

寒天ゲルを用いた蛔虫の抗原性の研究

2. 硫安塩析及びカラムクロマトグラフィーによる 虫体抽出液の画分

山 本 隆 一
やま もと たか かず

長崎大学風土病研究所寄生虫学部 (主任: 片峰大助教授)

(昭和41年12月17日 受付)

Antigenic Analysis of Ascaris Worm by Means of Agar-gel Diffusion Technique

II. Fractionation of Whole Ascaris Worm Extract by Saltingout Method with Ammonium-sulfate and by Column Chromatography.

Takakuzu Yamamoto

Department of Parasitology, Research Institute of Endemics, Nagasaki University
(Director: Prof. Dr. Daisuke Katamine).

Abstract

Using saltingout method with ammonium-sulfate and DEAE-cellulose chromatography, ascaris body extract was fractionated and antigenicity was studied on each fraction.

First, ascaris worm extract was fractionated into four fractions by saltingout method, and then, these fractions were tested with anti-dirofilaria serum and ascaris infected serum of rabbits by agar double diffusion anti ascaris serum, and immunoelectrophoresis technique.

Precipitin bands appeared in every fraction except Fraction D which was obtained in 100% saturation. The largest number of precipitin bands appeared in Fraction B which was obtained in 65% saturation. This Fraction B contained the largest amount of protein among all fractions, while Fraction D was mostly composed of carbon-hydrate containing very low amount of protein. There seems to be close correlation between the amount of protein in each fraction and its antigenicity.

Using DEAE-cellulose chromatography, nine fractions were obtained from Fraction B which has the highest antigenicity. When these nine fractions were tested with anti-ascaris serum and ascaris infected serum, large number of precipitin bands appeared in Fraction 5, 6 and 7 than any other fraction, although smaller number of precipitin bands were found on the test with ascaris infected serum.

Immunoelectrophoresis of these fractions revealed a shift of precipitin bands from cathode region to anode region as the fraction number increased. In every

test with three types of anti serum sensitized separately with organs of ascaris worm, largest number of precipitin bands appeared in Fraction 5, 6 and 7.

In the previous paper, the distribution of precipitin bands on immunoelectrophoresis in relation to organ specificity was discussed, but in the present study, it was revealed that antigenic substances specific to body wall and genital organ were distributed in large amount around Fraction 5, 6 and 7 judging from the reactions pattern immunoelectrophoresis although intestine specific antigens were distributed every in all fractions.

When these fractions were tested with anti-dirofilaria rabbit serum using double diffusion technique, one precipitin band appeared in each fraction with exception of two fractions.

緒 言

著者は前報で寒天ゲル内沈降反応を用いて蛔虫々体の抗原性特にその臓器のもつ抗原性を比較検討し、各臓器には共通な抗原物質が広く分布するが、同時に臓器の示す反応系は必ずしも同一でなく、夫々の臓器に特有の抗原構成を有することを推論した。又他の寄生

虫との交叉反応のありかたも臓器により同一でないことを推論した。

本報では蛔虫々体抽出液を硫酸塩析法及び Column chromatography を用いて分離分画してその抗原性を追求した。

実験材料と方法

粗抗原は新鮮豚蛔虫成虫 (♂♀混合) の重量を測定しその3倍量の生食水と共にホモジナイザーで摩砕する。次いで -4°C の氷室内で24h マグネチックスターラーで攪伴し更に24h 静置して充分抽出させた後10000 r.p.m. 15分遠沈し、上清を凍結乾燥して保存した。

抗血清は豚蛔虫及び犬糸状虫の全虫体抽出液と蛔虫の体壁、腸管、生殖器の夫々の抽出液で免疫した5種の抗血清及び蛔虫成熟卵を投与して得た家兎感染血清の2種類を使用した。

前者は生食水に8%濃度に溶解した夫々の粗抗原1.5ccと同量、Freunds incomplete adjuvant を混じて各々2匹づつの家兎背部皮下に連続5日間注入し5日間休止する。この操作をくり返し抗体価が充分上昇した所で全採血した。

感染家兎血清は成熟卵を23匹の家兎胃部に5000ヶ、12日後10000ヶ、更に20000ヶ、30000ヶ投与して得た。

二重拡散法は Ouchterlony 法に準じ、Difco-Bactoagar を pH 7.0, μ 0.075 の10000倍にマーズオンを加えた磷酸緩衝液に1.5%に溶解、シャーレ又はガラス板上に厚さ3~4mmの寒天平板を作製した。抗原と抗血清の穴は径5mm、相互の距離は4mmで抗原は乾燥抗原を磷酸緩衝液に8%濃度に溶解したものを用いた。

