

## 豚蛔虫体腔液の抗原精製とその免疫学的 特性に関する研究

井上 洋子<sup>1)</sup> 阪田 泰和<sup>1)</sup>  
林 鷹治<sup>2)</sup> 辻 守康<sup>1)</sup>

(昭和59年8月7日 受領)

**Key words:** allergen, *Ascaris suum* body fluid, passive cutaneous anaphylaxis, IgE induction

### 緒言

寄生虫感染により、宿主にいわゆるレアギン型抗体が産生されることは、Prausnitz-Küstner (P-K) 反応を用いて、古くより(1920年代後半)知られている。また、実験的に寄生虫を感染させた動物を用いたモデルで、Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応を用いて、レアギン型抗体の産生とその消長についての詳細な追求が行なわれてきた。人のレアギンが、IgE という新しい免疫グロブリンに属することが発見され、以来、IgE mediated reaction, 即ち、I型アレルギー反応として、寄生虫症が、アレルギー学の見地より、検討が行なわれるようになってきた。

寄生虫感染によるI型アレルギー現象として、皮疹、気管支喘息、好酸球増多症、胃腸過敏症などが挙げられるが、アレルギー診断的には、虫体抗原による即時型皮内反応、血清中の虫体抗原特異的 IgE 抗体の証明などの方法がとられている。

寄生虫学におけるアレルギー分野での研究特性は、寄生虫抗原に対する宿主血清中 IgE 抗体の産生とその動態、寄生虫感染による IgE 産生の非特異的促進、虫体抗原(アレルゲン)の分析と精製などに向けられている。これら研究課題の全てに共通するのは、当然のことながら、複雑な組成をもつ虫体抽出物質の精製であり、各組成の物理化学的性質が明らかにされることによって、それらの免疫学的特性の究明も期待される。このことは、寄生虫によるI型アレルギーの病態を解き明か

し、寄生虫感染の免疫学的診断法の開発に大きく寄与することと考えられる。

著者らは、豚蛔虫(*Ascaris suum*)体腔液物質を粗抗原とし、その精製分析を試みることによって、蠕虫症におけるI型アレルギー現象の解明の一助とすべく、以下の実験研究を行なった。

### 材料および方法

#### (1) *Ascaris suum* 粗抗原の作成

広島市食肉検査所において、屠殺直後の豚の腸管から採取した *Ascaris suum* (以後 *As. suum* と略) 成虫を、生理食塩水で数回洗浄した後、雌虫体の尾部を切断し、体腔液を採取した。体腔液を 10,000rpm 30分間遠心分離し、その上澄液を凍結乾燥したものを粗抗原とした。

#### (2) 実験動物

生後3カ月(体重180~200g)の Wistar 系ラットの雄を使用し、1群は、4匹以上とした。

#### (3) 抗 *As. suum* 血清

抗原0.1mg を生理食塩水0.5ml に溶かし、20mg/ml の Al(OH)<sub>3</sub> ゲル (Levine and Vaz, 1970) 1ml と共に、ラット腹腔内に注射した。感作後3週目に、心臓穿刺により採血し、3,000rpm 10分間遠心分離した血清を使用時まで-20°C に保存した。

#### (4) PCA 反応

Ovary and Bier (1953) と Ogilvie (1964) の方法に準じた。即ち、抗血清を生理食塩水にて 2<sup>11</sup>まで倍々希釈し、各希釈血清の0.1ml を剃毛後区分したラット背部へ皮内注射した。抗血清注射72時間後に、抗原0.1mg を含

<sup>1)</sup> 広島大学医学部寄生虫学教室 <sup>2)</sup> 林耳鼻咽喉科 (広島市)

む1%エバンスブルー液0.5mlをラット大腿静脈に注射し、30分後に、皮内注射部位のブルースポットを計測し、エンドポイントは、5mmとしてPCA活性を判定した。なお、PCA価は、血清希釈倍数で表わした。

(5) Ouchterlony 法および Immuno-electro-phoresis (IEP)

辻 (1974) の方法に準じた。即ち、ペロナール緩衝液 (pH 8.2) に、0.9%の割合になる様に、agarose (Behring Werke 社) を加え、85~90°C で加熱溶解し、これをガラス板上に流して支持体とした。Ouchterlony 法の場合は、各分画抗原 (1mg/0.1ml) を溝に入れ、これと3mmの間隔の血清孔に各抗血清を入れた。

(6) Column chromatography

Sephadex G-50, DEAE-Sephadex A-50, CM-Cellulose (Pharmacia 社) などを用いて、試料をフラクションコレクター (Toyo Kagaku) により分画した後、Varian techtron spectro photometer 635で、280nmにおける吸光度 (OD<sub>280</sub>) を測定した。

(7) 蛋白量測定

Lowry *et al.* (1951) の方法に従って、蛋白量を測定し、標準曲線作成には、Sigma 社の Bovine serum albumin (BSA) を使用した。

(8) Isoelectric focusing

1% Ampholine (pH range 3.5-10) を含む50% (W/V) 蔗糖溶液と5% (W/V) 蔗糖溶液を、ペリスタポンプを使用して、110ml カラム (LKB) にて、pH 勾配を作成した。カラム下端を陰極、上端を陽極とし、陰極側電極液には、60% (W/V) 蔗糖を含む水酸化ナトリウム液を、陽極側には、りん酸溶液を使用して、800vで48時間通電した後、フラクションコレクターにより2mlずつ分画し、pHメーターによるpH測定とOD<sub>280</sub>を測定した。

(9) アミノ酸分析

試料は、6N-HClで110°Cにて、24時間加水分解した。使用したアミノ酸分析計は、JLC-5AH-Liquid chromatograph (ニンヒドリン法) と、Toyo Soda HLC-805 (OPA法) で、アミノ酸標準液は、それぞれ5nmoleおよび100pmole用いた。

(10) 分子量測定

分子量既知の標準蛋白として、Bio rad 社の ovalbumin (44,000), myoglobin (17,000), cytochrome C (12,500), vitamin B-12 (1,350) を、また、Vo測定には、thyroglobulin (670,000) を用いて、Sephadex G-50カラム (1.5×38.2cm) にて、ゲル濾過し、OD<sub>280</sub>

