

ウエステルマン肺吸虫の抗原分析に関する研究

2. 成虫分画抗原の免疫反応について

今 井 淳 一*

長崎大学熱帯医学研究所, 寄生虫学部門

Studies on the Antigenic Analysis in *Paragonimus westermani*. 2. Observations on antibody response against fractionated antigens from adult-worm extract.

Jun-ichi IMAI (Department of Parasitology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract: Experimental studies were conducted to elucidate the nature, development and changes in antibody response against gel filtration of fractionated and metabolic antigens in *Paragonimus westermani* infection of cat and human being.

(1) Somatic antigen of adult worm was resolved into 6 fractions on Sephadex G-200 gel filtration of molecular weight ranging 30,000 to 700,000 daltons.

(2) During infection, precipitin reaction was observed mainly against lower molecular weight fractions in Ouchterlony tests and immunoelectrophoresis, while it was against higher molecular weight fractions in immunized rabbit sera. Precipitin arcs were most numerous against fractions No. 2, 3 and 4.

(3) Metabolic antigen in worm sac behaved similarly to fractions No. 4 and 5 in thin layer electrophoresis of polyacrylamide gel and the pattern was also similar in immunoelectrophoresis.

(4) Consequently, precipitin against fractions No. 3 and 4 were detected in the early stage and the titer reached its peak around 12-14 weeks of infection. Reaction to fraction No. 4 was most numerous (100%) followed by fraction No. 3 (88%) and No. 5 (82%). Precipitin against fractions No. 1 and 6 appeared in the late stage of infection.

Tropical Medicine, 21(2), 45-55, August, 1979

はじめに

蠕虫のような粗大寄生虫の抗原構成はきわめて複雑で、しかも宿主体内への侵入後の発育経過のなかでその構成物質は量的、質的に変化して行くもので、感染寄生によって形成される抗体抗原系の実態はきわめて複雑なものと思像される。

近年、ゲル内沈降反応を用いて虫体の抗原構成の追究や抗原抗体系を分別し、更には種に特有な反応系を明らかにして診断に応用しようとする試みがなされて

いる。肺吸虫に関しては沢田ら(1964), *Yogore et al.* (1965), *Capron et al.* (1965, 1969), 辻ら (1967, 1968, 1975) などの報告があるが、いずれも粗抗原を用いた研究でその詳細は明らかとは云えない。

著者らもこの観点から虫体粗抗原の硫酸分画や、DEAE-Celluloseを用いた分画化と抗原活性の追究など行って来た。

本報に於ては Sephadex G-200 によるゲル濾過を行って得た分画抗原についてその理化学的性状を明らかにすると共に Ouchterlony 二重拡散法, 免疫電気

* 現所属: 宮崎医科大学寄生虫学教室
長崎大学熱帯医学研究所業績 第887号
Received for publication, July 2, 1979

泳動法による沈降反応を示標として肺吸虫寄生による抗体抗原系の分析を行い、更に虫体の発育、感染の経過との関係に於てその推移を追究した。

材料および方法

I. 抗原作製

1. 成虫抽出抗原 (SOM 抗原)

実験的感染後20週を経過したネコの肺臓よりウエステルマン肺吸虫成虫を取り出し、生理食塩水で洗浄後、第1報(1972)に述べた方法に準じてSOM抗原を調製した。尚、虫体を生食水中に浸漬している間に排出された分泌物とその洗浄液は分泌・排泄抗原(ES抗原)の一部として使用した。一方、SOM抗原の蛋白質量はLowry *et al.* (1951)のCu-Folin法で測定し、Ouchterlony反応には5mg/ml、免疫電気泳動には10mg/ml、更に一次免疫拡散法には3mg/mlにそれぞれ調整して使用した。

2. 虫体の分泌・排泄物 (ES 抗原)

