

小形条虫の抗原性物質に関する研究

I. 遅延型過敏症誘導抗原の解析

村松邦彦・浅野和仁・岡本謙一

(平成元年12月6日掲載決定)

要 約

50個の小形条虫虫卵をBALB/c系雄マウスに経口投与, その5日後に感作腸間膜リンパ節細胞を採取した。この感作細胞 2×10^7 個を小形条虫虫卵抗原, 同頭節抗原あるいは牛血清 γ グロブリンと共に同系正常マウスの足蹠皮内に注射, 足蹠の厚さの変化を調べた。得られた結果は以下の通りである。

- 1) 感作細胞をPBS可溶性虫卵抗原と共に注射したマウスの足蹠では, 著明な足蹠の厚さの増加が観察された。ところが, PBS不溶性抗原, 頭節抗原あるいは牛血清 γ グロブリンと共に感作細胞をマウスの足蹠皮内に注射しても有意な足蹠の厚さの増加は観察されなかった。
- 2) PBS可溶性虫卵抗原をセルロフィンGCL-2000でゲル濾過したところ, 推定分子量18万, 5万, 2.5万のところにピークのある3つの分画に分かれた。
- 3) 感作細胞を分画抗原と共にマウスの足蹠皮内に注射, 足蹠の厚さの変化を観察したところ, 推定分子量18万にピークのある分画抗原と共に感作細胞を注射したマウスの足蹠では, 著明な足蹠の厚さの増加が観察された。ところが, 他の2つの分画抗原と共に感作細胞をマウスの足蹠皮内に注射しても著明な変化は認められなかった。

Key words: *Hymenolepis nana*, mouse, footpad, delayed type hypersensitivity, soluble egg antigen

結 言

小形条虫虫卵はマウスに対する抗原性が強く, 同虫卵の経口投与を受けたマウスでは, その後比較的早期から腸間膜リンパ節細胞(以下MLNCとする)主導型の細胞性免疫応答が誘導される(浅野ら, 1982; Asano *et al.*, 1986)。

近年著者らは, 小形条虫虫卵経口投与マウスから採取したMLNCと虫卵抽出液を*in vitro*において混合培養すると, 当該細胞の芽球化が促進される(岡本ら, 1986)と共にその培養上清中にはインターロイキン2, マクロファージ活性化因子等のリンフォカインが産生・放出されていることを報告した(Asano *et al.*, 1990印刷中)。さらに, 虫卵抽出液にMLNCを浮遊させ, 正常マウスの足蹠皮内に注射すると細胞性免疫の代表的なもの1つである遅延型過敏症(以下DTHとする)が当該マウスの足蹠において観察されることをも報告した(浅野ら, 1987)。これらの報告は, 小形条虫感染マウスから採取したMLNCが虫卵抽出液に含まれているある種の抗原を認識し, その結果, MLNCの芽球化が促進されたり, DTHが惹起されていることを示唆するものと考えられる。しかしながら, 上記反応の発現に寄与している

抗原性物質の性質に関しては不明な点が多い。

今回, 上述したようなDTHの発現に寄与している抗原の性質について, その特異性も含め, いくつかの解析を試みたので報告する。

材料と方法

実験動物

本実験で使用したマウスは, 当教室で継代している5週令のBALB/c系雄マウスであった。使用したマウスの数は, 細胞の供与者として1群10匹, 同受容者として1群5匹であった。抗原の抽出, マウスの感作に用いた寄生虫は当教室で維持している小形条虫であった。

マウスの感作方法と細胞浮遊液の調整

50個の小形条虫脱殻卵(Berntzen and Voge, 1965)をマウスに経口投与し, 感作した。対照として用いた牛血清 γ グロブリン(以下BGGとする; Miles Scie., Inc.)によるマウスの感作は, Schields-Parrot (1985)の方法に準じて行った。

小形条虫脱殻卵を経口投与したマウスは投与後5日目に, BGGで感作したマウスはBGG注射後7日目にそれらを殺し, 前報(浅野ら, 1982; Asano *et al.*, 1986)の方法に準じて, それぞれのマウスから感作MLNC浮遊液を作製した。また, 未感作マウスからも上記と同様に

