

モノクローナル抗体による日本住血吸虫の 虫卵周囲沈降反応に関する研究

小林 富美恵

(昭和61年5月8日 受領)

Key words: *Schistosoma japonicum*, circumoval precipitin test, circumoval precipitinogen, monoclonal antibody, soluble egg antigens

緒 論

虫卵周囲沈降 (circumoval precipitin: COP) 反応は、住血吸虫感染患者や感染動物血清と住血吸虫卵との反応によって、その卵殻周囲に沈降物が形成されるものである (Oliver-González, 1954)。COP 反応は特異性が高く (Hillyer, *et al.*, 1979)、操作が簡便なことから、ラジオイムノアッセイや酵素抗体法等と共に住血吸虫症の免疫血清学的診断法として広く応用されてきた。

COP 反応に関与する抗原 (以下、COP 関連抗原) について、Hillyer and Pelley (1980) は、マンスン住血吸虫の虫卵から精製された主要抗原の1つである MSA₁ (major serologic antigen 1) に対するモノクローナル抗体が COP 反応で陽性であったと報じている。このことから、MSA₁ はマンスン住血吸虫の COP の出現に際して重要な関連抗原の1つであることが明らかにされた。一方、日本住血吸虫卵に含まれている COP 関連抗原については、耐熱性 (Kamiya, 1980; Kawanaka *et al.*, 1983) であること、糖タンパク抗原との関連 (Long *et al.*, 1981a) 等の報告が僅かにあるのみで、その性状、特異性の詳細については殆どが明らかにされていないのが現状である。

住血吸虫症における主要な障害の一つとして、虫卵の宿主組織内介在による肉芽腫形成があるが、Boros and Warren (1970) がマンスン住血吸虫卵から分離した可溶性物質によって誘引される肉芽腫形成について考察している如く、虫卵に含まれる種々の抗原物質の生化学的性状や免疫学的特異性を明らかにすることは、本症の発症機序を解明する上でも極めて重要であると思われる。また、COP 関連抗原についての研究は、免疫病理学上、

虫卵性肉芽腫形成機構の解明に寄与すると同時に、免疫診断にも有用な情報を与えてくれるものと思われる。

そこで本研究では、日本住血吸虫卵に対し COP 反応を起こすモノクローナル抗体を作製し、これを用いて COP 関連抗原を同定し、その物理化学的性状および特異性について検討したところ興味ある知見が得られたので報告する。

材料と方法

虫卵および成虫の採取

日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*: Sj) は山梨県甲府盆地由来のもので、実験室内においてマウスとミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* を用いて継代している系統である。生後6~8週の雌の ddY マウスに1匹あたり20~40尾のセルカリアを腹腔内注射して感染させ、感染8~9週後、感染マウスにエーテル麻酔をかけ心臓より全採血した後、胸大動脈から生理食塩水を注入すると共に門脈本幹を切開して灌流することによって成虫を採取した。虫卵は感染マウスの腸管から Kobayashi *et al.* (1985a) の消化法に従って分離し、抗原調製時まで -20°C で保存した。

マンスン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*: Sm) セルカリアは、国立予防衛生研究所より分与されたものを供試し、マウス1匹にセルカリア約80尾を腹腔内注射し、上記と同様の方法により成虫を採取し、虫卵は腸管と肝臓からそれぞれ分離した。

抗原の調製

住血吸虫卵に5倍量の 0.85% NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.2 (PBS) を加えガラスホモジナイザーで磨細し、4°C、1昼夜抽出した。次いで 100,000×g で 4°C、1時間遠心して得られた上清を孔径 0.45 μm のミリポアフィルターで濾過した液を虫卵抗原とした。

ミラジウムは孵化コルペンで集め、冷 PBS で3回洗浄した後、虫卵抗原と同様の方法でミラジウム抗原を作製した。ミラジウム孵化液（以下、孵化液）は、Kobayashi *et al.* (1985a) の方法に従って調製した。成虫抗原は、雌雄混合（雌雄同数）、雌および雄成虫のみの3種抗原を、虫卵抗原と同様にして調製した。成虫および虫卵抗原は Bradford (1976) の方法に従って蛋白量を測定して実験に用いた。

モノクローナル抗体の作製

Sj の虫卵抗原 300 μg と Freund's complete adjuvant を混合し、6週齢の雌の BALB/c マウスに免疫し、2週間後、さらに虫卵抗原 20 μg を追加免疫した。その3日後、免疫マウスの脾細胞と NS-1 ミエローマ細胞とを、ポリエチレングリコール 1500 を用い、Oi and Herzenberg (1980) の方法に従って融合させた（脾細胞：NS-1 細胞=5:1）。2週間後、虫卵抗原に対する抗体のスクリーニングを後述の ELISA で行ない、抗体を産出している細胞を限界希釈法でクローン化した。クローンは2度繰り返す、フィーダー細胞として胸腺細胞を用いた。得られた融合細胞を、あらかじめプリスタンを投与した BALB/c マウスの腹腔に注射し、10~20日後に腹水を採取した。クローン化された融合細胞のうち4種の細胞株によって培養上清または腹水中に産生されたモノクローナル抗体を、それぞれ 1C3 抗体 (IgM)、2B8 抗体 (IgG₁)、2C4 抗体 (IgG₃)、3D10 抗体 (IgM) と命名し、実験に用いた。なお、これらのモノクローナル抗体のアイソタイプの同定は、抗マウス IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM、IgA ウサギ血清 (Miles 社) と融合細胞の培養上清を用いた二重免疫拡散法 (Ouchterlony and Nilsson, 1978) によった。また、NS-1 細胞由来の培養上清および腹水を対照として使用した。