本実験では前記の虫体排出物ならびにその洗浄液と肺臓の虫嚢内貯溜液を対象にES抗原として使用した。

毛細ピペットで嚢内貯溜液を吸い取り、更に少量の生食水で内液を洗い取った液をビーカーにpoolし、遠心分離(4°C, 20,000rpm, 30min)後、上清液をアミコン濃縮器(DM 5メンブレン使用)で濃縮し、5-10mg protein/mlに調整して-20°Cに保存した。

3. 分画抗原 (Fr. 抗原)

SOM抗原のSephadex G-200ゲルによるカラムクロマトグラフィーにより溶出分別された6つの画分を夫々アミコン攪拌セル(DM 5メンブレン使用)およびセファデックス粉末による濃縮法を用いて濃縮し、蛋白質量5-10mg/mlに調整後、各反応や検定に用いた。

II. 抗血清

1. 感作家兎血清

SOM抗原を用い Freund's incomplete adjuvantと共に家兎の皮下及び筋肉内に注射して抗体価が十分上るまで実施した。尚、感作方法は前報と同様に行った。

2. 実験的感染猫血清

ウエステルマン肺吸虫メタセルカリア30~40個体を1匹の猫に経口投与し、計10匹の猫を実験に用いた。これらの猫は感染後17~26週目に虫体回収に先立って全採血を行った。尚、このうち5匹の猫については感染後2週日から2週間隔で26週日(182日)まで13回に亘って経時的に部分採血を行い抗体価の測定ならびに沈降反応の経時的観察に用いた。

3. 感染人血清

肺吸虫卵が確認された患者血清28例及び肺吸虫VBS皮内反応陽性でゲル内沈降反応も陽性だが虫卵が確認されていない者22例、合計50例の肺吸虫感染者と同定しうる人血清を本実験に用いた。

III. 実験方法

1. Sephadex gel filtration

Sephadex G-200ゲル(Pharmacia社)を十分量のpH7.4, 0.2M NaCl-0.1M Tris-HCl緩衝液中で3日間膨潤ならびにデカンテーションによる微粒子ゲルの除去を行った後、ゲル懸濁液の脱気を行い、3.2×60cmカラムにゲルを充填した。試料を添加する前にblue dextranによるカラムのvoid volume(溶媒容積)を求め、同時にゲルのカラム充填状況を確認した後、SOM抗原10ml(総タンパク量105mg)をカラムに添加し、4°Cの低温下で前記緩衝液による溶出を行った。カラムからの溶出液は島津UV-140型column chromat monitor systemを用いてフラクション・コレクターで分取し、同時に溶出液中の蛋白濃度を280mμ波長で連続的に吸光度を測定して溶出曲線をつくり、ピークを中心に画分を行い、各試験管液をpoolし各画分の溶出液量を計測後アミコン攪拌セルで濃縮した。

2. 分画抗原の分子量測定

Andrews (1965) および宇井 (1967) の方法に準じて行った。肺吸虫成虫粗抗原溶出に使用した同一のSephadexカラムで溶出条件も同一にして分子量既知の蛋白質(Ferritin, Catalase, Aldolase, Human serum albumin, Chymotrypsinogen) (Boehringer社)を夫々3~5mg秤量し、5mlの緩衝液に混合溶解して溶出した。これによって得られた各既知タンパク質の溶出曲線のピークに於ける溶出液量と分子量の対数目盛で検量曲線を作成した。同様の処理法で肺吸虫成虫分画抗原の主要成分を示すと思われる分子量を検量曲線から求めた。

3. Polyacrylamide gel 薄層電気泳動

Disc電気泳動に用いる分離用ゲルを適用した。特にDavis (1964)の試薬を用いた7.5%分離用ゲルとpH8.3 Tris-glycin電極槽用緩衝液を調製した。その他の術式は第1報の方法に従い、蛋白染色には0.1% coomassie brilliant blue 染色液を使用した。尚、泳動帯の位置をRf値で求めた。