MLNC 浮遊液を作製した。細胞濃度は Medium 199 (日本製薬) 1 ml 当り 40×10^7 個であった。

小形条虫抗原の調整

本実験では、4種類の小形条虫抗原を使用した。すなわち、未熟体節を含む頭節(以下頭節とする)から抽出した0.05 M PBS(以下PBSとする)可溶性抗原と同不溶性抗原、そして受精卵から集めた虫卵抽出PBS可溶性抗原と同不溶性抗原である。頭節抗原の作製方法は次の様であった。虫卵投与後マウスをエーテル麻酔によって殺し、その腸管から成虫体を採取、頭節を切断し氷冷したPBS中に採集した。これらの頭節を氷冷下で超音波破壊(60ワット、1時間)後、16000gで1時間遠心(4℃)した。次に上清の蛋白量をLowry *et al.* (1951)の方法に準じて測定、PBS 1 ml 当り2mgになるように調整後0.45 μ mのミリポアフィルター(Nihon Millipore Kogyo k. k.)で濾過滅菌しPBS可溶性頭節抗原(Soluble Scolex Antigen, 以下SSAとする)とした。PBS不溶性頭節抗原(Unsoluble Scolex Antigen, 以下USAとする)は、上清を採取した後沈渣を滅菌したPBSで3回遠心洗浄(16000g, 1時間, 4℃)して得られたものをSSAと同量のPBSに懸濁させたものである。PBS可溶性虫卵抗原(Soluble Egg Antigen, 以下SEAとする)と同不溶性抗原(Unsoluble Egg Antigen, 以下UEAとする)の作製方法は、頭節抗原のそれと同様であった。SEAの蛋白量は2mg/mlあるいは4mg/mlであった。これらの抗原は滅菌後1時間以内に実験に使用した。

抗原のゲル濾過法

0.01MのPBSで数回遠心洗浄(600g, 10分間, 室温)したセルロファイブGCL-2000(生化学工業)を高さ45cmになるように直径2cmのガラス管に充填し、分画用カラムとした。このカラムに蛋白量4mg/mlのSEA 1mlを重層し、0.01M PBSを用いて7ml/hrの流速で抗原の分画を行った。溶出分画を3mlずつ分取、280nmにおける吸光度を測定して流出蛋白量の分布を調べた。次に、各分画をミニコンB-15(Cut off point 1万ダルトン, Amicon Corp.)を用いて2mlに濃縮、滅菌後直ちに実験に用いた。分画抗原の分子量推定には、Blue Dextran 2000, Ovalbumine, Chymotrypsinogen A, Cytochrome C (Boehringer Mannheim)の標準品を指標とした。

MLNCの皮内注射と足蹠反応の測定

上記の方法で調整したMLNC浮遊液を200gで10分間遠心し、上清を可能な限り除去した。次に、細胞をその濃度が1ml当り 40×10^7 個になるように前述した抗原液あるいはPBS中に再度浮遊させた。正常マウスの右後肢皮内にPBS中に浮遊させたMLNCを、同マウス左後肢皮内には抗原液に浮遊させたMLNCを、それぞれ50 μ l

ずつ注射した。

これらの皮内注射後24時間目に Dial Thickness Gauge (尾崎産業)を用いて両足の足蹠の厚さを1匹のマウスにつき3回ずつ測定、得られた値を平均し、下記の式により足蹠の厚さの増加率を計算した。

増加率(%) = {(左足蹠の厚さ - 右足蹠の厚さ) ÷ 右足蹠の厚さ} × 100。

統計処理

統計的有意差の検定には Student's *t* test を用いた。

結果

実験 I

本実験では、小形条虫虫卵またBGGによって感作した2群のマウスから得た感作MLNCを小形条虫抗原液あるいは100 μ g/mlのBGG液に浮遊させ、正常マウスの足蹠皮内に注射、足蹠の厚さの変化を調べた。

