

## 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析

### 2. 補体による多包虫・多包条虫に対する 溶解作用とその作用機序

神谷 晴夫 神谷 正男 大林 正士

北海道大学獣医学部家畜寄生虫病学教室

(昭和54年9月3日 受領)

#### はじめに

前報(神谷ら, 1980)において, 先天的に胸腺を欠如するヌードマウスに加え, 3種類のげつ歯類の多包虫に対する感受性を報告し, 宿主の抵抗性が, 宿主の種類と胸腺に関係していることを報告した。しかしながら, これらの抵抗性因子ですら Yamashita *et al.* (1957, 1960), Baron *et al.* (1974) が報告した感染初期の抵抗性の発現や, また, Williams and Oriol (1976) が報告した接種原頭節数による感染成立の成否を説明するに充分ではない。一方, 最近, 数種類の蠕虫に対する補体の作用に言及した報告があり, その作用機序が注目されている(Kassis and Tanner, 1976, 1977; Heard, 1976; Machado *et al.*, 1975; Rickard *et al.*, 1977; Leventhal and Soulsby, 1977)。

そこで, 著者らは, 宿主抵抗性因子の1つとして, 補体に着目し, 系統マウスを含めた色々な動物の正常血清中の原頭節, 幼若成虫の動態を比較・観察すると同時に, 現在のところ定説のない多包虫・多包条虫に対する補体の活性についての検討を行なった。

#### 材料と方法

動物と血清: 系統マウスのうちヌードマウス (BALB/cA-nu/nu: JCL), ヘテロ (BALB/cA+/nu: JCL) は実験動物中央研究所より, 他の系統マウスは北海道大学免疫科学研究所より, ラット (WKA) は北海道大学医学部附属実験動物施設より分与していただいた。また,

本研究は文部省科学研究費試験研究(課題番号487027)の補助を受けて行なわれた。記して謝意を表す。

モルモット (JY-1), スナネズミは, 当教室で継代していたものである。イヌ, ネコは札幌市環境衛生事業所よりの, また, コイは野外で捕獲したものである。これらの動物から採血し, 血清は分離後ただちに使用するか, または $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結して保存後使用した。また, 補体第4成分(C4)が欠損しているC4D系モルモット血清は, 東京都立臨床医学総合研究所より分与していただいた。ヒト血清は, 多包虫に感染していないことを血清学的に確認したものをを用いた。

多包虫・多包条虫: 使用した虫体は, 当教室で20年間余継代しているアラスカ株である。原頭節はスナネズミ, マウスの二次多包虫より得た。包虫組織を, できるだけ宿主成分を含まない状態で採取して, 100メッシュの金網ですりつぶしてろ過, 生理食塩水またはハンクス液中で洗浄し, 機械的にピペッティングすることのみによつて, 翻転した原頭節を得た。幼若成虫は, ラットよりの原頭節を実験的にイヌに感染させて, 感染後15日と23日目の虫体を使用した。なお, 原頭節は採取時の溶解の有無を検査して使用した。

溶解作用の手技と観察: 虫体は使用前, リン酸緩衝液(0.15M, pH 7.2; 以下PBS)で3回, よく洗浄した。浅いホールグラスに約30~50匹の虫体を採り, 分離した各種動物の血清を原液で約0.05ml加え, カバークラスで覆い, 周囲をワセリンで封入して乾燥を防止した。反応は $37^{\circ}\text{C}$ の湿潤箱中で24時間行ない, 体表の膨化, 原形質様物質の流出, 鉤の脱落, 運動の停止などを陽性の標準とした。溶解過程は光学顕微鏡を用いて観察した。

補体血清の処理: 原頭節および幼若成虫の溶解作用に対する補体の作用機序を検討するため, Table 2に示す

ごとく、種々の処理を行なった。正常モルモット血清を 0.01M と 0.04M EGTA・ゼラチン・ペロナル緩衝液 (0.01M EGTA-GVB, 0.04M EGTA-GVB), 56C 30分および 50C 30分間の熱処理を行なった。また、モルモット補体第4成分 (C4) の影響を調べるため、抗モルモット C4-ウサギ抗体 (富士臓器製, anti-C4) で、血清2に対して1の割合でC4を吸収した。それぞれの対照として、PBS, 0.01M EGTA-GVB, 0.04M EGTA-GVB, anti-C4, 正常モルモット血清を用いた。

