

ラットにおける大平肺吸虫感染：間接免疫蛍光法 でみた抗脱囊幼虫 IgG 抗体産生

池田 照 明 谷 莊 吉

(昭和59年8月11日 受領)

Key words: *Paragonimus ohirai*, excysted juvenile, indirect immunofluorescence, IgG antibody response

肺吸虫感染動物における抗体の経時的変化については、宗 (1959), Tada (1967), 多田 (1968), 池田・多田 (1978), 今井 (1979) らが報告している。しかし、宗が *in vitro* で脱囊幼虫周囲沈降反応をみた以外、いずれも成虫抗原を用いて検出した抗体について報告したものである。今回 著者らは、幼虫周囲沈降反応に比べより鋭敏で、かつ抗体価の測定および虫体の抗原局在部位の決定が可能な間接免疫蛍光 (IIF) 法を用い、大平肺吸虫感染ラットにおける脱囊幼虫に対する IgG 抗体産生を追求したので報告する。

材料および方法

感染ラット:

ウィスター系の雌ラット (体重180-200g) に大平肺吸虫のメタセルカリアあるいは成虫を腹腔内投与した。用いたメタセルカリアは兵庫県の円山川に生息していたクロベンケイガニの肝臓から採取し、滅菌生理食塩水で数回洗浄後、その一定数を注射器でラット腹腔内に投与した。X線照射メタセルカリアの投与に当っては、洗浄メタセルカリアを medical linear accelerator (三菱 ML-15II B) により200 roentgens/min の条件下で2,000rad のX線量を照射して、それら10匹をラット腹腔内に投与した。成虫体の投与は、メタセルカリア投与後5週目および15週目のラットの肺から虫体を回収し、滅菌生理食塩水で洗浄後、それぞれの成虫3匹をラット腹腔内に移植した。

血清:

メタセルカリア10匹を投与したラットの眼窩静脈洞より一定期間毎に採血し、これらより分離した血清を6匹ごとにプールして-20°C で保存した。他の投与方法によ

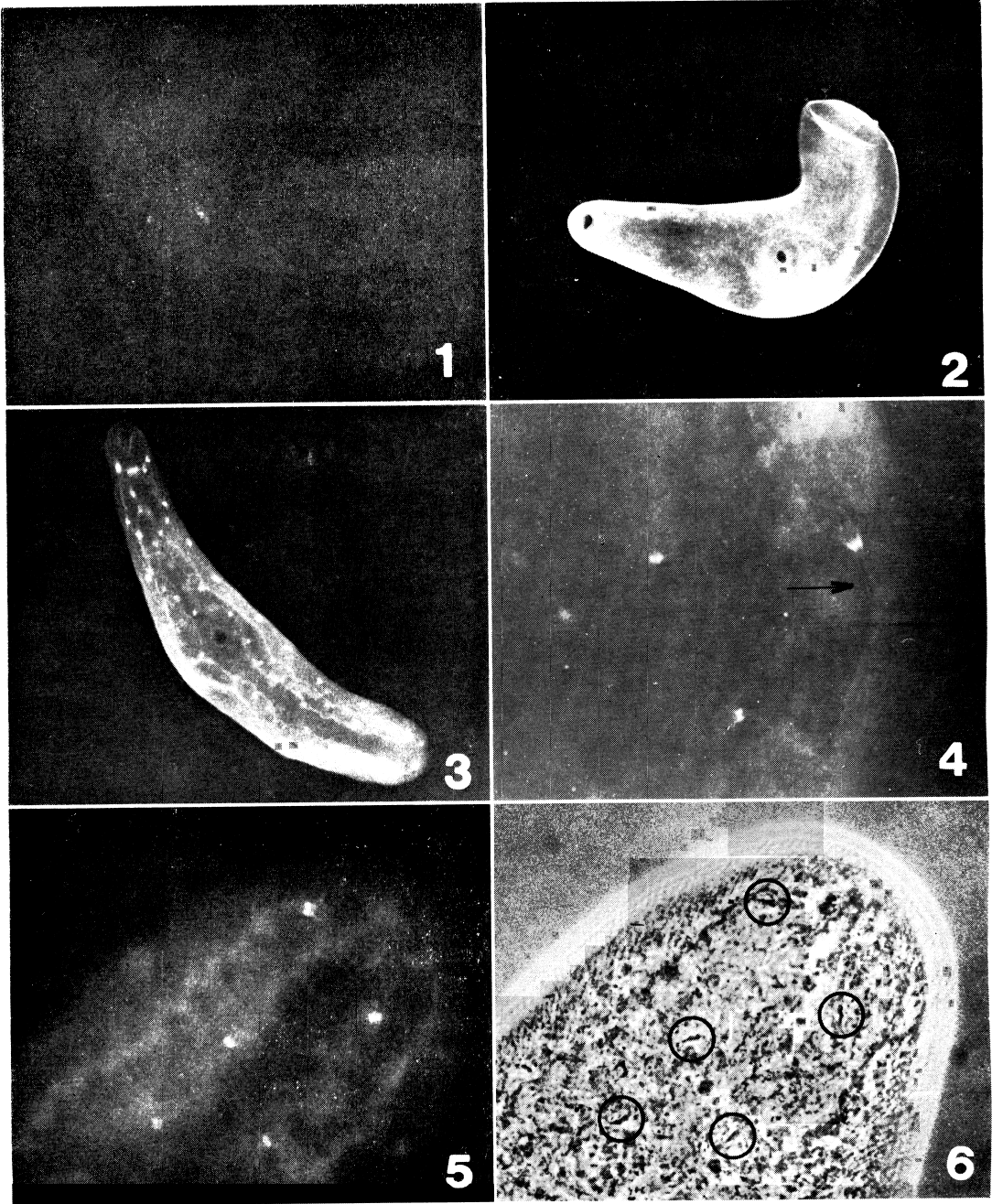
り感染させたラットでは、それぞれの群から投与後3週目に血清を得て5~6匹ごとにプールした。