免疫電気泳動法は Scheidegger の Micromethod に準じ、ガラス板上に100×80×3mmの寒天平板を作り、両端電圧110~120 volt の条件で4時間半通電した。泳動終了後抗原の穴より4mmの位置に3×58mmの側溝を設けて抗血清を注入した。注入後 4°C 、48~72時間適当な湿度を保持する箱内に入れて反応を行わせた。

沈降帯像の永久保存その他は第一報に述べた方法に準じて行った。

DEAE-cellulose は Serva 製を使用した。

実 験 成 績

1) 硫酸塩析抗原

豚蛔虫より抽出した粗抗原に飽和硫酸塩 (76 g/100 cc) を除々に攪伴しながら添加、所要濃度に達した後1時間静置、次いで10000 r.p.m. 15分遠沈して夫々

A (0.35飽和)、B (0.65飽和)、C (0.90飽和) 及び D (1.0飽和) の4ヶの分画を得た。(第一表)

Folin Cu 法による各分画のタンパク及び Anthron 法による糖の組成は第2表の通りである。タンパク及

Table 1; Preparation of antigens

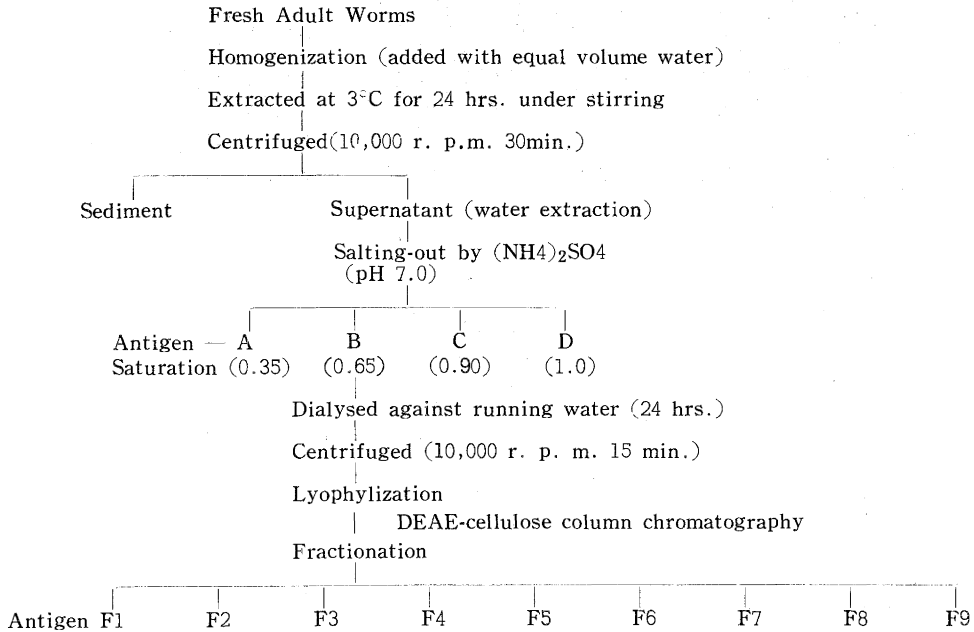


Table 2 ; Protein and Carbohydrate quantity
Fractions of crude antigen separated by
salting-out with Ammonium sulfate.

	Protein (γ /ml)	Carbohydrate (γ /ml)	Dry weight (mg/ml)
Antigen A	4992	20.0	
B	10992	200.5	3.53
C	5520	175.0	3.75
D	4.3	21460.0	
Crude antigen		25200.0	

Fractions of antigen B separated by
DEAE-cellulose column chromatography.

	Protein (γ /ml)	Carbohydrate (γ /ml)	Dry weight (mg/ml)
Fraction 1	664.8	8.0	2.48
2	273.6	3.0	1.74
3	463.2	1.0	2.09
4	252.0	3.0	2.33
5	218.4	8.0	2.45
6	60.0	1.2	1.09
7	297.6	10.3	2.03
8	74.4	4.3	1.62
9	472.8	19.8	1.84

Technique; protein; Follin Cu method.
Carbohydrate; Anthrone methode.