を測定した。溶出部位よりKavを算出し、試料の分子量を推定した。

## 実験成績

*As. suum* 体腔液物質からの抗原の精製方法は、Fig. 1に示した。

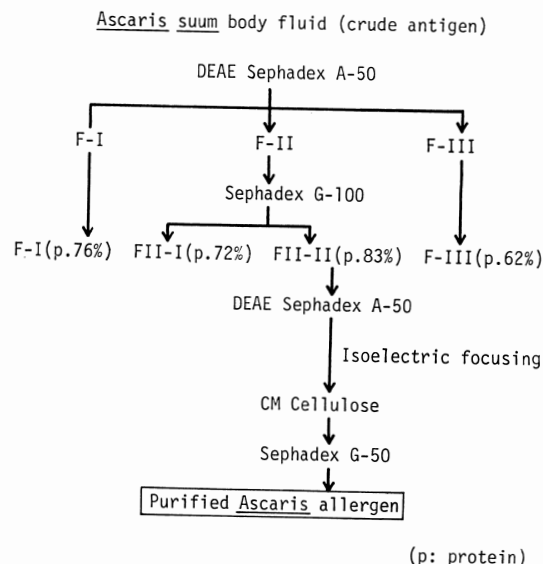


Fig. 1 Purification of allergen from *Ascaris suum* body fluid antigen.

なお、粗抗原を Al (OH)<sub>3</sub> ゲルと共に、ラットに感作して得られた抗血清は、56°C で3時間の熱処理後、PCA反応を行なうと、PCA活性は、完全に失活していた。

### 1. 粗抗原のカラムクロマトグラフィーによる分画

粗抗原1gを蒸留水30mlに溶解し、3,000rpm 5分間遠心分離した上澄液を、pH 8.0の蒸留水で平衡化した DEAE-Sephadex A-50カラム (2.6×38cm) に添加し、0~0.2M ギ酸アンモニウムの直線濃度勾配で溶出し、更に、0.5M ギ酸アンモニウム (pH 4.0) で溶出した (Fig. 2)。溶出液について OD<sub>280</sub> と PCA 活性を測定した。OD<sub>280</sub> より3つに分画し、それぞれ F I, F II, F III として、これら各分画の抗原活性を、粗抗原で感作したラットのレアギン血清を用いての PCA 反応で調べた。PCA 活性は、F II に高く、F I と F III には殆ど認められなかった。

次いで、抗原活性が集中して認められた F II 抗原 500 mg/5ml を、0.05M ギ酸アンモニウム (pH 6.5) を緩衝液として、Sephadex G-50カラム (2.6×94cm) に

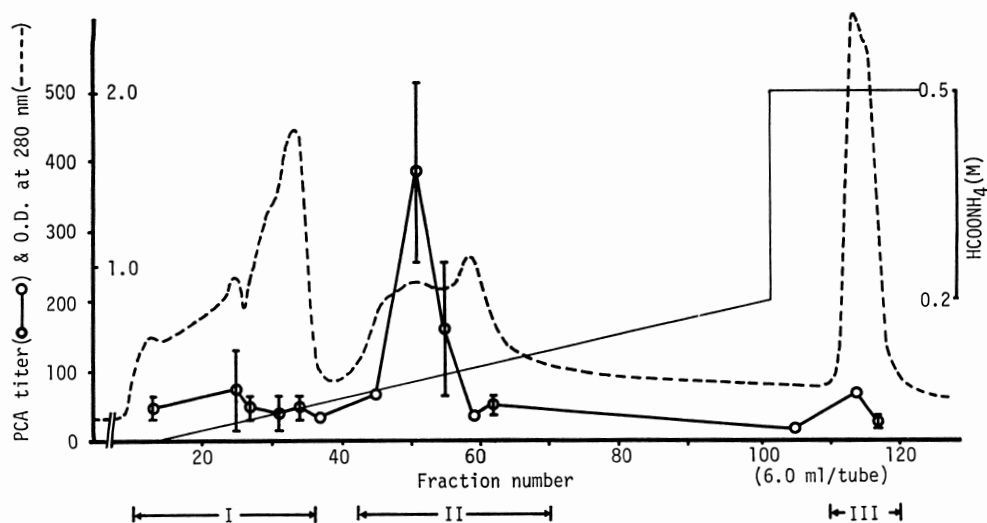


Fig. 2 Chromatography of *As. suum* body fluid (F) on DEAE-Sephadex A-50 column. Column size: 2.6×38.0 cm. Eluent: 0.0M (pH 8.0)–0.2M HCOONH<sub>4</sub> (pH 6.5). 0.5M HCOONH<sub>4</sub> (pH 4.0). (Antiserum: anti crude antigen rat serum, Antigen volume: 1/40 tube)

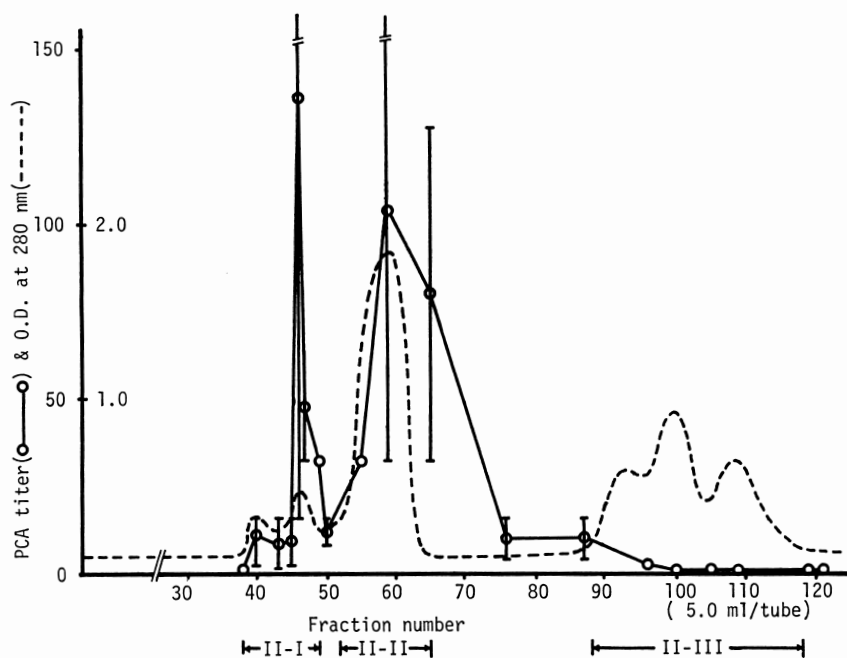


Fig. 3 Gel filtration of fraction II (DEAE-Sephadex A-50) on Sephadex G-50. Column size: 2.6×94.0 cm. Eluent: 0.05M HCOONH<sub>4</sub> (pH 6.5). (Antiserum: anti crude antigen rat serum, Antigen volume: 1/30 tube)

