

## 旋毛虫筋肉幼虫クチクラ抗原の分析 クチクラの発育段階に特異的な抗原性

水野直人・宇野貴子・鈴木秀和・徳田千代吉・高橋優三・荒木恒治

(平成元年12月25日掲載決定)

### 要 約

旋毛虫筋肉幼虫クチクラよりデオキシコール酸処理にて抽出したクチクラ可溶性抗原を Fischer 系ラットに免疫し、抗クチクラ抗体を得た。この抗体の旋毛虫各期虫体クチクラに対する反応性を免疫電顕法により検討した。その結果、抗クチクラ抗体は、筋肉幼虫に対してはクチクラ内層と強い反応を示した外、角皮下層、体腔液、側索などとの間にも反応が認められた。一方、この抗クチクラ抗体を成虫および胎内幼虫に対して反応させたところ、角皮下層、体腔液などに反応が認められるものの、クチクラ内層とは反応が確認されなかった。これより各期クチクラ内層の抗原性に差異があることが明らかになり、クチクラ表面のみならず、クチクラ内層にも発育段階に特異的な抗原が存在することが証明された。

**Key words:** *Trichinella spiralis*, cuticle inner layer, immunocytochemistry, antigen, stage-specificity, sodium deoxycholate

### 緒 言

線虫の虫体表面に存在するクチクラは角皮下層 (hypodermis) と呼ばれる薄い一層の細胞に支持される細胞外物質である (Vilella, 1970)。クチクラの主な成分はコラーゲン様物質 (Lee, 1966) といわれており、また、その主な機能は虫体の外部刺激からの保護と虫体成分漏出防止であると考えられている。

旋毛虫のクチクラは光顕的には特異な構造を欠如する均一に近い物質である (Takahashi *et al.*, 1987, 1988 b) が、電顕的には、表面に存在する epicuticle を含め、数層の層構造を示す (Beckett and Boothroyd, 1961; Bruce, 1970; Bird, 1980; Wright, 1987)。旋毛虫は生活史の中で数回脱皮し、この際、外側のクチクラが離脱し、内側のクチクラが虫体表面に出現する (Bruce, 1970)。

旋毛虫のクチクラには強い抗原性を示す物質が存在することが免疫組織化学的および免疫化学的に確認されているが、虫体表面に存在するクチクラが抗原性を有することは感染防御上重要であり、クチクラ抗原については数多くの研究がなされてきた。その結果、クチクラには、各発育段階に特異的な抗原 (Mackenzie *et al.*, 1978; Philipp *et al.*, 1980, 1981; Jungery *et al.*, 1983; Almond *et al.*, 1986) や、他の多くの寄生虫抗原と交差反応を生ずる非特異的な抗原 (Takahashi *et al.*, 1988 a) が存在することが明らかになった。

著者らは、旋毛虫感染ラットまたは感染ヒト血清を用

いた免疫電顕法によりクチクラに強い抗原性があることを報告した (Takahashi *et al.*, 1988 a, 1988 c, 1989 a) が、本報では、動物感染により容易にかつ多量に集められる点で、免疫診断用抗原および防御免疫源として実用性の高い筋肉幼虫抗原のうち、クチクラより抽出した可溶性抗原の発育段階に特異的な抗原性について免疫電顕法により検討した。

### 材料及び方法

#### 1. 旋毛虫 (Polish isolate)

本研究では、弘前大学医学部寄生虫学教室山口富雄名誉教授より供与され、継代された *Trichinella spiralis* のポーランド分離株を用いた。

筋肉幼虫は、感染後3ヶ月経過したICRマウスの筋肉より通常の pepsin-HCl 消化法にて集めた。成虫は、感染6日後のマウス腸管より集めた。すなわち、ICRマウスに筋肉幼虫300隻を経口投与し、6日後にマウス腸管を取り出し、生食加磷酸緩衝液 (PBS) 中で37℃、30~60分間放置、遊出した成虫を採集した。

#### 2. 筋肉幼虫クチクラ可溶性抗原の作製

##### 1) クチクラ分画の調製

筋肉幼虫を、超音波破砕機 (20KHz, UR-200P, TOMY SEIKO Co., Ltd. Tokyo, Japan.) にて4℃で20分間破砕、PBS 中にて4℃で一晩攪拌した後、10,000 rpm で20分間遠心した。沈渣を回収し、PBS 中で充分攪拌後、1000 rpm, 3分間遠心し、PBS 可溶性成分を除去した。このPBS洗浄を3回繰り返した沈渣をクチクラ分画とした。また、各洗浄上清を pH 3.5~9.5 のアンホライン

を含む5%ポリアクリルアミドゲル (LKB Ampholine PAG plates No. 1804-101, LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden) にて等電点電気泳動後, Coomassie brilliant blue R で染色し, クチクラ分画の純度を生化学的に検定した。これと共に, クチクラ分画の一部より透過型電顕用標本を作製し, クチクラ分画の純度を形態的に検定した。

