

## *Toxoplasma gondii* の可溶性及び粒子画分 による免疫マウスの体液性抗体応答

別 所 元 茂

(昭和55年7月7日 受領)

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, latex agglutination test, humoral antibody, fluorescent antibody, gel diffusion test, foot pad test

*Toxoplasma gondii* に対する *in vivo* 抗体応答パターンの分析あるいは抗体検出法の技術的開発に関する数数の研究によつて、トキソプラズマ症の診断と病期の判定は著しく前進した(常松, 1979). 例えば, IgM の消長から捕らえる病期の診断, 胎児 IgG の証明による母親における感染との相関関係の判断のように, グロブリンクラスでの論議が行われるようになってきた(Krick and Remington, 1978). これらの抗体応答を解析する方法の一つとして, 抗原側から追究する手段があり, いくつかの化学組成の明らかな抗原に対応する抗体の差異から宿主の免疫応答が究明されている(松岡, 1977).

著者は, トキソプラズマ症における抗体応答を理解する一助として, この応答を抗原側から追究するため, 比較的原虫本来の組成を維持しているホモジネートを素材に, これを可溶性及び粒子画分に分画して抗原に使用した. また, これら抗原に対する宿主の免疫応答の増強にあずかると思われる(Araujo and Remington, 1974a; 土本, 1978) Freund の complete adjuvant (FCA) の効果についても検討した.

### 材料及び方法

実験動物: 体重 $25 \pm 2$  g の ddY 雌マウス(徳島実験動物研究所)を使用した. メタルケージ当たり 5~10匹を恒温下で固形飼料(オリエンタル酵母 KK, MF)と水道水で飼育した.

原虫: 腹腔内継代によつてマウスに10年以上維持されている *T. gondii* RH 株を使用した.

抗原: マウス当たり  $1 \times 10^7$  個の原虫を腹腔内接種し3日後に腹水から集めた原虫を, リン酸緩衝食塩水, pH 7.2 (PBS) で3回遠心洗浄の上ガーゼでろ過し, 更にグラスフィルター(池本理工 KK, No. 3)を通し

た後アセトン・ドライアイスによる凍結融解を5回繰り返した. 次に, テフロングライNDERで一層均等にし, PBS で  $2 \times 10^9$  原虫/ml のホモジネートに補正した. この一部を  $5 \sim 10$  C で  $100,000 \times g$  120分遠心し, 可溶性部(Sup)と粒子部(Sed)に分けた. Sed は PBS で3回洗浄後, 再び PBS で元のホモジネート濃度にもどした. Schneider (1945) の方法によつて得たタンパク画分について, Sup, Sed 及びホモジネートのタンパク量を測定(Lowry *et al.*, 1951)した.

抗原接種: 抗原 0.1ml ( $2 \times 10^8$  原虫分)を腹腔内に接種した. それらのタンパク量は, Sup, Sed 及びホモジネートそれぞれ 1.03, 0.87 及び 1.69mg であつた. FCA は抗原と等容量を加えて乳化の上使用し, 対照には抗原の代わりに生理食塩水を与えた.

血清抗体の測定: 次の方法によつて各抗原に対する抗体応答を測定した. 1) 定性的に色素試験(Sabin and Feldman, 1948)と符合度の高いラテックス凝集反応(平井ら, 1977; 常松, 1979) (LA). 実験には市販のキット(栄研化学)を使用した. 2) 間接蛍光抗体法(IFA)による IgG, IgM 及び IgA の分析. 測定はマウス実験マラリアにおける佐藤ら(1979)及びトキソプラズマ症における Walton *et al.* (1966) の方法に準じて行った. 抗マウス IgM, IgG 及び IgA 血清は MBL 社製品を使用した. 3) 一次元免疫ゲル拡散法(寺野・長谷部, 1973). 各抗原刺激に対するマウス血清中の  $\gamma$ -グロブリン総量測定の目的で, 抗マウス IgG, IgM 及び IgA をそれぞれ 0.75, 10 及び 20% 含むゲル板に 2.5mm  $\phi$  の小孔を開け, 被検血清 3  $\mu$ l を入れ, 5 C で 48~72 時間反応させた. 判定には小孔に対する同心円状の沈降輪を測定し, 同一板で反応させた標準グロブリンの沈降輪値から比較算定した(Photo. 1). ゲル剤はアガロース A37 (半井化学)を, 標準グロブリンは Miles 社製品