て、ゲル濾過した。溶出液について OD<sub>280</sub> と PCA 活性を測定したところ、高分子領域 (F II-I) と中分子領域 (F II-II) の両分画に強い PCA 活性が認められた

が、安定して活性が再現されたのは、F II-II の分画であった (Fig. 3)。

## 2 分画抗原の免疫原性

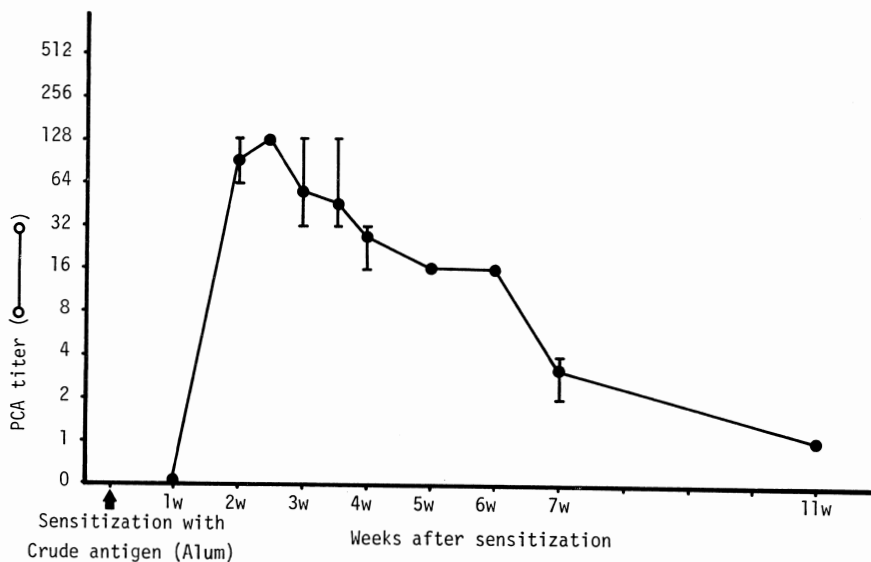


Fig. 4 Evolution of PCA titers to crude antigen.

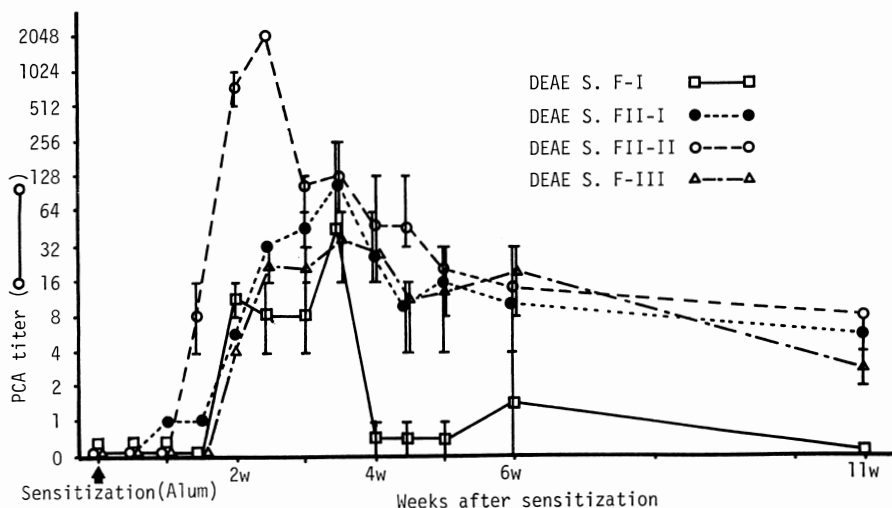


Fig. 5 Evolution of PCA titers to each fractionated antigen.

1) レアギン抗体産生能について

粗抗原およびF I, F II-I, F II-II, F IIIの各分画抗原について, PCA 活性の経時的変化を調べた. 抗原 0.1mg/0.5ml を20mg/ml のAl (OH)<sub>3</sub>ゲル1 ml と共に, ラット腹腔内に注射し, 眼窩静脈より採血した. 得られた抗血清と対応する各分画抗原による PCA 活性を比較すると, 粗抗原では, Fig. 4に示す様に, 感作2週後で急上昇し, 2.5週目で PCA 価は128倍で最高となり, それ以後は低下していった. 分画抗原に関しては,

Fig. 5の如く, F II-I で, 感作1週後より PCA 活性が認められ, 他の分画は, 1.5週~2週後に上昇し始めた. その後, F I, F II-I, F IIIは, 感作3.5週目で最高となり, それらの PCA 価は64倍前後であったが, F II-IIは, 感作2.5週目で2,048倍の PCA 価を示しており, 最も強くレアギン抗体を産生していた.