蛍光抗体法: 1. 虫体に反応した宿主由来の IgG 抗体の有無を検討するため直接蛍光抗体法を行なった。使用した標識抗体は, fluorescein isothiocyanate (FITC) を標識したウサギ抗イヌ IgG 抗体 (MILES-YEDA 製; 以下 FITC anti-Dog), ウサギ抗マウス IgG 抗体 (MILES-YEDA 製; FITC anti-Mouse) およびウサギ抗ラット IgG 抗体 (MILES-YEDA 製: FITC anti-Rat) である。原頭節, 幼若成虫各20匹を, それぞれ PBS で3回よく洗浄し, それぞれの標識抗体で 37C 15分間の感作を行なった。その後, 同様に PBS で洗浄し, 無蛍光スライドガラスにのせ, 周囲をワセリンで封じて観察した。また, 同じ方法で宿主由来の IgM 抗体の有無の検討を, FITC 標識ウサギ抗マウス IgM 抗体 (富士臓器製) を用いて行なった。

2. 補体血清として用いた正常イヌ, マウス, ラット血清中の自然抗体である IgG および IgM 抗体の検出のため, 間接蛍光抗体法を行なった。使用した標識抗体は, 該当する動物の FITC 標識抗 IgG 抗体と抗 IgM 抗体である。被検血清を 37C 15分間感作したのち PBS で3回, よく洗浄し, 以後は直接蛍光抗体法と同じく, 標識抗体を感作し, PBS で洗浄後観察した。

3. 虫体表面への補体第3成分 (C3) の附着を検出するため, 間接蛍光抗体法を用いた。原頭節, 幼若成虫各20匹に0.1ml の正常モルモット血清を加え, 37C 15分間感作し, PBS で3回洗浄したのち, 1:16に稀釈した FITC 標識抗モルモット C3-ウサギ抗体 (富士臓器製: 以下 FITC anti-C3) を感作した。その後は上記1の方法に準拠した。また 56C 30分, 50C 30分で熱処理した血清および PBS 対照を用い, 同様の方法で観察した。

鏡検にはオリンパス社製落射蛍光顕微鏡 BH-RFL 型を使用し, 写真撮影には Kodak Ektachrome Professional film (ASA 200) を用い, 1分間露出した。

## 成 績

### 1. 溶解作用の発現 (Figs. 1~12)

各種動物の正常血清による原頭節および幼若成虫の溶解の発現の有無を Table 1 にまとめた。

Table 1 Lytic effect of fresh sera on protoscolices and pre-adult of *Echinococcus multilocularis* in vitro

Origin of serum	Protoscollex		Pre-adult	
	2h*	24h	2h	24h
Guinea pig				
JY-1	+	+	+	+
C4D	+	+	+	+
Rat (WKA)	+	+	+	+
Mouse				
AKR/MK	-	-	-	-
A/HeJ	-	-	-	-
DBA/2J	-	-	-	-
DBA/1J	+	+	+	+
CF#1	+	+	-	+
C57BL/6	+	+	+	+
SJL/J	+	+	+	+
C3H/HeJ	+	+	+	+
BALB/cA +/nu	+	+	+	+
BALB/cA nu/nu	-	+	-	+
Mongolian gerbil	+	+	+	+
Dog	+	+	-	±†
Cat	+	+	-	±†
Man	+	+	+	+
Fish (Carp)	+	+	-	+

\* Incubation time in hours.

† Slight lysis.

溶解作用は, モルモットの血清 (以下同様) で最も強く, ほぼ, ヒト, ラット, マウス, スナネズミ, イヌ, ネコ, コイ, スードマウスの順序であった。しかし系統マウスでは著しい差があり, 補体第5成分 (C5) が欠損しているとされている AKR/MK, DBA/2J, A/HeJ では原頭節と幼若成虫ともに溶解はおこらなかったが, 他の完全な補体系を有する系統マウスと C4 の欠損動物とされている C4D 系モルモット血清では溶解した。しかしながら, 多包虫感染に対して抵抗性の C57BL/6, SJL/J では, その作用は強く発現した。その他, 原頭節と幼若成虫間にも若干の差があり, イヌ, ネコ正常血清中では幼若成虫に対する溶解作用はきわめて軽微であつ