間接免疫蛍光法:

滅菌生理食塩水で洗浄したメタセルカリアを、ペニシリン100U/ml・ストレプトマイシン100 μ g/ml 含有タイロッド培養液 (pH 8.0) 中で37°C・一昼夜培養して脱囊幼虫を得た。それらを冷95%エタノールで固定した後、使用するまで95%エタノール中で-20°C で保存した。固定脱囊幼虫を水洗後、96穴V底マイクロプレート内で被検血清と37°C・2時間反応させ、0.15M リン酸緩衝食塩水 (PBS pH 7.2) で5回吸引洗浄した後、20倍希釈した fluorescein isothiocyanate 標識抗ラット IgG 抗体液 (Cappel 社) と37°C・2時間反応させた。虫体を PBS で充分吸引洗浄した後、無蛍光スライドガラス上で90%グリセロール PBS 液でカバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡 (Leitz Orthoplan) で観察した。未感染ラット血清で処理した対照虫体 (Fig. 1) と比較して、顕著に特異蛍光が観察される時の被検血清の最大希釈倍数を抗体価 (IIF 価) とした。

結 果

感染ラット血清での IIF 法により、脱囊幼虫の体表およびある種の細胞に特異蛍光が認められた (Fig. 2)。また、腸管は体表の蛍光により識別が困難であるが蛍光染色されていた。2,000rad のX線照射メタセルカリアを投与したラットのごとく、体表に対する IgG 抗体産生が低い場合には腸管の蛍光はより顕著に観察された (Fig. 3)。特異的に蛍光染色される細胞は、毛細管と連なり (Fig. 4)、透過光で観察すると、炎細胞を固定した時にみられる漏斗状構造物と一致していた (Figs. 5, 6)。さらに、それらの細胞数は横川ら (1960) が報告し



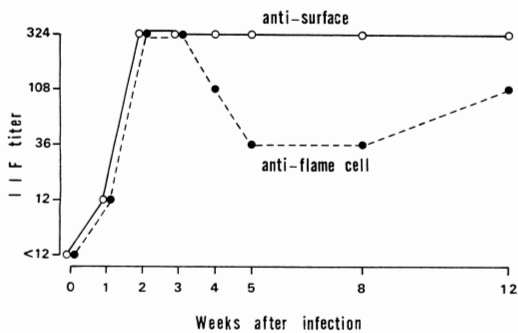


Fig. 7 Kinetics of IgG antibody response against the surface (solid line) and the flame cell (dotted line) of the excysted juvenile in rats infected with 10 metacercariae. IIF titers were determined on pooled sera from 6 rats.