## 2) クチクラ抽出物抗原の抽出

クチクラ成分の可溶化は Parkhouse et al (1981) の方法を改変して行った。すなわち, 上記の方法にて集めたクチクラ分画を10%デオキシコール酸ナトリウム加トリス緩衝液 (pH 8.0) 中でホモゲナイズし, さらに, 氷中で20分間放置したものを, 4℃, 25,000g, 30分間遠心分離した。上清をトリス緩衝液 (pH 8.0) および蒸留水に透析後, 凍結乾燥してクチクラ抽出物抗原とした。

## 3. クチクラ抽出物抗原免疫ラット血清

クチクラ抽出物抗原 1mg/ml をフロインド完全アジュバントと共に, Fischer 系ラット (3週齢, 雄) の背部皮下に接種, これを1週間間隔で3度行い, 初回接種後4週目に心臓採血し, その血清をクチクラ抽出物抗原免疫ラット血清として実験に供した。

## 4. プロテインA-金コロイド複合体の作製

### 1) 金コロイドの作製

Slot and Geuze (1985) の方法により金コロイドを作製した。すなわち, 2%塩化金溶液 (NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan.) 1ml 及び再蒸留水159ml を三角フラスコに入れ, 60℃の恒温槽で攪拌した。さらに, 1%クエン酸ナトリウム 9ml と再蒸留水31ml の混合液を加えて約2時間60℃の恒温槽内で攪拌した。溶液の色調が赤色に変化したところで, 直ちに加熱し, 2~3分間煮沸させ, 粒子の直径15nm の金コロイド溶液を得た。

### 2) プロテインA-金コロイド複合体の作製

Tanaka et al., (1984) の方法に基いて, プロテインA-金コロイド複合体を作製した。すなわち, 0.1mg のプロテインA (Pharmacia Fine Chemicals Co. Uppsala, Sweden.) をプラスチックビーカーにとり, 0.005M NaCl 0.1ml を加え溶解した。次に金コロイド溶液 5ml を加え1~2分間攪拌した。これに5%ポリエチレングリコール (PEG, 分子量20,000, NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan.) を0.15ml 加え, プロテインA-金コロイド混合液とした。0.05%PEG と, 0.02%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を含む5%グリセロール溶液 2.5ml を0.45μm のフィルターでろ過後, プラスチック製の遠沈管に入れ, この上にプロテインA-金コロイド混合液を静かに重層し, 55,000g, 4℃, 40分間遠心 (HITACHI 65P, Hitachi Koki Co., Ltd. Tokyo, Japan.) 後, 上清約6.5ml を除去し, 残りの1ml を沈殿物とよく混和した。これをプロテ

インA-金コロイド複合体として, 4℃で保存, 1週間以内に使用した。使用時には, 1%ウシ血清アルブミン加PBS (1%BSA-PBS) にて10倍に希釈, マイクロ遠心機 (KUBOTA MICRO II KM 1100, KUBOTA SEISAKUSHO Co., Ltd. Tokyo, Japan) を用い, 8,000g で室温にて5分間遠心後, 上清をさらに1%BSA-PBS にて5倍に希釈して免疫染色に供した。

## 5. 免疫染色

筋肉幼虫及び成虫を $\frac{1}{2}$ カルノフスキー固定, アルコール脱水後, LR White (London Resin Company Ltd. UK) に包埋し, 厚さ80nmの超薄切片を作製した。この切片に対し, クチクラ抽出物抗原免疫ラット血清を1%BSA-PBS にて200倍希釈し, 室温で30分間反応させた。1%BSA-PBS にて洗浄後, プロテインA-金コロイド複合体を室温, 30分間反応させた。1%BSA-PBS および蒸留水にて洗浄後, 酢酸ウラニールで電子染色し電顕観察に供した。対照として正常ラット血清を用い同様に染色した。