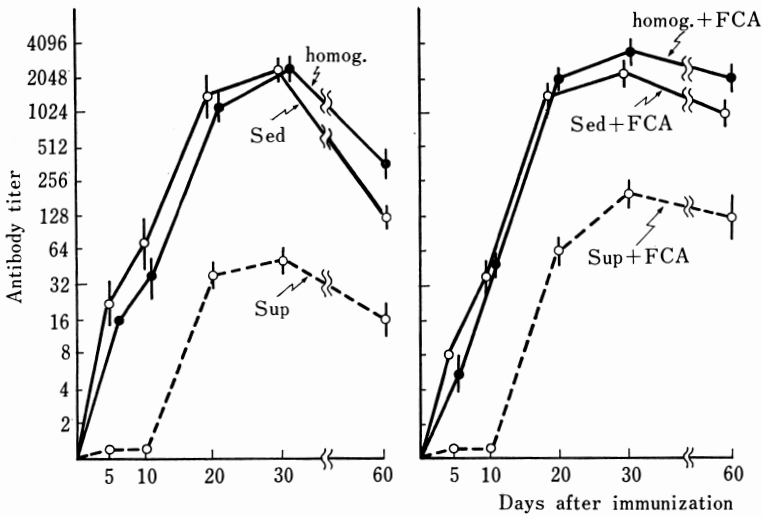


Fig. 1 Latex agglutination antibody titers in sera of mice immunized with soluble and particulate fractions from *Toxoplasma* cell homogenate.  
Sed and Sup: particulate and soluble fractions FCA: Freund's complete adjuvant

を使用した。マウス血清  $\gamma$ -グロブリン濃度の年齢差を考慮し、30、40及び60日齢無処置マウスでの平均値を標準範囲とみなし対照とした (Figs. 3, 4)。

皮膚過敏反応試験：上記免疫マウスについて抗体依存性 Arthus 型皮膚過敏反応及び遅延型反応を足蹠反応 (foot pad test) で測定した。これは免疫12及び60日後のマウスに抗原液0.02ml ( $2 \times 10^7$  原虫分)を足蹠に皮内接種し、3及び48時間後桂(1975)の方法によつて計測した。

### 成績

免疫マウスの LA 抗体価：抗原刺激5、10、20、30及び60日後抗体価を測定した (Fig. 1)。Sup では約20日後ようやく力価1:32を示し、以後徐々に上昇しながら30日でピーク (1:64) に達した。ホモジネート及び Sed では急速かつ直線的に抗体価が上昇し、20日値で1:1,024、30日でピーク (1:2,048) に達した。両群共ピーク値から急速に下降したが、60日後においても、Sup 群のピークを上回る力価を維持した。すなわち、Sup では抗体発現も遅く、力価も低値で、その点他の2群と明らかに異なっていた。FCA を添加した場合、ホモジネート及び Sed 群では、単独刺激によるピーク値 (1:2,048) を超えなかつたが、Sup では逆に単独刺激のピーク値より幾分高かつた (1:256)。また、各群共 FCA 添加によつてピークからの下降が抑制された。

IFA による IgG、IgM 及び IgA の特異抗体価：抗

原刺激5、10、20、30及び40日後に測定した (Fig. 2)。

IgG 抗体については、Sup 群は20日まで直線的に上昇 (1:256) し、続いてピーク (1:512) を画いた。Sed 群は、5日で既に1:256を示し、以後緩やかにしかし常に Sup 群より高値を保ちながら40日で1:2,048に達した。ホモジネート群5日後の力価は Sed 群と一致 (1:256) したが、その後の上昇は Sed 群を下回り40日で同じ値 (1:2,048) に達した。

FCA 添加各群の IgG 抗体レベルは単独刺激群と大差なかつたが、20日以降は添加群の値がいずれも1段階高かつた。Sup の添加群では5日後に IgG 抗体産生増強効果が顕著であつた。

IgM 抗体価は、Sed 及びホモジネート群共5日後1:64を示したが、その後急速に低下して20日では既に測定できなかつた。Sup 群では5日で1:2と低かつたが、その後20及び30日は1:16まで上昇し、40日では消失した。すなわち、IgM 抗体産生は Sup 群の方が長期間持続した。IgM 抗体に対する FCA の効果は、Sup 群で20日に認められた外見のべきものはなかつた。なお、IgA 抗体は終始測定できなかつた。