感染マウス血清

Sj 感染16週後あるいは Sm 感染9週後のマウスより心臓採血した後、1,700×g、20分間遠心して分離した血清を、使用時まで -20°C で保存した。

虫卵周囲沈降 (COP) 反応

PBS で希釈した腹水あるいは血清 0.25 ml に、横川・佐野 (1966) の方法で調製した新鮮な虫卵懸濁液を等量加えた。37°C で24~96時間保温した後、観察した虫卵数に対する、卵殻周囲に沈降物を認めた虫卵（陽性卵）数の割合を COP 陽性虫卵率として表わした。卵殻周囲の沈降物の形状は、横川ら (1967) に準じて、その大きさによって I 型、II 型、III 型に分類した。

酵素抗体法 (ELISA)

融合細胞の抗体産生の有無を調べるための ELISA は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Sj 虫卵抗原を吸着させたマイクロプレート（トミー精工製）と、Mono-Screen P kit (Zymed 製) とを用いて行なった。

モノクローナル抗体の特異性を調べるための inhibition-ELISA (IELISA) は、Abdel-Hafez *et al.* (1983) の方法を一部改変して行なった。アッセイは、coating buffer (Voller *et al.*, 1976) に溶いた 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Sj 虫卵抗原を吸着させた後 1% ウシ血清アルブミンでブロックしたマイクロプレート (Dynatech 社) で行なった。モノクローナル抗体（腹水型、1:1000）に、PBS で 0.01~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したブロッキング用抗原液を等量加え、4°C で1昼夜反応させた後、反応液 50 μl をプレートに加え、37°C で1時間保温した。その後3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ウサギ血清 (Miles 社、1:1000) を 100 μl 加え、37°C で1時間保温した。5回洗浄した後、o-phenylene diamine, H₂O₂ 200 μl を基質として加え、25°C、30分間保温後、490 nm の波長で吸光度を測定した。洗浄液には、0.05% Tween 20 と 0.1% ウシ血清アルブミンを含む PBS を用いた。

阻害率の算定は Abdel-Hafez *et al.* (1984) に準じ、以下の通りとした。

$$\text{阻害率} = \frac{\text{OD}(\text{Mc} - \text{Ag}) - \text{OD}(\text{Mc} + \text{Ag})}{\text{OD}(\text{Mc} - \text{Ag})}$$

Mc はモノクローナル抗体、Ag はブロッキング抗原、OD は吸光度を表わす。

アフィニティークロマトグラフィー

クロマトグラフィーは Carter and Colley (1979) に準じて行なった。10⁻⁴M CaCl₂、10⁻⁴M MnCl₂ を含む PBS で透析した虫卵抗原を Con A-Sepharose (Pharmacia 製) のカラムに充填し、同じ緩衝液で未吸着の物質を溶出した。次に、この緩衝液に溶いた 0.1 M α -メチルマンノシドでカラムに結合した物質を溶出し、PBS で透析後、濃縮した液を虫卵糖タンパク画分とした。

SDS-スラブ電気泳動

SDS-スラブ電気泳動は Laemmli (1970) の方法によって行ない、泳動後のゲル中のタンパク質および糖を、それぞれ、Oakley *et al.* (1980) による銀染色法、Zacharius *et al.* (1969) による PAS 反応によって染色した。また、分子量を推定するための指標として、分子量測定マーカー (Bio Rad 社) を同時に泳動した。

Western blot

モノクローナル抗体によって認識される標的抗原は以

下の Western blot によって同定した。虫卵抗原をスラブ電気泳動した後、分画された成分を Southern (1975) の方法でニトロセルロース膜に転写し、この膜を Towbin *et al.* (1979) の方法に従ってモノクローナル抗体 (培養上清, 1: 100) と反応させた後、ペルオキシンダーゼ標識抗マウス IgG ウサギ血清 (1: 100) と反応させた。反応後の膜を 3, 3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride, H₂O₂ で発色させ、モノクローナル抗体と反応した抗原バンドの分子量を算定した。

間接蛍光抗体法

Sj 感染 9 週目のマウス肝の凍結切片 (5 μ m) を作製し、スライドガラス上で間接蛍光抗体法を行なった。切片にモノクローナル抗体 (培養上清, 10倍濃縮) を反応させた後、fluorescein isothiocyanate 標識抗マウス IgG, IgM ウサギ血清 (1: 100) を反応させ、モノクローナル抗体と反応した抗原の存在部位を観察した。

結 果

モノクローナル抗体と *Sj* 虫卵との COP 反応

1C3抗体, 2B8抗体, 2C4抗体, 3D10抗体を用いて、それぞれ、日本住血吸虫 (*Sj*) 虫卵に対する COP 反応を行なった。Table 1 に示すように、モノクローナル抗体を含む腹水 (10倍希釈液) で24時間反応させた場合、

それぞれの反応液中に I 型および II 型の COP 陽性虫卵が認められた。また、表には示さなかったが、48時間反応させると、II 型を呈する陽性虫卵の割合が増加した。さらに、反応時間を96時間に延長すると、沈降物の最も多い III 型の COP 陽性虫卵がそれぞれの反応液に観察された (Photo. 1A)。COP 反応は腹水の 100 倍希釈液を用いても、いずれも陽性であったが、この場合の反応型はすべて I 型であった。

Sj 雌雄成虫抗原, ミランジウム抗原, 孵化液による、モノクローナル抗体と虫卵抗原の結合に対する阻害

Sj 雄成虫, 雌成虫にモノクローナル抗体と虫卵抗原との反応を阻害する抗原が存在するか否かを IELISA によって調べた (Fig. 1, Table 2)。1C3, 3D10 抗体は虫卵抗原による I₅₀ (50%阻害を与える抗原量) が比較的高かったため、IELISA には、2B8, 2C4 抗体を用いた。Fig. 1 に2B8抗体で得られた結果を示したが、*Sj* 虫卵抗原は 0.7 μ g/ml で2B8抗体と虫卵抗原との反応を50%阻害したが、雄成虫抗原, 雌成虫抗原はいずれも 100 μ g/ml までの高濃度でも反応を阻害しなかった。2C4 抗体でも同様の結果が得られた (Table 2)。これらの結果から、2B8, 2C4 抗体の標的抗原は成虫には存在しないことが示唆された。

