

# 肝蛭感染ウサギの血液性状ならびに免疫 学的抗体価の推移

## —特に体内移行との関係—

### 第2報 感染後の寒天ゲル内沈降反応ならびに 補体結合反応抗体価の推移

赤 羽 啓 榮

信州大学医学部寄生虫学教室

(昭和50年9月1日 受領)

著者らはウサギに肝蛭を感染させその血液性状をしらべた結果血液性状は虫体の体内移行と密接に関係して推移することを報告した(赤羽 1975)。本報では同じ材料を用いてウサギ肝蛭症の寒天ゲル内沈降反応、補体結合反応の抗体価の推移について報告するが、これらの免疫学的性状も血液性状同様虫体の体内移行と密接に関係していることがわかった。肝蛭症の免疫学的研究はウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギなどを材料に免疫学的診断法の分野でなされ、特に皮内反応は最も一般化しており術式は小野・磯田(1952)、小野・渡辺(1956)升、(1958)、Rifatt *et al* (1963) らの報告により、スクリーニングテストとしてその価値がみとめられている。寒天ゲル内沈降反応は Urquhart *et al* (1954)、市原ら(1956a, b, c)、Biguet *et al* (1962)、Geyer(1967)、Sewell(1964) らが試み診断法として有用であることを報告している。補体結合反応は吉田ら(1954)、椿・升(1955)、Bénex(1964) らの報告はあるが診断的効果は期待できない(Pantelouris 1965)とされ、再検討が望まれている。

そこで著者らははじめて蔗糖重層法により肝蛭の膜成分をとり出しこれを抗原として補体結合反応を試み、肝蛭感染後の寒天ゲル内沈降反応ならびに補体結合反応の抗体価の推移を追跡したのでその結果を報告する。

#### 材料及び方法

##### 1. 血清

前報の肝蛭感染ウサギの血液性状をしらべる際同時に本研究の費用の一部は文部省科学研究費によった。ここに記して謝意を表する。

約5 ml の血液をとり分離後血清を $-20^{\circ}\text{C}$  で保存し実験終了後 $56^{\circ}\text{C}$  30分非働化した後沈降反応、補体結合反応を試みた。感染実験の詳細は前報(赤羽 1975)を参照されたい。

##### 2. 寒天ゲル内沈降反応

###### 1) 抗原

寒天ゲル内沈降反応抗原は以下のごとく辻(1968)の方法に準じて作った。屠場で採集した肝蛭虫体を良く洗い凍結乾燥後、適当量の0.1%食塩水を加え十分に磨砕し凍結、融解をくり返した。これを $4^{\circ}\text{C}$  で冷凍遠心(10,000 r.p.m 1時間)後、上清をとり一昼夜 $4^{\circ}\text{C}$  の蒸留水で静置透析し、凍結乾燥した。使用時蛋白量が16,000 $\gamma$ /mlになるようにV.B.S.で溶かして沈降抗原とした。なお蛋白量はLayne(1957)の紫外部吸収光度による方法で測定した。

###### 2) 術式

ガラス板上に寒天濃度が0.9%になるようにV.B.S.で溶かした寒天板を作りそこに孔間距離9 mm、孔直径6 mmの孔をあけた、中央の孔には抗原、周囲の8個の孔には血清の原液から倍進希釈したものを27倍まで0.025 ml ずつ入れ、室温で24時間、 $4^{\circ}\text{C}$  の氷室中で48時間放置後判定した。

##### 3. 補体結合反応

###### 1) 抗原

補体結合反応抗原はMaurice & Liselotte(1971)に準じ次のごとく作った。虫体(湿重)10gに25%蔗糖液100mlを加えホモジナイザー(Ultra Trax)で乳状にし、ガーゼ濾過後濾液を30%蔗糖層の上に重層した。

これを遠心 (3,000 r.p.m 15分) 後、沈渣と30%蔗糖層を捨て上清部を再び遠心し (25,000 r.p.m 1時間)、上清を捨て沈渣に30%蔗糖60ml を加え、混和後テフロンホモジナイザーにかけた蔗糖液を C. F 抗原とした。この方法により虫体の膜成分を有効にとり出すことができた。