一次元免疫ゲル拡散法による血清 IgG、IgM 及び IgA の濃度：各抗原刺激後5、10、20及び40日 (IgA は20日まで) の血清中の濃度を同一ゲル板で比較し (Photo. 1)、測定値を抗原別に図示した (Figs. 3, 4)。

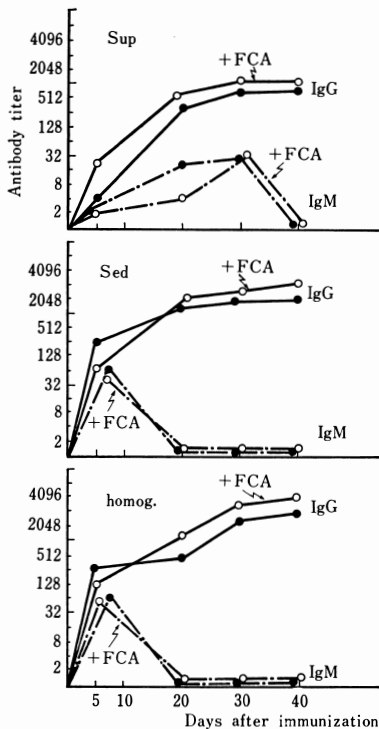


Fig. 2 Indirect fluorescent-antibody titers of IgG and IgM in sera of mice immunized with soluble and particulate fractions from *Toxoplasma* cell homogenate.

Sed and Sup: particulate and soluble fractions  
FCA: Freund's complete adjuvant

血清 IgG は, Sup 群では10日をピーク (1.4mg/ml) に以後標準値まで下がった。FCA 添加群では20日で1.2 mg/ml に達し, 40日後もほぼ同じレベルを保った。Sed 群では20日まで上昇 (1.6 mg/ml) し, 40日に至るも力価が維持された。FCA を添加すると40日まで直線的に上昇し2.2mg/ml に達した。ホモジネート群は FCA 添加の有無にかかわらず直線的に上昇し, 40日には単独及び FCA 添加群それぞれ1.7及び2.1mg/ml を示した。

血清 IgM は Sup 及び Sed 群共20日にピーク (そ

れぞれ0.75及び0.93mg/ml) を持つ素直なカーブを描き, FCA 添加による影響はわずかであった。ホモジネート群では20日で単独及び FCA 添加群それぞれ0.92及び0.94 mg/ml を示し, 40日にはそれぞれ1.12及び1.23mg/ml に達した。FCA 添加による影響も見べきものはなかった。

血清 IgA の濃度は20日に上昇が見られ, 特に Sup 及び Sed において著しかった。

皮膚過敏反応: 無処置マウスを対照に, Sed 及び Sup 刺激後12及び60日のマウスについて足趾の腫脹度を抗原接種3時間後 (即時型) 及び48時間後 (遅延型) に測定した (Fig. 5)。感作後12日では, FCA 添加 Sup 群に強い即時型反応が現れ, 60日の場合は FCA 添加 Sed に即時及び遅延型, FCA 添加 Sup に即時型の顕著な反応が見られた。すなわち, 強度の皮膚反応は FCA 添加群に限られ, Sup 及び Sed 刺激では即時型が強く現れ, 明らかな遅延型反応は Sed のみに見られた。