次いで、2B8, 2C4 抗体の標的抗原が成熟虫卵のどの

Table 1 Circumoval precipitin (COP) reaction using monoclonal antibodies with eggs of *Schistosoma japonicum*

| Antibody | Isotype* | Percentage of egg positive in the COP reaction† | | | |
|-----------------------|------------------|---|---------|----------|-------|
| | | Type I | Type II | Type III | Total |
| Monoclonal antibodies | | | | | |
| 1C3 | IgM | 36.8 | 7.9 | 0 | 44.7 |
| 2B8 | IgG ₁ | 22.2 | 2.5 | 0 | 24.7 |
| 2C4 | IgG ₃ | 30.2 | 1.6 | 0 | 31.7 |
| 3D10 | IgM | 29.2 | 9.2 | 0 | 38.5 |
| CAF‡ | — | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control mouse sera | | | | | |
| Infected§ | | 15.4 | 0 | 0 | 15.4 |
| Normal | | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Isotype determinations were performed with hybridoma culture supernatants.

† In the test, 38 to 81 eggs (mean of 64) were counted after 24-h incubation. Antibody dilution was 1/10 in PBS. Circumoval precipitates were classified into three types according to their sizes and forms as described in Materials and Methods.

‡ CAF: Control ascites fluid.

§ Sera from mice infected with *S. japonicum* for 16 weeks.

Table 2 Stage specificity of antigens recognized by monoclonal antibody 2B8 and 2C4: The ability of crude antigens from developmental stages of *S. japonicum* to inhibit the binding of monoclonal antibodies to SEA

| Crude Antigen | Monoclonal antibody 2B8 | | Monoclonal antibody 2C4 | |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | I ₅₀ (μg)* | I ₅₀ ratio† | I ₅₀ (μg) | I ₅₀ ratio |
| Soluble egg antigens (SEA) | 0.70 | | 0.56 | |
| Adult male worm extracts (MWE) | >100‡ | | >100 | |
| Adult female worm extracts (FWE) | >100 | | >100 | |
| Soluble egg antigens (SEA) | 1.5 | | 0.78 | |
| Soluble miracidium extracts (SME) | 17.5 | 0.09 | 2.5 | 0.31 |
| Hatch fluid (HF) | 1.9 | 0.79 | 0.76 | 1.03 |

* Amount of antigen inhibiting 50% of the binding of monoclonal antibody.

† I₅₀ with *S. japonicum* SEA / I₅₀ with other crude antigen tested (a value of 1.0 representing identity).

‡ No inhibition with 100 μg.

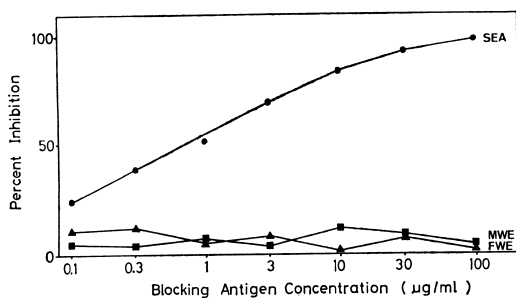


Fig. 1 Percent inhibition of binding of monoclonal antibody 2B8 to *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens (SEA) by *S. japonicum* adult male worm extracts (MWE) and adult female worm extracts (FWE) as compared with SEA.

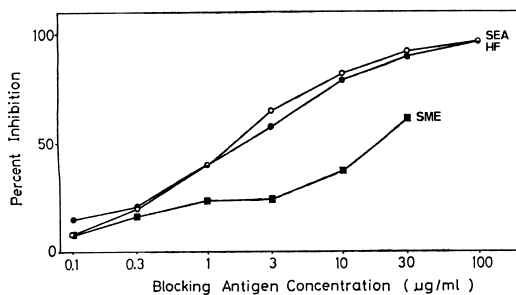


Fig. 2 Percent inhibition of binding of monoclonal antibody 2B8 to *S. japonicum* soluble egg antigens (SEA) by *S. japonicum* hatch fluid (HF) and soluble miracidium extracts (SME) as compared with SEA.

部位に多く含まれているかを調べるため、ミランジウム抗原と孵化液の阻害活性を比較した。その結果、2B8抗体と標的抗原の結合は孵化液によって完全に阻害され、その数値を線で表わした阻害曲線は虫卵抗原による阻害曲線とほぼ一致した (Fig. 2)。ミランジウム抗原による阻害では、Fig. 2 に示した如く、曲線は緩やかなスロープを描いたが、I₅₀は孵化液で1.9であったのに対し、ミランジウム抗原は17.5であった (Table 2)。この結果は、2B8抗体の標的抗原はミランジウム、孵化液双方に存在するが、より多く孵化液に存在することを示している。2C4抗体を用いた実験でも同様の傾向が認められた (Table 2)。

マンスン住血吸虫 (*Sm*) 由来の抗原による、モノクローナル抗体と *Sj* 虫卵抗原の結合に対する阻害

Sm の虫卵抗原および成虫抗原の阻害活性を *Sj* 虫卵抗原のそれと比較した。*Sm* の虫卵抗原が2B8、2C4それぞれの抗体と標的抗原との結合を阻害する値 I₅₀ は *Sj* 虫卵抗原で得られた値と近似し (Table 3)、阻害曲線のスロープもほぼ一致した (Fig. 3)。*Sm* 成虫抗原にもまた阻害活性が認められ、3 μg/ml 以上では *Sj* の虫卵抗原による曲線とほぼ平行して阻害率が上昇した (Table 3, Fig. 3)。これらのことから、*Sm* 虫卵には2B8、2C4の両抗体の標的抗原と同一かあるいは極めて類似した抗原決定基を有する成分が存在し、さらにこの交叉抗原は *Sm* 成虫にも含まれることが示された。