び糖はどの分画にも存在しているが、タンパク質は分画Bが多く分画Dには極めて少く大部分は糖類よりなっている。(第二表)

この4つの分画を夫々抗原として抗血清との間に二重拡散法及び免疫電気泳動法を行うと第1及び第2図に見られる様な像を得た。二重拡散法を行うと各分画はDを除き感作血清、感染血清、いずれに対しても数本の著明な沈降帯の出現を見る。(第1図)

免疫電気泳動法でA, B, Cの3分画を上記血清と組合せてみると、C分画では両血清との間に夫々2及び4本の沈降帯が見られるが、B分画では感作血清に対して4本、感染血清に8本以上の明瞭な極めて多数の沈降帯の出現が見られる。即ち分画Bが最も抗原性が強く、しかも感染に際しての抗体産生にたづさわる抗原性物質が含まれていると考えられる。(第1図)

又犬糸状虫で免疫した抗血清との間の反応を見ると、二重拡散法で分画Dを除き、いずれの分画抗原との間にも1本の、しかし極めてはっきりした沈降帯が表われ、犬糸状虫との間に共通な抗原がいずれの分画にも含まれていることがわかる。(第1図)

2) DEAE セルローズクロマトグラフィー

分画Bの乾燥重量で700~1000mgを0.005M, pH7.0の磷酸緩衝液に10%に溶解し、一昼夜同緩衝液で透析して平衡化した後、10000 r.p.m. 15分遠沈し上清を使用した。

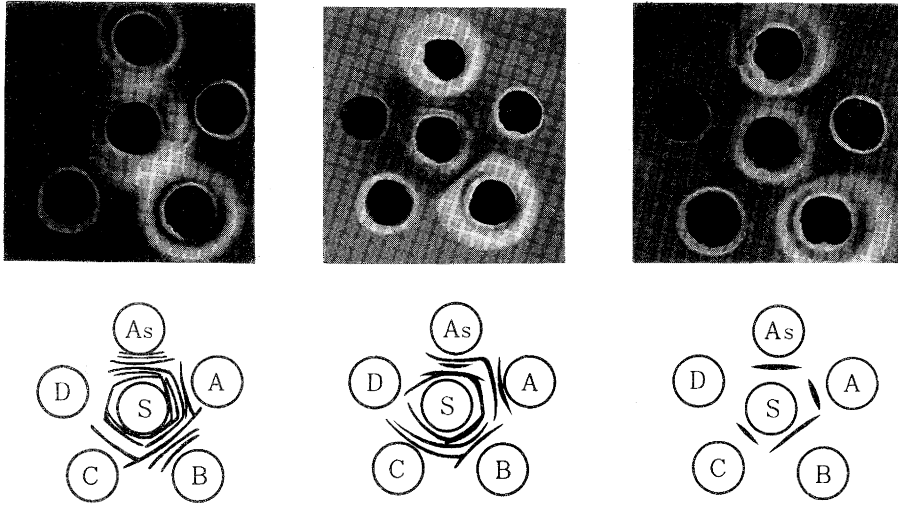


Fig 1; Double diffusion pattern of fractions separated by salting-out method to anti sera.
 1; Anti ascaris serum. 2; Serum of infected rabbit. 3; Anti *Df. immitis* serum.

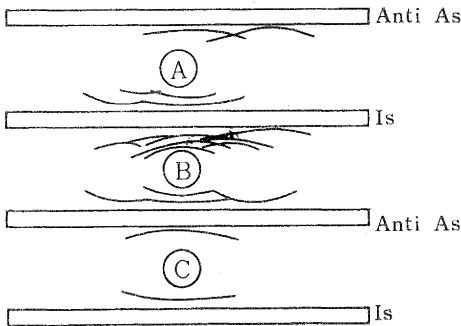


Fig 2; Diagram of immunoelectrophoresis pattern of fractions against anti As and Is. As; Whole ascaris worm. Is; Serum of infected rabbit. Fraction B gives the greatest number of precipitin bands.

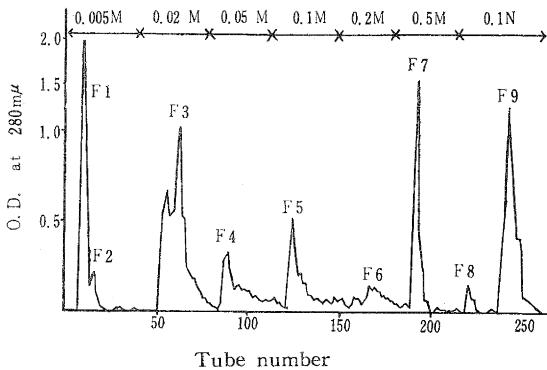


Fig 3; Column chromatographic profile of Fraction B by DEAE-cellulose.

