自然感染アフリカマイマイ (*Achatina fulica*) を細断し, 人工胃液 (1%ペプシン+7%塩酸) で消化して集めた第3期幼虫50~100隻を体重200g程度のラット20匹に経口投与し, 投与後40~50日にラットの大腿動脈を切断して全採血したのち, 肺動脈, 心臓内より虫体を採取した. ブタ回虫 (*Ascaris suum*) は屠場でブタの消化管内より, またイヌ回虫 (*Toxocara canis*), イヌ糸状虫

(*Dirofilaria immitis*) は新潟市で捕獲されたイヌの消化管, 心臓内よりそれぞれ得た. アニサキス幼虫 (*Anisakis* type I larva; Berland, 1961) は北海道産のスケソウダラの内臓より採取した. 肺吸虫 (*Paragonimus westermani*) は50個のメタセルカリアを実験的に感染させたイヌの肺臓より採取し, 包虫 (*Echinococcus multilocularis*) は北大・獣医学部より提供をうけた感染スナネズミの肝臓を用いた.

b) 虫体全抽出液

広東住血線虫成虫抽出液の作製は Fig. 1 に示したごとく, pH 7.2 のリン酸緩衝食塩水 (PBS) で十分に洗浄した虫体を凍結乾燥後, 乳鉢を用いてよく磨碎して粉末とした. これに4°Cのアセトンを加えて10分間脱脂し, 8,000 rpm, 30分遠心した沈渣に PBS を加えて48時間スターラーで攪拌して抽出した. 抽出液は20,000rpm, 30分遠心して上清をとり, 濃縮したあと PBS に2日間透析した. 他の各種寄生虫の抽出液も同様の方法で作製した.

c) 各種寄生虫感染血清

広東住血線虫感染血清は前記感染ラット血清を用いた. ブタ回虫, イヌ回虫の場合, 雌成虫より得た受精卵を0.1N 硫酸溶液中で25°C, 40日間培養して仔虫包蔵卵となつたものを各4羽の家兔に2,500個ずつ経口投与し, 30日後に十分抗体が産生されたのを確かめてから全採血し, 血清を採取した. アニサキス幼虫感染血清は, 同じく4羽の家兔に幼虫を25隻手術的に皮下に埋没させ, 30日後に血清を採取した. イヌ糸状虫感染血清は自然感染のイヌで比較的抗体価の高いものを用いた. 肺吸虫と包虫感染血清はいずれも虫体の採取に用いた感染イヌおよ

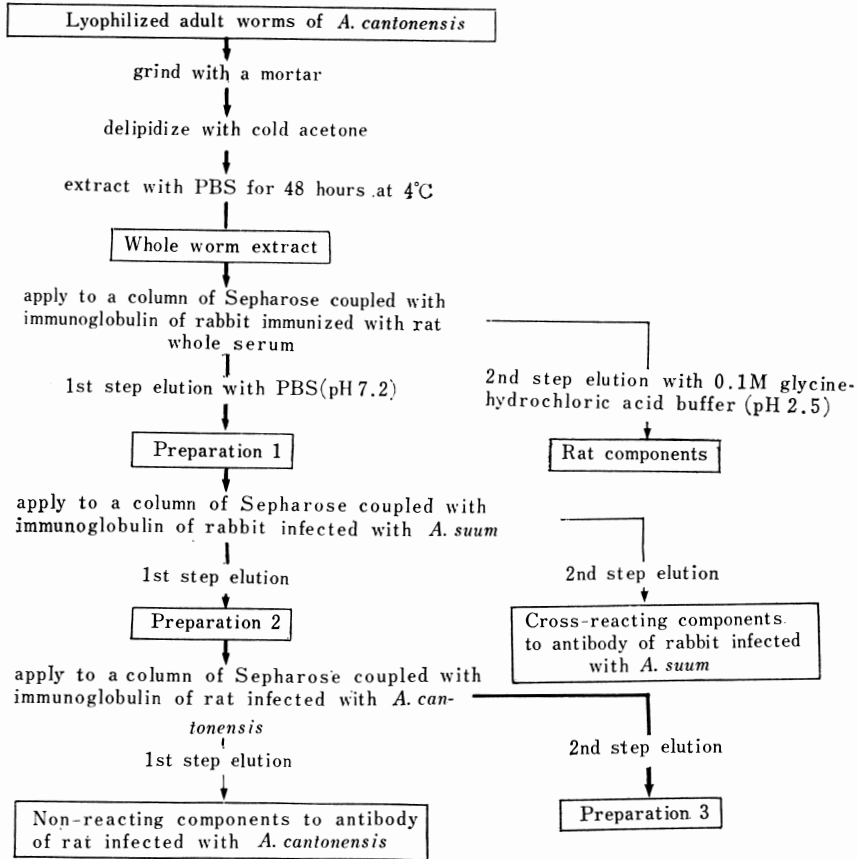


Fig. 1 Diagrammatic representation of purification process of *Angiostrongylus cantonensis* antigen.