標的抗原の同定

2B8、2C4の両抗体が認識する *Sj* 虫卵中の標的抗原

Table 3 Species specificity of antigens recognized by monoclonal antibody 2B8 and 2C4: The ability of crude antigens from *S. mansoni* eggs and adults to inhibit the binding of monoclonal antibodies to *S. japonicum* SEA

| Crude Antigen | Monoclonal antibody 2B8 | | Monoclonal antibody 2C4 | |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|----------------|
| | I_{50} (μ g)* | I_{50} ratio† | I_{50} (μ g) | I_{50} ratio |
| <i>S. japonicum</i> SEA‡ | 0.70 | | 0.56 | |
| <i>S. mansoni</i> SEA | 1.0 | 0.7 | 0.58 | 0.97 |
| <i>S. mansoni</i> AWE§ | 13.0 | 0.05 | 16.0 | 0.04 |

* Amount of antigen inhibiting 50% of the binding of monoclonal antibody.

† I_{50} with *S. japonicum* SEA / I_{50} with other crude antigen tested (a value of 1.0 representing identity).

‡ SEA: Soluble egg antigens.

§ AWE: Adult worm extracts.

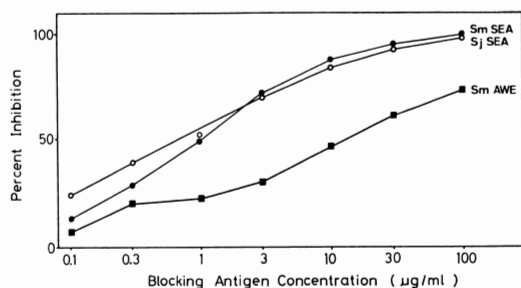


Fig. 3 Percent inhibition of binding of monoclonal antibody 2B8 to *S. japonicum* soluble egg antigens (*Sj* SEA) by *S. mansoni* soluble egg antigens (*Sm* SEA) and adult worm extracts (*Sm* AWE) as compared with *Sj* SEA.

の分子量を決定するため Western blot を行なったところ、Fig. 4 に示すように、感染血清による反応では多くのバンドが出現したが、2B8抗体と2C4抗体による反応では、それぞれ1本のバンドが観察された。同時に泳動したマーカータンパクとの比較により、2B8、2C4の両抗体の標的抗原の分子量は、いずれも、145,000 と算定された。

Sj 虫卵抗原および虫卵糖タンパク画分を SDS-スラブ電気泳動し、銀染色、PAS 染色したところ、分子量145,000 の位置に存在する成分は PAS 強陽性の糖タンパクであり、Con A 吸着性であることが明らかとなった (Fig. 5)。

Sm 虫卵による COP 反応

モノクローナル抗体と *Sj* の虫卵抗原との反応を阻害する、*Sm* 虫卵抗原中の成分が COP 反応に関与するか

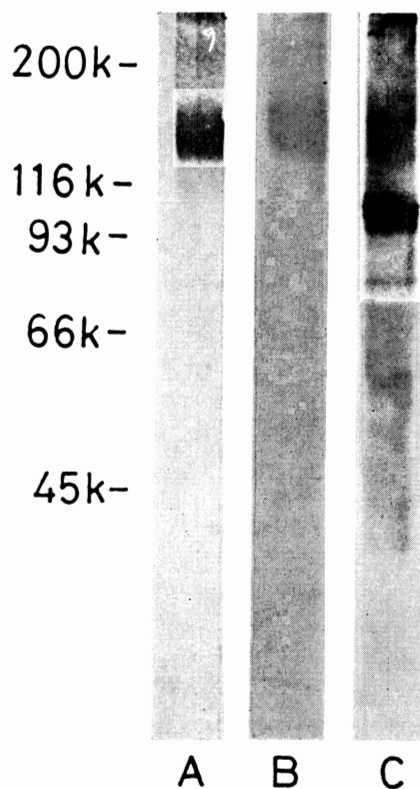


Fig. 4 Western blot analysis of *S. japonicum* egg antigens detected by monoclonal antibodies. (A) monoclonal antibody 2B8; (B) monoclonal antibody 2C4; (C) infected mouse serum.

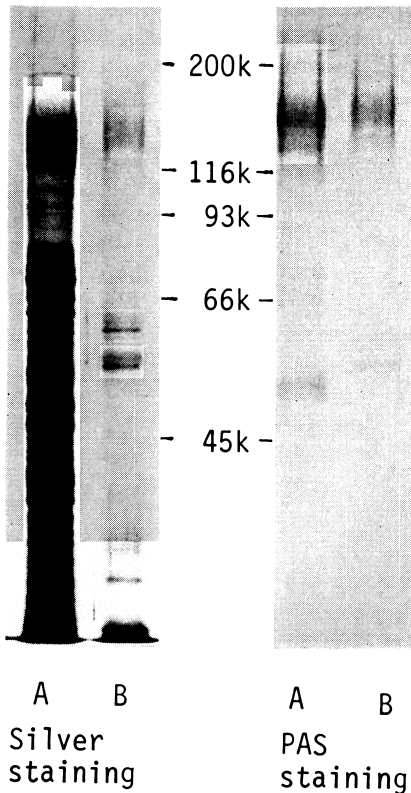


Fig. 5 SDS polyacrylamide gel electrophoretic analyses of *S. japonicum* soluble egg antigens (SEA) and egg glycoproteins. Egg glycoproteins were purified with Con A-Sepharose column. A, 33 μ g of SEA; B, 4.2 μ g of egg glycoproteins.