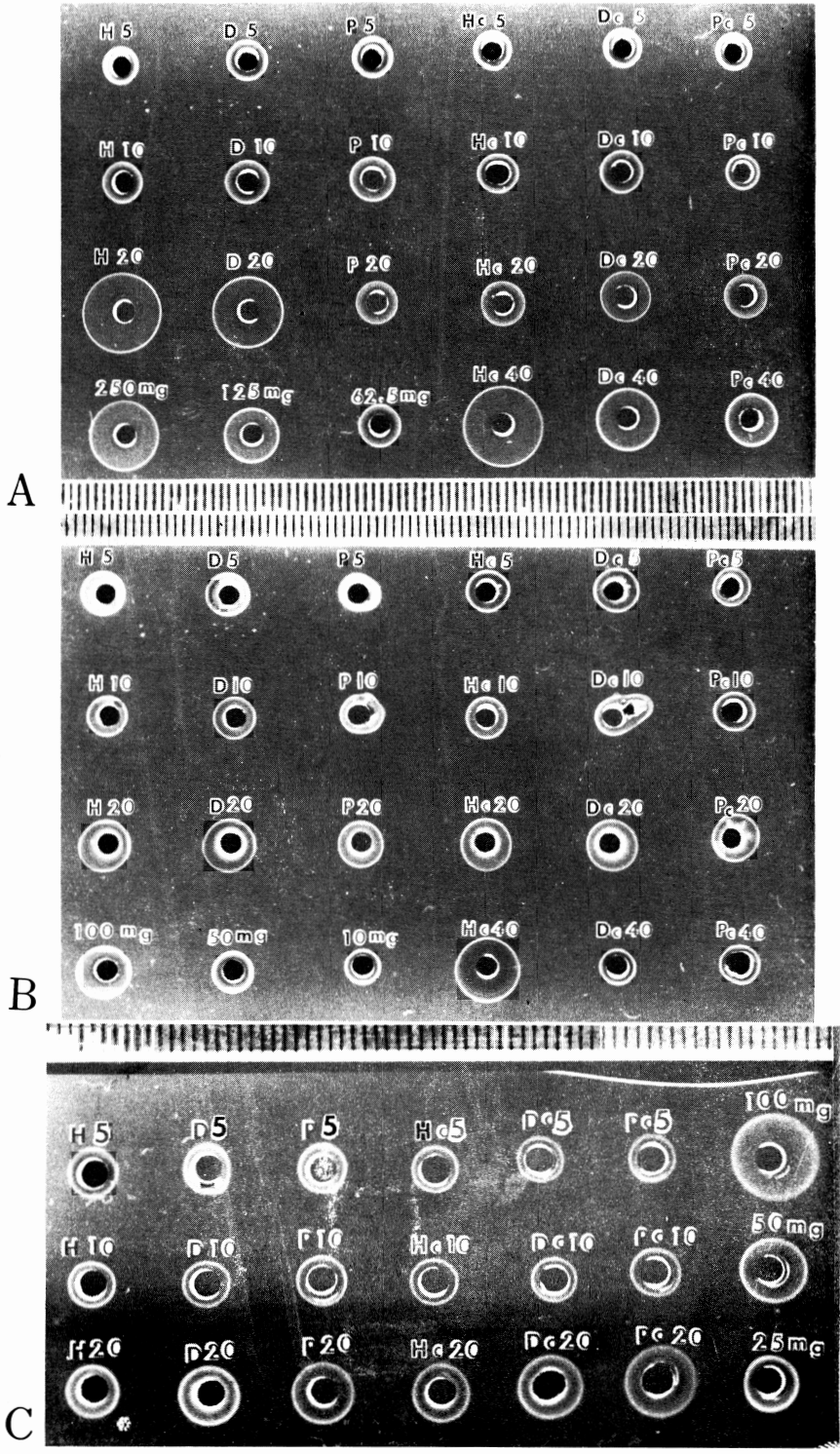
#### 総括並びに考察

*T. gondii* に対する宿主の免疫応答には, 液性及び細胞性の両面が考えられるが, 感染防御は細胞性応答に依存すると言われる (中野, 1973; Remington and Krahenbuhl, 1976)。しかし, *in vitro* で抗体が原虫の細胞内侵入を抑制し, 感染防御に何らかの役割を果たしているとする報告も少なくない (常松, 1963; Anderson *et al.*, 1976 等)。現に Hafizi and Modabber (1978) は cyclophosphamide 処理によつて, 十分抵抗性を備えた慢性感染宿主の抗体産生を抑制すれば, 特異抵抗性が減弱し, しかもこれは宿主に1:500程度 (IFA による力価) の抗血清を数回にわたつて受身伝達することにより回復することを認めた。

*T. gondii* に対する特異抵抗性獲得の免疫学的分析の多くは, 弱毒生虫 (Beverley 株等) の感染を経過した動物で進められてきた (Nakayama, 1965; Hafizi and Modabber, 1978)。しかし感染という抗原刺激は免疫応答を抗原側から解析するにいくつかの障害を持つてい

Photo. 1 The precipitating antibody reaction of mouse antisera on a single radial immunodiffusion plate.

H: homogenate D: particulate fraction P: soluble fraction C: in the presence of Freund's complete adjuvant Arabic numerals: days after immunization One division of a rule: 1 mm Agar contained rabbit antiserum against mouse IgG (A), IgM (B) and IgA (C). Antigen wells were filled with sera of mice immunized with *Toxoplasma* cell homogenate and soluble and particulate fractions in the presence or absence of Freund's complete adjuvant. Reactions with known amounts of respective immunoglobulin classes in standard sera are shown on each plate.