2) 沈降抗体産生能について

各分画抗原と Al (OH)<sub>3</sub>ゲルおよび Freund の complete adjuvant (FCA) により産生された抗血清を用い

て、対応する分画抗原との沈降反応を、Ouchterlony 法と IEP で検討した。

Al (OH)<sub>3</sub>ゲルをアジュバントとした抗血清では、

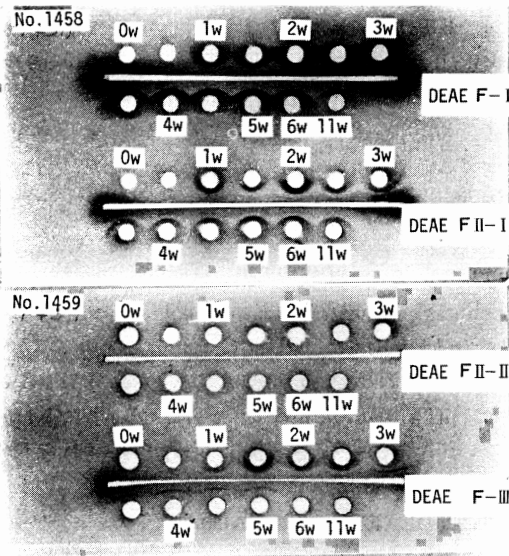


Fig. 6 Agar gel double diffusion between each fractionated antigen and anti each fraction rat serum (with Al (OH)<sub>3</sub>).

Fig. 6に示す様に、F I に最も強い沈降反応がみられ、次いで F II-I, F III と反応が強く、F II-II では、非常に弱い沈降線しか認められなかった。

次に、FCA をアジュバントとした抗血清について沈降反応を調べた。分画抗原 1 mg/0.5ml を FCA 0.5ml と共に、ラット背部皮内数カ所に注射し、抗血清を採取した。Ouchterlony 法で観察すると、F I と F II-I に強い沈降線を認め、F II-II では、沈降反応は認めなかった。また、IEP の結果は、F II-I で 2 ~ 5 週にかけてかなり強い沈降反応が観察され、F I は抗原孔付近に、F III は陽極側にかけて沈降線が認められたが、F II-II では、弱い沈降線が認められたのみであった。

即ち、沈降抗体産生能は、アジュバントの種類にかかわらず、F I および F II-I の分画が強く、F II-II の分画は、極めて弱かった。

### 3 F II-II 抗原活性の性質

F II-II の分画を Sephadex G-50 カラムにて、更に 3 ~ 5 回、単一のピークになるまでゲル濾過を行ない、精製抗原を得た (Fig. 7)。

得られた精製抗原 15 μg を使用して、JLC-5AH-Liquid chromatograph (ニンヒドリン法) により、アミノ酸分析を行なった (Table 1)。その結果、cystine が含

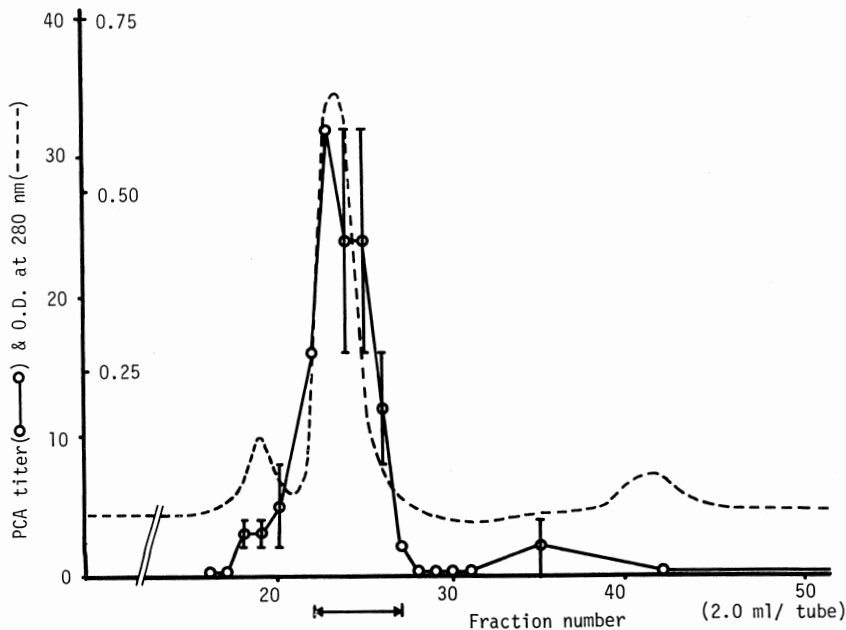


Fig. 7 Gel filtration of fraction II-II on Sephadex G-50.

Column size: 0.9×142.0 cm. Eluent: 0.05M HCOONH<sub>4</sub> (pH 6.5).

(Antiserum: anti F II-II antigen rat serum, Antigen volume: 1/50 tube)

Table 1 Amino acids composition of *Ascaris* FII-II antigen

Amino acid	content (n mole)	integer (valine=4)	%
Lysine	14.57	12	12.9
Histidine	4.94	4	4.4
Arginine	0.95	1	0.8
Aspartic Acid	10.30	8	9.1
Threonine	4.60	4	4.1
Serine	4.19	3	3.7
Glutamic Acid	22.71	18	20.1
Proline	0.76	1	0.7
Glycine	7.79	6	6.9
Alanine	11.14	10	9.9
Half Cystine	1.00	1	0.9
Valine	5.00	4	4.4
Methionine	1.08	1	1.0
Isoleucine	3.90	3	3.5
Leucine	13.89	11	12.3
Tyrosine	3.88	3	3.4
Phenylalanine	2.17	2	1.9
Total			100.0

有されていたので、2-メルカプトエタノールを用いて環元処理し、S-S結合を切断した後、PCA活性に及ぼす影響を調べた。PCA活性は、完全に失活しており、そ

の後空酸化を試みたが、活性は、再現されなかった。

また、蛋白分解酵素であるペプシンを用いて、37°Cで一晩消化した後、PCA活性を調べたが、活性は、完全に消失していた。

#### 4 FII-II抗原の精製

FII-IIの精製抗原をDEAE-Sephadex A-50カラム(1.5×34cm)にて、0~1.0M炭酸アンモニウムの直線濃度勾配で溶出し、FII-II抗原で感作したラットのレアギン血清を用いて、PCA活性を測定した。活性は、Fig. 8に示す様に、OD<sub>280</sub>の第2のピークに強く認められた。

次いで、先のPCA反応において活性の高かった部分(Fig. 8)の等電点分画を行ない、PCA活性抗原の等電点(pI)を調べた。OD<sub>280</sub>のピークは、Fig. 9に示す如く、pH 4.7, 5.0, 5.6の3点にみられたが、PCA活性は、pH 4.5~6.0にかけて広がっており、特にpI 5.0に高い活性のピークがあり、pI 6.0にもやや弱い活性のピークが認められた。