## 2) 術式

補体は健康なモルモットの心臓より採血した血清を、血球は健康なヒツジの頸静脈より採血し当量の Alsever 液を加え 4°C で保存したものを用いた。溶血素はウサギの抗ヒツジ血球血清を西岡 (1969) の方法で免疫して作製した。本試験に先だち抗原、補体、溶血素力価を測定し本試験ではすべてその稀釈倍率によつた。なお、抗原稀釈濃度は前述の抗原を 200 倍にしたものを、ヒツジ血球は  $10^9/\text{ml}$  になるように稀釈したものを使用した。術式は Naiki & Taketomi (1969) のマイクロタイター法により、補体は 2 単位使用するコルマー法である。判定は肉眼的にかなりはつきりしていたため、血球の大部分が溶血していたものを陰性、されないものを陽性とした。被検血清は 20 倍から倍進稀釈した。

## 結 果

### 1) 寒天ゲル内沈降反応

重感染群 (メタセルカリア 20, 50 感染) 6 羽, 軽感染群 (メタセルカリア 1, 10 感染) 6 羽, 対照群 (無感染群) 10 羽の平均力価の推移を Fig. 1 に示した。図からも明らかなごとく感染後 28 日目にはじめて陽転し以後力価は急激に上昇した。重感染群では上昇傾向がやややく感染後 50 日頃最高に達し平均 7 倍まで陽性を示した。一方軽感染群ではややおくれて感染後 70 日頃最高となり平均値は 10.5 倍となった。しかし力価は 70 日以降徐々に下降し、100~140 日の間では下降傾向が特に著しかつ

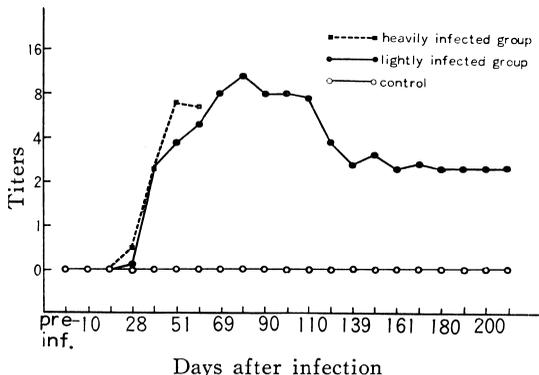


Fig. 1 Patterns of the changes of ouchterlony titers after infection

た。140 日以降は比較的安定し抗体価は 2~3 倍を保つたが一部の個体は感染後 150 日で陰転した。このウサギの血清原液を用いた沈降反応を Fig. 2 に示した。この写真からも明らかな通り 150 日以降沈降線はみとめられず、沈降抗体量は著しく減少した。しかし 150 日以降の血清も 2 倍以上濃縮すると沈降線が出現し、弱いながら沈降抗体をみとめた。なお、対照群のウサギで陽転したものは 1 羽もなかった。

### 2) 補体結合反応

補体結合反応抗体価の平均値の推移を Fig. 3 に示した。図からも明らかな通り抗体価の変動は寒天ゲル内沈降反応よりはるかに大きく最高値は 5120 倍以上に達した。軽感染群における抗体価の推移の 1 例を Fig. 4 に示した。図からも明らかな通り、感染前のウサギ血清においても 40~80 倍程度は陽性反応を示した。しかし感染後 30~40 日から抗体価は急激に上昇し、肝蛭寄生に起因する特徴的变化を示した。重感染群ではやややく上昇し死亡直前に最高の抗体価を示した。一方軽感染群では感染後 60~70 日に最高の抗体価を示したが、その後は徐