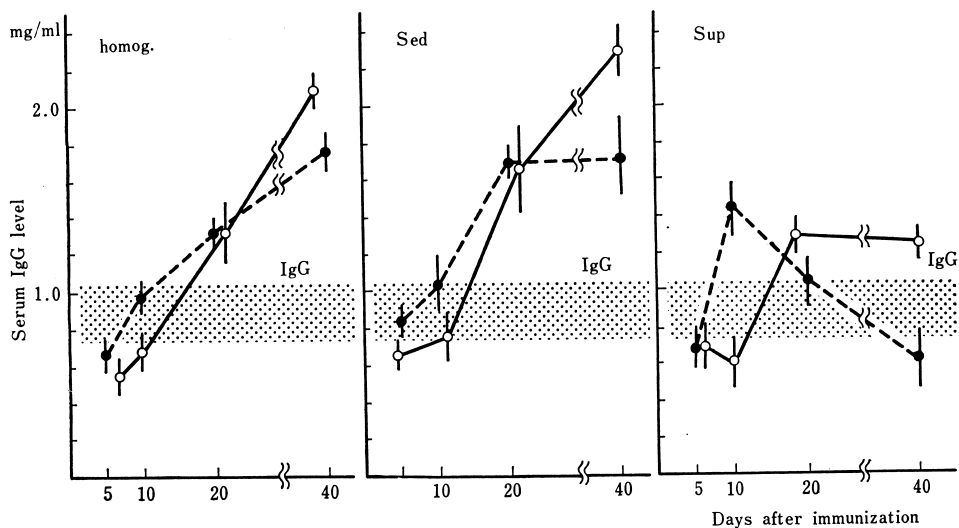


Fig. 3 IgG levels in sera of mice immunized with soluble and particulate fractions from *Toxoplasma* cell homogenate by single radial immunodiffusion technique.

○—○ : antigen+Freund's complete adjuvant      ●—● : antigen alone  
 ■ : normal IgG range      Sed and Sup: particulate and soluble fractions

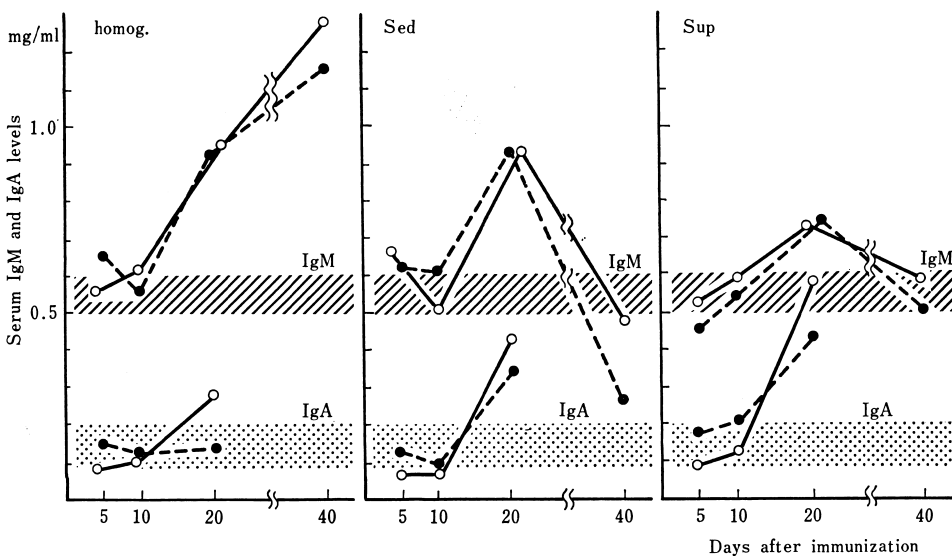


Fig. 4 IgM and IgA levels in sera of mice immunized with soluble and particulate fractions from *Toxoplasma* cell homogenate by single radial immunodiffusion technique.