た。しかし、いずれにしても、各種動物の正常血清による溶解作用の発現の程度は、多包虫感染に対する動物種間、系統マウス間の感受性の差異——*in vivo*での宿主抵抗性の程度——とほぼ合致した。一方、ヌードマウスでは、ヘテロに比し、溶解の発現は著しく遅れ、感作2時間後ですら認められなかったが、ヘテロでは短時間で溶解した。

原頭節に対するモルモットの正常血清による溶解作用は次のごとくである。血清と感作数分後にはすでに溶解がはじまるが、最初、体が収縮し、円く小さくなり、ついで体表面に小さいテグメントの膨化 (tegumental bubbling) が認められ、特に尾端部にそれが顕著となる。その後、この“tegumental bubbling”がしだいに大きくなり、短時間のうちに破裂し、原頭節の顆粒状の原形質様物質が流出する。しだいに溶解はすすみ、脂質様滴状物、石灰小体の放出も認められ、全体が沈降物様物質でとりかこまれる。鉤の脱落もおこり、ついには動きをやめ、多くのものは約10分後には、全例に溶解がおこり死滅した。また、陥入した原頭節は翻転したものに比べ、若干抵抗性であったが、やはり短時間のうちに溶解した。

幼若成虫の場合も、ほぼ同様の過程を経て溶解がおこったが、原頭節に比べ、長時間を要した。最初、体が著しく収縮し、楕円形となり、片節間の境界が不明となった。約2分後、吸盤、頸部に沈降物様物質が認められ、約3分後、この状態が急激に進展し、ほぼ全面に認められるようになった。約5分後、動きがにぶり、50分後に

はほとんどのものが溶解、鉤は脱落して、約1時間後に死滅した。ラット血清中では、頭節部にキャップ様の沈降物の形成を認めた。

## 2. 補体血清前処置による溶解作用にあたる影響

正常モルモット血清に Table 2 のような前処置を行ない、溶解作用におよぼす影響を観察した。56C 30分間の熱処理による補体の非働化と 0.04M EGTA-GVB による  $Ca^{2+}$  イオンのキレートでは溶解は発現しなかった。しかし、0.01M EGTA-GVB ではわずかに溶解が認められ、50C 30分間の熱処理では明瞭な溶解作用が発現した。また、anti-C4 で正常モルモット血清より C4 を吸収したものは、無処理の正常モルモット血清と同様に溶解作用が認められた。それぞれの対照 PBS, 0.01M EGTA-GVB, 0.04M EGTA-GVB, anti-C4 ではいずれも陰性であった。

## 3. 蛍光抗体法による IgG および IgM の検出

虫体に反応した宿主由来の IgG, IgM 抗体が、溶解作用に関与しているかどうかを、FITC で標識した anti-Dog, anti-Mouse, anti-Rat IgG および anti-Mouse IgM を用いて直接蛍光抗体法で調べたが、反応はいずれも陰性であった。また、FITC で標識した anti-Mouse, anti-Rat, anti-Dog IgG および anti-Mouse IgM を用いて、間接蛍光抗体法により、正常補体血清中のいわゆる“自然抗体”の検出を試みたが、直接蛍光抗体法と同じく陰性であった。

## 4. 虫体への C3 の結合

間接蛍光抗体法によつて虫体表面へのモルモット C3

Table 2 Lytic effect of pretreated serum on protoscolices and pre-adult of *Echinococcus multilocularis*

Added serum type	Treatment	Lytic effect	
		Protoscolex	Pre-adult
Normal guinea pig (JY-1)	Heating at 56C, 30 min	—	—
	Heatin at 50C, 30 min	+	+
	0.01 M EGTA-GVB	+	±*
	0.04 M EGTA-GVB	—	—
	Absorbtion with anti-C4	+	+
	None	+	+
None	PBS	—	—
	0.01 M EGTA-GVB	—	—
	0.04 M EGTA-GVB	—	—
	Anti-C4	—	—

\* Slight lysis.