正常MLNCを注射した被検マウスでは、同細胞を浮遊させる抗原液の種類を変えても、著明な足蹠の厚さの増加は観察されなかった。

BGG感作マウスのMLNCを皮内注射した被検マウスでは、その細胞をBGG液に浮遊させた場合にのみ著明な足蹠の厚さの増加が観察された(Table 1)。

50個の虫卵を経口投与したマウスのMLNCを皮内注射した被検マウスでは、その細胞をSEAに浮遊させて注射した場合に極めて著明な足蹠の厚さの増加が観察されたが、当該MLNCをBGG, UEA, SSAあるいはUSAと共に被検マウスの皮内に注射しても著明な足蹠の厚さの増加は観察されなかった(Table 1)。また、この結果は再度繰り返した実験でも確認された。

実験 II

本実験では、マウスの足蹠の厚さの増加に寄与しているSEAの分子量の推定を行った。まず、セルロファイブGCL-2000を用いてSEAのゲル濾過を行ったところ、Fig. 1に示したようにSEAは推定分子量18万、5万さらに2.5万のところにピークをもつ3つの分画に分けることができた。同じ実験を3回繰り返したが、いずれの場合もFig. 1と同様の分画パターンであった。

次に、それぞれの分画に虫卵経口投与マウスから採取したMLNCを浮遊させ、被検マウスの足蹠皮内に注射、足蹠の厚さの変化を調べた。

分子量18万のところにピークを示した分画抗原液(Fraction 1と表示)にMLNCを浮遊させ、被検マウスの皮内に注射したところ、著明な足蹠の厚さの増加が観察され、その増加率は対照マウス(Unfractionatedと表示)で観察されたそれと大差がなかった($P < .05$)。ところが、分子量5万(Fraction 2と表示)、2.5万(Fraction 3と表示)のところにピークを示した分画抗原に

Table 1 Induction of footpad swelling by intradermal injection of 2×10^7 MLNC together with various type of antigens

| Treatment of donor mice | % increase in footpad thickness (mean of five mice \pm SD) | | | | |
|------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|---------------|
| | BGG | SEA | UEA | SSA | USA |
| None | 6.1 \pm 2.9 | 9.7 \pm 3.3 | 9.3 \pm 5.6 | 7.1 \pm 3.7 | 7.0 \pm 3.7 |
| BGG/CFA, i.p.* | 28.9 \pm 3.6 | 7.8 \pm 2.5 | — | 3.9 \pm 1.2 | — |
| 50 <i>H. nana</i> eggs, p.o. | 5.8 \pm 2.4 | 40.0 \pm 5.2 | 15.5 \pm 4.3 | 6.9 \pm 1.4 | 9.4 \pm 3.7 |

*: BALB/c mice were immunized i.p. by the injection with 100 μ g of BGG emulsified in CFA in a volume of 0.1 ml.

Abbreviations: BGG, Bovine- γ -Globuline; SEA, Soluble Egg Antigen; UEA, Unsoluble Egg Antigen; SSA, Soluble Scolex Antigen; USA, Unsoluble Scolex Antigen; CFA, Complete Freund's Adjuvant; i.p., intraperitoneally; p.o., *per os*