否かを調べるため、新鮮 *Sm* 虫卵を用いて COP 反応を行なった。反応24時間後には2B8, 2C4抗体とも陽性虫卵は認められなかったが、48時間後の観察ではいずれの反応液中にもI型の陽性虫卵が数%認められた (Table 4)。反応96時間後には、胞状の沈降物 (II型) が認められたが (Photo. 1B), 陽性虫卵率の著明な増加はなく、III型のCOP陽性卵は観察されなかった。*Sj* 虫卵に対しCOP陽性の1C3, 3D10抗体を同時に検査したところ、これらの反応液中にも、COP陽性の *Sm* 虫卵が認められた。

組織内虫卵における標的抗原の局在

Sj 感染マウス肝切片とモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法を行なった (Table 5)。その結果、いずれも、卵殻とミランジウムとの領域が、ミランジウム内部や、卵殻周囲の宿主組織よりも強い蛍光を発した。ミランジウム内での蛍光は、内部に一樣に認められるのではなく、限局された部位で認められる例が多く観察された。この部位は、ヘマトキシリン・エオジン染色した組織切片標本との比較から、ミランジウムの腺組織である穿刺腺に相当すると考えられた。

考 察

本研究で用いた1C3, 2B8, 2C4, 3D10の4種のモノクローナル抗体は日本住血吸虫 (*Sj*) の虫卵に対してI型およびII型の卵殻周囲沈降物を形成し、反応時間を延長すると、III型の沈降物も認められた。このうち、2B8, 2C4抗体についてIELISAを行なったところ、2B8, 2C4抗体と虫卵抗原との結合はいずれも雄成虫抗原や雌

Table 4 Circumoval precipitin (COP) reaction using monoclonal antibodies with eggs of *S. mansoni*

| Antibody | Percentage of egg positive in the COP reaction* | |
|-----------------------|---|-----------------|
| | 24-h incubation | 48-h incubation |
| Monoclonal antibodies | | |
| 1C3 | 0 | 3.1 |
| 2B8 | 0 | 2.4 |
| 2C4 | 0 | 1.2 |
| 3D10 | 0.6 | 2.8 |
| CAF† | 0 | 0 |
| Control mouse sera | | |
| Infected‡ | 4.7 | 3.5 |
| Normal | 0 | 0 |

* In the test, 116 to 317 eggs (mean of 172) were counted. Antibody dilution was 1/5 in PBS.

† CAF: Control ascites fluid.

‡ Sera from mice infected with *S. mansoni* for 9 weeks.

Table 5 Localization of antigens recognized by monoclonal antibodies in *S. japonicum* egg, present in cryostat section of mouse liver infected with *S. japonicum* by the indirect immunofluorescent technique

| Localization of antigen | Monoclonal antibody | | | |
|---------------------------------|---------------------|-----|-----|------|
| | 1C3 | 2B8 | 2C4 | 3D10 |
| miracidium | ++ | + | + | ++ |
| between miracidium and eggshell | ### | ++ | ++ | ### |
| around eggshell | ++ | ± | + | ++ |

Fluorescence intensity indicated for hybridoma culture supernatants concentrated tenfold: ±=weak fluorescence; +=moderate fluorescence; ++=strong fluorescence; ###=very strong fluorescence.

成虫抗原によって阻害されなかった。この結果は、2B8, 2C4抗体の標的抗原と共通した成分が *Sj* 成虫には存在しないことを示している。雌成虫はその体内にミラジウムまで発育していない未成熟の虫卵を内蔵することから、雌成虫抗原にはこうした虫卵由来の抗原も含まれていることが考えられる。従ってこの結果は同時に、標的抗原が、雌虫体内に内蔵されている未成熟の虫卵中にはまだ発現されておらず、産卵後の虫卵に発現される抗原であることを示唆している。2B8, 2C4抗体に認識される抗原については、これと共通の抗原性をもつ物質がマンソン住血吸虫 (*Sm*) の虫卵中に存在することが IELISA の結果から明らかになった。*Sm* 虫卵中のこの共通抗原もまた、COP 反応に関与する抗原であった。COP 反応において種特異性を示さないという本抗原の性質は、*Sm* の MSA₁ (Hillyer and Pelley, 1980) のそれに類似している。IELISA において、2B8, 2C4抗体と *Sj* 虫卵抗原との結合は *Sm* 成虫抗原によっても阻害されたが、それが *Sm* 成虫内の未成熟虫卵由来の抗原によるものか、*Sm* 成虫そのものに交叉抗原が存在するのか、その決定にはさらに検討を要する。

Sj の COP 関連抗原の性状については、COP 反応に用いる虫卵を熱処理してもその反応が認められること (Kamiya, 1980; Kawanaka *et al.*, 1983), 過ヨーン酸処理した虫卵切片を用いた蛍光抗体法では感染血清に対する抗原性が失われること (Kamiya and Kamiya, 1980) などから、糖タンパク質の関与が指摘されてきた。しかし、これを詳細に検討した報告は極めて少ない。Long *et al.* (1981b) は Con A-Sepharose カラムから α -メチルマンノシドで溶出される *Sj* の虫卵糖タンパク画分に COP 阻害活性を認め、これを分画して

COP 阻害活性成分・JAG II を得た。彼らは、JAG II は SDS-電気泳動で分子量 40,000~100,000 に広く拡散する “size disperse” な糖タンパクであったと報告している。今回用いられた 2B8, 2C4 抗体によって認識される COP 関連抗原は、分子量 145,000 の糖タンパク (以下、145 k 抗原) であった。これは、JAG II とは分子量や拡散性が異なる物質であり、本研究によって新たに *Sj* 虫卵中の COP 関連抗原の 1 つとして同定された。従って、Long *et al.* (1981a) や Hillyer and Rivera-Marrero (1980, 1982) が示唆した通り、COP 反応には複数の抗原が関与することが明らかとなった。

2B8, 2C4抗体のステージ特異性、種特異性は極めて類似した結果を示したが、これらのモノクローナル抗体が認識する 145 k 抗原分子上の抗原決定基が同一のものであるかどうかについては、さらに詳細な検討が必要である。Cruise *et al.* (1981) は *Sj* 虫卵に対する COP 反応で “bleb like” な沈降物を形成する 3 種のモノクローナル抗体を得て、これら 3 種はおそらく同一の抗原決定基を認識すると報告している。しかし、彼らは、それらのモノクローナル抗体の標的抗原の性状、特異性について報告していないので、今回示した 145 k 抗原との異同は明らかではない。