びスナネズミ血清である。これらの感染血清は分注して -20°C に保存した。また、広東住血線虫とブタ回虫感染血清の一部は後述の Sepharose に結合させる目的で硫酸塩析により粗グロブリン液として、凍結乾燥して保存した。

d) 広東住血線虫抽出液ならびにラット血清に対する抗血清

免疫血清はいずれも体重約2.5kgの家兎2羽を用いて作製した。1mlの虫体抽出液またはラット血清に等量の Freund's complete adjuvant (Difco) を十分混和し、家兎の大腿ならびに背側の筋肉内の十数カ所に注射して免疫した。この操作は1週間間隔で4回行ない、最終免疫の10日後に頸動脈より全採血して血清を分離した。抗血清は硫酸の50%飽和で塩析して粗グロブリン液とし、凍結乾燥して -20°C に保存した。

2) 抗原の精製方法

虫体抽出液からの抗原の精製は抗体結合 immuno-

sorbent により行なつた。immunoabsorbent は CNBr 活性化 Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) を用いた。Sepharose に抗体蛋白を結合させる方法は既報の如く(佐藤ら, 1973), Porath *et al.* (1967)の方法に準拠して行なつた。すなわち、Sepharose の乾燥ゲル1gあたり200mlの0.001M塩酸溶液を用いてガラスフィルター上で膨潤、吸引洗浄を行ない、0.1M $\text{NaHCO}_3 + 0.5\text{M NaCl}$ 溶液にゲルを置換したのち、直ちに同一溶液に予じめ溶解した抗体蛋白(蛋白量10~20mg)を加えて反応させた。反応は栓付試験管内で行ない、試験管の上下反転をくり返してゲルを混合しつつ室温で2時間行なつた。反応終了後、1,000rpm, 3分遠心した沈渣にさらに1Mのエタノールアミン溶液(pH8.0)を30ml加えて同様に1時間反応させ、ゲル表面の遊離の結合基を遮へいしてからカラムに充填した。カラムは充填したゲルの高さが7~10cmになるようにゲル量に応じて適宜直径をかえた。このカラムにPBSを流して

十分にゲルを洗浄し、通常、溶出液の $OD_{280m\mu}$ が 0.04 以下になったら虫体抽出液 (蛋白量 10mg) を加え、PBS で室温下毎時 8 ml の割合で溶出を行なった。溶出終了後、カラムは氷冷 0.1M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) で洗浄し、ゲル表面の抗体と結合している抗原成分を解離溶出させてから直ちに PBS で再び平衡化して 4°C に保存した。このようにして同一カラムを 3~4 回繰り返し使用した。この抗体結合 Sepharose カラムを用いて広東住血線虫抽出液から抗原を精製する方法は Fig. 1 に示すごとくである。

a) 宿主成分ならびに交差反応成分の除去

虫体抽出液に混在する宿主成分や交差反応成分を除去する目的で抗-ラット血清家兔免疫グロブリン結合 Sepharose カラムおよびブタ回虫感染家兔免疫グロブリン結合 Sepharose カラムを作製し、これに虫体抽出液をのせて PBS で溶出させ、混在する宿主成分とブタ回虫感染血清と交差反応を起こす成分の吸収除去を行なった (Prep. 1, Prep. 2)。

b) 広東住血線虫感染血清との反応成分、非反応成分の分離

上記、Prep. 2 の一部を広東住血線虫感染ラット免疫グロブリン結合 Sepharose カラムに適用し、PBS によって溶出される成分はゲル表面の抗体とは反応しない成分として除去したのち、グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) によって抗体と反応した成分のみを解離溶出させた (Prep. 3)。これは直ちに pH 11.0 のグリシン緩衝液で中和し、PBS に透析した。

3) 抗原の検定方法

a) Ouchterlony 法および免疫電気泳動法 (IEP)

Ouchterlony 法 (Ouchterlony, 1962) および免疫電気泳動法 (Scheidegger, 1955) はいずれもペロナール-塩酸緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.1$) で 1.2% になるように加熱溶解した Agarose (Behringwerke) をガラス板上に流して固め、厚さ 1.5mm の寒天平板を作製して用いた。Ouchterlony 法の場合、これに孔間 5mm になるように直径 5mm の孔をあけ、各々に抗原および抗血清を入れて 24 時間後に沈降線を観察した。IEP は 100V 定電圧で 2 時間行ない、泳動終了、抗原孔より 5mm の位置に抗血清用の溝をつくり、これに抗体液を満して 24 時間後に沈降線を観察した。

b) 間接赤血球凝集反応 (IHAT)