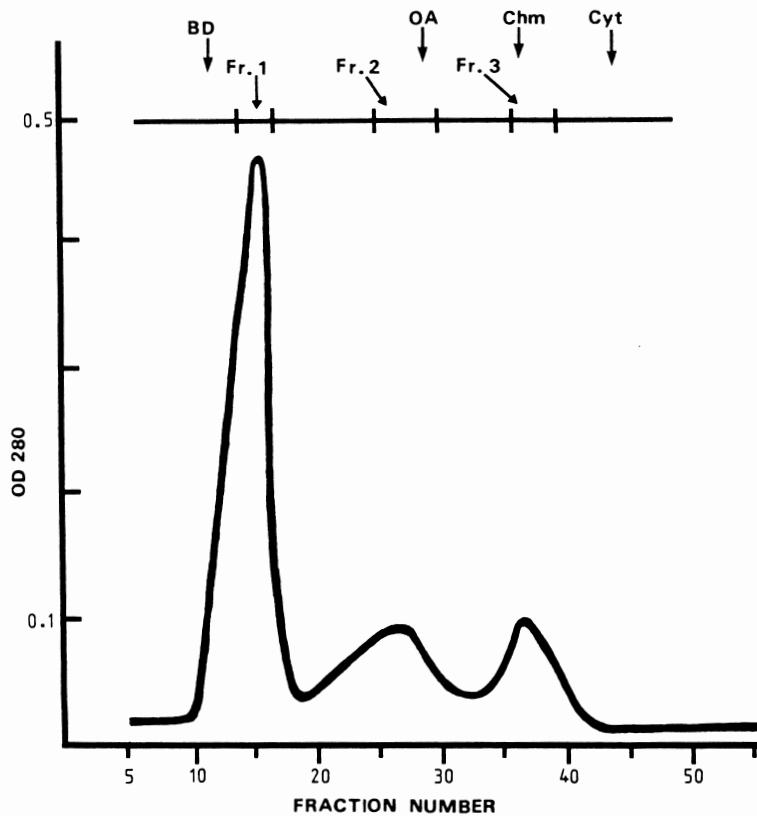


Fig. 1. Gel filtration of *H. nana* soluble egg antigen on a Cellulofine GCL-2000 column. The flow rate was 7.0 ml/hr and the fraction size was 3 ml. Each fraction was concentrated into 2 ml and then sterilized by passing through Millipore membrane 0.45 μ m. Fr., Fraction; BD, Blue Dextran; Chm, Chymotrypsinogen A; OA, Ovalbumin; Cyt, Cytochrom C; OD 280, Optical Density at 280 nm.

Table 2 Ability of the fractionated antigen of *Hymenolepis nana* eggs to provoke the footpad swelling in normal mice

| MLNC suspended in | mol. wt. | % increase in footpad thickness (mean \pm SD) |
|-------------------|----------------------|---|
| Unfractionated | — | 38.1 \pm 1.5 |
| Fraction 1 | c. 18×10^4 | 36.2 \pm 2.6 |
| Fraction 2 | c. 5×10^4 | 6.8 \pm 1.2 |
| Fraction 3 | c. 2.5×10^4 | 17.9 \pm 3.8 |

Mean values based on five mice per group.

Student's *t* test.

Unfractionated vs Fraction 1 P = Not Significant

MLNCを浮遊させ、被検マウスの皮内に注射しても、著明な足蹠の厚さの増加は観察されず、その値はFraction 1の増加率より有意に小さかった ($P < .05$)。また、別に分画した抗原を使って同じ実験を再度繰り返したところ、上記と同様の結果が得られた。

考 察

小形条虫虫卵の経口投与を受けたマウスでは、その後非常に強力な細胞性免疫応答が発現してくる (Okamoto, 1968; Okamoto and Koizumi, 1972)。著者らは、これまでに本反応を再感染防御免疫として捉え、免疫細胞学的に解析し、防御免疫の発現には腸間膜リンパ節内の細胞、とりわけLyt-1抗原陽性T細胞が関与していることを報告した (浅野ら, 1982; Asano *et al.*, 1986)。さらに、著者らは小形条虫感染マウスから採取したMLNCの活性化を³H-thymidineの取り込みを指標にして調べ、虫卵の経口投与によって当該細胞の急激な活性化 (取り込みの増加) が起きることを報告 (Asano *et al.*, 1988) すると共に、その活性化は、主にIa抗原は陰性であるがLyt-1抗原は陽性なT細胞によっていることを観察した (浅野ら, 未発表)。

Vadas *et al.* (1976) はマウスのT細胞をLyt-1抗原並びにIa抗原によって分類し、液性抗体の産生に対して補助的に作用する細胞 (Helper T細胞) はLyt-1抗原, Ia抗原共に陽性であるが、DTHの発現に関与している細胞 (DTH effector T細胞) は、Lyt-1抗原は陽性であるがIa抗原は陰性であることを報告している。従って、これらの報告からマウスに小形条虫虫卵を経口投与すると、その虫卵由来の抗原がDTHの発現に関与している細胞に作用し、その細胞の活性化をもたらしている可能性が推察される。そこで今回、感作MLNCの局所移行という方法を用いて小形条虫感染マウスにおいてDTHが成立しているか否かを調べた。

本実験の結果 (Table 1) から、小形条虫虫卵経口投与マウスMLNCをSEAと共に正常マウスの足蹠皮内に注射すると極めて著明な足蹠の厚さの増加が起きることが明らかになった。また、虫卵投与マウスMLNCをBGG, UEA, SSA, さらにはUSAの各抗原と共に注射した場合の足蹠の厚さの増加率は、陰性対照 (未感作) マウスMLNCの注射によって惹起されたそれと大差がないこと、BGG免疫マウス (陽性の対照) MLNCはその細胞をBGGと共に皮内注射した場合のみ著明な足蹠の厚さの増加をもたらすことから、ここに示した足蹠反応はSEAに対して特異的なものであることが推察される。