更に、DEAE-Sephadex A-50カラムクロマトグラフィーの第2ピーク(Fig. 8)の活性画分を、CM-Celluloseカラム(0.75×63.5cm)を通して、0.01~0.5Mギ酸アンモニウムの直線濃度勾配により溶出し、PCA活性を調べた。活性は、Fig. 10に示す様に、OD<sub>280</sub>のピークと一致して認められた。

再度、この活性画分をSephadex G-50カラムコロマ

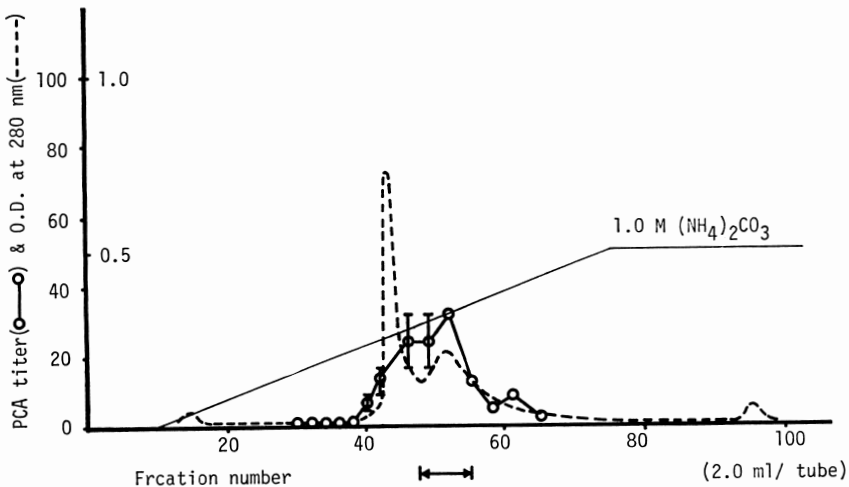


Fig. 8 Chromatography of fraction II-II (Sephadex G-50) on DEAE-Sephadex A-50 column. Column size: 1.5×34.0 cm. Eluent: 0.0M (pH 9.0)-1.0M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 5.0). (Antiserum: anti FII-II antigen rat serum, Antigen volume: 1/10 tube)

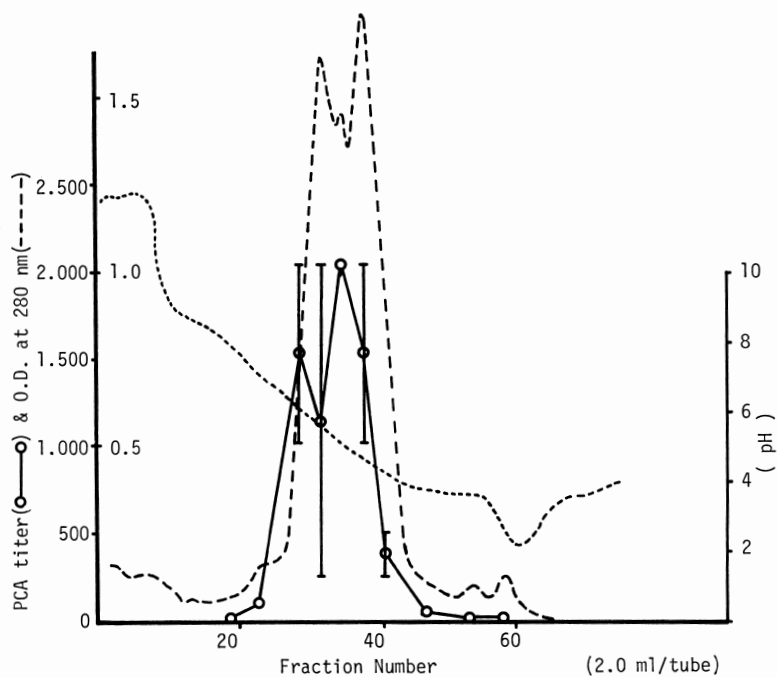


Fig. 9 Elution pattern of active fraction (Fig. 8) by isoelectric focusing. Column size : 110.0ml. pH range : 3.5-10.0. (Antiserum : anti FII-II antigen rat serum, Antigen volume : 1/20 tube)

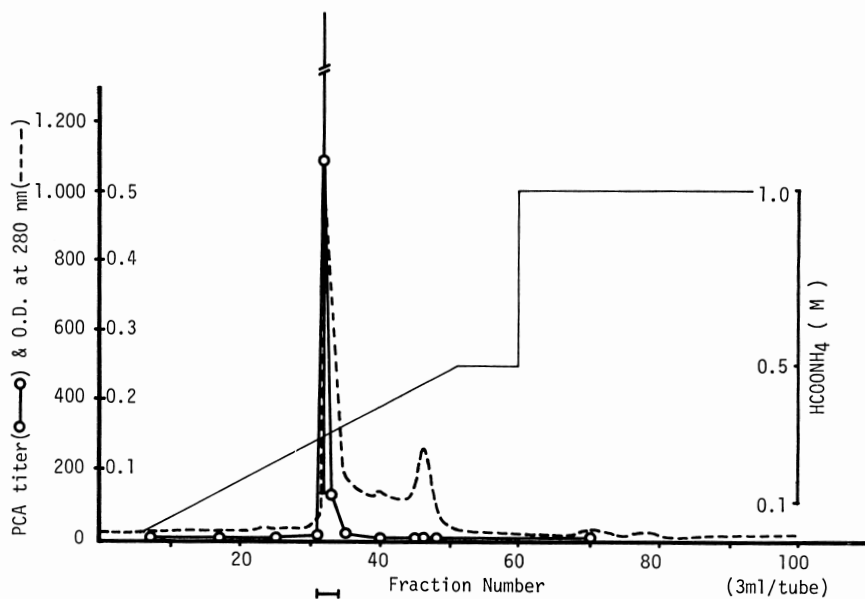


Fig. 10 Chromatography of active fraction (Fig. 8) on CM-Cellulose column. Column size : 0.75×63.5cm. Eluent : 0.01M HCOONH<sub>4</sub> (pH 5.0)-0.5M HCOOMH<sub>4</sub> (pH 9.0). 1.0M HCOONH<sub>4</sub> (pH 9.0). (Antiserum : anti FII-II antigen rat serum, Antigen volume : 1/2 tube)