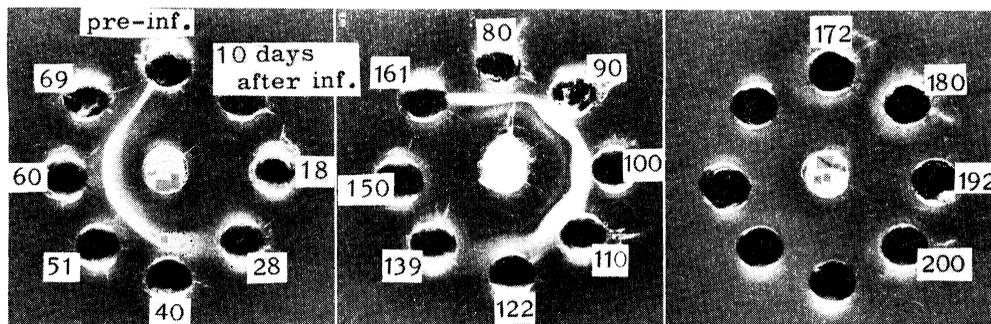


Fig. 2 Ouchterlony test on lighty infected rabbit.

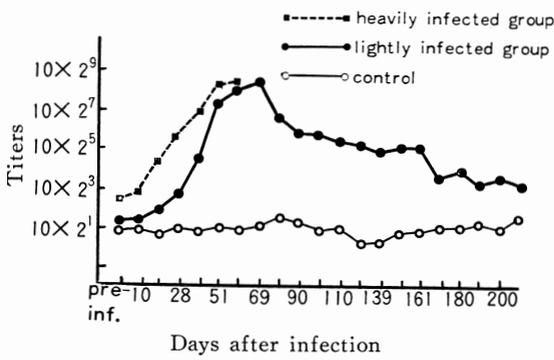


Fig. 3 Patterns of the changes of complement fixation titers after infection

々に減少した。

考 察

著者は前報で肝蛭感染後のウサギの血液性状の推移を報告し、白血球以外のヘマトクリット値、赤血球数、好酸球数、好酸球百分率は肝蛭が寄生すると特徴的な変化を示すことを述べた。しかし血液性状は肝蛭症の固有な症状とはいえず、虫体の侵入と特異的に対応する免疫学的診断法がより重視される。今回はウサギ肝蛭症の寒天ゲル内沈降反応ならびに補体結合反応抗体価の推移を同時に比較した。特に補体結合反応は、従来横川・栗野(1956)の方法が最も広く実施されているがThorp(1964)や著者(赤羽, 未発表)が実施した蛍光抗体法の結果から、肝蛭の抗原は虫体の膜成分に集中的にみられたので蔗糖重層法により膜成分をとり出しこれを抗原として補体結合反応を実施した。

結果は前報で述べた通り血液性状同様、虫体が肝実質寄生時と胆管系へ移行後で異なった推移をとつた。急性肝蛭症と慢性肝蛭症にわけて検討してみる。

1. 急性肝蛭症

重感染群では感染してから宿主が死亡するまで、軽感染群ではおおよそ糞便内に虫卵が排出されるまでの期間で糞便検査は診断的意味を有しない。寒天ゲル内沈降反応は早いもので感染後28日、大部分のものは40~50日、遅いものでも60日には陽転したが Biguet *et al*(1962)の報告にくらべると陽転時期がややおくれる。急性肝蛭症で死亡した重篤なウサギは大部分40日以前に陽転し、軽感染群でも陽転しない例は1例もなくウサギにおける急性肝蛭症の診断に利用できることがわかった。補体結合反応は感染前ならびに対照群のウサギに40~80倍まで陽性を示す例もあり陽性反応の解釈がやや複雑である