の結合を調べたところ、正常モルモット血清および50C 30分間の熱処理を行なった血清を一次血清として用いた場合、原頭節 (Fig. 13) および幼若成虫 (Fig. 14) のほぼ全面に特異蛍光を認めた。Fig. 15は原頭節の一部を拡大したものであるが、吸盤周辺に認められる溶解作用の結果生成された孔部分を除く全域に蛍光が認められた。対照としての56C 30分間熱処理したモルモット血清、PBS ではいずれも陰性であった。

### 考 察

多包虫感染に際し発現する宿主抵抗性因子として、動物種、系統、性、年齢、胸腺が関与していることが知られている (Yamashita, 1968; Kamiya, 1972; 神谷ら, 1980)。特に、著者らは前報 (神谷ら, 1980) において、胸腺が重要な役割をになうことを報告した。しかしながら、それだけでは、感染初期の抵抗性の発現 (Yamashita *et al.*, 1957, 1960; Baron *et al.*, 1974; Williams and Oriol, 1976) を説明するには充分ではない。

一方、最近、正常血清、感染血清中に、殺条虫作用 (溶解作用) の存在することが報告され、その作用が補体によるものであることが知られている (Kassis and Tanner, 1976, 1977; Herd, 1976; Rickard *et al.*, 1977)。そこで著者らは、多包虫感染初期に発現する抵抗性にも、補体が関与している可能性に着目した。

Table 1 に示したように、*in vitro* での多包虫、幼若多包条虫に対する各種動物の溶解作用は、Yamashita *et al.*, (1958), 神谷 (1973) および神谷ら (1980) により報告された多包虫に対する *in vivo* での感受性とほぼ合致した。このことは、補体第5成分 (C5) の欠損動物とされている AKR/MK, DBA/2J, A/HeJ 系マウス正常血清 (Day and Good, 1977) 中で溶解が発現しなかつたことと、さらに、補体第4成分 (C4) が欠損している C4D 系モルモット正常血清で溶解が発現したことも含めて、補体が多包虫感染に対する感染性を左右する重要な因子であることを示唆している。

さらに、ヌードマウス正常血清中で、コントロールのヘテロに比し、溶解作用の発現が遅れたことは、補体レベルでの何らかの差異が存在する可能性が示唆され、ヌードマウスの特性としての検討を今後行なう必要があろう。また、本来終宿主であるイヌ・ネコの正常血清中で、多包条虫に対する溶解作用がきわめて弱いことは、合目的々解釈ができ、何らかの抗溶解因子の存在が考えられ、興味深い。

補体は、抗原-抗体複合体をはじめ、種々の物質によ

つて活性化され、その結果として多彩な生物活性を示すことが知られるようになった (Day and Good, 1977)。補体が活性化される経路は、classical pathway (古典的補体経路) と近年再確認された alternative pathway (補体第2経路、プロパージン系経路) がある。後者は、抗原-抗体複合体 C1→C4→C2 の反応過程を経ないで、直接 C3 以後が活性化される経路であるが、C3 が活性化される機序は一様ではなく、関与する因子の解明は、その緒についたばかりである。今回の実験で、多包虫感染における宿主の抵抗性の発現と相関があると認められた虫体の溶解作用は、以下に考察する点において、補体第3成分 (C3) の活性化によつて惹起されるものと考えられる。

1. Classical pathway における補体結合性の抗体は、通常 IgG と IgM とされている。しかし、虫体に結合するそれぞれの宿主由来 IgG (イヌ、マウス、ラット) および IgM (マウス) 抗体の存在と正常補体血清中のイヌ、マウス、ラットの IgG およびマウスの IgM のいわゆる“自然抗体”の存在が、それぞれ直接蛍光抗体法と間接蛍光抗体法により否定された。したがって、この溶解作用に虫体表面の抗原と抗体 (補体結合性の IgG, IgM) の複合体が関与する可能性は少ないと判断される。

2. C1 は C1q に C1r と C1s の2種類の酵素前駆体が Ca<sup>2+</sup> を介して結合している複合体である。しかしながら、0.01M EGTA によつて Ca<sup>2+</sup> を選択的にキレートすることにより C1 の活性化を阻害したにもかかわらず、溶解の発現をみたことは、classical pathway 以外の補体の活性化の経路の存在が考えられる。また、0.04M EGTA で溶解作用の発現をみなかつたことは、EGTA の濃度によつて C1q の結合を阻止するばかりでなく、虫体への C3 の結合をも阻止することによると考えられる (Leventhal and Soulsby, 1977)。

3. Classical pathway では C1→C4→C2 の順序で活性化されると考えられているが、今回の実験において、C4 を吸収したにもかかわらず、溶解作用が認められた。同じく C4 が欠損しているとされている C4D 系モルモット正常血清によつて溶解した。