トグラフィーにより、OD<sub>280</sub> をもつ不純物を除去し、PCA 活性の高い分画を集めて、*Ascaris* allergen とした。得られた精製 *Ascaris* allergen の収量は、約 5 mg であった。

精製 *Ascaris* allergen で感作したラットのレアギン血清を用いた PCA 反応は、0.1mg/0.5ml Allergen 量で2,048倍以上の PCA 価を示した。また、同抗血清を用いて、PCA 反応を惹起させるのに最低必要な allergen 量は、 $5 \times 10^{-9}$ g/0.5ml であった。

### 5 *Ascaris* allergen の特性

#### 1) 分子量の測定

各標準蛋白 (OA: ovalbumin, MB: myoglobin, Cyt. C: cytochrome C, V. B-12: vitamin B-12) を用いて、Sephadex G-50 にて、ゲル濾過し、*Ascaris* allergen の分子量を測定した。横軸に分子量を対数で表わし、縦軸に Kav を表示して標準線を作成した (Fig. 11)。その結果、*Ascaris* allergen の分子量は、20,000ダルトンと推定された。

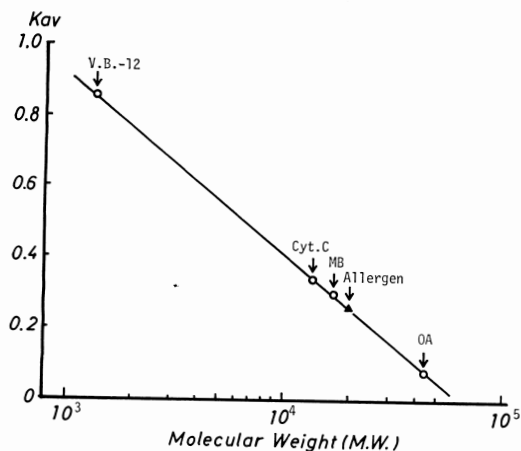


Fig. 11 M. W. estimation of allergen by Sephadex G-50 gel filtration  
OA; ovalbumin MB; myoglobin Cyt. C; cytochrome C V. B-12; vitamin B-12.

#### 2) 熱に対する安定性

粗抗原と *Ascaris* allergen を各々100 $\mu$ g ずつ、浴槽内で90°C および100°C で加熱した。粗抗原は、90°C で失活傾向がみられ、100°C、1時間の熱処理で完全に失活した。一方、*Ascaris* allergen は、90°C では殆ど影響を受けず、100°C、1時間でやや活性が低下する傾向を認めただけであった (Table 2)。

#### 3) アミノ酸分析

Table 2 PCA titer of crude *Ascaris* antigen and purified *Ascaris* allergen after boiling

	Crude antigen		Purified allergen	
	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>8</sup>
90°C/15min			2 <sup>9</sup>	2 <sup>8</sup>
30min	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>7</sup>
1hr	2 <sup>4</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>9</sup>
2hrs	2 <sup>2</sup>	(-)	2 <sup>8</sup>	2 <sup>7</sup>
100°C/15min	2 <sup>8</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>9</sup>
30min	2 <sup>2</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>7</sup>
1hr	(-)	(-)	2 <sup>7</sup>	2 <sup>6</sup>
2hrs	(-)	(-)		

Table 3 Amino acids composition of purified *Ascaris* allergen

Amino acid	content (n mole)	integer (valine=4)	%
Lysine	431	7	15.9
Histidine	132	2	4.6
Arginine	55	1	2.0
Asparatic Acid	189	3	7.0
Threonine	120	2	4.4
Serine	130	2	4.8
Glutamic Acid	484	8	17.9
Proline	—*	—	—
Glycine	196	3	7.2
Alanine	257	4	9.5
Half Cystine	—*	—	—
Valine	118	2	4.4
Methionine	0	0	0.0
Isoleucine	109	2	4.0
Leucine	350	6	12.9
Tyrosine	76	1	2.8
Phenylalanine	63	1	2.3
Total			100.0

— \* Not detected

*Ascaris* allergen 375ng を、Toyosoda HLC-805 (OPA 法) により、アミノ酸分析を行なった (Table 3)。その結果、アミノ酸組成比は、glutamic acid 17.9%, lysine 15.9%, leucine 12.9% であり、methionine は 0%, arginine 2.0%, tyrosine 2.8%, phenylalanine 2.3% という値を示した。なお、proline と cystine



は、この分析方法では測定不可能であった。

## 考 察

気管支喘息、鼻アレルギー、食餌性アレルギーなどの症状を呈する I 型アレルギーは、IgE 抗体の関与する反応であり、起因する抗原としては、室内塵、花粉、カビ、食餌、寄生虫などが知られている。食物、室内塵などは、経口的に、または直接吸入することで、アレルギーを摂取することが多いが、寄生虫は、その種類により感染方法が異なるし、寄生部位も様々で、体内侵入後の虫体の変化や排泄物など、抗原としては、一定でない。自然感染の場合は、IgE 抗体は容易に産生されるが、実験的に動物に免疫する場合は、IgE 抗体産生は難しい。しかし、抗原として、虫体抽出物や体腔液が用いられる為、自然な感染とは違い、抗原が体内で変化し続けることはなく、一定の条件で産生された抗体を用いて、実験研究が行なわれる。

O'Donnell and Mitchell (1980) は、radio allergo sorbent test (RAST) 法と radio immunoassay (RIA) 法により、*ascaris* 感染者血清中の IgE 抗体と IgG 抗体が、*Ascaris* 体腔液のどの抗原部分と結合するか検討し、IgG 抗体と反応する抗原は、限定されたが、IgE 抗体と反応する抗原は、等電点も分子量も広い範囲に存在していたことから、自然感染された人の血清を用いて抗原を同定する *in vitro* の実験は、抗体応答の多様性もあり、困難があると述べている。また、Turner *et al.* (1980) は、線虫感染者血清中の IgE 抗体価を RAST 法により測定しており、pH 5.0~6.0 と pH 7.0~8.6 の範囲の等電点を有する抗原部分が、*Ascaris* 感染者に特異的であったと述べている。