145 k 抗原の重要性は虫卵中の主要抗原との関連にあると考えられる。*Sj* の虫卵抗原には、感染慢性期になってはじめて抗原性を示す画分と、感染初期から抗原性を有している画分とが含まれていることがマウスの住血吸虫症において明らかにされているが (Carter and Colley, 1981; Kobayashi *et al.*, 1985b), このうち後者は、ヒト慢性住血吸虫症血清と反応する (Warren *et al.*, 1978) ことから注目される画分である。Carter

and Colley (1981) は, *Sj* 感染初期 (7 週目) マウス血清から精製した抗体を結合させたカラムを用いて, 虫卵抗原から分子量 130,000 の “7 week antigen” を単離した. 今回著者によって COP 関連抗原であることが同定された 145 k 抗原は, 彼らの報告した抗原と比較的近似した分子量を有していた. 糖タンパクはその糖鎖の性質により SDS-ポリアクリルアミドゲル内で変則的に挙動することから (Segrest *et al.*, 1971), SDS-電気泳動法による分子量は推定的なものであることを考慮しなくてはならないが, “7 week antigen” が孵化液中に主要に認められる成分であること (Kobayashi *et al.*, 1985a), およびその強い PAS 染色性から, 両抗原は同一物質であろうと考えられた.

Kamiya (1981) は, 虫卵と感染血清によって形成される沈降物が, 虫卵周囲ばかりでなく虫卵内にも形成されることを微分干渉顕微鏡を用いて観察している. 今回用いた孵化液は成熟虫卵のミラシジウムと卵黄膜の間に充満する液と考えられる. 従って, 孵化液によるモノクローナル抗体と虫卵抗原の結合に対する強い阻害は, 145 k 抗原がミラシジウムと卵殻との間に多量に存在することを示している. このことは, 間接蛍光抗体法によっても明らかにされた. 感染後, 宿主組織にトラップされた虫卵は, 成熟して 145 k 抗原を穿刺腺から分泌し, 145 k 抗原はまず卵黄膜との間に貯留され, 卵黄膜を, さらには卵殻の小孔 (Sakumoto *et al.*, 1972; Demaree and Hillyer, 1981) を通過して宿主組織内に浸潤すると考えられる. 従って, この抗原は宿主の虫卵に対する免疫応答, 特に虫卵性肉芽腫形成に主要な役割を果たしていると思われる. Tracy and Mahmoud (1982) は肺肉芽腫形成モデル実験によって, 肉芽腫形成を感作する活性をもつ *Sj* 虫卵中の抗原として, gp1 (分子量 138,000), gp2 (分子量 65,000) および gp3 (分子量 32,000~50,000) を同定したが, このうち gp1 は, 前述した “7 week antigen” 同様, その分子量および PAS 反応性が 145 k 抗原に類似することが今回明らかになった.

日本住血吸虫症における肉芽腫形成の過程は Manson 住血吸虫症における過程とは異なり (Warren *et al.*, 1975, 1978), その形成・退縮には体液性免疫も深く関わりとされている (Olds *et al.*, 1982). COP 陽性のモノクローナル抗体を用いて *Sj*, *Sm* の虫卵抗原を詳細に比較検討すれば, 両者の免疫病理学的相違点を解明し得るかもしれない. また, このようなモノクローナル抗体は, 日本住血吸虫症における病性の軽減, 治療並びに診断に貢献するものと思われる.

要 約

1. 日本住血吸虫の可溶性虫卵抗原 (SEA) を免疫したマウスの脾細胞と, マウスミエロマ細胞 NS-1 との細胞融合により, 日本住血吸虫卵に対して虫卵周囲沈降 (COP) 反応が陽性である 4 種のモノクローナル抗体—1C3 (IgM), 2B8 (IgG₁), 2C4 (IgG₃), 3D10 (IgM)—を作製した. これらのモノクローナル抗体と, 住血吸虫から調製した種々の抗原を用いて, inhibition ELISA, SDS-電気泳動, immunoblot 法等を行ない, 以下の結果を得た.

2. 2B8抗体あるいは2C4抗体によって認識される抗原は日本住血吸虫の成熟虫卵に含まれており, 虫卵内のミラシジウムと, 孵化液の双方に存在したが, より多く孵化液に含まれていた.

3. 2B8抗体あるいは2C4抗体と日本住血吸虫のSEAとの反応は, 同種の雄成虫抗原, 雌成虫抗原のいずれにも阻害されなかったが, マンソン住血吸虫のSEAに強く阻害された. また, マンソン住血吸虫の成虫抗原にも阻害活性が認められた.

4. 2B8抗体および2C4抗体が認識する日本住血吸虫卵中の抗原は, いずれも, 分子量 145,000 で, Con A 吸着性の糖タンパクであり, これまでに報告された病理関連抗原と同一物質であると考えられた.

5. 日本住血吸虫感染マウス肝切片を用いた蛍光抗体法では, モノクローナル抗体によって, ミラシジウムと卵殻の間が特に強い蛍光を発し, ミラシジウム内では局所的な蛍光が認められた.

謝 辞

稿を終るに臨み, 終始御懇切なる御指導を賜わった杏林大学医学部寄生虫学教室 飯島利彦教授, 森井勤助教授, ならびに, 浜松医科大学寄生虫学教室 佐野基人教授に深甚なる感謝の意を表します. また, マンソン住血吸虫を分与していただいた国立予防衛生研究所寄生虫部室長 川中正憲博士, 種々御協力いただいた杏林大学寄生虫学教室員の皆様へ感謝致します.

文 献

- 1) Abdel-Hafez, S. K., Phillips, S. M. and Zodda D. M. (1983): *Schistosoma mansoni*: Detection and characterization of antigens and antigenemia by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (IELISA). *Exp. Parasitol.*, 55, 219-232.