以上、これら1~3の事実は、classical pathway 以外の別の補体活性化の経路の存在を示唆するものと考えられる。

4. C3 が活性化される際、低分子フラグメント C3a アナフィラトキシンと高分子フラグメント C3b とに限定分解される。C3b は免疫粘着現象、オプソニン反応、さらに抗体産生機構とも関連し、生体防御機構上も

重要なフラグメントである。また、C3bは alternative pathway において、B,  $\bar{D}$  因子と反応して、C3 活性化酵素 (C3bB) を生成する。この反応は C3 活性化反応をさらに増幅させる回路として注目されている (Cooper, 1976; Day and Good, 1977; Dias da Silva *et al.*, 1970; Cochrane and Müller-Eberhard, 1968; Müller-Eberhard, 1969)。Rickard *et al.* (1977) が正常血清中で溶解した単包虫 *Echinococcus granulosus* の原頭節の表面に C3 の存在を報告しているが、今回の結果においても、FICT anti-C3 による直接蛍光抗体法によつて、多包虫および多包条虫の全面に C3 の活性化に関与する部分のあることが認められた。これらのことから、今回の多包虫および多包条虫の溶解作用は補体の活性化の alternative pathway すなわちプロパージン系類似の経路を介して発現するものと考えられる。この経路の活性化には、A, B, D 因子を必要とすることが明らかになっている。このうち B 因子は glycine-rich  $\beta$  glycoprotein (GBG) であり、C3 proactivator (C3PA) と同一の物質であることが明らかにされ (Alper *et al.*, 1973)、50C 30分の熱処理で活性は失われ、プロパージン系は作動しなくなるとされている。したがつて、今回の実験において、モルモット補体血清を 50C 30分間の熱処理を行なつたにもかかわらず、溶解作用の発現をみたことは、これまでのプロパージン系経路では説明できない。Machado *et al.* (1975) は Manson 住血吸虫のセルカリアに対して補体が関与する殺セルカリア効果において、また、Leventhal and Soulsby (1977) は豚回虫幼虫に対して、同様に 50C 30分間の熱処理にもかかわらず、虫体への C3 結合を認めている。このことは C3PA は易熱性であるが、alternative pathway を介して、溶解作用をおこすのに充分量の機能的な C3PA が残っていたか、あるいは、従来の alternative pathway でもない別の補体活性化の機序が存在する可能性を示唆するが、その点に関しては、補体第 5 成分 (C5) 以降の活性化の機序も含めて、今後の研究にまたなければならぬ。

一方、自然界での好適中間宿主であるエゾヤチネズミ、ミカドネズミなど感受性が高いとされている動物だけでなく、多包虫症患者についても、補体面からの検討が必要である。さらに、人臨床面への応用として、これまで手術時ホルマリンあるいはアルコールを包虫内に注入することにより、殺条虫および転移防止の処置がとられているが、これら副作用の強い薬物のかわりに補体血清を利用することも一考の余地があろう。

以上、宿主抵抗性と相関が認められた補体による多包虫、多包条虫の溶解作用と補体の作用機序の一端を明らかにすることはできたが、さらに今後の研究にまたなければならぬ多くの問題も含んでいる。

## 要 約

動物種、系統マウス間での多包虫に対する感受性の違いに関係する因子の 1 つとして補体に着目し、各種宿主の無処置血清中で多包虫、多包条虫の動態を観察し、その結果を考察してその作用機序の解明を試みた。この *in vivo* での宿主の抵抗性の差異は *in vitro* での各種動物の正常補体血清中の多包虫、多包条虫の溶解現象とほぼ合致した。特に、補体第 5 成分 (C5) 欠損動物とされている AKR/MK, DBA/2J, A/HeJ では溶解は発現せず、第 4 成分 (C4) 欠損とされている C4D 系モルモット血清中では溶解した。また、ヌードマウスの血清中で、コントロールのヘテロに比し、溶解の発現が遅れたことは、補体レベルでの差異が存在していることが考えられるが、ヌードマウスの特性であるか否かについては、今後の検討をまたなければならぬ。さらに、イス、ネコの血清中では、多包条虫の溶解がきわめて軽微であつたことは、これらの動物が終宿主であり、合目的々とも考えられ、興味深い。モルモット正常補体血清を 56C 30分間、50C 30分間の熱処理、0.01M EGTA-GVB, 0.04M EGTA-GVB による  $Ca^{2+}$  のキレート、および抗モルモット補体第 4 成分-ウサギ抗体 (anti-C4) で C4 吸収の処理を行なつた。その結果、50C 30分間の熱処理、anti-C4 により吸収処理した補体血清では、正常な非処理の補体血清と同様な溶解作用がおこり、0.01M EGTA-GVB 処理血清では、わずかに溶解が認められた。