4. 一元免疫拡散法

本実験ではMancini (1965)の方法の変法で実施した。即ち、SOM抗原寒天平板を作成後、径2.5mmの

抗体孔を縦横7.5mmの間隔で作し、これに倍数希釈抗血清を加え37°C下で24~48時間反応させた。また、厚さ1mmの抗原寒天平板は3mg protein/mlのSOM抗原液3.5mlとpH8.2, Barbital-HCl緩衝液に加熱溶解した2% Agarose寒天液を夫々56°Cに保ち、当量の両液を手早く混合して水平台上にのせた7×10cmのガラス板に流して作成した。

尚、抗体価は沈降輪を形成した最高の血清希釈倍数値でもって表示した。反応終了後のプレートの染色その他の処理はOuchterlony法に準じて行った。

5. Ouchterlony 二重拡散法

本法の術式は第1報に詳述した如く、今回もこれに従った。尚、新たに市販(栄研)のmicro-ouchterlony gel plateを一部追加使用した。

反応終了後のゲル平板は0.85%生食水中で十分洗浄し未反応のタンパク質を除去した後、濾紙下で乾燥させた。これを0.1% coomassie brilliant blue 250R液で染色後10%酢酸液で十分脱色、続いてゲルを数回水洗して2枚のセロファン紙にはさみ乾燥フィルムとして観察、保存した。

6. 免疫電気泳動 (IEP)

免疫電気泳動はLKBのマルチフォー電気泳動装置とその泳動キットを使用して行った。泳動用ゲル及び電極槽の緩衝液はpH8.6, $\mu=0.05$ のバルビタール緩衝液を使用し、そのゲル平板は90×80mmの大きさで厚さ3mmの1% Agaroseである。泳動は長辺と平行に行い、短辺のゲル幅に対し2.5mA/cmの定電流で3時間通電泳動した。泳動終了後、幅2mmの血清溝を長辺と平行に抗原孔と4mmの間隔で作し、血清を入れて37°Cで2日間反応させ、Ouchterlony法と同様に染色して観察した。

実験成績

1. Gel filtration (による分画抗原の理化学的性状)

1. 蛋白質, 糖質含有量及び分子量

ウェステルマン肺吸虫成虫抽出液 (SOM 粗抗原) のSephadex G-200による溶出曲線はFig. 1に示したようにFr.1からFr.6までの6つの分画に分別された。各分画の蛋白質, 糖質の含有量は曲線の後半部に溶出されたFr.4, Fr.5, Fr.6の3分画に全蛋白質の76%が含まれ、虫体抗原を構成する主要な蛋白成分であることがわかる。糖質はその72%がFr.6に集中して溶出された (Table 1)。

各分画の蛋白質の分子量はFig. 2の検量曲線によったが、Fr.1はSephadex G-200のvoid volume (溶媒容積) と同じ点で溶出され、Ferritin 蛋白と近

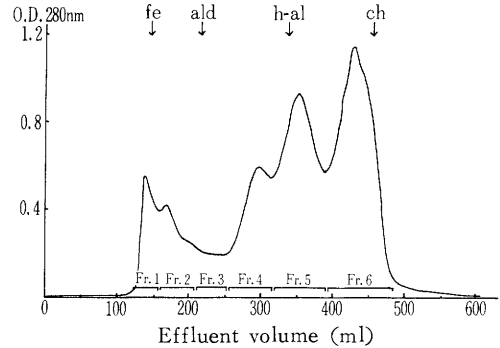


Fig. 1. Gel filtration of *Paragonimus westermani* extract on Sephadex G-200.

Column dimensions : 3.2 × 60cm ; Eluants : 0.1 M Tris-HCl buffer containing 0.2 M NaCl, pH 7.4 ; Sample: volume 10ml, total protein 105mg. Abbreviation : fe : ferritin, ald : aldolase, h-al : human serum albumin, ch : chymotrypsinogen.

Table 1. Protein and sugar content of the fractions of adult worm antigen, *Paragonimus westermani*.

