

犬蛔虫幼虫 ES 抗原複合糖質の各種レクチン に対する反応性による解析

赤尾 信明 近藤 力王至

(昭和61年3月14日 受領)

Key words: *Toxocara canis*, ES antigen, biotinyl lectin, glycoconjugates

緒 言

犬蛔虫第2期幼虫の *in vitro* での培養が de Savigny (1975) によって報告されて以来、幼虫排泄・分泌物 (ES) 抗原の生化学的性状や抗原性に関する研究がなされ、幼虫の放出する ES 抗原は糖蛋白からなり、感染血清とは他の犬蛔虫由来抗原よりも強く反応することが明らかにされている (Maizels *et al.*, 1984; Koizumi *et al.*, 1983; Sugane and Oshima, 1983). 著者ら (1983) も、犬蛔虫 ES 抗原の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた分析から、ES 抗原の殆どに分画が PAS 反応陽性の糖蛋白からなり、とくに MW 100KD 以上の分画が PAS 強陽性であり、感染初期のウサギ血清は MW 100KD 以上の分画と反応し、感染後期血清は MW 40KD 付近以下の分画と反応することを報告した。

近年、寄生虫糖蛋白質の分析手段としてレクチンの糖結合特異性を用いた報告がなされ (Bennett and Seed, 1977; Murrell *et al.*, 1978; Warton and Honigberg, 1980), その病原性や組織内侵入機構の解析が試みられている。本報告では犬蛔虫 ES 幼虫抗原に含まれる糖組成について、各種レクチンに対する反応性からの解析を試み、また、その幼虫内局在についても検討したので報告する。

材料と方法

1. 犬蛔虫幼虫 ES 抗原の調整

犬蛔虫幼虫 ES 抗原は de Savigny (1975) の方法に準じ、犬蛔虫第2期幼虫を *in vitro* で培養して得た培養上清を濃縮して得た (近藤ら, 1981). 抗原の蛋白量は Lowry (1953) の方法により測定した。

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法と免疫転写法

1 mg/ml に調整した ES 抗原を既報 (赤尾ら, 1983) の如く10%ポリアクリルアミドゲルにて 150 V 定電圧、150分間泳動した。抗原蛋白分画は銀染色試薬 (Bio Rad, USA) を用いて染色した。泳動後のゲルは Southern (1975) の方法によって、その分画抗原を Durapore® 膜 (MILLIPORE, NY, USA) に転写した。また、分子量 (MW) を推定するための指標として SDS-PAGE Marker I® (生化学工業) を用い、クマシー・ブリリアント・ブルー R-250 (Merk, USA) で染色した。さらに、ES 抗原の抗原性を検討する為に用いた血清は、犬蛔虫幼虫移行症が疑われた患者血清 (島田ら, 1985) で、間接酵素抗体法により ES 抗原中の抗原活性分画を染色した。

3. 各種レクチンとの反応

用いたレクチンは *Ulex europaeus* I (UEA-I), *Arachis hypogaea* (PNA), *Dolichos biflorus* (DBA), *Glycine Max* (SBA), *Ricinus communis* I (RCA-I), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Triticum vulgare* (WGA) の7種類であり、その糖特異性については、UEA-I は α -L-Fuc と、PNA および RCA-I は β -D-Gal, DBA と SBA は α -D-GalNAc, ConA は α -D-Man, WGA は β -D-GlcNAc と特異的に結合すると言われている (辻, 1985)。

転写後の膜は 1% Bovine Serum Albumin (BSA) 加 Tris-HCl 緩衝液 (0.01 M Tris, 0.1 M HCl, 0.15 M NaCl, pH 8.6) で 37°C, 1時間 preincubation を行った。そのあと上記の Tris-HCl 緩衝液で1回洗浄後、10 μ g/ml に希釈した7種類のビオチン結合レクチン (VCTOR, CA, USA) とそれぞれ室温で30分間、攪拌しながら反応させた。ただし、ビオチン結合 ConA を希釈した Tris-HCl 緩衝液には 0.01 M CaCl₂, 0.01 M