また、FITC 標識抗モルモット C3-ウサギ抗体を用いて、補体第 3 成分 (C3) の虫体への附着の有無を検出するため、間接蛍光抗体法を用いて調べたところ、C3 の虫体への附着が認められた。

さらに、直接蛍光抗体法、間接蛍光抗体法を用いて、虫体に反応した宿主由来の抗体および流血中の非特異的自然抗体の溶解作用への参加を調べたが、いずれも陰性であつた。

以上のことにより、多包虫、多包条虫は補体が関与して溶解を惹起し、その作用機序は classical pathway (古典的補体経路) ではなく、主として alternative pathway (補体第 2 経路またはプロパージン系経路) による補体活性化経路であることを示唆している。

## 謝 辞

本研究に使用した系統マウスの分与ならびに御指導、御校閲をいただきました、北海道大学免疫科学研究所柿沼光明博士に深謝致します。さらに、C4D モルモット血清の分与ならびに適切な御示唆をいただきました、東京都立臨床医学総合研究所副所長西岡久寿弥、木内吉寛博士、ヌードマウスを供与していただきました、実験動物中央研究所所長野村達次博士ならびに、多包虫感染に関しての血清学的な御助言をいただきました北海道立衛生研究所副所長熊谷満博士に深謝致します。論文執筆にあたり御協力いただいた阪田裕美氏に感謝致します。

なお、本研究の要旨は、第47回日本寄生虫学会大会シンポジウム「ヌードマウス1979」(東京)ならびに The 3rd International Workshop on Nude Mice; Bozeman, Montana, 1979 において一部発表した。

## 文 献

- 1) Alper, C. A., Goodkofsky, I. and Lepow, I. H. (1973): The relationship of glycine-rich  $\beta$ -glycoprotein to factor B in the properdin system and to the cobra factor-binding protein of human serum. *J. Exp. Med.*, 137, 424-437.
- 2) Baron, R. W., Rau, M. E. and Tanner, C. F. (1974): Growth of secondary *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected hosts. *Can. J. Zool.*, 52, 587-589.
- 3) Cochrane, C. G. and Müller-Eberhard, H. J. (1968): The derivation of two distinct anaphyratoxin activities from the third and fifth component of human complement. *J. Exp. Med.*, 127, 371-386.
- 4) Cooper, N. R. (1976): "Complement system" Basic & clinical immunology, 1 ed. 58-69, Ed. Fudenberg, H. H., Stites, D. P., Caldwell, J. L. and Wells, J. V., Tokyo: Maruzen Company, Limited.
- 5) Day, N. K. and Good, R. A. (1977): "Biological amplification systems in immunology" *Comprehensive immunology*, 2, 1-325, New York & London; Plenum medical book company.
- 6) Dias da Silva, W., Vieira, M. N. R. and Diniz, C. R. (1970): The role of the complement system in the pathogenesis of acute pulmonory oedema produced by nephrotoxic serum in rats. *Clin. Exp. Immun.*, 6, 395-406.
- 7) Herd, R. P. (1976): The cestocidal effect of complement in normal and immune sera in vitro. *Parasitol.*, 72, 325-334.
- 8) Kassis, A. I. and Tanner, C. E. (1976):

The role of complement in hydatid disease: in vitro studies. *Internat. J. Parasit.*, 6, 25-35.