Fraction	Effluent volume(ml)	Protein (μ g/ml)	Total (mg)	%	Sugar (μ g/ml)	Total (mg)	%
Fr. 1	36	185	6.7	6.6	80.6	2.9	6.1
Fr. 2	49	228	11.2	11.0	22.4	1.1	2.3
Fr. 3	40	185	7.4	7.3	20.0	0.8	1.7
Fr. 4	57	322	18.4	18.1	29.8	1.7	3.6
Fr. 5	71	432	30.2	30.2	93.0	6.6	13.9
Fr. 6	102	268	27.3	26.8	336.3	34.3	72.4
Total	355		101.7			47.4	
SOM	10	10,500	105.0		5,960	59.6	
recovery				96.9			79.5

SOM : adult worm extract.

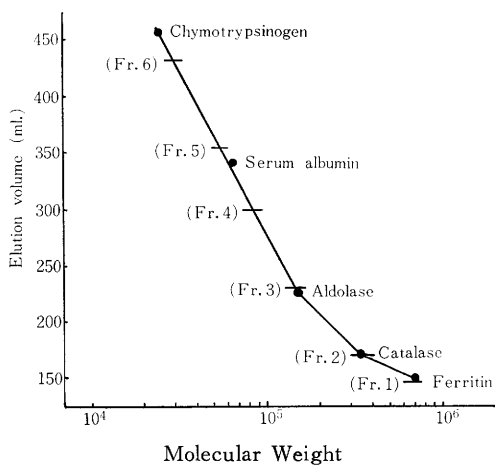


Fig. 2. Plot of elution volume against log molecular weight for proteins and fractions on Sephadex G-200 column ($3.2 \times 60\text{cm}$).

似した 溶出位置であることから、その 蛋白は分子量 700,000 以上と推定される。他の分画の蛋白質も夫々 Fr. 2 : 350,000, Fr. 3 : 140,000, Fr. 4 : 90,000, Fr. 5 : 60,000, Fr. 6 : 30,000 相当の分子量を示している。要するに虫体構成蛋白は分子量で 30,000 から 700,000 以上に及ぶ広い範囲にわたることが確認された。

2. 紫外吸収スペクトル

200 から 340 $m\mu$ の紫外外部波長域に於ける 各分画の吸収曲線を描き Fig. 3 に示した。

いずれも 210–220 $m\mu$ に最初の強い吸収があり、次いで 250–280 $m\mu$ にかけて第 2 の吸収がみられるが、分子量の大きい Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3 はいずれも一般に吸収度が弱く、なだらかな曲線を示したのに対し Fr. 4 及び Fr. 5 では概ね 280 $m\mu$ 波長域に明瞭なピークが認められ、その像は同時に行った ES 抗原のそれとよく相似している。また、Fr. 6 は 260–280 $m\mu$ にかけて吸光がみられ、他の分画と明らかな相違を示した。各分画にはその吸収波長域とその強さに夫々違いが認められる。

3. Polyacrylamide gel 薄層電気泳動像

先ず SOM 粗抗原及び ES 抗原の電気泳動像をみると各成分はいずれも試料孔を原点として陽極側に移動した。前者の泳動分離像は全域にわたってみられるが概して原点附近、中央部、陽極近くに集中している。その泳動帯の数は 8–9 本を認め、このうち Rf 値 0.03, 0.29, 0.53, 0.59, 0.88, 0.92 を示す泳動帯は比較的明瞭な線として認められる。ES 抗原での泳動