○—○ : antigen+Freund's complete adjuvant      ●—● : antigen alone  
 ▨ : normal IgM range      ■ : normal IgA range  
 Sed and Sup: particulate and soluble fractions

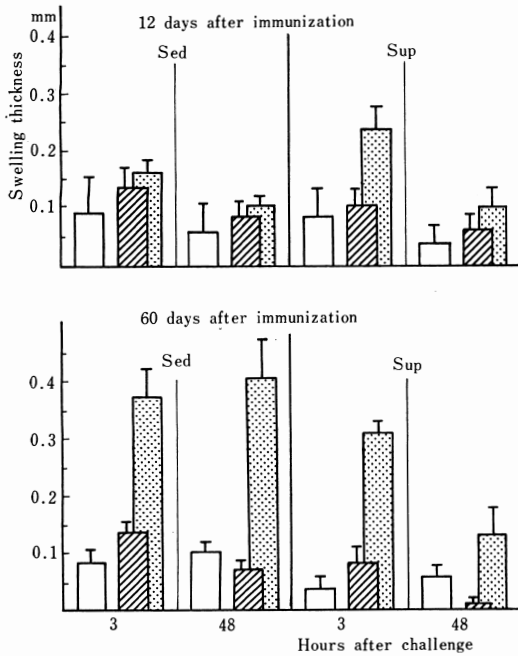


Fig. 5 Foot pad test in mice injected homologous antigens 12 and 60 days after intraperitoneal injections of soluble and particulate fractions from *Toxoplasma* cell homogenate.

□: control    ▨: antigen alone    ▤: antigen + Freund's complete adjuvant

Sed and Sup: particulate and soluble fractions  
The swelling was measured 3 and 48 hours after challenge

る。例えば、初期免疫応答と関係が深いと考えられる原虫と宿主との初めての出会いで、本原虫が宿主細胞に積極的に侵入するかどうかについてもまだ十分に説明されていない (Kirchhoff and Langer, 1971; Hirsch *et al.*, 1974; Araujo and Remington, 1974b)。またあらゆる有核細胞に侵入する本原虫の感染は免疫機構に何らかの影響を与えると考えられる。このような感染刺激を単純に抗原側から宿主の応答を分析する方法は特異抵抗性付与の研究で試みられ、抗原分析と共に宿主の免疫応答を理解するのに役立つ (Araujo and Remington, 1974a; 土本, 1978)。著者は、トキソプラズマ症における抗体応答を抗原側から追究するため、原虫ホモジネートを素材として、その可溶性 (Sup) 及び粒子画分 (Sed) を抗原に使用し、一部に FCA の添加を加味して宿主の産生する抗体のパターン、力価及びサブクラスを比較検討し、次の結果を得た。

LA 試験による抗体産生の定性的経時変化では、Sup

と Sed とのタンパク量はほぼ同程度であるにもかかわらず、抗体出現は明らかに Sup の方が遅く、FCA 添加によっても早められなかった (Fig. 1)。

IFA による抗トキソプラズマ抗体の分析において、Sed による IgM 抗体の産生は初期 (5 日) にのみ認められたが、Sup 刺激では 30 日まで力価が上昇した (Fig. 2)。IgG 抗体及び IgM 抗体のいずれの誘導にも FCA 添加の上昇効果は少なく、LA の場合同様、継続的抗原刺激に基づく抗体価の維持にあずかっていたに過ぎなかった。以上のように、抗体産生パターンには経時的にも抗原による相違が観察された。これは Sup 及び Sed が抗原として宿主免疫担当細胞を刺激する様式の差によるものと考えられる。

一次元免疫ゲル拡散法の結果から、今回の抗原には特に血清 gA に対する非特異的刺激性が見られた (Fig. 4) が、抗原によつて他のグロブリンクラスの経時的産生パターンが異なっていた。すなわち、ホモジネート及び Sed 刺激後早期 (5~10 日) に見られた特異抗体が、血清  $\gamma$ -グロブリン濃度には反映せず、血清 IgG、血清 IgM 共に標準範囲を超えなかった (Figs. 3, 4)。更に血清 IgM においては、特異的抗体 (Fig. 2) と血清中濃度 (Fig. 3) とは無関係とさえ思われ、血清 IgG (Fig. 3) の経時的増加が IgG 抗体 (Fig. 2) のそれとやや類似したにとどまった。

各抗原による免疫マウスの即時型皮膚反応において、明らかな腫脹は FCA 添加群にのみ見られ、その場合は強い反応が免疫後 12~60 日の間保たれた (Fig. 5)。また、Sup 刺激宿主では即時型の反応が強く、Sed の場合は即時型と遅延型の両反応が見られた。