- 2) Abdel-Hafez, S. K., Phillips, S. M. and Zodda, D. M. (1984) : *Schistosoma mansoni* : Detection and characterization of schistosome derived antigens by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (IELISA) utilizing monoclonal antibodies. *Z. Parasitenkd.*, 70, 105-117.
- 3) Boros, D.L. and Warren, K.S. (1970) : Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.*, 132, 488-507.
- 4) Bradford, M.M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- 5) Carter, C.E. and Colley, D.G. (1979) : Partial purification and characterization of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen with Con A-Sepharose chromatography. *J. Immunol.*, 122, 2204-2209.
- 6) Carter, C.E. and Colley, D.G. (1981) : *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens : Separation by Con A chromatography and immunoaffinity purification. *Mol. Immunol.*, 18, 219-225.
- 7) Cruze, K. M., Mitchell, G. F., Tapales, F. P., García, E. G. and Sung-Ru, H. (1981) : Murine hybridoma-derived antibodies producing circumoval precipitation (COP) reactions with eggs of *Schistosoma japonicum*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 59, 503-514.
- 8) Demaree, R. and Hillyer, G. V. (1981) : *Schistosoma* species : Transmission electron microscopy of the circumoval immune precipitin reaction on eggs. *Exp. Parasitol.*, 52, 77-85.
- 9) Hillyer, G. V. and Pelley, R. P. (1980) : The major serological antigen (MSA₁) from *Schistosoma mansoni* eggs is a "circumoval" precipitinogen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 582-585.
- 10) Hillyer, G. V. and Rivera-Marrero, C. (1980) : Circumoval precipitin antigens for the diagnosis of schistosomiasis. I. Development of an antiserum reactive with *Schistosoma mansoni* eggs by the circumoval precipitin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 1249-1254.
- 11) Hillyer, G. V. and Rivera-Marrero, C. (1982) : Circumoval precipitin antigens for the diagnosis of schistosomiasis. II. Isolation of functional antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 785-789.
- 12) Hillyer, G. V., Ruiz Tiben, E., Knight, W. B., Gómez de Ríos, I. and Pelley, R. P. (1979) : Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni* : Comparison of ELISA, radioimmunoassay, and precipitation tests performed with antigens from eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28, 661-669.
- 13) Kamiya, H. (1980) : Influence of temperature on the antigenicity of *Schistosoma japonicum* lyophilized eggs for circumoval precipitin test (COPT). *Jpn. J. Vet. Res.* 28, 149-154.
- 14) Kamiya, H. (1981) : Technique of the intraoval precipitin (IOP) reaction by using formalin fixed tissue section for the diagnosis of schistosomiasis. *Jpn. J. Parasitol.*, 30, 161-165.
- 15) Kamiya, H. and Kamiya, M. (1980) : Preliminary application of a formalin fixed tissue section to the indirect fluorescent antibody test and intraoval precipitin reaction for the diagnosis of schistosomiasis japonica. *Jpn. J. Vet. Res.*, 28, 155-160.
- 16) Kawanaka, M., Hayashi, S. and Ohtomo, H. (1983) : Localization of antigen within eggs of *Schistosoma japonicum* that participate in circumoval precipitin (COP) reaction. *J. Parasitol.*, 69, 444-447.
- 17) Kobayashi, F., Iijima, T., Morii, T. and Matsui, T. (1985a) : Immunological and biochemical characterization of the antigens from hatch fluid of *Schistosoma japonicum* eggs. *Jpn. J. Parasitol.*, 34, 253-260.
- 18) Kobayashi, F., En, T., Morii, T., Matsui, T. and Iijima, T. (1985b) : Characterization of *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens by double immunodiffusion assay. *J. Kyorin Med. Soc.*, 16, 389-396.
- 19) Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature, London*, 227, 680-685.
- 20) Long, G. W., Lewert, R. M. and Pelley, R. P. (1981a) : Characterization of glycoprotein antigens which mediate the *Schistosoma japonicum* circumoval precipitin reaction. *Infect. Immun.*, 34, 389-396.
- 21) Long, G. W., Lewert, R. M. and Pelley, R. P. (1981b) : Fractionation of *Schistosoma japonicum* soluble egg antigen glycoproteins by hydrophobic interaction chromatography. *Infect. Immun.*, 34, 397-406.

- 22) Oakley, B. R., Kirsch, D. R. and Morris, N. R. (1980): A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105, 361-363.
- 23) Oi, V. T. and Herzenberg, L. A. (1980): Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. In *Selected Methods in Cellular Immunology*. ed. by Mishell, B. B. and Shijji, S. M., W. H. Freeman and Company, San Francisco, 351-372.
- 24) Olds, G. R., Olveda, R., Tracy, J. W. and Mahmoud, A. A. F. (1982): Adoptive transfer of modulation of granuloma formation and hepatosplenic disease in murine schistosomiasis japonica by serum from chronically infected animals. *J. Immunol.*, 128, 1391-1393.
- 25) Oliver-González, J. (1954): Anti-egg precipitins^e in serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.*, 95, 86-91.
- 26) Ouchterlony, Ö. and Nilsson, L.-Å. (1978): Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In *Handbook of Experimental Immunology*. Vol. 1. Immunochimistry, 3rd ed. by Weir, D. M., Blackwell Scientific Publications, Oxford, Chapter 19: 1-44.
- 27) Sakumoto, D., Tongu, Y., Suguri, S., Itano, D., Inatomi, S., Tanaka, H. and Matsuda, H. (1972): Ultrastructural observation of the circumoval precipitation of *Schistosoma japonicum*. In *Research in Filariasis and Schistosomiasis*, Vol. 1, ed. by Yokogawa, M., University Park Press, Baltimore, 199-209.
- 28) Segrest, J. P., Jackson, R. L., Andrews, E. P. and Marchesi, V. T. (1971): Human erythrocyte membrane glycoprotein: A re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 390-395.
- 29) Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- 30) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 4350-4354.
- 31) Tracy, J. W. and Mahmoud, A. A. F. (1982): Isolation of *Schistosoma japonicum* egg glycoprotein antigens which sensitize mice to lung granuloma formation and elicit an immediate hypersensitivity response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 1201-1212.
- 32) Voller, A., Bidwell, D. E. and Bartlett, A. (1976): Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Bull. W. H. O.*, 53, 55-65.
- 33) Warren, K. S., Boros, D. L., Hang, L. M. and Mahmoud, A. A. F. (1975): The *Schistosoma japonicum* egg granuloma. *Am. J. Pathol.*, 80, 279-293.
- 34) Warren, K. S., Grove, D. I. and Pelley, R. P. (1978): The *Schistosoma japonicum* egg granuloma. II. Cellular composition, granuloma size, and immunologic concomitants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27, 271-275.
- 35) 横川宗雄・佐野基人 (1966): 日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究 (2) Circumoval precipitation test (COPT) に使用する感染マウス臓器内虫卵の分離集卵法について. *寄生虫誌*, 15, 394-398.
- 36) 横川宗雄・佐野基人・荒木国興 (1967): 日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究 (3) Circumoval precipitation test (COPT) に関する研究. *寄生虫誌*, 16, 77-84.
- 37) Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. and Woodlock, J. J. (1969): Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 30, 148-152.