抗原のヒツジ赤血球への感作および抗体価の測定法は既に報告したごとく (佐藤ら, 1973), Boyden のタン

ニン酸処理法 (Boyden, 1951) の変法を用いた。すなわち、今回用いた抗原は box titration によつて至適蛋白濃度が $200\mu\text{g/ml}$ と判断されたので、これを等量の 3% タニン酸処理赤血球浮遊液と混じ、37°C, 15 分間反応させて抗原感作を行なった。被検血清は PBS で 4 倍に希釈して 56°C, 30 分非働化したのち、等量の 3% 無感作赤血球浮遊液を加えて 4°C, 一晚吸収を行なつてから使用した。抗体価の測定は小試験管を用い、2 倍連続希釈した血清 0.5ml に 3% 抗原感作赤血球浮遊液 0.05ml づつを加えて混和し、室温で 4 時間後に凝集の有無を観察した。

c) 皮内反応

広東住血線虫感染者ならびに非感染者について皮内反応を実施した。抗原は蛋白窒素 (PN) 濃度を $20\mu\text{g/ml}$ に調整し、その 0.02ml を前腕屈側皮内に接種し、15 分後の膨疹直径を測定した。精製抗原はさらにこれを段階的に希釈して同様に 0.02ml づつ接種し、反応の閾値を求めた。判定は膨疹直径 (縦横径の平均) が 9mm を越えるものを陽性とした (石崎ら, 1961)。

実験成績

1) 宿主成分の除去

ラット血清で免疫した家兔の抗体グロブリンを結合させた Sepharose カラムによつて、虫体抽出液中の宿主成分の吸収を試みた。Fig. 2 はその際の蛋白溶出パターンを示したもので、PBS によつて溶出する成分 (Fr. 1) とグリシン-塩酸緩衝液による溶出成分 (Fr. 2) が得られた。各々を濃縮して Ouchterlony 法を行なった結果 (Fig. 3), 吸収前の全抽出液中に認められたラットの血清成分は Fr. 1 には現れず、Fr. 2 にはラット血清成分のみが認められた。この操作は全抽出液に含まれるラット成分の量と吸収に用いる抗-ラット血清家兔血清の抗体価とに関係があり、数量的に規定することはできないが、一回のみの吸収操作では完全に除去できないほどの大量の宿主成分を含む抽出液でも、カラムを酸性緩衝液で洗い、先の吸収操作において結合した宿主成分を解離除去して再び PBS で平衡化して繰り返し使用すれば、同一カラムによつてこの宿主成分を完全に除去することが可能であつた。Fig. 4 に示したのは多量の宿主成分を含む全抽出液について 3 回の吸収操作を同一カラムを用いて行ない、吸収の効果を調べた結果である。第 1 回目から第 3 回目の吸収後の試料まで各々の広東住血線虫感染血清に対する反応の強さには差は認められな

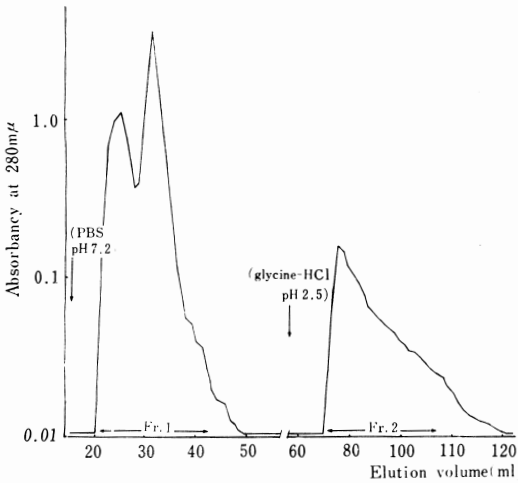


Fig. 2 Fractionation of whole worm extract of *A. cantonensis* by affinity chromatography on Sepharose coupled with immunoglobulin of rabbit immunized with rat whole serum.
Fr. 1 eluted with phosphate buffered saline, pH 7.2 at 20°C, and Fr. 2 eluted with cold glycine-hydrochloric acid buffer, pH 2.5. The arrow indicates the start of elution with phosphate buffered saline or glycine-hydrochloric acid buffer.

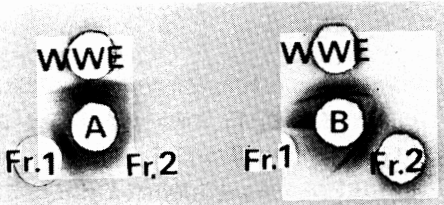


Fig. 3 Ouchterlony plate illustrating the selective removal of rat serum components from whole worm extract of *A. cantonensis*.
WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; Fr. 1: fraction of the 1st step elution with phosphate buffered saline; Fr. 2: fraction of the 2nd step elution with glycine-hydrochloric acid buffer; A: serum of rat infected with *A. cantonensis*; B: serum of rabbit immunized with rat whole serum.

いが、抗-ラット血清家兎血清に対する反応は第3回目の吸収を行なったのちの試料ではかなり弱いものとなっている。

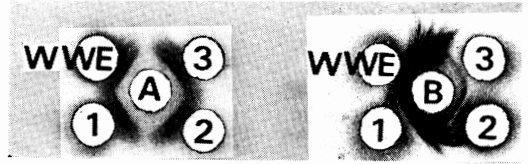


Fig. 4 Ouchterlony plate illustrating the gradual selective removal of rat serum components from whole worm extract of *A. cantonensis* with three repeated absorptions on a column of Sepharose coupled with immunoglobulin of rabbit immunized with rat whole serum.
WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; 1~3: fractions eluted with phosphate buffered saline in the 1st to 3rd absorption process; A: serum of rat infected with *A. cantonensis*; B: serum of rabbit immunized with rat whole serum.