## 結 果

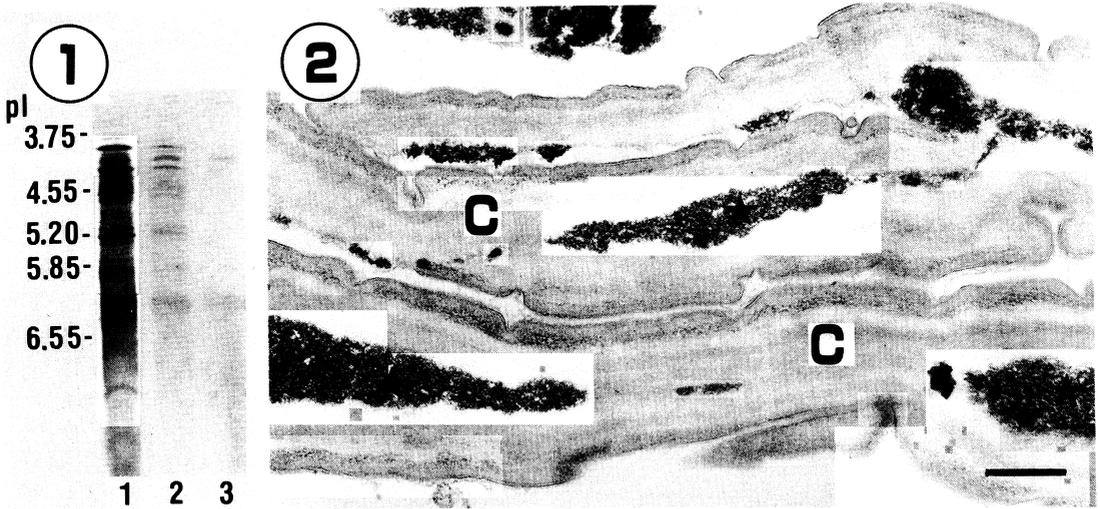
### 1. 抗原の検定

クチクラ分画の洗浄液を, 等電点電気泳動にて検定したところ, 1回目の洗浄液では, pH 3.5~9.5の間に少なくとも23本のバンドが確認され, また, 3回目の洗浄液では, pH 3.9およびpH 6.0に2本のバンドが確認された (Fig. 1)。このことより, 使用したクチクラ分画には, 少量ではあるが, PBS可溶性成分が混在していると考えられる。また, デオキシコール酸処理する前段階のクチクラ分画より通常電顕標本を作製し, 電顕観察した結果では, クチクラの内側に, 破碎された虫体内部組織の残骸と思われる物質が確認でき (Fig. 2), このクチクラ分画は必ずしも純粋なクチクラ標本ではなく, 超微形態的には使用したクチクラ分画が他の虫体組織成分を含有していたと思われる。

### 2. 免疫電顕

金コロイドを標識として用いた免疫電顕法では, 筋肉幼虫の切片を染色した場合, クチクラ内層に非常に多くの金コロイド粒子が観察され (Fig. 3), クチクラ抽出物抗原免疫ラット血清がクチクラ内層と反応することが確認された。クチクラ内層以外には, 角皮下層 (Fig. 3), 体腔液 (Fig. 3), 側索などに金コロイド粒子が観察され, クチクラ抽出物抗原免疫ラット血清はこれらの抗原とも反応を示した。しかし, 感染血清による染色で抗原性を示すことが報告 (Takahashi et al., 1988a, 1988c, 1989a) されているクチクラ表面 (Fig. 3), スティコサイトの顆粒 (Fig. 3) 食道内腔物, 中腸内腔物には金コロイド粒子が観察されなかった。

成虫クチクラは筋肉幼虫クチクラと同様, 角皮下層に



Figs. 1 and 2. Purity of cuticle fraction.

The cuticle fraction was obtained by sonicating muscle larvae and then centrifuging at 10000 rpm. The resulting pellet, the cuticle fraction, was washed three times with PBS. Isoelectric focusing revealed at least 23 bands in the first wash solution (lane 1 in Fig. 1); however, only two bands remained after the third wash (lane 3 in Fig. 1). The cuticle fraction was processed for immunoelectron microscopy (Fig. 2). It was composed of cuticle (C) and an amorphous material with high electron density (☆) resulting from severe damage to the larvae by sonication. Thus the cuticle fraction was contaminated with other, unidentifiable cell components.

支持されて存在し、電顕的に1~3層の層構造を示すが、部位により層の厚さと構造が異なる。また、成虫の側索には腺構造 (hypodermal gland) が存在する (Bruce, 1970)。成虫切片を染色した場合、側索の腺構造 (Fig. 4)、角皮下層 (Fig. 5)、体腔液 (Fig. 5) などに金コロイド粒子が観察され、免疫染色陽性であるが、成虫クチクラには金コロイド粒子が観察されず、クチクラ抽出物抗原免疫ラット血清が成虫クチクラと反応しないことが確認された。

また、雌成虫子宮内には産出直前の胎内幼虫が存在し (Fig. 5)、この胎内幼虫の表面にも1~2層の構造を示す薄いクチクラが存在する。クチクラ抽出物抗原免疫ラット血清はこの胎内幼虫のクチクラとも反応しなかった (Fig. 5)。

対照として正常ラット血清を用いて免疫染色を行った場合、筋肉幼虫、成虫および胎内幼虫のいずれの組織構造物にも金コロイド粒子は観察されず (Fig. 6)、染色の特異性が確認された。