- 9) Kassis, A. I. and Tanner, C. E. (1977): Host serum proteins in *Echinococcus multilocularis*: Complement activation via the classical pathway. *Immunol.*, 33, 1-9.
- 10) Kamiya, H. (1972): Studies on echinococcosis in resistance to infection with *Echinococcus multilocularis* in ARK strain of mouse. *Jap. J. Vet. Res.*, 20, 69-76.
- 11) 神谷晴夫 (1973): 多包虫感染に対する系統マウスの感受性について, *寄生虫誌*, 22, 294-299.
- 12) 神谷晴夫・神谷正男・大林正士・野村達次 (1980): 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析, 1. 各種げつ菌類, 特にヌードマウスの感受性, *寄生虫誌*, 29, 87-100.
- 13) Leventhal, R. and Soulsby, E. J. L. (1977): *Ascaris suum*: Cuticular binding of the third component of complement by early larval stages. *Exp. Parasit.*, 41, 423-431.
- 14) Machado, A. J., Gazzinelli, G., Pellegrino, J. and Dias da Silva, W. (1975): *Schistosoma mansoni*: The role of the complement C3-activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Ibid.*, 38, 20-29.
- 15) Müller-Eberhard, H. J. (1969): Complement. *A. Rev. Biochem.*, 38, 389-414.
- 16) Rickard, M. D., Mackinlay, L. M., Kane, G. J., Matossian, R. M. and Smyth, J. D. (1977): Studies on the mechanism of lysis of *Echinococcus granulosus* protoscoleces incubated in normal serum. *J. Helminth.*, 51, 221-228.
- 17) Williams, J. F. and Oriol, R. (1976): Immunological response to experimental echinococcosis in *Meriones unguiculatus*. *J. Parasit.*, 62, 563-568.
- 18) Yrmashita, J. Ohbayashi, M. and Konno, S. (1957): Studies on echinococcosis. VI. Secondary echinococcosis multilocularis in mice. *Jap. J. Vet. Res.*, 5, 197-202.
- 19) Yamashita, J., Ohbayashi, M., Kitamura, Y., Suzuki, K. and Okugi, M. (1958): Studies on echinococcosis. VIII. Experimental echinococcosis multilocularis in various rodents; especially on the difference of susceptibility among uniform strains of the mouse. *Ibid.*, 6, 135-155.
- 20) Yamashita, J., Ohbayashi, M. and Sakamoto, T. (1960): Studies on echinococcosis. XI. Observations on secondary echinococcosis. *Ibid.*, 8, 315-322.
- 21) Yamashita, J. (1968): Natural resistance to echinococcosis and the biological factors re-

sponsible. Bull. Wld Hlth Org., 39, 121-122.

**Abstract**

STUDIES ON THE HOST RESISTANCE TO INFECTION WITH  
*ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* 2. LYTIC EFFECT  
OF COMPLEMENT AND ITS MECHANISM

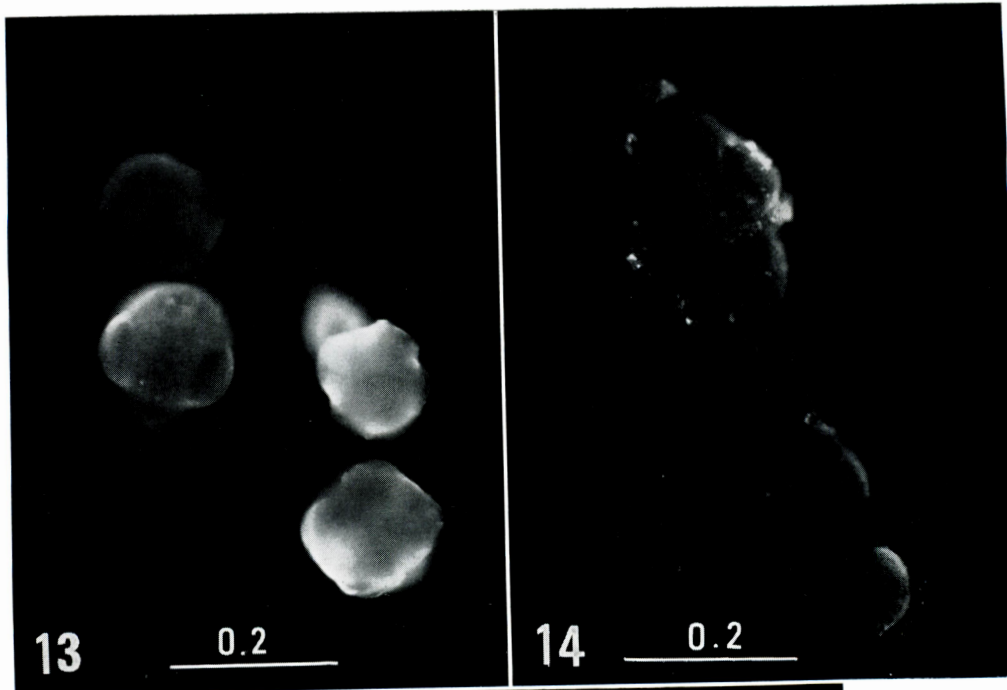
HARUO KAMIYA, MASAO KAMIYA AND MASASHI OHBAYASHI

(*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Hokkaido University*)