MnCl₂ を添加し、残りのレクチンの希釈には Tris-HCl 緩衝液を用いた。反応後の膜は Tris-HCl 緩衝液で3回洗浄後、同緩衝液で希釈したペルオキシダーゼ結合アビチン (5 µg/ml, Vector, CA, USA) と室温で30分間、攪拌しながら反応させた。Tris-HCl 緩衝液で洗浄後、ジアミノペンチジン4塩酸塩 (0.5 mg/ml, 0.003% H₂O₂, 0.2 M Tris pH 7.6, ドータイト) を基質とする発色液で、反応した複合糖質分画を可視化した。

4. 各種レクチンと反応する複合糖質の幼虫内局在

上記7種類のレクチンと反応する複合糖質の幼虫内局在を検討するために、幼虫の凍結切片を用いた。即ち、脱殻直後の活発に運動する幼虫を PLP 固定液 (0.01 M NaIO₄, 0.075 M リジン, 0.0375 M PB, 2% パラホルムアルデヒド) で4°Cで一晩固定した。固定後、7.5% sucrose 加 0.05 M PB (pH 7.6) で一晩水洗、15% sucrose 加 0.05 M PB でさらに一晩水洗し、最後に20% sucrose 加 0.05 M PB で12時間水洗した。そのうち、OCT Compound に包埋して5 µm の凍結切片とした。

ビオチン加レクチンとの反応およびペルオキシダーゼ結合アビチンとの反応は SDS-PAGE 後の Durapore® 膜を染色したときと同じ方法で実施した。

結 果

1. 各種レクチンと反応する犬蛔虫幼虫 ES複合糖質分画

今回検討した7種類のレクチンの内、犬蛔虫 ES 抗原と最も強く反応したのは ConA と RCA1 であった。このうち、ConA と反応する分画は幼虫 ES 分画のうち分子量 (MW) が 42KD 付近以下の分画であった。幼虫 ES 抗原分画の蛋白染色像との比較から MW42KD 付近以下の分画はすべて ConA と反応していると考えられた (Fig. 1)。

一方、RCA1 と反応する分画は MW が 100KD 以上の分画であり、biotin 化 RCA1 の濃度が 10 µg/ml ではそれ以下の分画とは反応が見られなかった (Fig. 2a)。WGA とは MW が 32 KD 付近以下の分画と僅かに反応がみられたが (Fig. 2c)、その他のレクチンとは全く反応しなかった (Fig. 2d-2f)。

2. 犬蛔虫幼虫複合糖質の幼虫内局在

凍結切片を用いて上記7種レクチンと反応する複合糖質の幼虫内局在をアビチン-ビオチン反応を利用して検索した。幼虫の排泄細胞に一致する部位での複合糖質の局在は Fig. 3 の如くである。SDS-PAGE 後の ES 分画と最も強く反応した ConA と RCA1 の幼虫内局在も