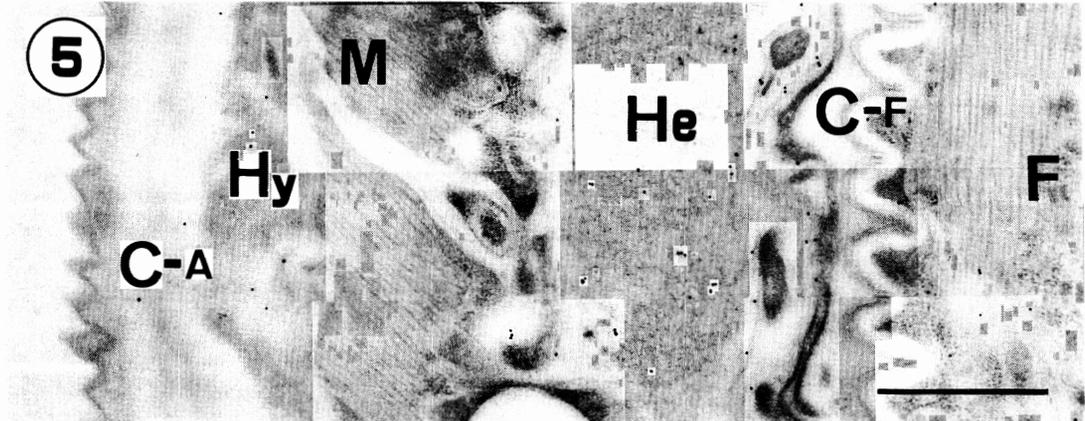
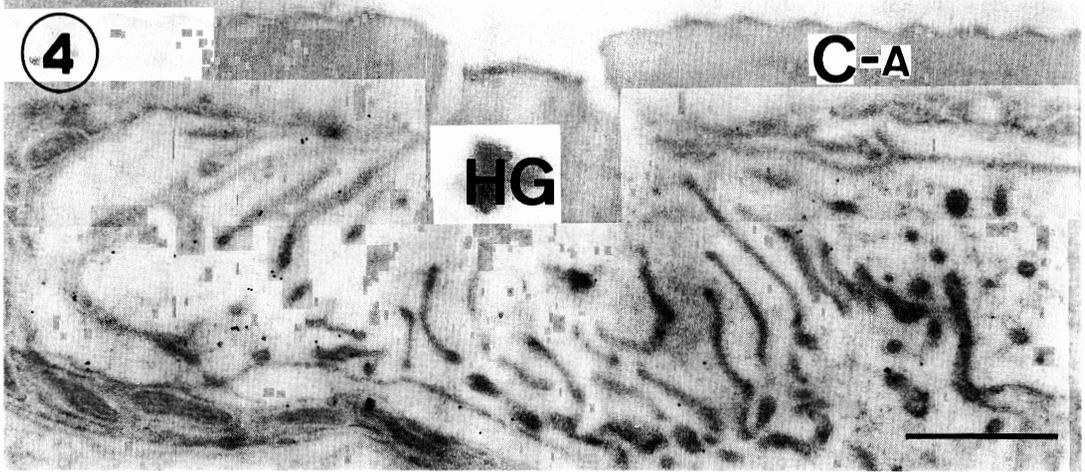
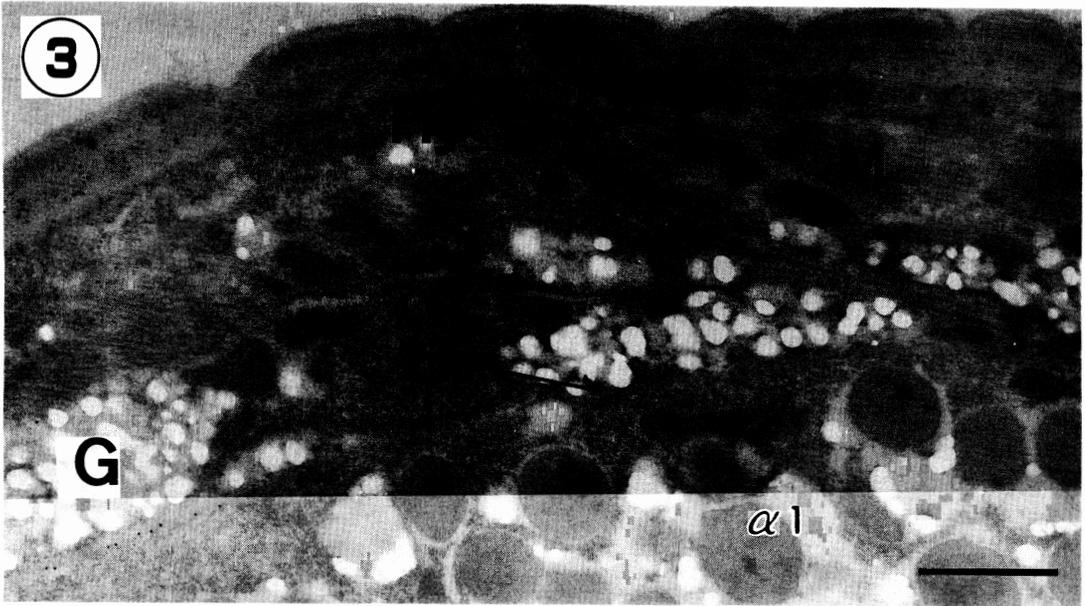
## 考 察

プロテインA-金コロイド法 (PAG法) による免疫染色では、金コロイドを標識したプロテインAが免疫グロブリン (主にIgG) のFc領域に特異的に結合することにより、金コロイド粒子の存在する部位に、免疫染色に用いた抗体と反応する抗原の局在を確認することができる。本研究では、クチクラ抗原の特性を明らかにするため、デオキシコール酸処理にてクチクラより可溶性抗原を抽出し、この可溶性抗原に対する免疫血清を得、上記のPAG法により免疫組織化学的検索を行った。