抗原の精製に関する報告をみると、ブタクサ花粉の水抽出物からは、最低 $10^{-12}$ g の抗原量で皮膚反応を生じる分子量 (M.W.) 37,800 の酸性蛋白質抗原 (antigenE) が報告されている (King, 1979)。また、Oka *et al.* (1977, 1979) は、ホヤの体液および内臓抽出物よりアレルギーを精製し、減感作療法などの治療に用いている。Tanaka *et al.* (1979) は、*As. suum* 体腔液を Sephadex G100 で 3 分画にし、その第 1 ピークは、PCA 活性が高く、第 2 ピークは、Eosinophil chemotactic factor (ECF) と Neutrophil chemotactic factor (NCF) を高く含んでおり、ECF とアレルギーとは、別の物質であると報告している。

*Ascaris* アレルギーに関する報告によると、Kent (1960, 1963) が、DEAE-Cellulose chromatography と

Agar block electrophoresis により、抗原活性の高い 2 つの陰性荷電した分画をみつけたのを始め、Hoggarth-Scott (1967) は、M.W. 10,000~50,000 の抗原物質を、Kuo and Yoo (1977) は、pI 6.0 の new allergen を、Ambler *et al.* (1972, 1973) は、若干の糖を含む pI 5.0~5.2 (M.W. 14,000) の allergen A を分離し、Hussain *et al.* (1972, 1973) は、8.5% の糖を含む pI 4.8~5.0 (M.W. 17,000~19,000) の Asc-I をみつけた。また、Dandeu and Lux (1978) は、抗 *Ascaris* 家兎血清とのゲル内沈降反応で交差反応性のない 2 つの異なる allergen (M.W. 約 15,000) を見いだした。

今回我々は、*As. suum* 抗原の精製とその免疫化学的特性に関して、種々の検討を行なった。*As. suum* 体腔液を DEAE-Sephadex A-50 で分離した 3 つの分画のうち、PCA 活性の高かった第 2 分画 (FII) を、更に、Sephadex G-50 でゲル濾過して得られた FII-II 抗原は、PCA 反応における抗原活性が著しく高く、かつ、レアギン抗体産生能も他の分画 (FI, FII-I, FIII) と比べると高かった。また、沈降抗体反応も殆ど認められなかったことから、I 型アレルギー抗原としては、最も重要であると考えられた。この FII-II 抗原は、蛋白分解酵素であるペプシンによる消化、および 2-メルカプトエタノール処理で完全に PCA 活性を失うことから、この精製抗原に若干含まれていた cystine の S-S 結合が還元され、蛋白質の一次構造が変化したことによる抗原の変性で失活したのではないかと思われ、S-S 結合が PCA 活性に何らかの影響をもつ蛋白質であることが推測される。

FII-II 抗原を、更に、DEAE-Sephadex A-50, CM-Cellulose, Sephadex G-50 にて、カラムクロマトグラフィを行ない、精製 *Ascaris* allergen を分離した。FII-II 抗原を、pH 9.0 の蒸留水で平衡化した DEAE Sephadex A-50 に吸着させると、PCA 活性は、ゲルに強く吸着していた後半の分画に高く、この分画の等電点分画を行なうと、pH 4.5~6.0 に活性があり、特に pI 5.0 に強く、pI 6.0 にもやや弱い活性のピークが認められた。また、0.01M ギ酸アンモニウム (pH 5.0) で平衡化した CM Cellulose に吸着させると、最初のピークに活性が集中していた。即ち、PCA 反応による抗原活性は、まだ電荷的には均一ではないが、pH 5.0~6.0 の抗原部分のうち、最も強い活性部位は、pI 5.0 付近にあると思われる。このことは、Ambler *et al.* (1973) の報告した allergen A (pI 5.0~5.2) と Hussain *et al.*

(1973) の報告した Asc-I (pI 4.8~5.0) とよく似ている。また、我々の精製した *Ascaris* allergen のアミノ酸組成は、中性アミノ酸が50%以上を占め、酸性アミノ酸が25%前後、塩基性アミノ酸が23%前後であり、glutamic acid 17.9%, lysine 15.9%, leucine 12.9%, alanine 9.5% と多くを占めており、Ambler *et al.*

(1973) の allergen A, Hussain *et al.* (1973) の Asc-I, Dandeu and Lux (1978) の pure allergen の1つである FVIII と似た組成比を示していた。allergen A には、含硫アミノ酸である cystine と methionine が存在しているが、FVIII には、両方とも含まれていないし、Hussain *et al.* (1973) は、cystine も methionine も重要ではないと述べている。我々の *Ascaris* allergen には、methionine は含まれていなかったが、cystine は測定不可能であったので、含硫アミノ酸の存在が PCA 活性に影響を及ぼすかどうか、詳しい追求をしていない。しかし、前述の研究者達により精製された *As. suum* の allergen は、多少の差異があると思われる。

以上、我々が精製した *Ascaris* allergen は、活性部分のみをかなり純粋にとりだした抗原物質であると考えられるが、更に、本物質の物理化学的性状および免疫学的特性について、追求していく所存である。

## 結 論

豚蛔虫 (*Ascaris suum*) 体腔液粗抗原から、PCA 反応における抗原活性が極めて高い allergen を、分離、精製した。その精製抗原は、レアギン抗体産生能も高く、興味ある成績を得たので、免疫学的および物理化学的的特性を検討した。

### 1) 高純度 allergen の精製

粗抗原を、DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-50 で分画し、レアギン抗体産生能と PCA 活性の高い FII-II 抗原を分離した。更に、DEAE Sephadex A-50, CM Cellulose などにより精製し、PCA 反応活性の高い *Ascaris* allergen を得た。