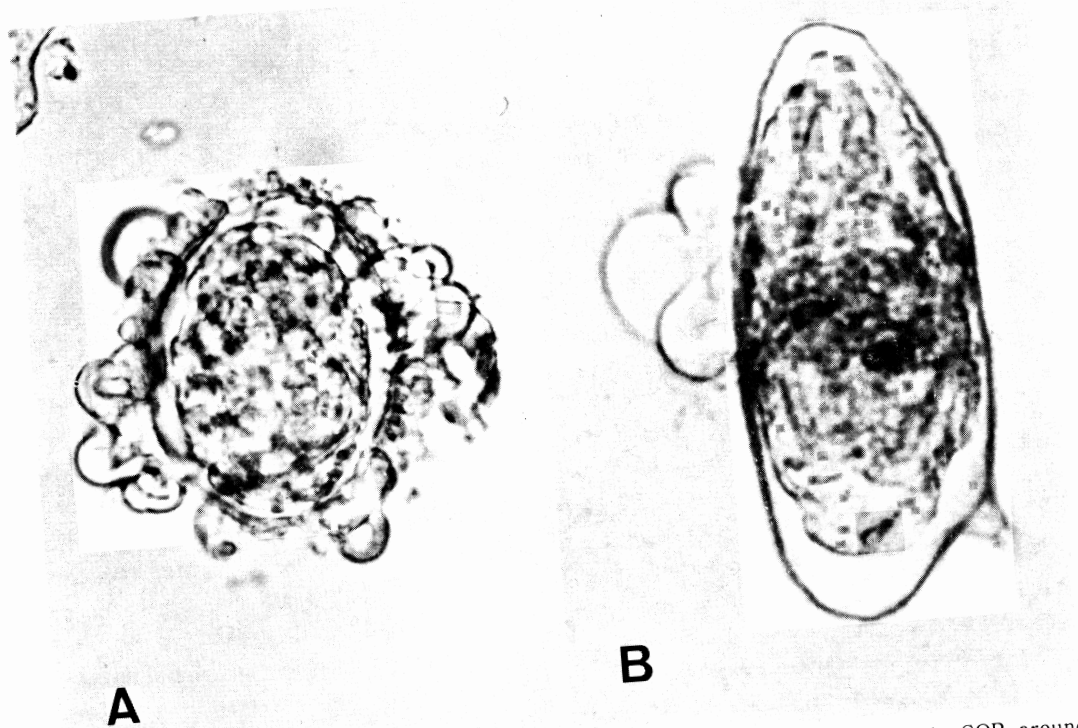


Photo. 1 Circumoval precipitates (COP) produced by monoclonal antibody 2B8. A. COP around *S. japonicum* eggshell after incubation for 96 hours at 37°C. B. COP around *S. mansoni* eggshell after incubation for 96 hours at 37°C.

Abstract

STUDIES ON THE *SCHISTOSOMA JAPONICUM* CIRCUMOVAL PRECIPITINOGEN
BY USING MONOCLONAL ANTIBODIES

FUMIE KOBAYASHI

(Department of Parasitology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo 181, Japan)

Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens (SEA) were prepared by the fusion of spleen cells of immunized mice with the murine myeloma NS-1 cells. Four monoclonal antibodies, which were designated 1C3 (IgM), 2B8 (IgG₁), 2C4 (IgG₃) and 3D10 (IgM), gave positive reactions with *S. japonicum* eggs in the circumoval precipitin (COP) tests. Inhibition enzyme-linked immunosorbent assays (IELISA) revealed that fluid from eggs hatched in tap water (hatch fluid) contained considerable amount of antigen recognized by 2B8 or 2C4. The egg antigen recognized by 2B8 or 2C4 was different from adult worm antigens, since its binding to each monoclonal antibody was not inhibited by adult worm antigens. With regard to species specificity, the egg antigens recognized by 2B8 or 2C4 strongly cross-reacted with SEA from *S. mansoni*, whereas adult worm antigens from *S. mansoni* showed partial cross reactivity. The molecular weight of the antigen recognized by 2B8 or 2C4 was 145,000. This antigen, designated 145k antigen, was a strongly PAS-reactive glycoprotein from eggs of *S. japonicum* and bound to concanavalin A. The 145k antigen was considered to be identical to an immunopathologically active egg antigen. Four monoclonal antibodies also showed COP reactions with *S. mansoni* eggs. In the immunofluorescent study using each of four monoclonal antibodies, the area between the miracidium and the eggshell showed stronger stainability than miracidium or the circum-oval space. In the miracidium, the antigens were localized in the limited portion.