た炎細胞数と同数の60であり、そのうちの6個が口吸盤周囲にみられた。以上の所見は、これらの螢光を発した細胞が炎細胞であることを示した。

抗体価の判定が比較的容易な脱囊幼虫の体表および炎細胞に対する IIF 抗体について、感染後12週目までの抗体価の推移を検討した。メタセルカリア10匹を投与したラットのプール血清での結果を Fig. 7に示した。抗体表抗体は、感染後1週目に IIF 価 1 : 12で検出され、2週目には IIF 価 1 : 324と急激な増加が認められ、以降、12週目まで同じ IIF 価を持続した。一方、抗炎細胞抗体は、感染後1週目に IIF 価 1 : 12で、2週目には 1 : 324と急激に増加し、3週目も同じ IIF 価を持続したが、4週目より IIF 価が低下し、12週目に再上昇がみられた。

各種方法で虫体を寄生させたラットについて、感染後3週目に得た血清の IIF 価を、メタセルカリア10個投与ラット(感染対照ラット)と比較検討した。各種ラットのプール血清での IIF 価の結果を Fig. 8に示した。

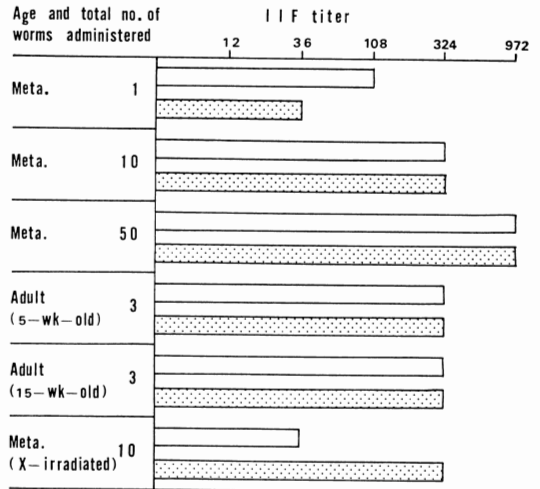


Fig. 8 Comparison of IIF titers among various rat groups exposed to a variety of infections. The titers were determined on pooled sera from 5 or 6 rats each. anti-surface antibody (□), anti-flame cell antibody (▨).

メタセルカリア1個を腹腔内投与させ、虫体寄生を確かめたラットの血清では、感染対照ラット血清に比べ、抗体表 IIF 価は1稀釈低く、抗炎細胞 IIF 価は2稀釈低かった。一方、メタセルカリア50個を投与したラットの血清では、両抗体の IIF 価は感染対照血清より1稀釈高かった。肝臓寄生の初期に回収した5週齢成虫あるいは慢性期に回収した15週齢成虫を腹腔内投与したラットでは、2種の IIF 価とも感染対照ラットと同値であった。2,000rad のX線を照射したメタセルカリア10個を腹腔内投与したラットでは、抗炎細胞抗体の抗体価は感染ラットと同値であったが、抗体表抗体の抗体価は低値であった。

- Figs. 1-6 Photographs of excysted juveniles treated by indirect immunofluorescent technique.
 Fig. 1 The juvenile was reacted with pooled sera (1 : 12) from 6 rats prior to infection. No specific labeling is observed.
 Fig. 2 The juvenile was reacted with pooled sera (1 : 36) from the rats at 3 weeks after infection with 10 metacercariae. The surface is strongly labeled.
 Fig. 3 The juvenile was reacted with pooled sera (1 : 36) from 6 rats at 3 weeks after infection with 10 X-irradiated (2,000-rad) metacercariae. The gut ceca and a number of flame cells are strongly labeled.
 Fig. 4 The labeled cell is seen connected by capillary tubule (arrowed).
 Figs. 5-6 The labeled cells (Fig. 5) are observed corresponding to the fixed flame cells (Fig. 6, in circles.).

考 察

吸虫類の宿主寄生において、体表は宿主内環境と接する部位であり、しかも活発な turnover により最外層にある glycoalyx をつぎつぎに剝離している (Kusel *et al.*, 1975; Wilson and Barnes, 1977; Hanna, 1980a). そして、虫体は絶えず腸管からの分泌物を食物の残滓とともに吐出し、また、炎細胞で濃縮・排泄された老廃物も排泄口から放出している。このことから、虫体の体表、腸管および炎細胞に存在する抗原物質が感染宿主において強い抗原性をもつことは推察される。今回の成績はこのことを裏書きするものであった。

