

## 日本住血吸虫の感染動物にみられる循環抗原について

### 1. 実験的感染ウサギにおける循環抗原の検出及び性状

平 田 瑞 城      阿 久 沢 実

久留米大学医学部寄生虫学教室

(昭和50年6月11日 受領)

住血吸虫は門脈系に寄生するため、虫体由来の代謝産物が血液中に排出され、更に尿中へ移行するものと考え、日本住血吸虫感染ヒト、ウサギの尿中の抗原物質を尿沈降反応によつて検索した結果、その存在をみとめ、尿沈降反応は日本住血吸虫患者の診断に有用であると報告された。(Okabe and Tanaka, 1958, 1961; 田中, 1960). また阿久沢 (1973, a, b) はその物質の性状について検討し、比較的低分子のものであろうと報告した。

住血吸虫感染動物の血液中の抗原物質については、Berggren and Weller (1967) によつてマンソン住血吸虫感染マウス、ハムスターの血液中に存在する抗原物質を circulating antigen として報告された。Nash *et al.* (1974) はそのものの性状について検討し、分子量10万以上の多糖類であると述べ、Okabe and Tanaka (1958, 1961) の報告している尿中抗原とは異なつてい

るだろうと報告した。

本研究は circulating antigen (以下 CA と略) と尿中の抗原物質との関係について明らかにすることを目的としている。本実験では先ず日本住血吸虫感染ウサギを材料として CA の検索を行ない、更にその性状について若干検討した。

#### 実験材料および方法

##### 1) 感染ウサギ血清

CA の検索には体重2.3~3.0 kg の27羽のウサギを使用し、日本住血吸虫セルカリアを1,000~2,000隻皮下注射によつて感染させた後、感染1週より10週まで各週に経時的に耳静脈より採血し、血清を分離して検索に供した。採血終了後、感染ウサギを実験開始後14週までに剖検し、寄生していた虫体数を数え回収虫体数とした (Table 1)。

##### 2) CA の検出方法

上述のようにして得られた感染血清と後に述べる抗血

清をいずれも原液の濃度で使用してオクタロニー法を行なつた。反応の観察は10日間行ない、更にアミドブラック染色、あるいはコマーシェンプルー染色を施して沈降線の有無を確認した。

##### 3) 抗血清

感作に使用した抗原は感染ウサギより回収した日本住血吸虫成虫の凍結乾燥虫体に1:200 (w/v) の割合に生理的食塩水を加え磨砕し、その間凍結融解を6回繰返して抽出したものである。感作には得られた虫体抽出液1 ml に等量の Freund's complete adjuvant を混和したものをウサギ (体重2.5 kg) の足趾部及び股筋に週1回、計8回注射したが、最終注射後、10日目に全採血し、分離した血清を抗血清として使用した。

##### 4) 免疫電気泳動

ベロナール緩衝液 (pH 8.2,  $\mu=0.1$ ) に1.0%の割合に Special Agar Noble (Difco) を加え、窒化ソーダを0.1%添加し、オートクレーブで溶解後、その3 ml を2.6×7.6 cm のスライドガラス上に載せて寒天平板を作製した。スライドガラス1枚に3 mA, 120分通電して抗原を泳動させた後、溝に抗血清を注入して37°C に18時間、更に室温下に2日間放置して沈降線の出現を観察した。

##### 5) 熱処理

CA 陽性の感染血清を沸騰水中にて攪拌しながら10分間加熱して、オクタロニー法に用いた。

##### 6) 透析

セロファンチューブ (Visking) を用いて CA 陽性の感染血清及び後に述べる虫体のフェノール抽出液2 ml を50 ml の生理的食塩水、及び蒸留水に対して7°C, 72時間透析し、その間2回外液を交換した。得られた外液全量を凍結乾燥によつて1 ml に濃縮し、内液と共にオクタロニー法に用いた。

##### 7) フェノール抽出

Table 1 Detectin of circulating antigen (CA) in rabbits infected with *S. japonicum*

Animal no.	No. of cercariae infected	Weeks of CA detected	No. of worms recovered	remarks
1	1,000	—	499	
2	1,000	—	293	
3	1,000	—	212	
4	1,000	—	402	
5	1,000	—	NC	
6	1,000	—	NC	
7	1,000	—	NC	dead (8 W)
8	1,500	—	395	
9	1,500	—	384	
10	1,500	—	NC	
11	1,500	6, 7W	832	
12	2,000	—	NC	
13	2,000	—	292	
14	2,000	5, 6, 7W	822	
15	2,000	—	NC	
16	2,000	—	NC	
17	2,000	—	NC	
18	2,000	—	NC	
19	2,000	—	1,000	
20	2,000	7 W	NC	
21	2,000	7 W	2,188	dead (8 W)
22	2,000	—	1,145	
23	2,000	—	1,333	dead (9 W)
24	2,000	—	1,593	dead (7 W)
25	2,000	—	980	
26	2,000	7 W	1,983	
27	2,000	—	495	