次に、SEAをゲル濾過によって分画し、足蹠の厚さの増加に寄与している抗原の分子量の推定を行ったところ、推定分子量18万の抗原と共にMLNCを皮内注射したマウスでは極めて著明な足蹠の厚さの増加が観察された。このことは、小形条虫虫卵投与マウスのMLNCがSEA中の推定分子量18万の抗原に対して反応し、足蹠の厚さの増加をもたらしていることを示している。

マウスにおけるDTH成立の可否の判定は、感作抗原を塗布した耳朶や皮内注射した足蹠の厚さを測定する方法 (Clark and Azar, 1977; Ruddle, 1978; Schields and Parrot, 1985) によって行なわれている。従って、ここに示した結果は、小形条虫虫卵のマウスへの経口投与は当該マウスの腸間膜リンパ節中にDTHを惹起し得る性質をもった細胞の出現を誘導することを明示すると共に、DTHの発現に寄与して抗原は分子量18万の虫卵由来物質であることを示唆している。

DTHは、一般的には免疫応答に基づく特異的な炎症反応として理解され、その発現には感作T細胞が対応抗原と会合して産生するインターロイキン2, マクロファージ活性化因子等の液性因子、所謂リンフォカインが重要な役割をはたしているとされている (Prystewsky *et al.*, 1982)。また、当該炎症部位を組織学的に観察すると、単核球を主体とした著明な細胞浸潤が認められることも報告されている (Cooper, 1972)。一方、著者らはすでに、小形条虫感染マウスのMLNCと虫卵抽出PBS可溶性抗原を*in vitro*において混合培養すると、その上清中にはインターロイキン2やマクロファージ活性化因子等が産生・放出されること、*in vitro*においてリンフォカインを産生し得るMLNCをヌードマウスに静注するとそのマウスの感染が完全に阻止されることを報告した (Asano *et al.*, 1990印刷中)。また、小形条虫再感染マウスの小腸を組織学的に観察すると、腸絨毛内に侵入した幼虫の周囲には細胞浸潤を伴った著明な炎症反応が認められるとされている (Miyazato *et al.*, 1979)。従って、これらの報告から、小形条虫再感染虫体のマウス腸管からの排除 (感染の防御) と本論文で示したDTHとは相互に関係し合っている可能性が推察されるが、この点