脱囊幼虫の体表および炎細胞に対する IgG 抗体は、両方の抗体とも感染後 1 週目に出現し、その後 2 週目には高値の抗体価を示した。成虫抗原で各種免疫学的方法により検出した抗体が、感染後 2 週目でも検出されないか、あるいは、検出されても低値であったのに比べて大きな相違であった。その後、抗体表抗体は長期間高い抗体価を持続し、抗炎細胞抗体も抗体価の一時的減少が認められるものの長期にわたって産生された。この IIF 価の経時的推移を、宗 (1959) が感染犬およびウサギの血清で行なった脱囊幼虫周囲沈降反応の結果と比較すると、虫体の体内移行期では類似がみられたが、慢性期では相違がみられた。即ち IIF 価が持続傾向を示すのに反し、幼虫周囲沈降反応は減弱傾向を示した。この相違点が単なる実験動物種の違いによるのか、あるいは関与する抗体クラスの違いによるのかそれとも反応する抗原の種類の違いによるのか、ラットの系での脱囊幼虫周囲沈降反応との比較検討が望まれる。

脱囊幼虫の体表および炎細胞に対する IgG 抗体が感染後長期に産生されることは、脱囊幼虫に存在する体表抗原および炎細胞抗原が虫体の成熟過程においても存在し続け、体外に放出されていることを示唆するものである。このことは、肺臓寄生の初期あるいは慢性期の成虫を投与したラットが、脱囊幼虫の体表および炎細胞に対する IgG 抗体をメタセルカリア投与ラットと同じ程度に産生するということから強く支持される。同様に脱囊幼虫に存在する腸管抗原が成虫になっても分泌されていることは、成虫投与ラット血清での IIF 法の結果により示された。浜島らは (1972)、ウェステルマン肺吸虫において、成虫抗原とメタセルカリア抗原との間に 9 種類の共通抗原が存在することを免疫電気泳動で確認している。しかし、共通抗原の虫体内局在部位に関しては言及しておらず、また、他種の肺吸虫においても、それ

について検討した研究はみあたらない。今回の研究は、大平肺吸虫の脱囊幼虫 (脱囊メタセルカリア) と成虫との共通抗原の 1 部が脱囊幼虫の体表、腸管および炎細胞に局在していることを示したといえる。

成虫体表に対する IgG 抗体の IIF 価の経時的推移 (Ohara *et al.* 投稿中) は、今回の脱囊幼虫体表での結果と一致せず、特に感染初期では抗成虫体表 IIF 価が低く、両者の間に著明な違いが認められた。このことは、成虫体表に脱囊幼虫の体表抗原が存在するものの、他の抗原物質が主成分として存在していることを示唆する。体表抗原が虫体の発育過程で転換するという現象は、肝蛭でも報告されている (Hanna, 1980 b).

メタセルカリア投与数を変えた実験では、投与数が多いラットほど、脱囊幼虫に対する IIF 価が高く、寄生虫体数に依存した IgG 抗体産生が認められた。2,000 rad の X 線照射メタセルカリアを投与したラットでは、抗体表 IgG 抗体のみの産生低下が認められた。Burden *et al.* (1983) は、4,000rad の γ 線照射を受けた肝蛭メタセルカリアが、虫体の正常発育に伴って起こる tegument 細胞の質的分化をなしえないことを報告している。このように、大平肺吸虫メタセルカリアも、X 線照射により発育が強く抑制される (池田・谷, 投稿中)。しかし、体表抗原を形成する tegument 細胞が他の抗原物質を形成・放出する細胞に比べてより大きな影響を受けた可能性が考えられる。

以上、大平肺吸虫感染ラットにおける脱囊幼虫に対する IgG 抗体産生を明らかにした。これら抗体と補体系あるいは免疫エフェクター細胞との協同による攻撃に対して、脱囊幼虫がいかなる機構による抵抗性をもつかを、今後検討を試みたい。

要 約

大平肺吸虫感染ラットにおける脱囊幼虫に対する IgG 抗体産生を、間接免疫蛍光法により検討した。感染ラット血清に脱囊幼虫の体表、腸管および炎細胞に対する IgG 抗体が検出された。抗体表抗体は感染後 1 週目に低値で検出され、2 週目には急激な増加があり、以後、12 週まで同じ高値の抗体価を持続した。一方、抗炎細胞抗体は一時的な抗体価の減少が感染後 4 週目から認められた。