NC: not counted

虫体抽出液及び CA 陽性の感染血清について80% フェノール処理 (阿久沢, 未発表) を行なった. ゲル内沈降反応にはフェノール処理によって得られた水層を透析して用いた.

#### 8) 吸収試験

吸収用抗原は感染マウス及びウサギより採取した成虫と感染ウサギより Smithers (1960) の方法によって得た虫卵を材料とした. 虫体についてはその抽出液の遠心分離した上清を凍結乾燥したもので, 虫卵については超音波 (15 kc, 4 分) によって破壊した後, 虫体の場合と同様にして処理した. 吸収操作は抗血清 1 ml に 20 mg の抗原粉末を加え, 37°C, 3 時間, その後7°C に 2 日間放置し, その間時々攪拌して行なった.

#### 実験結果

##### 1) CA の検出成績

Table 1 に CA の検出成績を示した. すなわち,

CA の検出率は27例中 5 例で18.5%であつた. その検出時間は感染後 5 ~ 7 週でその後みとめられなかつた.

CA 陽性の感染ウサギにおける寄生虫体数は800隻以上で, 800隻以上の寄生虫体数がみとめられた感染ウサギにおける CA の検出率は 9 例中 4 例で44.4%であつた.

##### 2) CA の性状

CA はオクタロニー法によって多くは単一の沈降線としてみとめられたが, 時々 2 本に分かれていることがあつた. 免疫電気泳動法においても同一の位置に 2 本並んでみとめられることがあつた (Fig. 2).

CA は免疫電気泳動法によって陽極側に強い易動度を示し, 虫体抽出液の泳動像と比較した結果, 陽極側の最先端にみとめられる沈降線 (Fig. 1, 矢印) と易動度が一致していた (Fig. 1).

CA に対して熱処理を行なった結果, 処理後の CA は処理前に比べて少し弱い沈降線としてみとめられた

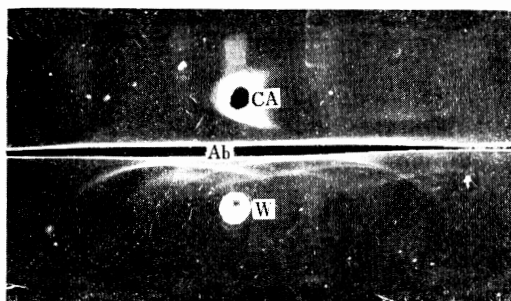


Fig. 1 Comparative immunoelectrophoresis of circulating antigen (CA) and whole worm extract (W) against anti-*S. japonicum* rabbit serum (Ab)

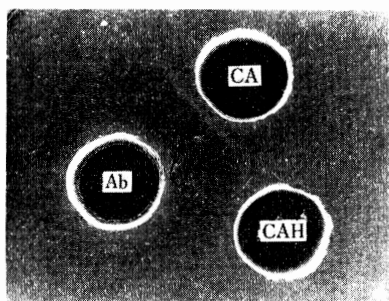


Fig. 2 Ouchterlony analysis of circulating antigen (CA) and heated one (CAH) against anti-*S. japonicum* rabbit serum (Ab)

が、なお反応活性を有していた (Fig. 2). 更に CA の透析性について検討した結果、感染血清中の CA もフェノール処理によって得られたものも全く外液への移行をみとめなかった。

### 3) CA と虫体のフェノール抽出物との関係

感染血清中の CA についてフェノール処理を行なった結果、得られたものは処理前の CA に比べて全く同様の反応活性を示した (Fig. 3).