著者らは、感染ラットおよび感染ヒト血清を用いたPAG法により、筋肉幼虫の抗原局在部位を検索し、角皮下層、体腔液、スティコサイトの顆粒、食道内腔物、中腸内腔物、腸腺顆粒、グリコーゲン顆粒等の他にクチクラ表面およびクチクラ内層にも抗原性物質が存在することを確認している (Takahashi *et al.*, 1988 a, 1988 c, 1989 a)。著者らのほか、Sulzer (1965) およびCrandall

Figs. 3, 4 and 5. Immunogold staining with anti-cuticle antibodies.

3. The cuticle inner layers of muscle larva (C-L) are uniformly and strongly stained. Hypodermis (Hy) and hemolymph (He) are also positive. The cuticle surface, myofibrils (M) and stichocyte  $\alpha$ 1-granules ( $\alpha$ 1) are negative. G: glycogen granules.
4. Cuticle of an adult worm (C-A) is negative, whereas hypodermal gland (HG) is positive.
5. Cross-section through the uterus of adult female: Cuticle of the adult (C-A) and fetus (C-F) are negative; hypodermis (Hy) and hemolymph (He) are positive. F: fetus.



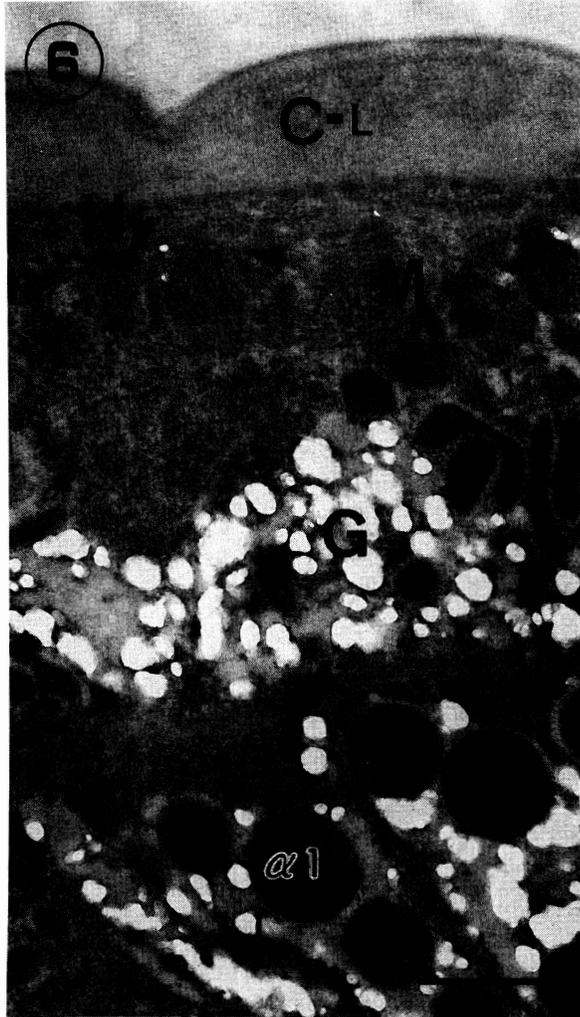


Fig. 6. Muscle larva treated with control sera: No significant staining was observed. C-L: cuticle of muscle larvae, Hy: hypodermis, M: myofibrils, G: glycogen granules,  $\alpha 1$ : stichocyte  $\alpha 1$  granules.

and Crandall (1972) が蛍光抗体法を用いて, Despommier *et al.* (1967) および Brzosko and Gancarz (1969) がフェリチン抗体法を用いて, また, Silberstein and Despommier (1984) が酵素抗体法を用いて, それぞれクチクラに抗原物質が含有されていることを証明している。

さらに, クチクラ抗原は, 旋毛虫の各発育段階に特異的な抗原性 (stage-specificity) を示すことが諸家により報告されている。すなわち, Mackenzie *et al.* (1978) は, 虫体表面における細胞吸着を指標として抗体の反応性を分析した結果, 感染血清を筋肉幼虫または成虫で吸

取した場合, それぞれ吸収に用いた発育段階の虫体表面に対する吸着反応のみが特異的に抑制されることを示し, また, Philipp *et al.* (1980, 1981), Jungery *et al.* (1983) および Almond *et al.* (1986) は, 各成長段階の旋毛虫虫体表面抗原を<sup>125</sup>I 標識後, デオキシコール酸処理により抽出し, SDS-PAGE により分析した結果, 虫体表面抗原は各発育段階でその種類および量とも異なることを報告している。

クチクラは, その表面 (epicuticle) と内層とが, 構造的にも (Bird, 1980) 免疫学的にも (Takahashi *et al.*, 1989 b) 異なることが確認されているが, 前述の