熱死虫抗原よりも生虫に近い抗原性を有すると思われる Sup 及び Sed を使用し、これら抗原で誘導される体液性抗体の分析を試みた結果、単なる 100,000 $\times$ g 分画抗原である Sup と Sed の間でさえ、それぞれの試験で宿主の抗体応答の力価や経時パターンに相違が認められた。これらの相違を感染によつて誘導される抗体応答の説明に直接導入することは早計であるが、抗原側からの解析の進め方の方向的役割は果たしていると考えられる。例えば、*T. gondii* 感染による抗体の出現が比較的遅い (Krick and Remington, 1978) 点は、Fig. 2 の Sup 刺激における IgM 抗体価のパターンに類似し、感染原虫による抗原刺激が、Sup のような可溶性抗原物質に依存していることも考えられる。

感染状態と死虫若しくは分画物の接種を受けた状態との違いは病原体の増殖であり、感染により抗原の継続的

刺激が与えられることである。本実験におけるアジュバント添加は、この抗原刺激の持続を期待した一種の感染モデルであつた。その効果は既述のように IgG クラス産生に現れ、更に抗体（主として IgG）依存性の高い即時型皮膚反応（板倉，1976）に顕著であつた。また、抗原としては Sed に FCA を加えた場合に最も強い応答が認められ、遅延型皮膚反応もこの組み合わせで発現した。したがつて、Sed には細胞性免疫誘導因子の局在が示唆される。

## 結 論

トキソプラズマ症における抗体応答の解析を意図して、原虫細胞ホモジネートを 100,000×g 120 分遠心して可溶性 (Sup) 及び粒子 (Sed) 画分に分け、これらを抗原としてそれぞれ単独あるいは Freund の complete adjuvant (FCA) と共にマウスを腹腔内免疫し、抗体産生に及ぼす効果を比較検討した。

ラテックス凝集反応 (LA) 試験では、FCA 添加の有無にかかわらず Sed 刺激群の抗体価は Sup 群を上回り、反応発現も早かつた。

間接蛍光抗体法で特異的 IgG, IgM 及び IgA を測定した結果、IgG 抗体産生の経時パターンは Sed, Sup 共 LA 試験と同じ傾向であつた。IgM 抗体は、Sed 群では免疫 5 日後にのみ検出されたが、Sup では 5~30 日の間持続的に認められた。IgA 抗体は終始検出されなかつた。

一次元免疫ゲル拡散法による免疫宿主血清中の各クラスの  $\gamma$ -グロブリン濃度は、抗原の種類を問わず 10 日以内はほとんど標準濃度を超えないことを知つた。なお経時パターンでは血清 IgG のみが他の試験と類似の成績を示した。

マウス足蹠による皮膚過敏反応試験では FCA 添加 Sed, Sup 両群で即時型反応が誘導され、60 日後にもなお強い反応が保たれた。一方遅延型反応は FCA 添加 Sed 群にのみ認められた。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導御校閲を賜つた徳島大学医学部寄生虫学教室尾崎文雄教授及び徳島大学教育学部保健科学教室岡好万教授並びに直接御指導いただいた伊藤藤義博助教授及び教室員各位に深謝致します。

## 文 献

- 1) Anderson, S. E., Jr., Bantista, S. C. and Remington, J. S. (1976) : Specific anti-

- body-dependent killing of *Toxoplasma gondii*. Clin. Exp. Immunol., 26, 375-380.
- 2) Araujo, F. G. and Remington, J. S. (1974a) : Protection against *Toxoplasma gondii* in mice immunized with *Toxoplasma* cell fractions, RNA and synthetic polyribonucleotides. Immunology, 27, 711-721.
- 3) Araujo, F. G. and Remington, J. S. (1974b) : Induction of tolerance to an intracellular protozoan (*Toxoplasma gondii*) by passively administered antibody. J. Immunol., 113, 1424-1428.
- 4) Hafizi, A. and Modabber, F. Z. (1978) : Effects of cyclophosphamide on *Toxoplasma gondii* infection: reversal of the effect by passive immunization. Clin. Exp. Immunol., 33, 389-394.
- 5) 平井徳幸・永井佳子・小林昭夫(1977) : トキソプラズマラテックス凝集反応 (榮研マイクロタイター法) の検討. 寄生虫誌, 26(増), 31.
- 6) Hirsch, J. G., Jones, T. C. and Len, L. (1974) : Parasites in the immunized host: mechanisms of survival. Ciba Foundation Symposium 25 (new series), New York, 205-223.
- 7) 板倉克明(1976) : 免疫反応による組織障害—アレルギー. 医科免疫学, 菊池浩吉編, 第 1 版, 278-297頁, 南江堂, 東京.
- 8) 桂 義元(1975) : 蛋白質抗原によるマウスの遅延型過敏症の足蹠試験. 免疫実験操作法 IV, 日本免疫学会編, 1201-1205頁, 日本免疫学会, 金沢.
- 9) Kirshhoff, H. and Langer, H. (1971) : Toxoplasmosis, 2nd ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 80p.
- 10) Krick, J. A. and Remington, J. S. (1978) : Current concepts in parasitology Toxoplasmosis in the adult—An overview. New Engl. J. Med., 298, 550-553.
- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 12) 松岡雄治(1977) : 抗体産生の調節. 免疫応答, 山村雄一・森沢成司編, 第 1 版, 109-135頁, 南江堂, 東京.
- 13) 中野康平(1973) : 医科研セミナー, 71, 免疫, 松橋 直編, 第 1 版, 78-92頁, 文光堂, 東京.
- 14) Nakayama, I. (1965) : Effects of immunization procedures in experimental toxoplasmosis. Keio J. Med., 14, 63-72.
- 15) Remington, J. S. and Krahenbuhl, J. L. (1976) : Immunology of *Toxoplasma* infection. In Immunology of Parasitic Infections,