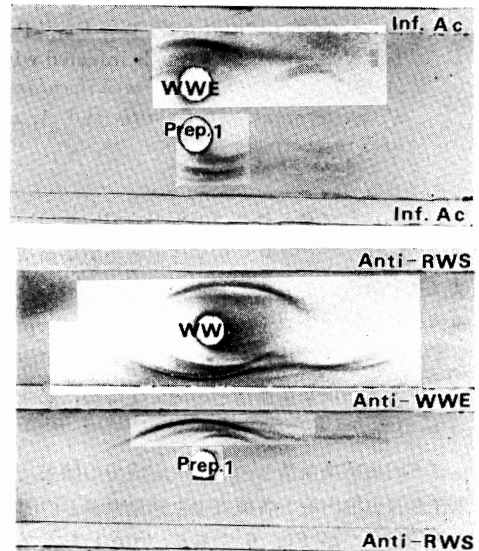


Fig. 5 Immunoelectrophoretic analysis of whole worm extract and preparation 1 freed of rat serum components.
WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; Prep. 1: preparation 1; Inf. Ac: serum of rat infected with *A. cantonensis*; Anti-RWS: serum of rabbit immunized with rat whole serum; Anti-WWE: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *A. cantonensis*.

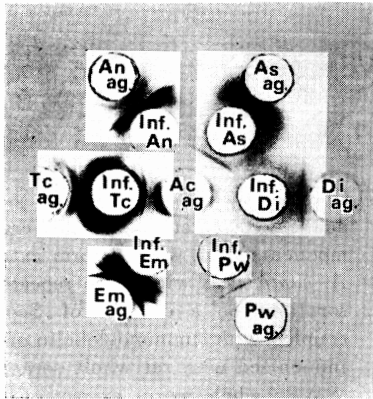


Fig. 6 Ouchterlony plate illustrating the cross-reactivity of whole worm extract of *A. cantonensis* against sera of animals infected with various helminths.

Ac, An, Tc, Em, Pw, Di, As ag: whole worm extract of *A. cantonensis*, *Anisakis*, *T. canis*, *E. multilocularis*, *P. westermani*, *D. immitis*, *A. suum*, respectively; Inf. An, Tc, Em, Pw, Di, As: sera from animals infected with *Anisakis*, *T. canis*, *E. multilocularis*, *P. westermani*, *D. immitis* and *A. suum*, respectively.

以上のようにして得られた PBS 分画 (Prep. 1) について IEP を行なった結果、広東住血線虫感染血清に対する沈降線には吸収前、後の試料間で差は認められないが、虫体の全抽出液に対する抗血清に対して Prep. 1 ではラット成分とみなされる 2 本の沈降線の消失が認められ、抗ラット血清家兔血清との間に沈降線は形成されなかつた (Fig. 5)。

2) ブタ回虫感染血清との交差反応成分の除去

広東住血線虫抽出液と各種寄生虫感染血清との間で交差反応を調べたのが Fig. 6 である。すなわち、ブタ回虫、イヌ回虫、アニサキス幼虫、イヌ糸状虫、包虫、肺吸虫感染血清のうちでブタ回虫およびイヌ回虫感染血清との間で強い交差反応が認められた。このことから、今回はブタ回虫感染家兔血清を用いて、これと交差反応を示す成分の吸収を試みた。前記 Prep. 1 をブタ回虫感染家兔免疫グロブリン結合 Sepharose カラムに適用し、同様の方法で吸収を行なった。Fig. 7 に示したごとく、PBS およびグリシン-塩酸緩衝液によって各々溶出される蛋白分画 (Fr. 1, Fr. 2) を得た。これらを濃縮して Ouchterlony 法を行なったのが Fig. 8 である。

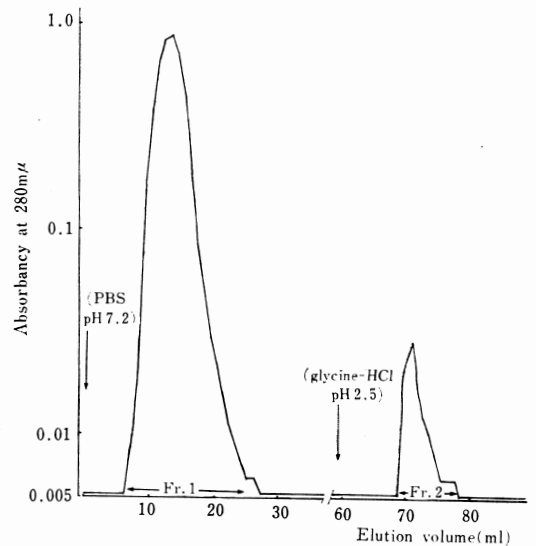


Fig. 7 Elution pattern of preparation 1 in affinity chromatography on Sepharose coupled with immunoglobulin of rabbit infected with *Ascaris suum*.

Fr. 1 eluted with phosphate buffered saline, pH 7.2 at 20°C, and Fr. 2 eluted with cold glycine-hydrochloric acid buffer, pH 2.5. The arrow indicates the start of elution with phosphate buffered saline or glycine-hydrochloric acid buffer.