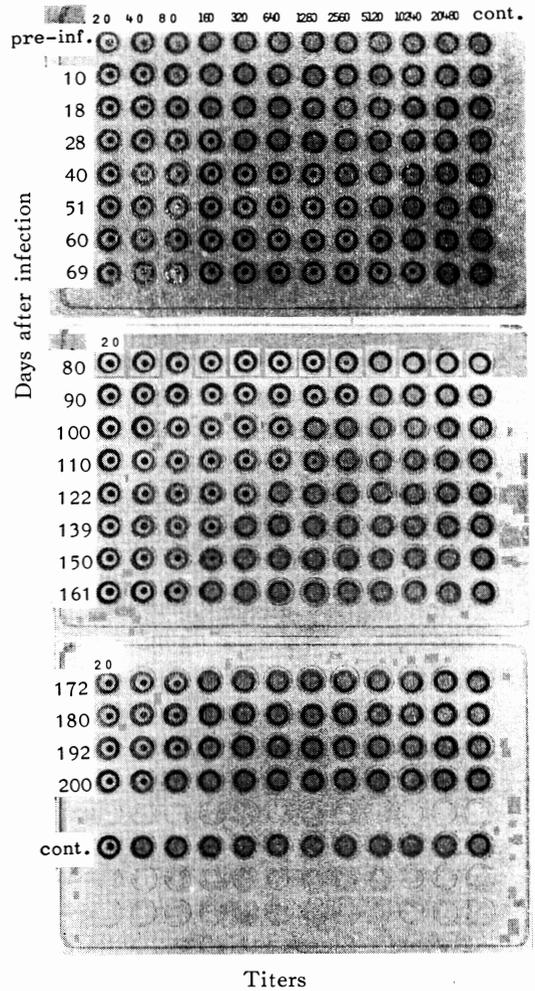


Fig. 4 Complement fixation test on lightly infected rabbit

が、少なくとも100倍以上陽性反応を示すものは肝蛭寄生によるものと判断できる。感染群の補体結合反応抗体価は20~30日頃から60~70日まで急激に上昇し、対照群の抗体価をはるかにうまわりウサギにおける急性肝蛭症の診断に利用できることがわかった。

2. 慢性肝蛭症

糞便内に虫卵が排出されはじめてから以後で大部分の虫体は総胆管に寄生している。寒天ゲル内沈降反応は大部分陽性を示すが、150日以降抗体価は著しく減少し一部陰転することもある。しかし16,000  $\gamma$ /ml 抗原濃度でも血清を2倍以上に濃縮すれば明瞭な沈降線がみとめられ、ウサギにおける慢性肝蛭症の診断に利用できる。補体結合反応抗体価は沈降反応より早く減少し、感染後

110日以降には対照群と抗体価は互に重複し、特徴的变化を示さなかつた。補体結合反応の肝蛭症診断効果が疑問視されるのはこのためであろう。

以上免疫学的抗体価を体内移行と関連させ2つにわけて論じたが抗体価は臓器を破壊する感染初期に高く成熟して管腔に出ると減少することは極めて興味深い現象で、同様な現象は体内移行の全く異なつた蛔虫のサーレス現象で知られている (Lejikina 1965)。

寒天ゲル内沈降反応、補体結合反応など免疫学的抗体価の推移も血液性状同様虫体の体内移行と関係して変化することを述べたが、著者らはすでに体内移行が虫体の成長様相、性成熟と密接に関係していることを報告した (赤羽ら1974)。また駆虫効果も肝実質寄生時と総胆管寄生時で異なるとの報告 (木村1972) もある。このように体内移行は寄生虫、宿主の両面に強く影響をあたえており、それに対応して疾病を動的にとらえてゆく必要がある。

なお著者らは人肝蛭症の免疫学的診断法を確立すべく研究を進めているが、各種実験動物を用いたこれら基礎的研究のほか、人肝蛭症患者での研究の蓄積が必要である。また肝蛭症と他の蠕虫症との交叉反応を否定できない (Bénex *et al* 1959) 現在、抗原の製法なども今後に残された課題である。

## ま と め

日本産肝蛭のメタセルカリアをウサギに感染させ寒天ゲル内沈降反応、補体結合反応抗体価の推移をしらべた。その結果両反応とも抗体価は肝蛭の体内移行と関係し、肝実質寄生時と胆管寄生時で著しく異なつた推移を示し次の結論を得た。