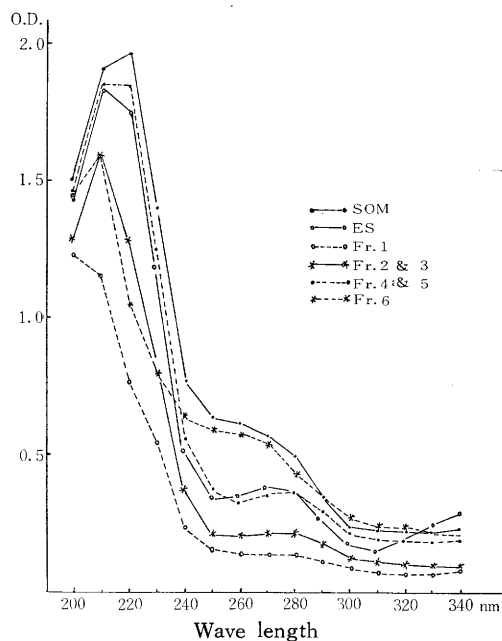


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of the somatic, metabolic and fractionated antigens of *P. westermanni*. SOM : adult worm extract. ES : excretion and secretion.

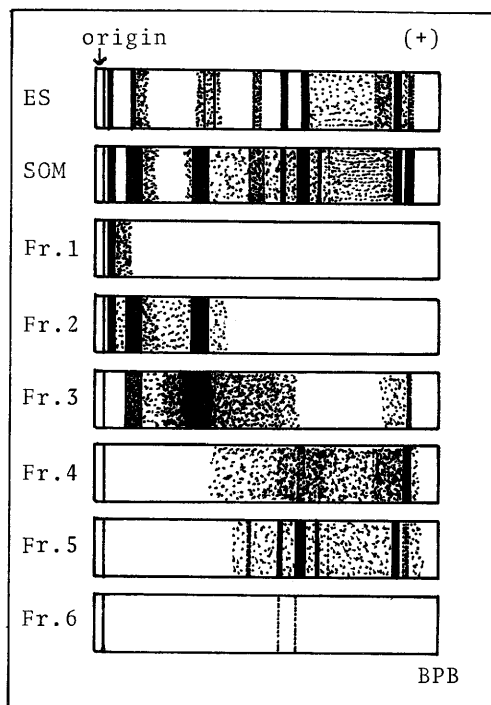


Fig. 4. Electrophoretic patterns of the fractions of *P. westermanni* adult worm extract on polyacrylamide gel. Stained with coomassie brilliant blue.

帯は6~7本で少ないがSOM粗抗原の泳動帯のいずれかに該当するものが殆んどで、主として中央部から陽極側にかけて認められる。分画抗原についてみると、Fr.1は電気的易動度が低く大部分が原点近くの泳動帯として現われ、そのRf値は0.03を示した。

Fr.2, Fr.3ではRf値が0.08~0.3の範囲にその像がみられ、特にFr.3では帯状に長く尾を引いた像がFr.2の分離帯より更に陽極側にみられる。またFr.4, Fr.5の泳動像はRf値0.59, 0.88, 0.91に強い線がみられ、これはES抗原の泳動像と近く、その抗原構成が似かよっていることが示唆される。以上の様に各分画は概ねその順に従って陽極側に向って移動しており、一般に分子量の小さい分画ほど移動距離が大きい傾向がある。(Fig. 4)

II. 分画抗原によるゲル内沈降反応

SOM粗抗原, ES抗原及びSephadex G-200により分別した分画抗原と感染ネコ血清, 患者血清, 感作家兎血清との間に二重拡散法によるゲル内沈降反応を行い、更に免疫電気泳動によって反応系の検討を行った。尚、感染ネコは感染後119日から182日を経過し、虫卵を証明した10匹を使用した。

1. Ouchterlony 法

まずSOM粗抗原に対する反応ではいずれの血清でも陽性反応を示す沈降帯の出現がみられる。

次に分画抗原を用いた10例の感染ネコ血清との反応をみるとFr.3, Fr.4, Fr.5の各分画はすべての血清に対して陽性反応を示し、Fr.1は10例中3例に陰性、陽性例でも3例を除きいずれも反応帯はきわめて弱い。Fr.2は全血清に陽性反応がみられるが、前者と同様その反応は比較的弱く、この両分画に出現する沈降線の強さは変化に富んでいる。Fr.6は6例にきわめ