吸収前の試料に認められた交差反応成分は PBS 分画 (Fr. 1) には認められず、Fr. 2 に現れるのがわかる。

この吸収操作によって得た PBS 分画 (Prep. 2) について、その IEP パターンを全抽出液と比較してみると、全抽出液ではブタ回虫感染血清と反応する成分が原点付近に 1 本の沈降線として示されたが、Prep. 2 では該当する沈降線の消失が認められた。しかし、この Prep. 2 において広東住血線虫感染血清と反応する成分は少なく、そのほとんどはこれと非反応性の成分であつた (Fig. 9)。

3) 広東住血線虫感染血清との反応性、非反応性成分の分離

既述したごとく宿主成分およびブタ回虫感染血清との交差反応成分を吸収した Prep. 2 には、依然として広東住血線虫感染血清との非反応性成分が多く含まれ、従つてより反応性の高い抗原試料を得る目的で、広東住血線虫感染ラットの抗体グロブリン結合 Sepharose カラ

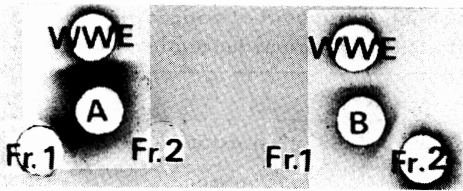


Fig. 8 Ouchterlony plate illustrating the selective removal of cross-reactive components to antibodies of rabbit infected with *Ascaris suum*.

WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; Fr. 1: fraction of the 1st step elution with phosphate buffered saline; Fr. 2: fraction of the 2nd step elution with glycine-hydrochloric acid buffer; A: serum of rat infected with *A. cantonensis*; B: serum of rabbit infected with *A. suum*.

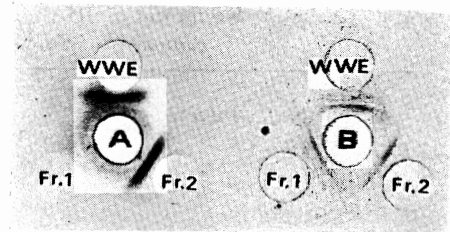


Fig. 10 Ouchterlony plate illustrating the separation of reacting components from non-reacting components to serum of rat infected with *A. cantonensis* by affinity chromatography on Sepharose coupled with immunoglobulin of rat infected with *A. cantonensis*.

WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; Fr. 1: fraction of the 1st step elution with phosphate buffered saline; Fr. 2: fraction of the 2nd step elution with glycine-hydrochloric acid buffer; A: serum of rat infected with *A. cantonensis*; B: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *A. cantonensis*.

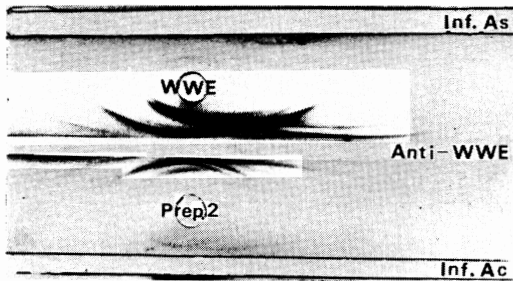


Fig. 9 Immunoelectrophoretic analysis of whole worm extract and preparation 2 freed of host components and cross-reactive components to serum of rabbit infected with *Ascaris suum*.

WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; Prep. 2: preparation 2; Inf. As: serum of rabbit infected with *A. suum*; Anti-WWE: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *A. cantonensis*; Inf. Ac: serum of rat infected with *A. cantonensis*.

ムに Prep. 2 をのせ、PBS で十分に溶出させたのち、冷グリシン-塩酸緩衝液で解離溶出させた分画を集めた。Fig. 10 はこの際に得られた PBS 分画 (Fr. 1) とグリシン-塩酸緩衝液による溶出分画 (Fr. 2) について Ouchterlony 法を行なった結果である。Fr. 1 には感染血清と反応する成分は微量しか検出されず、Fr. 2 に多量に存在することがわかる。

このように酸性条件下で解離溶出された分画 (Prep. 3)

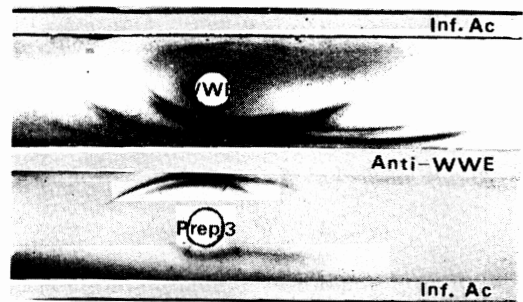


Fig. 11 Immunoelectrophoretic analysis of whole worm extract and preparation 3 which was freed non-reacting components from preparation 2.

WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; Prep. 3: preparation 3; Inf. Ac: serum of rat infected with *A. cantonensis*; Anti-WWE: serum of rabbit immunized with whole worm extract of *A. cantonensis*.