に関しては今後更に詳細な検討が必要であろう。

文 献

- 1) 浅野和仁・中村文規・岡本謙一 (1982) : 小形条虫に対する宿主マウスの感染阻止能のヌードマウスへの移入 (Passive transfer) とその免疫細胞学的検討。寄生虫誌, 31, 391-400.
- 2) Asano, K., Shinoda, M., Nakamura, F. and Okamoto, K. (1986): *Hymenolepis nana*: Passive transfer of mouse immunity by T-cell subset of phenotype Lyt-1. Exp. Parasitol., 61, 373-378.
- 3) 浅野和仁・篠田みゆき・岡本謙一 (1987) : 小形条虫に対する宿主の感染阻止能に関する研究。6) 感染阻止能と遅延型過敏症。寄生虫誌, 36 (増), 48.
- 4) Asano, K., Shinoda, M. and Okamoto, K. (1988): Protective immunity to *Hymenolepis nana* in mice. II. Actively dividing mesenteric lymph node cells are responsible for transfer of immunity to *Hymenolepis nana* in nude mice. Jpn. J. Parasitol., 37, 51-55.
- 5) Asano, K., Muramatsu, K. and Okamoto, K. (1990): Protective activity of secondary effector lymphocytes generated *in vitro* to *Hymenolepis nana* infection *in vivo* and an assay for *in vitro* lymphocyte proliferation. Jpn. J. Parasitol., 39, (印刷中).
- 6) Berntzen, A. K. and Voge, M. (1965): *In vitro* hatching of oncospheres of four hymenolepidid cestodes. J. Parasitol., 51, 235-242.
- 7) Clark, C. and Azar, M. M. (1977): Comparison of murine delayed hypersensitivity reactions elicited with particle-associated versus human- γ -globulin. Int. Archs. Allergy appl. Immunol., 54, 143-150.
- 8) Cooper, M. G. (1972): Delayed-type hypersensitivity in the mouse. I. Induction and elicitation by *Salmonella adelaide* flagellin and its derivatives. Scand. J. Immunol., 1, 167-178.
- 9) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 10) Miyazato, T., Furukawa, T. and Inoue, T. (1979): Intestinal pathology associated with primary and secondary infections of *Hymenolepis nana* in mice. Jpn. J. Parasitol., 28, 185-196.
- 11) Okamoto, K. (1968): Effect of neonatal thymectomy on acquired resistance to *Hymenolepis nana* in mice. Jpn. J. Parasitol., 17, 53-59.
- 12) Okamoto, K. and Koizumi, M. (1972): *Hymenolepis nana*: Effect of anti-thymocyte serum on acquired immunity in mice. Exp. Parasitol., 32, 56-61.
- 13) 岡本謙一・浅野和仁・篠田みゆき・中村文規 (1986) : 小形条虫に対する宿主の感染阻止能の研究。5) 虫卵抽出抗原に対する感作腸間膜リンパ節細胞の反応。寄生虫誌, 35 (増), 61.
- 14) Prystewsky, M. B., Ely, J. M., Beller, D. I., Eisenberg, L., Goldman, J., Goldman, M., Goldwasser, E., Ihle, J., Quintans, J., Remold, H., Vogel, S. N. and Fitch, F. W. (1982): Alloreactive cloned T cell lines. VI. Multiple lymphokine activities secreted by helper and cytolytic cloned T lymphocytes. J. Immunol., 129, 2337-2344.
- 15) Ruddle, N. H. (1978): Delayed hypersensitivity to soluble antigens in mice. Int. Archs. Allergy appl. Immunol., 57, 560-566.
- 16) Schields, J. G. and Parrot, D. M. V. (1985): Appearance of delayed-type hypersensitivity effector cells in murine gut mucosa. Immunol., 54, 771-776.
- 17) Vadas, M. A., Miller, J. F. A. P., Mckenzie, I. F. C., Chism, S. E., Shen, F. W., Boyse, E. A., Gamble, J. R. and Whitelaw, A. M. (1976): Ly and Ia antigen phenotypes of T cells involved in delayed-type hypersensitivity and in suppression. J. Exp. Med., 144, 10-19.

Abstract

STUDIES ON THE ANTIGENIC ANALYSIS OF *HYMENOLEPIS NANA*.
I. OBSERVATIONS ON CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE
AGAINST FRACTIONATED EGG ANTIGEN

KUNIHICO MURAMATSU, KAZUHITO ASANO AND KEN-ICHI OKAMOTO

(Department of Medical Biology, School of Medicine, Showa University,
Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan)

We examined whether oral administration with *Hymenolepis nana* eggs could induce delayed type hypersensitivity (DTH) in mice by using local transfer technique of DTH. Mesenteric lymph node cells (MLNC) were prepared from BALB/c mice sensitized with *H. nana* eggs 5 days before cell collection. *H. nana* antigens used were prepared from eggs and scolices, respectively. Aliquotes of 2×10^7 MLNC were injected with *H. nana* antigens into hind footpads of syngeneic recipients. DTH was assessed by the degree of footpad swelling. The degree of swelling was measured at 24 hr after cell injection. MLNC could transfer DTH only when injected with soluble egg antigen, and the response produced was significantly greater than that produced when MLNC were injected with either insoluble egg antigen, soluble scolex antigen or insoluble scolex antigen. The soluble egg antigen was chromatographed on Cellulofine GCL-2000 and eluted column fractions were tested for their ability to induce DTH. One main peak (Fraction 1; molecular weight 180,000) and two small peaks (Fraction 2; molecular weight 50,000; Fraction 3; molecular weight 25,000) were eluted. Each fraction was injected intradermally into the footpads of recipient mice together with sensitized MLNC. The most potent stimulator of DTH was Fraction 1, followed by Fraction 3. Fraction 2 had little activity.