溶出法は stepwise technique により, 0.005M, 0.01M, 0.05M, 0.1M の各 pH7.0 の磷酸緩衝液及び 0.2M, 0.5M の NaCl, 0.1M の NaOH をいずれも 200~300cc 流下させて溶出を行った。

尚流下速度は 70cc/h, チューブ容量 7.0cc の条件で実施した。

その結果第3表に示す様に9ケの分画が得られた。各分画は純水にて透析, 凍結乾燥して貯えた。

各分画のタンパク及び糖の組成, 収量は第2表に示した通りである。F6, F7 のタンパク量は他の分画より僅かに少く, 一方糖は F3 と F4 に少い。

この様にして得た9ケの分画抗原を前記4種の免疫血清, 感染家兔血清及び犬糸状虫抗血清との間に二重拡散及び免疫電気泳動を行った。

二重拡散法にて各分画抗原を全虫体免疫家兔血清及び感染家兔血清と反応させると, 2つの抗血清とも9つのすべての分画抗原に対して著明な沈降帯の形成が見られる。沈降帯の数は前者で1~6本, 後者で1~3本で, 一般に感染家兔血清にその数が少い。分画別に見ると, いずれの血清に対しても F5, 6, 7 の分画に沈降帯の数が多く又強い。(表3図4)

次に体壁, 消化管, 生殖器で別々に免疫した血清では総ての組合せで反応が見られるが, この場合にも前記の F5, 6, 7 の分画に最も強い反応が見られる。免疫電気泳動像から見ると, 5, 6, 7分画は抗体壁血清で夫々6, 6, 5, 抗消化管血清で7, 6, 10, 抗生殖器血清で7, 6, 9と更に多数の沈降帯が確認され他の分画に比べて最も強い抗原性のあることが推

Table 3: Precipitin bands of antigens fractionated by DEAE-cellulose chromatography against various anti sera. As; Whole ascaris worm. W; Body wall. I; Intestine. G; Genital organ. Is; Serum of rabbit infected with ascaris worm. () ; Number of the bands in immunoelectrophoresis.

Anti Serum / Antigen		Anti Ascaris lumbricoides					Anti Df. immitis
		Anti As	Is	Anti W	Anti I	Anti G	
By DEAE-Cellulose	F 1	3	2	2(3)	2(4)	1(6)	1
	F 2	1	2	1(✓)	1(✓)	0(✓)	1
	F 3	1	0	1(3)	1(1)	0(1)	0
	F 4	1	0	0(1)	1(1)	1(1)	1
	F 5	6	2	3(6)	3(7)	2(10)	1
	F 6	4	3	2(6)	3(6)	1(9)	1
	F 7	3	2	4(6)	5(10)	2(9)	1
	F 8	2	2	2(✓)	3(✓)	2(✓)	1
	F 9	2	1	0(2)	2(1)	1(1)	0

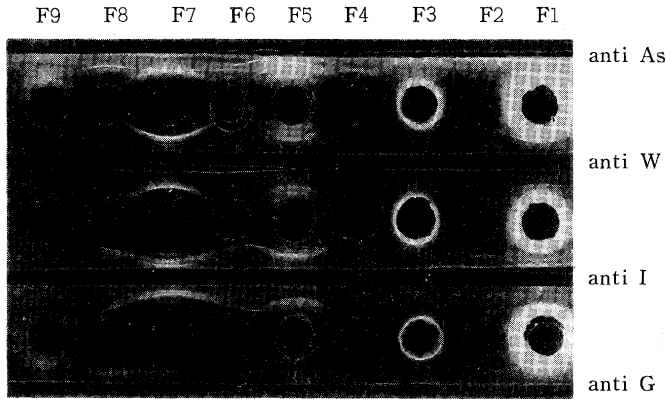


Fig 4: Double diffusion pattern of antigens fractionated by DEAE-cellulose chromatography to anti sera.

As; Whole ascaris worm. W; Body wall. I; Intestine. G; Genital organ.

The most remarkable precipitin bands appears in F5,6,7 and 1 against all of the anti sera.