について IEP を行なつてみると、広東住血線虫抽出液に対する抗血清との間に 3 本の沈降線が認められ、これらはいずれも感染ラット血清と反応する成分であった (Fig. 11).

4) 精製抗原を用いての間接赤血球凝集反応および皮

Table 1 Reciprocal of IHAT titers with non-absorbed or absorbed antigens of *A. cantonensis* in sera of animals infected with various helminths

Animal No.	Infected with;	Antigen		
		Whole worm extract	Absorbed extract (Prep. 2)	
Rat	1	<i>A. cantonensis</i>	128	256
			32	64
			64	256
			8	32
			64	256
			128	512
			256	1024
			1024	1024
			128	256
			8	8
Rabbit	1	<i>A. suum</i>	32	8
			256	8
			512	16
			512	64
Rabbit	1	<i>T. canis</i>	256	64
			256	128
			512	256
			512	512
Rabbit	1	<i>Anisakis larva</i>	16	8
			8	8
			8	16
			32	16
Dog	1	<i>D. immitis</i>	16	8
			8	8
			16	8
Gerbil	1	<i>E. multilocularis</i>	32	32
Dog	1	<i>P. westermani</i>	8	8

内反応

a) 間接赤血球凝集反応

前記3段階の精製過程を経て最終的に得られた Prep. 3は収量が少なく、これを用いての IHAT には精製過程において多量の感染ラット血清や Sepharose を要することから、今回は宿主成分とブタ回虫感染血清との交差反応分を除去しただけの Prep. 2 について IHAT を実施した (Table 1)。虫体の全抽出液および Prep. 2 はともに対応する広東住血線虫感染血清に対して十分な抗原性を発揮し、Prep. 2 の反応性は精製前の全抽出液に

比べてやや良好であった。他方、非対応のブタ回虫感染血清に対しては全抽出液は高い抗体価を示したのに対し、Prep. 2 では力価はきわめて低いものであった。しかし、イヌ回虫感染血清に対する反応では精製前後の抗原間に有意の差は認められず、ブタ回虫感染血清との交差反応成分の除去はイヌ回虫感染血清に対しても特異性を高める結果にはならなかった。アニサキス幼虫、イヌ糸状虫、包虫、肺吸虫感染血清に対しては精製前の全抽出液自体がそれ程強い交差反応を示さず、この意味では精製前後の抗原間に差はなかった。

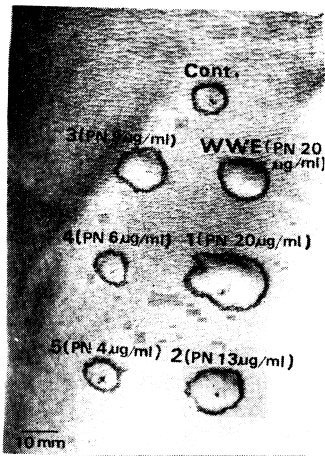


Fig. 12 Skin reaction on the forearm of a patient of angiostrongyliasis, 15 minutes after intradermal injection with 0.02 ml of whole worm extract and various dilution of preparation 3.

Area of wheals lightly outlined with a ball point pen. The number in parentheses indicates the protein nitrogen concentration of antigen.

WWE: whole worm extract of *A. cantonensis*; 1~5: preparation 3; Cont.: control with physiological saline.

b) 皮内反応

最終的に精製された Prep. 3 を用い、1968年より1970年までの間に台湾省台東県で発生した広東住血線虫症の確定症例4例と脊髄液中の好酸球増多を伴う脳髄膜炎で脊髄液中に虫体の証明されなかつた4例計8例について皮内反応を行なつた。PN濃度を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した Prep. 3 と、同濃度の全抽出液を0.02mlづつ皮内に接種した結果では、いずれの抗原に対しても陽性反応を呈したが、Prep. 3 に対する反応は全抽出液より明らかに強かつた (Fig. 12)。1例についてはあるが、石崎ら(1961)に従がい精製抗原の閾値を調べたが、その結果ではPN濃度9.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで陽性反応があらわれた。

考 按

広東住血線虫症の多発地域においては脳脊髄液中の好酸球増多などの臨床所見から、本症が疑がわれるが、実際に虫体を検出して確定診断を下した例は少ない。そのため本線虫の抽出液またはその代謝産物を抗原に用いた免疫診断が試みられているが、今までのところ必ずしも満足すべき成果は得られていない。(Alicata & Brown,

1962; Anderson *et al.*, 1962; Kagan & Zaiman, 1964; Kamiya & Tanaka, 1969).