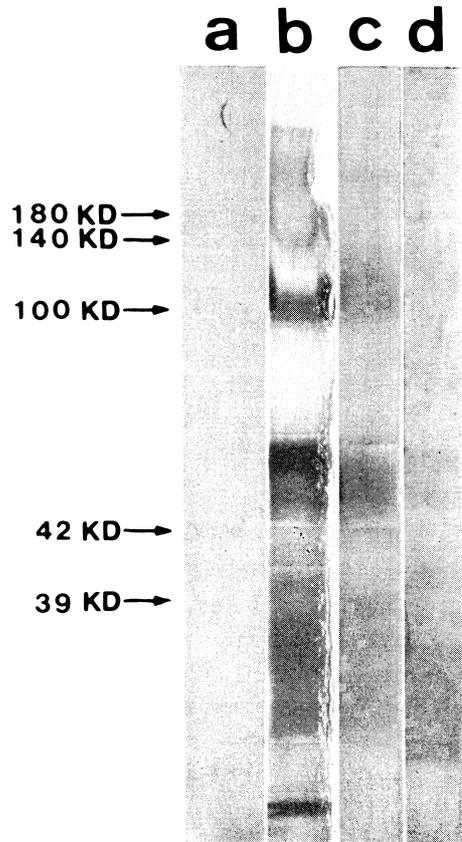


Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae. Samples were dissolved in 0.15 M Tris-HCl, pH 6.8 containing 2% SDS and 10% glycerol, and incubated at 100°C for 90 second. After electrophoresis at 150 V for 150 minutes, proteins were visualized by silver stain (b). ES antigen was reacted with serum of toxocarosis patient (c), and biotinylated ConA (d) followed by immunoblotting to Durapore filter. The position of molecular weight markers was indicated on the lane of (a).

同じ部位にみられ、排泄細胞内が強く染色された (Fig. 3A, 3B)。また、角皮、筋層にも局在が認められたが、その程度は排泄細胞のそれに比べて弱かった。WGA とは角皮および筋層に弱い反応がみられたが、排泄細胞には WGA と反応する複合糖質は殆ど認められなかった。PNA, SBA, UEA1, DBA と反応する幼虫の複合糖質は排泄細胞以外の部位に極くわずかに認められたが、排泄細胞内には全く局在していなかった。

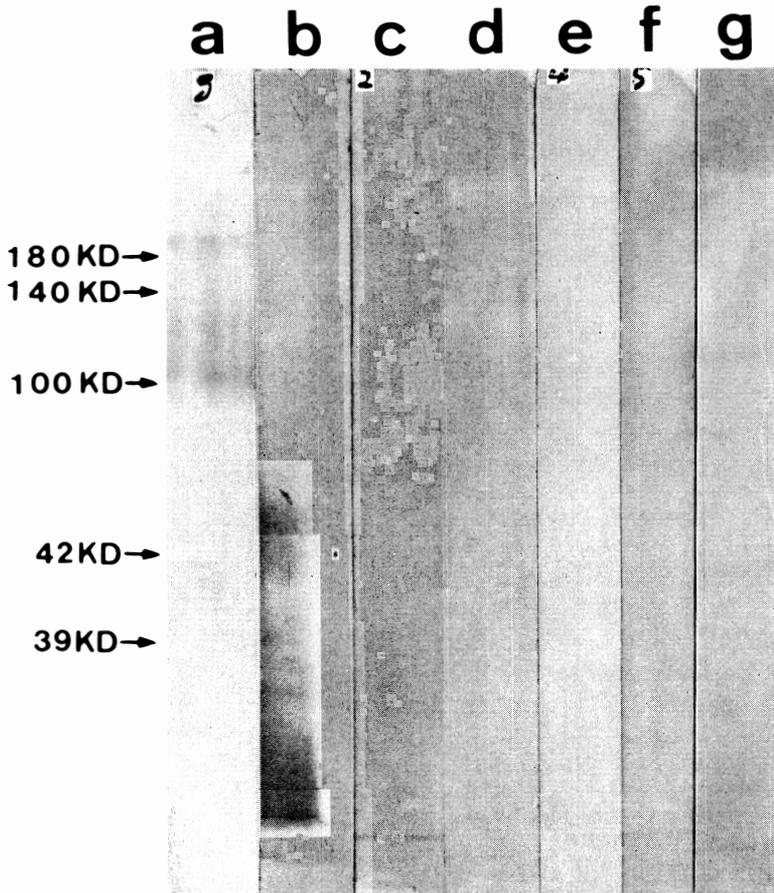


Fig. 2 Glycoconjugates patterns of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae. (a) biotinylated RCA-1, (b) biotinylated ConA, (c) biotinylated ConA, (c) biotinylated WGA, (d) biotinylated SBA, (e) biotinylated DBA, (f) biotinylated PNA, (g) biotinylated UEA-1. The position of molecular weight markers was indicated on the left-hand side.