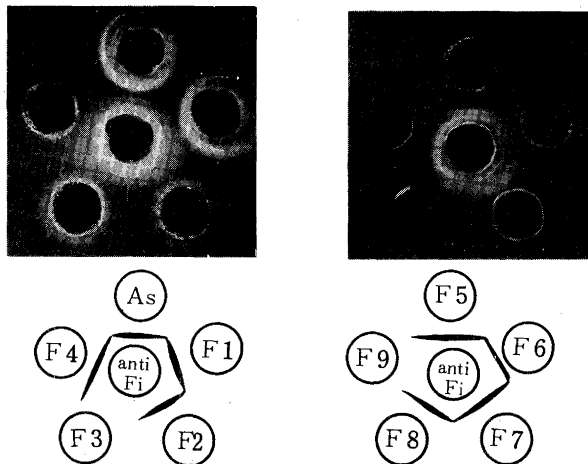


Fig 5: Double diffusion pattern of fractionated antigens to anti D. immitis serum.

測される。又沈降帯の出現する部位は概ね分画番号の順に陰極側より陽極側に全体として移動する傾向が見られる。(表3)

犬糸状虫全虫体感作血清との二重拡散法での反応で

は、F3 と F9 を除きどの分画にも1本の沈降帯が出現し、糸状虫との間に交叉反応を起す抗原はどの分画にも分布していることがわかる。(図5)

摘

要

蛔虫々体のもつ抗原構成特にその感染に際して抗体産生に關与する物質を追求し、出来得ればその分離精製を目的として実験を行った。この度はその過程として虫体で免疫した家兎血清や感染家兎血清を用い、塩析法や DEAE セルローズクロマトグラフィーにて得られた抗原分画について検討を行った。

その結果蛔虫抽出液の硫酸塩析法にて 0.65 飽和で得られるタンパクを主とした分画に最も強い抗原性が認められ、これを DEAE セルローズクロマトグラフィーにより分けると、0.1M, 0.2M, 0.5M で溶出する 5, 6, 7 の分画に最も強い多数の沈降帯が出現することが明かとなった。

文

献

- 1) 赤堀四郎編：酵素研究法。1. 朝倉書店，東京，1955.
- 2) 赤堀四郎編：酵素研究法。4. 朝倉書店，東京，1961.
- 3) Braisden, L. & Tromba, F. G. : DEAE-CELLULOSE chromatography of Kidney Worm Antigen. Jour. Parasitol., 49(3): 375-379, 1943.
- 4) Burnet, M. : 免疫理論，一クロン選択説—岩波書店，東京.
- 5) Graber, P. & Burtin, P. : Immuno-electrophoretic analysis. Elsevier Publishing. Amsterdam, etc., 1964.
- 6) Isoii, Y. & Morisawa, S. : Intradermal test for paragonimiasis. Specificity of skin test with purified peptides. Fukuoka Acta Med., 52: 594-602, 1941.
- 7) 石崎達，荒木英齋，久津見晴彦：皮内反応の基礎的研究。(1) 即時反応陽性判定基準及び反応の特質に就いて。アレルギー，10(5): 307-317, 1961.
- 8) Kagan, I. G. : Serum agar double diffusion studies with *Ascaris lumbricoides* antigen. Jour. Infect. Dis., 101: 11-19, 1957.
- 9) Kagan, I. G. : A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. Jour. Parasitol., 49: 773-798, 1963.
- 10) Kagan, I. G. & Goodchild, C. G. : Polysaccharide cont of *Schistosoma* skin test antigen and the reactivity of nitrogenous and carbohydrate components. Amer. Jour. Trop. Med. &

- Hyg., 12: 179-183, 1963.
- 11) Kent, N. H. : Biochemical studies on the proteins of *Hymenolepis diminuta*. Exp. Parasitol., 6: 351-357, 1957.
- 12) Kent, N. H. : 5 Antigens. Exp. Parasitol., 13: 45-56, 1963.
- 13) Kent, N. H. : Fractionation, isolation and definition of antigens from Parasitic Helminths. Amer. Jour. Hyg. Monographic Series., 22: 30-45, 1963.
- 14) 三本 徹：肝吸虫症の沈降反応および凝集反応に關する研究。(肝吸虫) 四国医学雑誌，15(5)：別刷 1959.
- 15) Morisawa, S., Tanaka, A, Shōjima, & Yamamura, Y. : Studies on tuberculin activ peptide. I. The isolation, carystallization properties of tuberculin activ peptide from *Tubercule Bacillus*. Biochim. Biophys. Acta., 38: 252-258, 1960.
- 16) 森下哲夫：新しい蛔虫症の診断法。日本医事新報，1646: 16, 1956.
- 17) 守屋 寛：ゲル濾過法，広川書店，1954.
- 18) Olivengonzalez, K. : Seminal on immunity to parasitic Helminths. III Serological studies on Stage Spisificity in *Trichinella spiralis*. Exp. Parasitol., 13: 13-17, 1963.
- 19) Peterson, F. A. & Sober, H. A. : Chromatography of protein. I. Cellulose ion-exchange adsorbentes. II. Fractionatation of serum protein