緒言にも述べたごとく、成虫よりの抽出液中には他の寄生虫、特に線虫との交差反応成分が多く (Bouthemy *et al.*, 1972), また本線虫感染血清とは反応しない成分や宿主成分が多く含まれるという事実 (Cheng *et al.*, 1973) から、全抽出液をそのまま用いての免疫反応には他の寄生虫との交差反応の存在と同時に本線虫感染血清に対する反応性もかなり低いことが予想される。そのため、本症の浸淫状況を推測するための疫学調査などには利用できるが、個々の症例の診断には利用価値が少ないと判断された (Suzuki *et al.*, 1973)。これまで本症の診断用抗原として特異的な成分を単離しようという試みは少なく、最近行なわれた Cheng *et al.* (1973) の硫酸塩析法と DEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーの組合せによる精製実験においても特異的抗原の精製には成功していない。これらの方法によつては、理想的な抗原成分を精製するに必要な十分量の全抽出液を得ることが困難であることも原因として考えられる。今回、著者らが用いた immunoabsorbent を利用する方法は、抗原-抗体反応を基調とした特異的でしかも簡単な方法であり、少量の全抽出液から効果的に抗原の精製ができるという点ですぐれた手段と考えられた。すなわち、本実験の目的は成虫の全抽出液より宿主成分、交差反応成分を除去したのち、感染ラットの血中抗体と反応する成分のみを純粋に取り出すことであり、その過程において精製された試料として感染ラット血清と反応する成分のみを取り出すことに成功したと判断された。しかし、感染ラット抗体結合 Sepharose カラムによる精製は、ラットから採取できる血清量が少ないことと高力価感染血清を得ることが難かしいなどの点から、間接赤血球凝集反応のような比較的少量の抗原を必要とする反応に使用するだけの量を得ることは今回の実験では困難であつた。それで宿主成分ならびに交差反応成分を吸収除去した試料について間接赤血球凝集反応を行なつた結果、この吸収抗原は高い特異性と安定した反応性を示した。著者らはこれまで未精製の全抽出液を用いた間接赤血球凝集反応において、感作赤血球が感染ラット血清に全く反応性を示さない事実をしばしば経験している。これは全抽出液中に感染ラット血清に反応する成分よりも反応しない成分が圧倒的に多く含まれることと、多量の宿主成分の混入が全体としてこの全抽出液の抗原性を著しく低下せしめるためと考えられる。今回、著者らの得た安定した成績

は、この宿主成分を除去することにより反応性の高い感作赤血球を得ることができたことに原因があると思われる。イヌ回虫感染血清に対する特異性を高められなかつた理由として、全抽出液にはブタ回虫感染血清と1本の沈降線しか認められなかつたのに対し、イヌ回虫感染血清との間には3本の沈降線が観察されたことから、イヌ回虫感染血清に対する交差反応部分が完全に吸収されずに残つたためと考えられる。

最終的に得られた精製抗原を用いての本線虫感染者に対する皮内反応成績から、この精製抗原の至適蛋白窒素濃度は13.0 μ g/ml程度と考えられた。台湾の本線虫症多発地域および対照地域の一般住民についてこの抗原液を用いて皮内反応を実施したところ、明らかな差が認められたが、その結果については別に報告する。

結 語

広東住血線虫症の免疫学的診断にあたり、特異的で反応性の高い抗原を得る目的で immunoabsorbent を用いる抗原の精製を試みた。すなわち、CNBr 活性化 Sepharose 4B に抗体蛋白を結合させたカラムを用意し、それに広東住血線虫抽出液を流して対応する抗原成分のカラムへの吸着と、解離溶出を行なう分画を実施した。

得られた結果を要約すると以下の通りである。

1) ラット血清で免疫した家兔の抗体グロブリンおよびブタ回虫感染家兔の抗体グロブリンを結合させた Sepharose ゲルカラムに全抽出液をのせ、PBS で溶出させることによつて宿主成分およびブタ回虫感染血清との交差反応成分を吸収除去することができた。

2) この吸収後の試料を用いて間接赤血球凝集反応を行なつたところ、安定した反応性と高い特異性が示された。

3) さらに、上記試料を広東住血線虫感染ラット抗体を結合させた Sepharose カラムに適用し、PBS で十分に溶出させたのち、pH 2.5 の酸性緩衝液で解離溶出させた成分を集めた。この試料に含まれる成分は感染ラット血清と特異的に反応する成分であつた。これを用いての皮内反応では、ごく微量の蛋白窒素濃度でも十分な抗原性が示された。

4) immunoabsorbent を用いる方法は、抗原-抗体反応を基調とした特異的抗原精製法であり、また操作が簡単で他の各種寄生虫の抗原精製にも応用できると考えられる。