- ed. by Cohen and Sadun, Blackwell, Oxford, 235-267.
- 16) Sabin, A. B. and Feldman, H. A. (1948) : Dyes as micro-chemical identifications of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.
  - 17) 佐藤功栄・鈴木 守・脇 誠治(1979) : マウス系モデルにおける酸性緩衝液処理抗原(*Plasmodium berghei* NK 65) を用いたマラリア診断法としての間接蛍光抗体法. *寄生虫誌*, 28, 35-42.
  - 18) Schneider, W. C. (1945) : Phosphorus compounds in animal tissue: extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161, 293-304.
  - 19) 寺野由剛・長谷部保彦(1973) : 抗体量の測定法(4), 一元免疫拡散による Becker 法. *免疫実験操作法Ⅲ*, 日本免疫学会編, 605-612頁, 日本免疫学会, 金沢.
  - 20) 土本正明(1978) : *Toxoplasma gondii* ホモジネート及び遠心分画物のマウスにおける感染防御抗原性. *寄生虫誌*, 27, 433-443.
  - 21) 常松之典(1963) : 感染防御抗体, *日本医学会第16回総会学術講演集2*, 744-749.
  - 22) 常松之典(1979) : 免疫学的診断 原虫性疾患. *臨床医*, 5, 692-697.
  - 23) Walton, B. C., Benchoff, B. M. and Brooks, W. H. (1966) : Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 15, 149-152.



**Abstract**HUMORAL IMMUNE RESPONSES IN MICE IMMUNIZED WITH SOLUBLE  
AND PARTICULATE FRACTIONS OF *TOXOPLASMA GONDII*

MOTOSHIGE BESSYO

*(Department of Parasitology, School of Medicine, The University  
of Tokushima, Tokushima, Japan)*

In an attempt to analyze humoral antibody responses in human toxoplasmosis, soluble (Sup) and particulate (Sed) fractions were prepared by centrifuging *Toxoplasma* cell homogenate at  $100,000\times g$  for 120 min, and they were used as antigens in the presence or absence of Freund's complete adjuvant (FCA). Mice were immunized with respective antigens intraperitoneally and the corresponding antibody production was checked.

In indirect latex agglutination (LA) test, antibody titers in the Sed-immunized animals (Sed group) were found to be higher than those in the Sup-immunized animals (Sup group) regardless of the presence or absence of FCA. The onset of the reaction was faster in the Sed group than in the Sup group.

Specific IgG, IgM and IgA were measured by indirect fluorescent antibody technique. The pattern of IgG production in both Sup and Sed groups was similar to that observed by LA test. IgM was detectable only 5 days after immunization in the Sed group while it was recovered continuously from 5 through 20 days after immunization in the Sup group. IgA was not identifiable by this technique.

The concentration of each class gammaglobulin in immune-host sera determined by single radial gel diffusion method scarcely exceeded the standard level within ten days following immunizations irrespective of the kind of antigens used. Only IgG showed similar patterns to those observed in the above two tests.

In foot pad tests in mice immunized with Sup and Sed in the presence of FCA, positive immediate hypersensitivity reaction was observed even 60 days after immunization, and delayed hypersensitivity reaction was positive only in the Sed group with FCA.