### 2) 精製抗原のレアギン抗体産生能

FII-II 抗原0.1mg で感作したラットのレアギン抗体を用いた PCA 反応は、感作2.5週目で最高となり、血清希釈倍数で2,048倍という高い PCA 価を示した。また、*Ascaris* allergen に対して産生された高レベルのレアギン抗体を用いた PCA 反応は、 $5 \times 10^{-9}$ g/0.5ml の allergen 量で惹起された。

### 3) *Ascaris* allergen の物理化学的性質

*Ascaris* allergen は、分子量20,000ダルトンで、pH

5.0と6.0の等電点に活性のピークがある耐熱性の蛋白質である。アミノ酸組成比は、glutamic acid と lysine を多く含んでおり、中性アミノ酸52.3%、酸性アミノ酸24.9%、塩基性アミノ酸22.8%という値を示した。

## 謝 辞

御指導、御鞭達を賜った東京大学、中嶋暉躬教授、並びに、アミノ酸分析など御助力、御指導を賜った東京医科歯科大学、安原義先生に敬意を表すると共に、本教室員各位に深謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第35回日本寄生虫学会西日本大会、第49回、第50回日本寄生虫学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Ambler, J., Doe, J. E., Gemmell, D. K., Roberts, J. A. and Orr, T. S. C. (1972): Biological techniques for studying the allergenic components of nematodes. I. Detection of allergenic components in *Ascaris suum* extracts. *J. Immun. Methods*, 1, 317-328.
- 2) Ambler, J., Miller, J. N., Johnson, P. and Orr, T. S. C. (1973): Characterization of an allergen extracted from *Ascaris suum*. *Immunochemistry*, 10, 815-820.
- 3) Dandeu, J. P. and Lux, M. (1978): Purification and characterization of two proteins from *Ascaris suum* extract, antigenically different but bearing common allergenic epitopes. *Immunol. commun.*, 7, 393-415.
- 4) Hoggarth-Scott, R. S. (1967): The molecular weight range of nematode allergens. *Immunology*, 13, 535-537.
- 5) Hussain, R., Strejan, G. and Campbell, D. H. (1972): Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. VII. Isolation and partial characterization of an allergen. *J. Immunol.*, 109, 638-647.
- 6) Hussain, R., Bradbury, S. M. and Strejan, G. (1973): Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. VIII. Characterization of a highly purified allergen. *J. Immunol.*, 111, 260-268.
- 7) Kent, N. H. (1960): Isolation of specific antigens from *Ascaris lumbricoides* (var *suum*). *Exp. Parasitol.*, 10, 313-323.
- 8) Kent, N. H. (1963): Seminar on immunity to parasitic helminths. V. Antigens. *Exp. Parasitol.*, 13, 45-56.
- 9) King, T. P. (1979): Immunochemical properties of some atopic allergen. *J. Allergy*

- Clin. Immunol., 64, 159-163.
- 10) Kuo, C. Y. and Yoo, T. J. (1977) : A new allergen from the perienteric fluid of *Ascaris suum* with respect to charges. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 54, 308-314.
  - 11) Levine, B. B. and Vaz, N. M. (1970) : Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 39, 156-171.
  - 12) 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.
  - 13) O'Donnell, I. J. and Mitchell, G. F. (1980) : An investigation of antigens of *Ascaris lumbricoides* using a radioimmunoassay and sera of naturally infected humans. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 61, 213-219.
  - 14) Ogilvie, B. M. (1964) : Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasites. Nature (London) 204, 91-92.
  - 15) Oka, S., Takeda, S. and Jyo, T. (1977) : Chemical composition of the presumed antigenic determinant in sea-squirt antigens. Jpn. J. Allergol., 26, 421-430.
  - 16) Oka, S., Suzuki, H., Jyo, T. and Tsuji, M. (1979) : Purification of two types of sea-squirt antigens. Int. Arch. allergy Appl. Immunol., 59, 408-419.
  - 17) Ovary, Z. and Bier, O. (1953) : Quantitative studies on passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig and its relationship to the arthus phenomenon. J. Immunol., 71, 6-11.
  - 18) Tanaka, J., Baba, T. and Torisu, M. (1979) : *Ascaris* and Eosinophil II. Isolation and characterization of eosinophil chemotactic factor and neutrophil chemotactic factor of parasite in *Ascaris* antigen. J. Immunol., 122, 302-308.
  - 19) 辻 守康 (1974) : 寄生蠕虫類の免疫電気泳動法について. 寄生虫誌, 23, 335-345.
  - 20) Turner, K. J., Fisher, E. H. and McWilliam, A. S. (1980) : Homology between roundworm (*Ascaris*) and hookworm (*N. Americanus*) antigens detected by human IgE antibodies. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 58, 249-257.

**Abstract**

PURIFICATION AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF FRACTIONATED  
ANTIGENS FROM *ASCARIS SUUM* BODY FLUID

HIROKO INOUE<sup>1)</sup>, YASUKAZU SAKATA<sup>1)</sup>, TAKAHARU HAYASHI<sup>2)</sup>  
AND MORIYASU TSUJI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Parasitology, Hiroshima University, School  
of Medicine, Hiroshima 734, Japan, <sup>2)</sup>Hayashi  
Otorhinolaryngology Clinic, Hiroshima 730, Japan)

An allergen was isolated and purified from body fluid of *Ascaris suum*, and characterization study was conducted. The allergen has activity for induction of PCA reaction with anti-*Ascaris* reaginic rat serum, and also stimulates production of reaginic antibody.

FII-II antigen which was isolated by DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-50 column chromatography showed strong allergenicity in PCA reaction. In rats, one injection of 0.1 mg FII-II antigen could stimulate production of reaginic antibodies in high levels, attaining to a PCA titer of 1 : 2,048.

FII-II antigen was furthermore purified using DEAE Sephadex A-50 and CM Cellulose column chromatography. The allergen obtained from FII-II antigen was heat-stable, its molecular weight was about 20,000 daltons, and isoelectric points were showed in pH 5.0 and 6.0. The amino acid analysis showed high content of glutamic acid, lysine and leucine, but absence of methionine.

PCA reaction with the reaginic antiserum for purified *Ascaris* allergen in rats was elicited positive in concentration of  $5 \times 10^{-9}$ g/0.5ml.