The host resistance to infection with *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, varied among different species of host and also different strains of inbred mouse. This host resistance to this parasite was nearly co-relative to the extent of lytic and cestocidal reaction to the protoscolex and pre-adult in fresh serum *in vitro*. Lysis of the parasite did not occur in sera of AKR/MK, DBA/2J and A/HeJ strain mice deficient in C 5 component of complement. But in the serum of C 4 D guinea pig deficient in C 4 component of complement, the lysis was observed. And this activity to the parasite was quite weak in the serum of nude mice (BALB/cA-nu/nu), as compared with that in the serum of heterozygous litter mate (BALB/cA-+/nu). Furthermore, the activity to the pre-adult was also weak in the serum of its definitive hosts, dog and cat, as compared with the activity to protoscolices.

The lytic activity in fresh serum was abolished by heating at 56C 30 minutes and Ca<sup>2+</sup> chelation by 0.04 M EGTA-GVB, but not by heating 50C 30 minutes and absorption with anti-C 4. Fresh serum treated by 0.01 M EGTA-GVB, however, slightly lysed protoscolex and pre-adult. Binding of C 3 component of complement to the parasite was confirmed by the indirect fluorescent antibody technique, by using FITC-conjugated rabbit anti-guinea pig C 3 antibody. Furthermore, direct and indirect fluorescent antibody studies failed to detect host antibodies (IgG) and non-specific antibodies (IgM) at the parasite tegument and also in fresh serum.

These results indicate that the lysis of protoscolices and pre-adults of *E. multilocularis* is mainly induced by the activation of complement through the alternative pathway.





### Explanation of Figures

- Figs. 1-6 show the lytic effect of the normal guinea pig serum on the pre-adult *Echinococcus multilocularis*, obtained from a dog at 15 days after infection.
- Fig. 1 The conspicuous contraction and the tegumental bubble on whole body surface; 5 minutes after incubation.  $\times 120$
- Fig. 2 Conspicuous tegumental bubble on surface of the part of tail; 15 minutes after incubation.  $\times 460$
- Fig. 3 Conspicuous tegumental expansion and the leakage of cytoplasmic materials like precipitin; 25 minutes after incubation.  $\times 120$
- Fig. 4 The shedding of hooks and the explosion at the tail of a parasite; 40 minutes after incubation.  $\times 120$
- Fig. 5 Dead parasites and shed hooks; 6 hours after incubation.  $\times 120$
- Fig. 6 Quite actively moving parasites in the serum treated by heating at 56C 30 minutes; 6 hours after incubation.  $\times 50$
- Figs. 7-12 show the lysis of protoscolex or pre-adult in the normal serum of various animals.
- Fig. 7 Lysis of 15-day-old pre-adults in the rat serum; 3 hours after incubation.  $\times 50$
- Fig. 8 Lysis of 15-day-old pre-adults in the rat serum; showing precipitation like a cap on the scolices and expansion of their posterior part; one and half hour after incubation.  $\times 50$
- Fig. 9 Lysis of protoscolices in the serum of heterozygous mouse (BALB/cA-+/nu), showing the leakage of cytoplasmic material at the posterior end; 3 hours after incubation.  $\times 120$
- Fig. 10 Formation of the tegumental bubble at the posterior end of actively moving protoscolices in the nude mouse (BALB/cA-/nu/nu) serum; 3 hours after incubation.  $\times 120$
- Fig. 11 Lysis of protoscolices in the dog serum; 2 hours after incubation.  $\times 250$
- Fig. 12 Lysis of protoscolices in the carp serum; showing the leakage of cytoplasmic materials at posterior part.  $\times 120$
- Figs. 13-15 show the identification of C3 component of complement on the parasite incubated in the normal guinea pig serum for 15 minutes at 37C, using FITC-conjugated rabbit anti-guinea pig C3 antibody. Scales are in mm.
- Fig. 13 Specific fluorescence on the whole body surface of protoscolices.
- Fig. 14 Specific fluorescence on the body surface of 23-day-old pre-adult.
- Fig. 15 Specific fluorescence around the hole or pit induced by the lytic effect on the anterior part of a protoscolex.