Mackenzie *et al.* (1978) や Philipp *et al.* (1980, 1981), Jungery *et al.* (1983) および Almond *et al.* (1986) が言及している発育段階に特異的な抗原性とは、方法論から推察するとクチクラ表面抗原の発育段階に特異的な抗原性をさすものと思われる。これは、<sup>125</sup>I 標識後抽出した虫体表面抗原に対するモノクローナル抗体が、免疫組織化学的にクチクラ表面に反応することからも支持される (McLaren *et al.* 1987)。これに対し、PAG 法では、クチクラ内層の抗原性を明確に検索することができる。本研究において、デオキシコール酸処理により抽出した筋肉幼虫のクチクラ抗原に対する免疫ラット血清が筋肉幼虫のクチクラ内層と強く反応したが、成虫および新生幼虫のクチクラ内層とは反応しなかったことは、クチクラ内層にも発育段階に特異的な抗原性が存在することを証明するものである。なお、クチクラ分画の純度を検定した結果より、クチクラ分画にはクチクラ以外の虫体組織成分が含まれていることが確認されており、これより抽出した抗原に対して得られた抗血清にはクチクラ抗原以外の抗原に対する抗体をも含むと考えられる。しかし、この抗血清による各発育段階の旋毛虫のクチクラに対する反応性の差は明らかであり、クチクラ内層に発育段階に特異的な抗原性が存在することを証明するのに十分な特異性があると思われる。

本研究で示されたように、クチクラ表面のみならずクチクラ内層にも発育段階に特異的な抗原が存在することは、宿主と寄生虫との相互関係、特に免疫学的な面での関係を検討する上で重要な知見となる。まず、感染防御の観点からは、現在までに旋毛虫由来の抗原を用いた防御免疫に関する実験が数多く行われているが、(Cambell, 1955; Chipman 1957; Bell *et al.*, 1979; Tronchin *et al.*, 1979; Despommier, 1981; Despommier and Laccetti, 1981 a, 1981 b; Durham *et al.*, 1984; Silberte in and Despommier, 1984, 1985; Gamble, 1985; Grecis *et al.*, 1986; Ching and Bell, 1987), 自然感染により宿主が獲得する防御免疫に匹敵する免疫力を成立させる抗原は少ない。これは免疫源としてある一つの発育段階の虫体由来の抗原を用いたためであろう。すなわち、多量に入手しやすいことから筋肉幼虫抗原が最も頻りに用いられてきたためであるが、腸管内での感染成立という意味から成虫抗原も重要である。事実、筋肉幼虫由来の抗原に基づく免疫と、成虫由来の抗原に基づく免疫とが、それぞれ感染の異なる段階に作用する (Gamble, 1985) ことを示した報告がある。また、最近では新生幼虫抗原も防御免疫の観点より注目を浴びている (James and Denham, 1974; Ruitenber g and Steerenber g, 1976; James *et al.*, 1977; Perrudet-Badoux and Binaghi, 1978; Bell *et al.*, 1985; Ching and Bell, 1987; Hua and Bell, 1988)。

本研究において、筋肉幼虫クチクラ内層の抗原性が、成虫および新生幼虫のクチクラ内層のそれと異なることが明示されたが、これは、筋肉幼虫由来の抗原のみに基づく宿主の免疫能が、感染防御に十分ではないことを示唆するものである。なぜなら、クチクラ内層に対する特異抗体がクチクラ表面に対する特異抗体よりも早期に産生される (Takahashi *et al.* 1990) こと、また、クチクラ表面 (epicuticle) が放出される (Philipp *et al.* 1980) 際や、脱皮により外層のクチクラが離脱する (Bruce, 1970) 際にクチクラ内層が宿主に暴露されることから、クチクラ内層もまた免疫攻撃の標的になり得るからである。よって、クチクラ内層抗原が発育段階により異なることは、旋毛虫が宿主の免疫攻撃より逃れる手段の一つになり得るものと思われる。

つぎに、免疫診断の観点からは、各発育段階の虫体由来の抗原に対する抗体は感染の異なる時期に産生されると考えられるため、各発育段階に特異的な抗原を用いた場合、血清の採取時期によっては偽陰性の判定結果を生ずることとなる。クチクラ内層抗原もまた、本研究において、発育段階により抗原性が異なることが証明されたため、これを免疫診断に用いる場合には各発育段階のクチクラ内層抗原に対する抗体の産生時期を考慮する必要があることが示唆された。

以上の結果より、旋毛虫症における防御免疫機構の解明や、有用な免疫診断法の確立のためには、宿主と寄生虫との間の免疫学的な相互作用を各発育段階毎に追及する必要があると思われる。すなわち、宿主が感染経過のどの時期に、どの発育段階の虫体に対して感染防御上効果的な免疫を獲得するのか、また、免疫診断上有用な抗体を産生するのかが問題となる。そのひとつとしてクチクラ表面および内層の抗原性が変化する時期を今後明らかにすることが必要である。