虫体投与数 (1, 10, 50) を変えたラットでは、抗体表および抗炎細胞抗体とも 3 週目の抗体価は虫体投与数に応じて抗体価は高かった。成虫 (5 週虫体あるいは 15 週虫体) を移植したラットでは、メタセルカリアを投与

したラットと同値の抗体価を両抗体とも示した。2,000 rad のX線照射メタセルカリアを投与したラットでは、抗炎症細胞抗体の3週目の抗体価は、正常メタセルカリアを投与したラットと比べて差がないのに反し、抗体表抗体の抗体価は低値であった。

文 献

- 1) Burden, D. J., Bland, A. P., Hughes, D. L. and Hammet, N. C. (1983) : *Fasciola hepatica*: development of the tegument of normal and γ -irradiated flukes during infection in rats and mice. *Parasitology*, 86, 137-145.
- 2) 浜島房則・斉藤 奨・辻 守康 (1972): ウェステルマン肺吸虫成虫感作血清と各発育期抗原による免疫電気泳動像の比較. 寄生虫誌, 21(増), 33.
- 3) Hanna, R. E. B. (1980a) : *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.*, 50, 103-114.
- 4) Hanna, R. E. B. (1980b) : *Fasciola hepatica*: an immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Exp. Parasitol.*, 50, 155-170.
- 5) 池田照明・多田 功(1977) : 大平肺吸虫感染ラットにおける抗体産生. 金沢医大誌, 2, 166-171.
- 6) 今井淳一 (1979) : ウェステルマン肺吸虫の抗原分析に関する研究. 2. 成虫分画抗原の免疫反応について. 熱帯医学, 21, 45-55.
- 7) Kusel, J. R., Mackenzie, P. E. and McLaren, D. J. (1975) : The release of membrane antigens into culture by adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 71, 247-259.
- 8) 宗 典郎(1959) : 大平肺吸虫の免疫学的研究—沈降反応及びサーレス現象—. 福岡医誌, 50, 2594-2623.
- 9) Tada, I. (1967) : Physiological and serological studies of *Paragonimus miyazaki* infection in rats. *J. Parasitol.*, 53, 292-297.
- 10) 多田 功(1968) : 宮崎肺吸虫感染ダイコクネズミ血清ならびに感作血清の免疫電気泳動像. 鹿大医誌, 19, 816-821.
- 11) 横川宗雄・吉村裕之・小宮義孝(1960) : 大平肺吸虫 (*Paragonimus ohirai* Miyazaki, 1939) の幼虫の形態について. 寄生虫誌, 9, 451-455.
- 12) Wilson, R. A. and Barnes, P. E. (1977) : The formation and turnover of the membranocalyx on the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 74, 61-71.

Abstract

IgG ANTIBODY RESPONSE AGAINST EXCYSTED JUVENILE
DETECTED BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENT METHOD
IN *PARAGONIMUS OHIRAI*-INFECTED RATS

TERUAKI IKEDA AND SHOKICHI TANI

(*Department of Medical Zoology, Kanazawa Medical
University, Uchinada, Ishikawa-Ken 920-02, Japan*)

IgG antibody formation against newly excysted juvenile in *Paragonimus ohirai*-infected rats was observed by indirect immunofluorescent (IIF) method, using whole body of the juvenile fixed in cold 95 % ethanol as antigen and fluorescein-conjugated rabbit anti rat IgG.

Immune serum gave a positive reaction on the surface, gut and flame cell. Time course titration of IIF antibodies against the surface and flame cell of the juvenile was determined in rats infected with 10 metacercariae. The IIF antibodies were detectable at low titers 1 week after infection, increased rapidly and reached a peak titer on week 2. Thereafter, however, the titer of anti-surface antibody was maintained at the same level through the period of the experiment, but that of anti-flame cell antibody decreased considerably.

Both the IIF antibody titers against the surface and flame cell in rats exposed to a variety of infections were compared in 3-week-postinfection sera. Increase of the number of metacercariae inoculated was associated with the increase in both the titers. In rats transplanted intraperitoneally with 3 adult worms, the titers stayed same level as those in rats with 10 metacercariae (infected control rats) regardless of the age, 5 or 15 weeks. In rats inoculated with ten X-irradiated (2,000-rad) metacercariae, although the titer of anti-flame cell antibody was as equal as that of control infected rats, that of anti-surface antibody was remarkably low.