### I. 急性肝蛭症

ウサギの急性肝蛭症において寒天ゲル内沈降反応は30～50日頃陽転し70日頃最高の力価を示した。補体結合反応は20～30日頃抗体価は急上昇しはじめ60～70日頃最高値を示し対照群にくらべ特徴的变化をみとめた。

### II. 慢性肝蛭症

虫体が胆管系へ移行後の慢性肝蛭症において、寒天ゲル内沈降反応は急激に弱くなり、一部のものは150日以降陰転するが、血清を2倍以上濃縮したら沈降線を検出できた。補体結合反応も徐々に減少し、対照群との差はわずかとなり、感染群の特徴的变化を示さなくなつた。

稿を終るにあたり補体結合反応について種々御教示いただいた本学の内貴正治博士 (現東大医学研究所)、ならびに御指導御校閲をいただいた本学の大島智夫教授

に深謝いたします。

尚本論文の要旨は第32回日本寄生虫学会東日本大会で発表した。

## 文 献

- 1) 赤羽啓榮・原田行雄・大島智夫 (1974) : 肝蛭濃厚感染牛における肝蛭虫体の発育ならびに寄生部位に関する観察. (1) 多数寄生牛における肝蛭の相対成長, 寄生虫誌, 23, 14-19.
- 2) 赤羽啓榮 (1975) : 肝蛭感染ウサギの血液性状ならびに免疫学的抗体価の推移—特に体内移行との関係—第1報. 感染後の血液学的諸性状の推移, 寄生虫誌, 24, 344-350.
- 3) Bénex, J. (1964) : Le diagnostic sérologique pratique de la distomatose. 1. Une méthode d'agglutination sur lame à l'aide d'antigène absorbé sur des particules de latex. Bull. Soc. Path. Exot., 57, 495-502.
- 4) Biguet, J., Capron, A. and Tran Van Ky, P. (1962) : Les antigènes de *Fasciola hepatica*. Etude électrophorétique et immunoelectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres helminthes. Ann. Parasit. Hum. et Comp., 37, 221-231.
- 5) Geyer, E. (1967) : Elektrophoretische Analysen an *Fasciola hepatica*. Totalextrakt. Z. f. Parasit., 28, 352-369.
- 6) 市原鶴雄・進 貞夫・蔵元虎蔵 (1956 a) : 肝蛭症の診断に関する研究, I. 沈降反応抗原, 日獣誌, 18, 119-129.
- 7) 市原鶴雄・進 貞夫・蔵元虎蔵 (1956 b) : 肝蛭症の診断に関する研究, II. 牛肝蛭症における沈降反応, 日獣誌, 18, 131-135.
- 8) 市原鶴雄・進 貞夫・蔵元虎蔵 (1956 c) : 肝蛭症の診断に関する研究, III. 山羊肝蛭症における沈降反応, 日獣誌, 18, 137-140.
- 9) 木村 重 (1972) : 肝蛭症の治療, 家畜・人の肝蛭症 (小野豊編), 120-148, 日本獣医師会, 東京.
- 10) Layne, B. (1957) : Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Method in Enzymology, III, 447-457.
- 11) Lejikina, E. S. (1965) : Research on ascariasis immunity and immuno-diagnosis. Bull. Wld. Hlth. Org., 32, 697-708.
- 12) Maurice, M. R. and Liselotte, G. (1971) : Preparation and testing of lipids for immunological study. Methods in immunology and immunochemistry., 1, 188 Academic press.
- 13) Naiki, M. and Taketomi, T. (1969) : Chemical and immunochemical properties of glycolipids from pig spleen. Jap. J. Exp. Med., 39, 549-571.