考 察

先に著者ら (1983) は、犬蛔虫第2期幼虫の出す排泄・分泌物は強い抗原性を持ち、その殆どの分画が糖蛋白から成ることを報告した。また、感染初期のウサギ血清は幼虫 ES 抗原の主として MW 100KD 以上の分画と反応し、慢性期では MW 40KD 付近の分画と反応することを明らかにした。本報告ではこのような幼虫 ES 抗原に含まれる複合糖質を、糖結合特異性を有する各種レクチンとの反応性から解析を試みた。用いた7種類のレクチンのうち、幼虫 ES 抗原分画と最も強く反応したのは ConA と RCA1 であった。しかし、その反応抗原分画は大きく異なっていた。即ち、ConA は幼虫 ES 抗

原の MW42KD 付近以下の分画と主として反応した。これに反して、RCA1 と反応する複合糖質分画は MW 100KD 以上の分画に存在していた。

最近、Meghji and Maizels (1986) は犬蛔虫幼虫 ES に含まれる糖蛋白の生化学的諸性状を詳細に分析し、幼虫 ES には ConA と結合する MW 32kd の分画と *Helix pomatia* に結合する MW 120kd 以上の分画があり、前者は pepsin や trypsin, chymotrypsin によって分解されるが、後者は pronase によってのみ分解されたと報告した。そしてこの幼虫 ES は40%の炭水化物を含み、その大部分が N-acetylgalactosamine と galactose からなると述べている。