文 献

- 1) Alicata, J. E. and Brown, R. W. (1962) : Observations on the method of human infection with *Angiostrongylus cantonensis* in Tahiti. *Canad. J. Zool.*, 40, 755-760.
- 2) Anderson, R. I., Sadun, E. H., Rosen, L., Weinstein, P. P. and Sawyer, T. (1962) : The detection of antibodies in eosinophilic meningitis. *J. Parasit.*, 48, (supp.) 15.
- 3) Bouthemy, F., Capron, A., Afchain, D. and Wattré, P. (1972) : Structure antigénique du Nématode *Angiostrongylus cantonensis*; Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Ann. de Parasit.*, 47, 531-550.
- 4) Boyden, S. V. (1951) : The adsorption of proteins on erythrocyte treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 93, 107-120.
- 5) Chen, S. N., Suzuki, T. and Liu, K. H. (1973) : Studies on immunodiagnosis of angiostrongyliasis 1. Detection of antigen and antibody in serum and cerebrospinal fluid. *J. Formosan Med. Assoc.*, 72, 161-166.
- 6) Chen, S. N. (1973) : Studies on immunodiagnosis of angiostrongyliasis 3. Detection of antibody in serum by indirect fluorescent antibody test (IFAT). *Chinese J. Microb.*, 6, 86-90.
- 7) Cheng, L. Y., Chiu, J. K. Suzuki, T. (1973) : Studies on immunodiagnosis of angiostrongyliasis 2. Preliminary experiment for preparing specific antigen from *Angiostrongylus cantonensis*. *Jap. J. Parasit.*, 23, 35-41.
- 8) 石崎達, 荒木英齊, 久津見晴彦 (1961) : 皮内反応の基礎的研究 (1). 即時型皮内反応陽性判定基準及び反応の特質に就いて. *アレルギー*, 10, 307-317.
- 9) Jacobs, L., Lunde, M. N. and Weinstein, P. P. (1965) : Hemagglutination test results with antigens derived from cultures of *Angiostrongylus cantonensis* and with whole worm extract. *J. Parasit.*, 51, 38.
- 10) Kagan, I. G. and Zaiman, H. (1964) : Evaluation of helminth skin-test antigens in a hospital in New York City. *Am. J. Med. Hyg.*, 13, 82-88.
- 11) Kamiya, M. and Tanaka, H. (1969) : Hemagglutination test in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Jap. J. Exp. Med.*, 39, 593-599.
- 12) Ouchterlony, Ö. (1962) : Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Prog.*

- Allergy, IV.
- 13) Porath, J., Axén, R. and Ernback, S.(1967)
Chemical coupling of protein to agarose. *Nature*, 215, 1941.
- 14) 佐藤良也, 鈴木俊夫, 山下隆夫, 白木公, 関川
弘雄, 大鶴正満(1973): アニサキス症の免疫学
的診断における蛍光抗体法の応用 I. 抗原の作
製法について. *寄生虫誌*, 22, 249-257.
- 15) Scheidegger, J. J.(1955): Une micro-méthode
de l'immuno-electrophorèse. *Intern. Arch.
Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103-110.
- 16) Suzuki, T., Liu, K. H., Chen, S. N., Lee,
S. Y., Lin, S. Y. and Tseng, P. T.(1973):
Epidemiological observations on angiostrongy-
liasis in Taiwan I. Results of indirect he-
magglutination test for angiostrongyiasis
among suspected Japanese encephalitis cases.
Jap. J. Parasit., 22, 187-192.

Abstract

STUDIES ON IMMUNODIAGNOSIS OF ANGIOSTRONGYLIASIS
4. PURIFICATION OF ANTIGEN BY USING IMMUNOADSORBENT

YOSHIYA SATO, TOSHIO SUZUKI, TAKAO YAMASHITA,
HIROHO SEKIKAWA AND MASAMITSU OTSURU
(*Department of Medical Zoology, Niigata University School of
Medicine, Niigata, Japan*)

SHIU-NAN CHEN, SUN-YU LEE AND KUO-HUI LIU
(*Taiwan provincial Malaria Research Institute, Taipei,
Taiwan, Republic of China*)

In an attempt to prepare the specific antigen for immunodiagnosis of angiostrongyliasis, purification of antigen from whole worm extract of adult *Angiostrongylus cantonensis* was performed by using immunoabsorbent. In accordance with the method reported by Porath *et al.* (1967), the columns of cyanogen bromide-activated Sepharose 4B gels coupled with antibodies were prepared. The whole worm extract was applied to the appropriate column and eluted the components, which did not react on antibodies coupled to Sepharose, with phosphate buffered saline (pH 7.2), and then the components combined on antibody-Sepharose was eluted secondarily with glycine-hydrochloric acid buffer (pH 2.5). Antigenic activities of these elutes were examined and the results were as follows:

1) To remove selectively rat serum components and cross-reactive components, the extract was passed over the columns of gels coupled with immunoglobulins from rabbits immunized with rat whole serum or infected with *Ascaris suum*. In the fraction which was eluted with phosphate buffered saline, rat serum components and cross-reactive components were selectively removed.

2) When this absorbed extraction was used as indirect hemagglutination antigen at a concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$, a stable reaction was obtained against sera of rats infected with *A. cantonensis*, but cross-reaction with sera of rabbits infected with *A. suum* was considerably diminished.

3) To separate the reactive components from the non-reactive components to serum of rat infected with *A. cantonensis*, the material prepared as mentioned above was then passed over a column containing gels coupled with immunoglobulins from rats infected with *A. cantonensis*. After components reacting to antibodies coupled to Sepharose were adsorbed to the column and other proteins were washed out with phosphate buffered saline, the components which were eluted with glycine-hydrochloric acid buffer were collected.

4) This antigen produced a strong skin reaction in patients of angiostrongyliasis by a 0.02 ml intracutaneous inoculation of the antigen in protein nitrogen concentration of 9 $\mu\text{g/ml}$.

5) The application of affinity chromatography on antibody-immunoabsorbent column to purification of antigens is not only a simple but also superior technique for purifying helminthic antigens.