- 14) 西岡久寿弥 (1969) : ヒツジ血球に対する抗体の作り方, 免疫の生化学, 79-80, 共立出版, 東京.
- 15) 小野元雄・渡辺 晋 (1956) : 肝蛭症における肝蛭虫体多糖体分割の皮内反応に関する研究, 日獣誌, 18, 141-147.
- 16) 小野 豊・磯田政恵 (1952) : 畜牛肝蛭症の診断に関する研究, とくに皮内反応の診断的価値について, 日獣畜大学紀要, 1, 21-27.
- 17) Pantelouris, E. M. (1965) : The common liver fluke., 164-174. Pergamon Press.
- 18) Rifaat, M. A. and Khalil, H. M. (1963) : The use of antigens prepared from adult *Fasciola gigantica*, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma bovis* in the diagnosis of urinary Schistosomiasis by the intra-dermal test (IDT). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 57, 438-444.
- 19) Sewell, M. M. H. (1964) : The immunology of Fascioliasis II. Qualitative studies on the precipitin reaction. Immunology., 7, 671-680.
- 20) 升 茂 (1958) : 肝蛭抗原の研究. I. 虫体諸物質の抗原性. 北里実験医学, 31, 115-121.
- 21) Thorpe, E. (1965) : An immunocytochemical study with *Fasciola hepatica*. Parasit., 55, 209-214.
- 22) 椿 精一・升 茂 (1955) : 皮内反応及び補体結合試験における牛肝蛭抗原の研究, 獣医畜産新報, 154, 249-254.
- 23) 辻 守康 (1968) : 免疫電気泳動法による寄生虫学領域の研究. 医学のあゆみ, 67, 531-536.
- 24) Urquhart, G. M., Mulligan, W. and Jennings, F. W. (1954) : Artificial immunity to *Fasciola hepatica* in rabbits. I. Some studies with protein antigens of *F. hepatica*. J. Infect. Disease., 94, 126-133.
- 25) 横川宗雄・粟野 林 (1956) : 肺吸虫症の補体結合反応. 一皮内反応と補体結合反応との関係—日本医新報, 1703, 27-35.
- 26) 吉田 孝・兼松知彦・渡辺昇蔵 (1954) : めん羊, 山羊の肝蛭症の診断に関する研究. 皮内反応と糞便検査との関係について, (附) 肝蛭症の補体結合反応について, 日獣会誌, 7, 64-67.

**Abstract**

THE CHARACTERISTIC CHANGES OF HAEMATOLOGICAL FINDINGS AND  
 IMMUNOLOGICAL RESPONSE OF THE RABBITS INFECTED WITH  
*FASCIOLA* SP. BY THE MIGRATION OF FLUKE IN THE LIVER  
 II. THE CHARACTERISTIC CHANGES OF THE TITERS OF  
 OUCHTERLONY AND COMPLEMENT FIXATION TESTS

HIROSHIGE AKAHANE

(*Department of Parasitology, School of Medicine Shinshu University, Matsumoto, Japan*)

In the previous paper (Akahane 1975), the author examined the changes of the haematological findings of the rabbits infected with *Fasciola* sp. Ouchterlony and complement fixation tests were performed with the same blood samples from these rabbits. The antigens used for ouchterlony and complement fixation tests were prepared according to Tsuji (1968), Maurice and Liselotte (1971), respectively. C.F.T. was carried out by microtitrator method (Naiki and Taketomi 1969). The results were discussed by the acute phase and chronic phase of infection and summarized as follows.

Acute phase (Until 100 days of infection): The ouchterlony titers of the sera of infected rabbits became positive on 30-50 days after infection, reaching the highest titers about 70 days (Fig. 1) and C.F.T. titers rose after 30 days showing the highest titers after 60 days (Fig. 3).

Chronic phase (After 100 days of infection): The ouchterlony titers of infected rabbits decreased from 90 days, and one rabbit became negative on 150 days (Fig. 1 and 2). The C.F.T. titers decreased more rapidly from 80 days and showed no difference of titers from control after 100 days of infection (Fig. 3 and 4). Thus the rise and fall of titers of both immune reactions were definitely influenced by the phase the migration of flukes. When the flukes migrated through the liver parenchyma in acute phase, the titers of both reactions rose up abruptly, and as they migrated out from parenchyma into the bile ducts, they began to decrease. When they stayed in the bile ducts, ouchterlony titers remained at relatively high level, while, C.F.T. titers became as low level as the control.