今回 RCA1 と反応した MW 100KD 以上の分画は

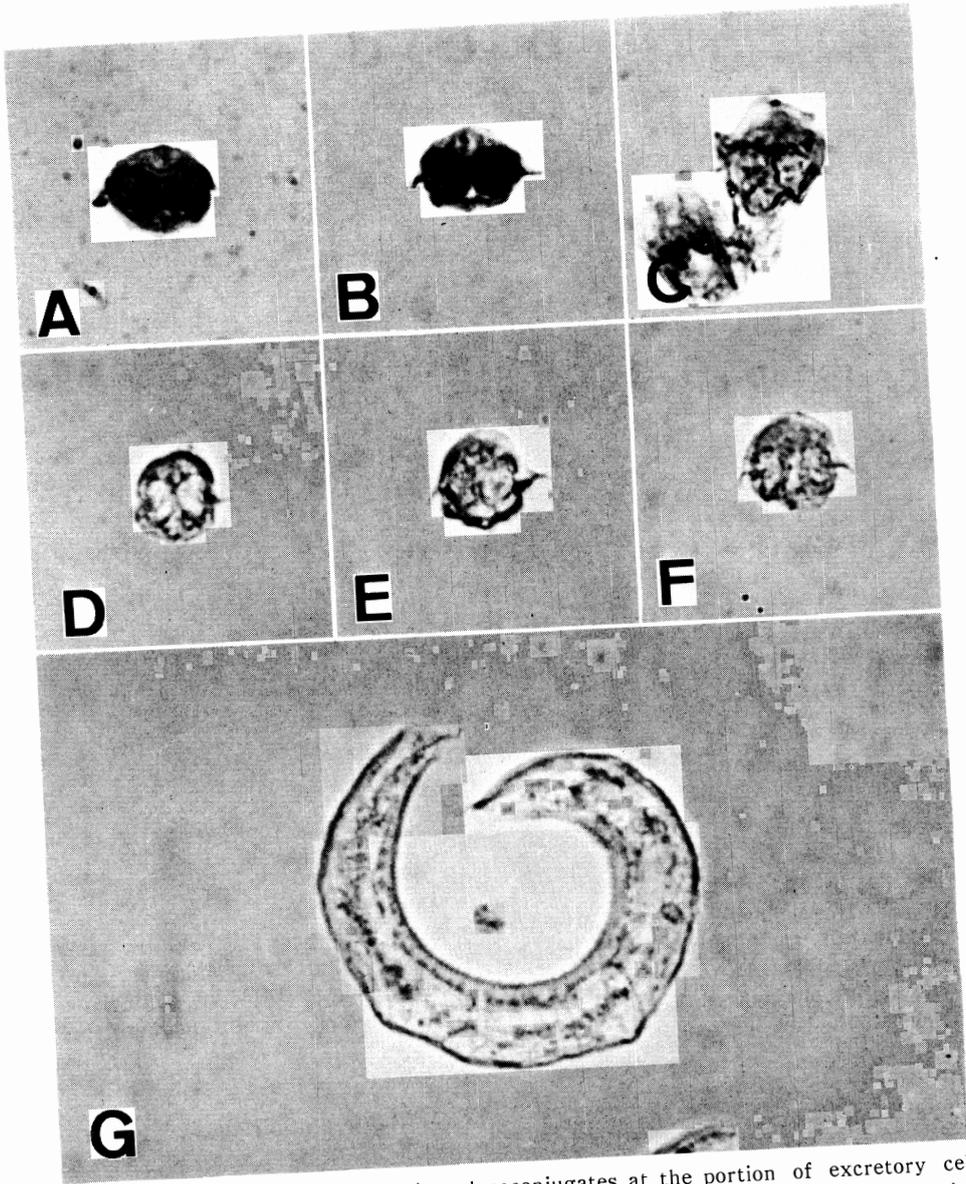


Fig. 3 Visualization of lectin-reactive glycoconjugates at the portion of excretory cells of *Toxocara canis* larva. (A) biotinylated ConA, (B) biotinylated RCA-1, (C) biotinylated WGA, (D) biotinylated PNA, (E) biotinylated SBA, (F) biotinylated UEA-1, (G) biotinylated DBA.

PAS 反応強陽性であり (Sugane and Oshima, 1983; 赤尾ら, 1983), 免疫電気泳動法では陽極側に泳動される分画である (Koizumi *et al.*, 1983). さらにこの分画は正常ヒト血清あるいは非感染マウス血清とも一部反応する (Maizels *et al.*, 1984). また, ConA と反応する分画は Ogilvie and de Savigny (1982) が述べている属特異的抗原分画の MW 42KD を含んでいる. Sugane

and Oshima (1983) は, 感染血清と反応するのは幼虫 ES の MW 32KD の分画で, 糖含量が 15% であったと述べている. 我々の成績では, この MW 32KD 付近の分画は ConA と強く反応し, WGA と弱いながらも反応がみられた. しかし, 他のレクチンとは全く反応しなかった. また, RCA1 と ConA とに反応する複合糖質分画はそのほとんどがヒト感染血清と反応し, 抗原活

性を保持していた。

次に、このような幼虫 ES 抗原複合糖質の幼虫内分布を検討したところ、幼虫の排泄細胞に強い局在がみられ、そのレクチン結合部位は ConA, RCA1 と近似していた。辻 (1982) によれば、RCA1 は β -D-gal と、また ConA は α -D-Man 残基をもつ糖鎖と特異的に結合し、アミノ酸との結合様式による分類ではいずれもアスパラギン結合型糖鎖をもつ複合糖質と特異的に結合すると考えられている。さらに犬蛔虫幼虫 ES は口腔、排泄孔、肛門から分泌され (Hogarth-Sott, 1966)、抗原活性も排泄細胞に最も強い (赤尾ら, 1983) ことから、幼虫 ES は排泄細胞で産生され、抗原性をもつアスパラギン結合型糖鎖を有する糖蛋白として存在すると考えられた。Maizels *et al.* (1983) は、このようにして産生された幼虫 ES 抗原が幼虫の排泄細胞あるいは肛門から放出され、角皮に一次的に付着したのち角皮表層から脱落していくのではないかと推測している。