## 文 献

- 1) Almond, N. M., McLaren, D. J. and Parkhouse, R. M. E. (1986): A comparison of the surface and secretions of *Trichinella pseudospiralis* and *T. spiralis*. *Parasitology*, 93, 163-176.
- 2) Beckett, E. B. and Boothroyd, B. (1961): Some observation on the fine structure of the mature larva of the nematode *Trichinella spiralis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 55, 116-124.
- 3) Bell, R. G., McGregor, D. D. and Despommier, D. D. (1979): *Trichinella spiralis*: Mediation of the intestinal component of protective immunity in the rat by multiple, phase-specific, antiparasitic response. *Exp. Parasitol.*, 47, 140-157.
- 4) Bell, R. G., Ching, H. W. and Ogden, R. W. (1985): *Trichinella spiralis*: Nonspecific resistance and immunity to newborn larvae in inbred mice. *Exp. Parasitol.*, 60, 101-110.

- 5) Bird, A. F. (1980): The nematode cuticle and its surface. In *Nematodes as Biological Models*, Vol. 2, Zuckerman, B. M., ed., Academic Press, New York, 213–236.
- 6) Bruce, R. G. (1970): *Trichinella spiralis*: Fine structure of body wall with special reference to formation and moulting of cuticle. *Exp. Parasitol.*, 28, 499–511.
- 7) Brzosko, W. J. and Gancarz, Z. (1969): Immunoelectronoscopic studies on antibody binding to the cuticle of *Trichinella spiralis* larvae. *Wiad. Parazytol.*, 15, 605.
- 8) Cambell, C. H. (1955): The antigenic roles of excretions and secretions of *Trichinella spiralis* in production of immunity in mice. *J. Parasitol.*, 51, 185–194.
- 9) Ching, H. W. and Bell, R. G. (1987): Host immunity against newborn larvae during a primary infection in rats. *J. Parasitol.*, 73, 1069–1071.
- 10) Chipman, P. B. (1957): The antigenic role of excretions and secretions of adult *Trichinella spiralis* in the production of immunity in mice. *J. Parasitol.*, 43, 593–598.
- 11) Crandall, R. B. and Crandall, C. A. (1972): *Trichinella spiralis*: Immunologic response to infection in mice. *Exp. Parasitol.*, 31, 378–398.
- 12) Despommier, D. D., Kajima, M. and Wostmann, B. S. (1967): Ferritin-conjugated antibody studies on the larvae of *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.*, 53, 618–624.
- 13) Despommier, D. D. (1981): Partial purification and characterization of protection-inducing antigens from the muscle larvae of *Trichinella spiralis* by molecular sizing chromatography and preparative flatbed isoelectric focusing. *Parasit. Immunol.*, 3, 261–272.
- 14) Despommier, D. D. and Laccetti, A. (1981a): *Trichinella spiralis*: Partial characterization of antigens isolated by immuno-affinity chromatography from the large-particle fraction of the muscle larvae. *J. Parasitol.*, 67, 332–339.
- 15) Despommier, D. D. and Laccetti, A. (1981b): *Trichinella spiralis*: Proteins and antigens isolated from a large-particle fraction derived from the muscle larvae. *Exp. Parasitol.*, 51, 279–295.
- 16) Durham, C. P., Murrell, K. D. and Lee, C. M. (1984): *Trichinella spiralis*: Immunization of rats with an antigen fraction enriched for allergenicity. *Exp. Parasitol.*, 57, 297–306.
- 17) Gamble, H. R. (1985): Comparison of immune effects in mice immunized with *Trichinella spiralis* adult and larval antigens. *J. Parasitol.*, 71, 680–682.
- 18) Grecis, R. K., Crawford, C., Pritchard, D. I., Behnke, J. M. and Wakelin, D. (1986): Immunization of mice with surface antigens from the muscle larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasit. Immunol.*, 8, 587–596.
- 19) Hua, C. and Bell, R. G. (1988): Antibody-mediated in vivo cytotoxicity to *Trichinella spiralis* newborn larvae in immune rats. *Parasit. Immunol.*, 10, 293–308.
- 20) James, E. R. and Denham, D. A. (1974): The stage specificity of the immune response to *Trichinella spiralis*. In *Trichinellosis*, Kim, C. W., ed., Intext Educational Publishers, New York, 345–351.
- 21) James, E. R., Moloney, A. and Denham, D. A. (1977): Immunity to *Trichinella spiralis*. VII. Resistance stimulated by the parenteral stage of the infection. *J. Parasitol.*, 63, 720–723.
- 22) Jungery, M., Clark, N. W. T. and Parkhouse, R. M. E. (1983): A major change in surface antigens during the maturation of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 7, 101–109.
- 23) Lee, D. L. (1966): The structure and composition of the helminth cuticle. *Adv. Parasitol.*, 4, 187–254.
- 24) Mackenzie, C. D., Preston, P. M. and Ogilvie, B. M. (1978): Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. *Nature.*, 276, 826–828.
- 25) McLaren, D. J., Ortega-Pierres, G. and Parkhouse, R. M. E. (1987): *Trichinella spiralis*: immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. *Parasitology.*, 94, 101–114.
- 26) Parkhouse, R. M. E., Philipp, M. and Ogilvie, B. M. (1981): Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasit. Immunol.*, 3, 339–352.
- 27) Perrudet-Badoux, A. and Binaghi, R. A. (1978): Immunity against newborn *Trichinella spiralis* larvae in previously infected mice. *J. Parasitol.*, 64, 187–189.
- 28) Philipp, M., Parkhouse, R. M. E. and Ogilvie, B. M. (1980): Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature.*, 287, 538–541.
- 29) Philipp, M., Taylor, P. M., Parkhouse, R. M. E. and Ogilvie, B. M. (1981): Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J. Exp. Med.*, 154, 210–215.
- 30) Ruitenberg, E. J. and Steerenberg, P. A. (1976): Immunogenicity of the parenteral stage of *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.*, 62, 164–166.
- 31) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. (1984): Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J. Immunol.*, 132, 898–904.
- 32) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. (1985): Immunization with purified antigens protects mice from lethal infection with *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.*, 71, 516–517.
- 33) Slot, J. W. and Geuze, H. J. (1985): A new method