- on anion exchange cellulose. Jour. Amer. Chem. Soc., 78 : 751-763, 1956.
- 20) **Porath, J. & Flodin, P.** : Gel filtration: A method for desalting and group separation. Natupe., 183 : 1657-1659, 1959.
- 21) 齊藤京子, 阿久沢実, 齊藤忠思, 土屋セツ子: イヌ糸状虫抗原. 4. 多糖体分画による皮内反応. 医学と生物学., 71(1): 43-45, 1965.
- 22) **Sawada, T., Kōno, M., Sato, S., Yamamoto, T. & Takei, K.** : Immunological studies on Filariasis. (I) Intradermal and precipitin tests with *Dirofilaria immitis* antigen in canine and human Filariasis. Gumma. Jor. Med. Scienc., XI (1) : 3, 1962.
- 23) **Sawada, T., Nagata, Y., Takei, K. & Sato, S.** : Studies on the substance responsible for the skin tests on Clonorchiasis. Jap. Jor. Exp. Med., 34(6) : 315-322, 1964.
- 24) 清水重夫, 阿久沢実: イヌ糸状虫抗原の研究. Diethylaminoethyl cellulose column によって画分した抗原による皮内反応について. 医学と生物学, 64(1) : 96-97, 1961.
- 25) 浮田忠之進他: 生化学講座. I. 生物物理化学, 共立出版, 東京, 1963.
- 26) **Soulsby, E. J. L.** : Antigenic analysis of *Ascaris* tissues by the double diffusion precipitin test. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 51 : 9, 1957.
- 27) **Tada, I. & Kawashima, K.** : Studies on the Skin reaction in human Filariasis with a purified antigen from *Dirofilaria immitis*. 寄生虫誌, 13(5) : 427-434, 1964.
- 28) 武井一利, 沢田利貞, 米山邦彦, 片峰大助, 吉村税, 山本久: *Filaria* 症の免疫学的研究. III. 分画精製した皮内反応抗原について. 日本衛生学雑誌, 19(5) : 別刷, 1964.
- 29) 山村雄一, 石坂公成編: 免疫化学, 朝倉書店, 東京, 1963.
- 30) 山本隆一: 寒天ゲルを用いた蛔虫の抗原性の研究. I. 蛔虫臓器組織の抗原の比較. 長崎大学風土病紀, 8(1) : 29-39, 1966.
- 31) 横川宗雄, 大島智夫, 勝呂毅: 肺吸虫症の皮内反応に関する研究. (II) 寄生虫誌, 4(3) : 282-289, 1955.
- 32) 横川宗雄, 大島智夫: 肺吸虫症の皮内反応に関する研究. (VI) 硫酸及び低温メタノール分画法による蛋白分画の抗原性について. 寄生虫誌, 8(1) : 44-49, 1959.
- 33) 吉村税: 糸状虫の皮内反応に関する研究. I. 糸状虫ベプタイド抗原による皮内反応とその特異性. 長崎大学風土病紀, 5(3) : 115-128, 1963.
- 34) 吉村税: 糸状虫症の皮内反応に関する研究. 2. 糸状虫症の経過より見た抗体産生と皮内反応. 長崎大学風土病紀, 5(4) : 190-198, 1963.
- 35) 米山邦彦: 肺吸虫皮内反応抗原物質に関する研究. アレルギー, 12(9,10) : 別刷, 1963.
- 36) **Whitaker, J. R.** : Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. Anal. Chem., 35 : 1950-1953, 1963.
- 37) **Woodruff, A. W., Bell, S., Ridley, D. S. & Schofield, D. F.** : Symposium on Onchocerciasis. Part II. Clinical diagnostic and therapeutic aspects of Onchocerciasis. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 52 : 97-108, 1958.