蠕虫類の体内にはヒトの血液型物質と似た成分が存在する (Oliver-Gonzalez and Torregrosa, 1944)。犬蛔虫幼虫移行症患者においてもその血清中の抗 A 抗 B 抗体の上昇が報告されている (Huntly *et al.*, 1969; Glickman *et al.*, 1978)。Smith *et al.* (1983) は幼虫表面に抗 A 抗 B 抗体の付着を認め、このような現象は幼虫の表面や ES に存在する抗原決定基が ABO 式血液型抗体と交差反応する為に生じると報告した。今回用いたレクチンのうちで、SBA と DBA は A 型特異的であり、また UEA1 は O 型特異的レクチンとして知られている。しかし今回の成績からは SBA や DBA と反応する A 型特異的糖鎖を有する複合糖質は幼虫排泄細胞に局在しておらず、SDS-PAGE 後の幼虫 ES 抗原分画との反応においても明確なバンドは認められなかった。レクチンの糖特異性については未だ完全には解明されておらず、同じ糖結合特異性を有するレクチンでも異なった反応を呈する場合があります。Smith *et al.* (1983) の成績と比較するには A 型あるいは B 型特異的糖鎖と反応する他のレクチンを用いた検討を行う必要があると思われる。

結 語

糖結合特異性を有する各種レクチンを用いて、犬蛔虫幼虫 ES 抗原に含まれる複合糖質の解析を試み、次の如き結果を得た。

(1) 幼虫 ES 抗原分画のうち MW 100KD 以上の分画は RCA1 と強く反応し、MW 42KD 付近以下の分画は ConA と強く反応した。WGA とは MW 32KD 未満の

分画が僅かに反応した。しかし、PNA, DBA, UEA1, SBA と反応する複合糖質分画は認められなかった。

(2) 幼虫の凍結切片を用いて複合糖質の局在を検討したところ、ConA, RCA1 と反応する複合糖質は幼虫の排泄細胞に最も強く局在していた。WGA と反応する複合糖質は幼虫全体に弱くみられたが、PNA, DBA, UEA1, SBA と反応する複合糖質は排泄細胞には全く認められなかった。

以上の結果から、犬蛔虫幼虫 ES 抗原にはアスパラギン結合型糖鎖を持つ糖蛋白が多量に含まれ、その大部分が排泄細胞に局在していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御校閲を戴いた金沢大学医学部寄生虫学教室吉村裕之教授、ならびに本実験の標本作製に終始御協力戴いた高越裕子嬢に深謝する。

文 献

- 1) 赤尾信明・近藤力王至・岡本 敬・吉村裕之 (1983): 犬蛔虫第 2 期幼虫 ES 抗原の抗原分析と感染経過中にみられる宿主の抗原認識の変化、寄生虫学雑誌, 32, 541-548.
- 2) Bennett, J.L. and Seed, J.L. (1977): Characterization and isolation of concanavalin A binding sites from the epidermis of *S. mansoni*. J. Parasitol., 63, 250-258.
- 3) de Savigny, D.H. (1975): In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J. Parasitol., 61, 781-782.
- 4) Glickman, L., Schantz, P., Dombroske, R. and Cypess, R. (1978): Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27, 492-498.
- 5) Hogarth-Scott, R.S. (1966): Visceral larva migrans—an immunofluorescent examination of rabbit and human sera for antibodies to the ES antigen of the second stage larvae of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* (Nematode). Immunology, 10, 217-223.
- 6) Huntly, C.C., Lyverly, M.C. and Patterson, M.V. (1969): Isohaemagglutinins in parasitic infections. J. Am. Med. Ass., 208, 1145-1148.
- 7) Koizumi, T., Hayakawa, J. and Kondo, K. (1983): *Toxocara canis*: Immunogenic sources of *Toxocara canis* in infected rats. Jpn.