- of preparing gold probes for multi-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.*, 38, 87-93.
- 34) Sulzer, A. J. (1965): Indirect fluorescent antibody tests for parasitic diseases I Preparation of a stable antigen from larvae of *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.*, 51, 717-721.
- 35) Takahashi, Y., Yoshikawa, Y., Furuki, J., Yamada, S. and Araki, T. (1987): Morphological study of *Trichinella spiralis*: an overall picture of a muscle larvae as revealed by longitudinal sectioning. *Jpn. J. Parasitol.*, 36, 361-366.
- 36) Takahashi, Y., Uno, T., Nishiyama, T., Yamada, S. and Araki, T. (1988a): Immunocytolocalization study of the external covering of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *J. Parasitol.*, 74, 270-274.
- 37) Takahashi, Y., Yoshikawa, Y., Kim, H., Aisaka, A., Yamada, S. and Araki, T. (1988b): The morphological findings of *Trichinella spiralis* as revealed by PAS and AZAN staining. *Jpn. J. Parasitol.*, 37, 242-247.
- 38) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Yagi, J. and Araki, T. (1988c): Immunohistochemical localization of antigenic substances in *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Jpn. J. Parasitol.*, 37, 435-440.
- 39) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Yamada, S. and Araki, T. (1989a): Ultrastructural localization of antigenic substances in *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.*, 75, 316-324.
- 40) 高橋優三・宇野貴子・水野直人・荒木恒治 (1989) : 旋毛虫筋肉幼虫のクチクラ表面抗原・寄生虫誌, 38, 22A.
- 41) Takahashi, Y., Mizuno, N., Uno, T., Aisaka, A. and Araki, T. (1990): A spectrum of antibody response with time after *Trichinella spiralis* infection in rats. *J. Parasitol.* in press.
- 42) Tanaka, H., Haga, S., Takatsuki, K. and Yamaguchi, K. (1984): Localization of adult T-cell leukemia-associated antigen by the immunocoloidal gold method. *Cancer Res.*, 44, 3493-3504.
- 43) Tronchin, G., Dutoit, E., Vernes, A. and Biguet, J. (1979): Oral immunization of mice with metabolic antigens of *Trichinella spiralis* larvae: Effects on the kinetics of intestinal cell response including mast cells and polymorphonuclear eosinophils. *J. Parasitol.*, 65, 685-691.
- 44) Villella, J. B. (1970): Life cycle and morphology. In *Trichinosis in man and animals*, Gould, S. E., ed. C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 19-60.
- 45) Wright, K. A. (1987): The nematode's cuticle - its surface and the epidermis: Function, homology, analogy - A current consensus. *J. Parasitol.*, 73, 1077-1083.

[*Jpn. J. Parasitol.*, Vol. 39, No. 1, 42-49, February, 1990]

### Abstract

## STAGE-SPECIFIC ANTIGENICITY IN THE CUTICLE INNER LAYER OF *TRICHINELLA SPIRALIS*

NAOTO MIZUNO, TAKAKO UNO, HIDEKAZU SUZUKI, CHIYOKICHI TOKUDA,  
YUZO TAKAHASHI AND TSUNEJI ARAKI

(Department of Parasitology, Nara Medical University, Kashihara-shi, Nara, 634, Japan)

Reactivity of antibodies to the cuticle of *Trichinella spiralis* at different developmental stages was examined cytochemically by the method of post-embedding immunogold staining. Antibodies against the cuticle of *T. spiralis* muscle larvae were raised in Fischer rats by immunizing with the cuticle extract. The extract was solubilized with sodium deoxycholate. The antibodies reacted strongly to the cuticle inner layer of muscle larvae, but not to the cuticle inner layer of either adult worms or embryonic larvae in the uterus of adult females. Thus, the cuticle inner layer of *T. spiralis* exhibits developmental stage-specific antigenicity.