虫体抽出液に対し同様のフェノール処理を行ない、得られたものと感染血清中の CA と比較検討した。オクタルニー法で両者は全く融合し (Fig. 4), 免疫電気泳

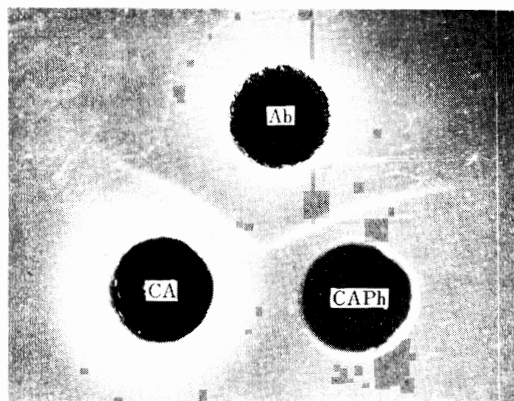


Fig. 3 Ouchterlony analysis of circulating antigen (CA) and phenol extract of serum from infected rabbit (CAPH) against anti-*S. japonicum* rabbit serum (Ab)

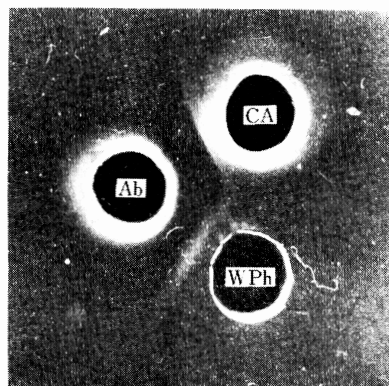


Fig. 4 Ouchterlony analysis of circulating antigen (CA) and phenol extract from whole worm (WPh) against anti-*S. japonicum* rabbit serum (Ab)

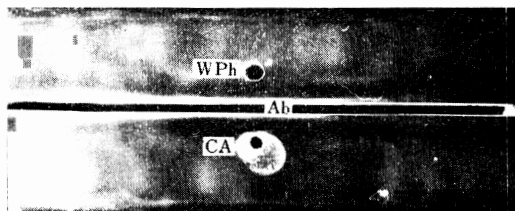


Fig. 5 Comparative immunoelectrophoresis of circulating antigen (CA) and phenol extract from whole worm (WPh) against anti-*S. japonicum* rabbit serum (Ab)

動法で全く同一の易動度を示した (Fig. 5).

#### 4) 吸収試験

虫体抗原によつて吸収された抗血清は感染血清中の CA と全く反応せず、虫卵抗原によつて吸収されたものは対照と全く同様の反応活性を示した。

### 考 察

日本住血吸虫感染ウサギの循環血液中に CA の存在をみとめたが、その検出率は18.5%であつた。マンソン住血吸虫の場合、Gold *et al.* (1969) は500~700隻のセルカリアを感染させたハムスターについてオクタロニー法で CA の検出を行ない、その88%に CA の出現をみとめている。更に Bawden and Weller (1974) は800隻のセルカリア感染ハムスターについて補体結合反応で検出し、その96%に陽性であつたと報告している。マンソン住血吸虫の場合と比べて本報告での CA の検出率が低い原因として、第1は CA の検出に用いた動物種のちがいが、第2はマンソン住血吸虫の場合、非常に多数の感染であるためと考えられる。又、用いる検出方法の改良によつて検出率の増加が想像される。

CA が検出された時期は感染後5~7週であつた。このことは予備実験として感染後39日~約1年経過した8羽のウサギで CA の検索を行なつた結果、感染後39日のもののみに CA をみとめたこととよく一致する。すなわち、CA は感染、6週前後をピークとして出現し、その後減少すると考えられる。CA が減少する原因は明らかでないが、抗原抗体複合物として除去されることが想像される。

日本住血吸虫感染ウサギにみられる CA は電気泳動で陽極側に強い易動度を示し、熱に安定、非透析性であることなどで Gold *et al.* (1969) や Nash *et al.* (1974) の報告しているマンソン住血吸虫感染動物のそれと一致する。マンソン住血吸虫の場合、CA が同一の易動度をもつ2本の沈降線としてみとめられるという報告はない。一方マンソン住血吸虫虫体抽出液についてフェノール処理を行なつて得られたものは日本住血吸虫感染ウサギの CA と融合することをみとめた。以上のことから日本住血吸虫感染ウサギにみられる CA はマンソン住血吸虫感染動物のそれと極めて類似した物質であると考えられる。

80%フェノール処理によつて虫体から得られたものは感染血清中の CA とゲル内沈降反応によつて一致した。虫体抽出物は非常に複雑な抗原系を示すが、フェノール処理後のものは CA と一致するものだけであり、