- J. Parasitol., 32, 379-386.
- 8) 近藤力王至・小泉 勤・坪田宣之・大西義博・吉村裕之(1981): 実験的移行性幼線虫症の研究(3)犬蛔虫幼虫感染家兔の抗体価の推移, 寄生虫学雑誌, 30, 549-556.
 - 9) Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
 - 10) Maizels, R.M., de Savigny, D. and Ogilvie, B.M. (1984): Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. Parasite Immunol., 6, 23-37.
 - 11) Meghji, M. and Maizels, R.M. (1986): Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. Mol. Biochem. Parasitol., 18, 155-177.
 - 12) Murrell, K. B., Taylor, D. W., Vannier, W. E. and Dean, D. A. (1978): *Schistosoma mansoni*: analysis of surface membrane carbohydrates using lectins. Exp. Parasitol., 46, 247-255.
 - 13) Ogilvie, B.M. and de Savigny, D. (1982): Immune response to nematodes. In Immunology of parasitic infections, 2nd ed., by Sydney Cohen and Kenneth S. Warren, Blackwell Scientific Publications, London, 715-757.
 - 14) Oliver-Gonzalez, J. and Torregrosa, M.V. (1944): A substance in animal parasites related to the human isoagglutinogens. J. Infect. Dis., 74, 173-177.
 - 15) 島田玲子・前川 悟・森 一満・宇治幸隆・新美勝彦・北村四郎・安藤勝彦・近藤力王至・赤尾信明(1985): Ocular Toxocariasis の2症例. 日本眼科紀要, 36, 863-869.
 - 16) Smith, H. V., Kusel, R. and Girwood, R.W.A. (1983): The production of human A and B blood group like substance by in vitro maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on the outer larval surfaces and in their excretions/secretions. Clin. Exp. Immunol., 54, 625-633.
 - 17) Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98, 503-517.
 - 18) Sugane, K. and Oshima, T. (1983): Purification and characterization of excretory antigen of *Toxocara canis* larvae. Immunology, 50, 113-120.
 - 19) 辻 勉(1985): レクチンと細胞生物学, レクチンの結合特異性. 大沢利昭編, 第1版, 69-80頁, 講談社サイエンティフィック, 東京
 - 20) Warton, A. and Honigberg, B.M. (1980): Analysis of plant lectins of surface saccharides of *Trichomonas vaginalis* strains which differ in pathogenicity. J. Protozool., 27, 410-419.

Abstract

GLYCOCONJUGATES OF EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS OF
SECOND STAGE LARVAE OF *TOXOCARA CANIS*: ANALYSIS OF
THEIR REACTIVITY TO LECTINS

NOBUAKI AKAO AND KAORU KONDO

(Department Parasitology, School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa City, Japan)

This study was undertaken to examine the glycoconjugates properties of excretory-secretory (ES) antigens of *Toxocara canis* larvae. The ES antigens were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained by silver reagent. The reactivities of these proteins to specific lectins were examined after transferring them to Durapore filter. *Richimus communis* agglutinin-1 (RCA1) reacted to the macromolecules greater than 100 KD antigen of the ES. On the other hand, *Canavalia ensiformis* (ConA) reacted to the low molecular weight of antigens smaller than 100 KD of the ES. Localization of glycoconjugates reacted to RCA1 was identical with those of ConA; excretory cells of the larva were strongly stained by immunoenzymatic techniques using cryostat sections of the parasites. *Triticum vulgare* reacted weakly to the antigens of 32 KD and its binding sites were diffusely located in the larval body. In contrast, glycoconjugates expected to react with *Ulex europeus*-1, *Arachis hypogaea*, *Dolichos biflorus* and *Glycine Max* were not observed in excretory cells of the larva, nor on the fractionated antigens followed by SDS-PAGE. These results indicated that a large amount of glycoproteins possessing asparagin linked oligosaccharide chains were located in the excretory cells of the larva.