反応活性の変化も何らみとめられなかつた。このことから CA の種々の性状を検討する際、フェノール法による CA の抽出は有用な方法であろうと考えられる。

CA の由来についてはマンソン住血吸虫において虫体の腸管より産生されていると報告されている (Lichtenberg *et al.* 1974; Nash, 1974)。本報告の抗虫体ウサギ血清と感染ウサギ血清との反応系で、感作に使用した虫体抽出液には虫体が貧食したウサギ由来の血液成分も含まれているためこれによる非特異反応が考えられるが、虫体抽出後と抗ウサギ血清 (MBL 社) の免疫電気泳動では CA に相当する位置に沈降線のみとめなかつた。又感染マウスより採取した虫体の抽出液による吸収試験の結果、抗体の反応性は消失し、CA 陽性のウサギにおける寄生虫体数は全て800隻以上であつた。以上のことからみとめられた CA は虫体由来する物質であると考えられる。

### 結 語

日本住血吸虫感染ウサギの循環血液中における抗原物質 (CA) の検索を行ない、更にその性状について若干の検討を加えた。

得られた結果は以下の通りである。

- 1) 感染ウサギの循環血液中に抗日本住血吸虫ウサギ血清と反応する CA の存在をみとめた。
- 2) CA は虫体由来であり、主として感染後6週前後をピークとして出現し、その後減少するものと考えられる。
- 3) CA は陽極側に強い易動度を示し、熱に安定、非透析であつた。
- 4) 虫体抽出液の80%フェノール処理によつて得られたものは感染血清中の CA とゲル内沈降反応によつて一致していた。
- 5) 日本住血吸虫感染ウサギにみられた CA は Berggren and Weller (1967) の報告しているマンソン住血吸虫感染動物のそれと極めて類似する物質と考えられる。

稿を終るに当り種々の御鞭撻、御指導をいただいた故岡部浩洋教授、塘 普教授、更に御助力を下さつた福岡歯科大の真田正幸助手に深く感謝します。

尚、本報告の要旨は第43回日本寄生虫学会総会 (1974) において発表した。

### 文 献

- 1) 阿久沢実 (1973 a): 日本住血吸虫感染ウサギ尿

- の免疫学的研究. 第1編. ゲル濾過法による尿中の抗原性物質の分離. 久留米医学会誌, 36, 563-567.
- 2) 阿久沢実 (1973b) : 日本住血吸虫感染ウサギ尿の免疫学的研究. 第2編. 尿中の抗原性物質の性状について. 久留米医学会誌, 36, 568-570.
  - 3) Bawden, M. P. and Weller, T. H. (1974) : *Schistosoma mansoni* circulating antigen. Detection by complement fixation in sera from infected hamsters and mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 1077-1084.
  - 4) Berggren, W. L. and Weller, T. H. (1967) : Immunoelectrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 16, 606-612.
  - 5) Gold, R., Rosen, F. S. and Weller, T. H. (1969) : A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18, 545-552.
  - 6) Lichtenberg, F. V., Bawden, M. P. and Shealey, S. H. (1974) : Origin of circulating antigen from the schistosome gut. An immunofluorescent study. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 1088-1091.
  - 7) Nash, T. E. (1974) : Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 1085-1087.
  - 8) Nash, T. E., Prescott, B. and Neva, F. A. (1974) : The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. J. immunol., 112, 1500-1507.
  - 9) Okabe, K. and Tanaka, T. (1958) : A new urine precipitin reaction for schistosomiasis japonica A preliminary report. Kurume, Med. J., 5, 45-52.
  - 10) Okabe, K. and Tanaka, T. (1961) : Urine precipitin reaction for schistosomiasis japonica. Kurume, Med. J., 8, 24-37.
  - 11) Smithers, S. R. (1960) : The isolation of viable schistosome eggs by a digestion technique. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 54, 68-70.
  - 12) 田中隆文 (1960) : 日本住血吸虫症の免疫学的研究. 久留米医学会誌, 23, 3220-3244.

## Abstract

### CIRCULATING ANTIGEN IN ANIMALS INFECTED WITH *SCHISTOSOMA JAPONICUM*

#### 1. DETECTION AND CHARACTERISTICS OF CIRCULATING ANTIGEN IN INFECTED RABBITS

MIZUKI HIRATA AND MINORU AKUSAWA

(Department of Parasitology, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan)

This report describes the presence of circulating antigen in sera of infected rabbits and its properties.

The circulating antigen was detected during weeks from the 5th to the 7th week after infection, but it was not detected after the 8th week.

The circulating antigen was heat-stable, non-dialysable and of anodic mobility.

The antigen in extract of whole worm with 80% phenol was the same as the circulating antigen immunologically.

These results indicate that the circulating antigen of rabbits infected with *S. japonicum* could be similar to that of animals infected with *S. mansoni*, reported by Berggren and Weller (1967).