て弱い反応がみられたに過ぎない (Table 2)。

50例の患者血清に対する反応成績はTable 3に示した。沈降帯の出現率はFr.1 56%, Fr.2 72%, Fr.3 88%, Fr.4 100%, Fr.5 82%, Fr.6 32%でFr.3, Fr.4, Fr.5に対して常に高い陽性反応がみられる。患者血清のうち全分画抗原に沈降線を認めたものが10例(20%), Fr.6を除き他の5分画に陽性のもの12例(24%), Fr.3, Fr.4, Fr.5及至はFr.4, Fr.5のみに集中的に陽性を呈するものが計11例(22%)で、各分画抗原に対する沈降帯の出現率及びその型は略感染ネコ血清の場合と一致する。次にネコと患者の感染血清でみられる反応でFr.4, Fr.5によるものは一般に強く、肉厚の幅広い沈降帯として現われる。これに比べると

Table 2. Double diffusion test with sera of experimentally infected cats against fractionated antigens of *P. westermani*.

Cat No.	Fractions					
	Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6
1	卅	卅	+	卅	卅	+
2	卅	+	卅	卅	卅	+
3	+	+	+	卅	卅	+
4	+	+	+	卅	卅	+
5	±	+	+	卅	卅	+
6	±	卅	卅	卅	卅	-
7	卅	卅	卅	卅	卅	+
8	-	+	+	卅	卅	-
9	-	+	+	卅	卅	-
10	-	+	+	卅	卅	-

(+, 卅, 卅): showing the grade of strength of bands formed.

Table 3. Double diffusion test with paragonimiasis patients sera against fractionated antigens of *P. westermani*.

Type	Fractions						Total(%)
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6	
A	+	+	+	+	+	+	10 (20)
B	+	+	+	+	+	-	12 (24)
C	+	+	+	+	-	-	4 (8)
D	-	+	+	+	+	+	3 (6)
E	-	+	+	+	+	-	5 (10)
F	-	-	+	+	+	-	11 (22)
G	Other patterns						5 (10)
No. of serum positive (%)	28 (56)	36 (72)	44 (88)	50 (100)	41 (82)	16 (32)	50

(+): showing positive reaction.

Fr.1, Fr.2, Fr.3 の沈降線は一般に弱いものが多いが、概して細い明確な沈降線として見られる (Fig.5).

一方、感作家兔血清との反応では Fr.1, Fr.2 および Fr.3 に強い明瞭な沈降線がみられ、Fr.4, Fr.5 ではこれに比べて比較的弱い。Fr.6 では殆んど反応がおこっていない。

要するに虫卵を排出する感染ネコや完成した人肺吸虫症患者についてみると、所謂、感染血清では Fr.1, Fr.2 及び Fr.6 に対する反応のかたは不定で個体差があるが、Fr.3, Fr.4, Fr.5 分画の陽性率は常に高く、これに対応する抗体系が主体をなすものと思われる。

2. 免疫電気泳動像

4 匹のネコ血清に対する各分画抗原による IEP 上の沈降線は夫々 Fr.1 で 0-3 本, Fr.2 2-5 本, Fr.3 2-5 本, Fr.4 2-5 本, Fr.5 1-4 本, Fr.6 0-2 本がみられるが、Fr.1 及び Fr.2 で形成される沈降線は一般に移動性が低く、陽極側へ向って延びる 3 本の沈降線の夫々の中心の移動位置は概ね試料原点から 8mm と 16mm の間にある。Fr.4~Fr.6 分画による IEP 像ではこれと一致する沈降帯はみられない。Fr.4~Fr.5 では一部原点附近にとどまるものもあるが陽極側に移動する沈降線はその中心位置が 16mm から 40 mm にあるものが多く、特に Fr.5 でみられる泳動帯の形状は肉厚で辺縁がはっきりしないものが多い。Fr.3 による沈降線の位置は両群にまたがり、Fr.6 に

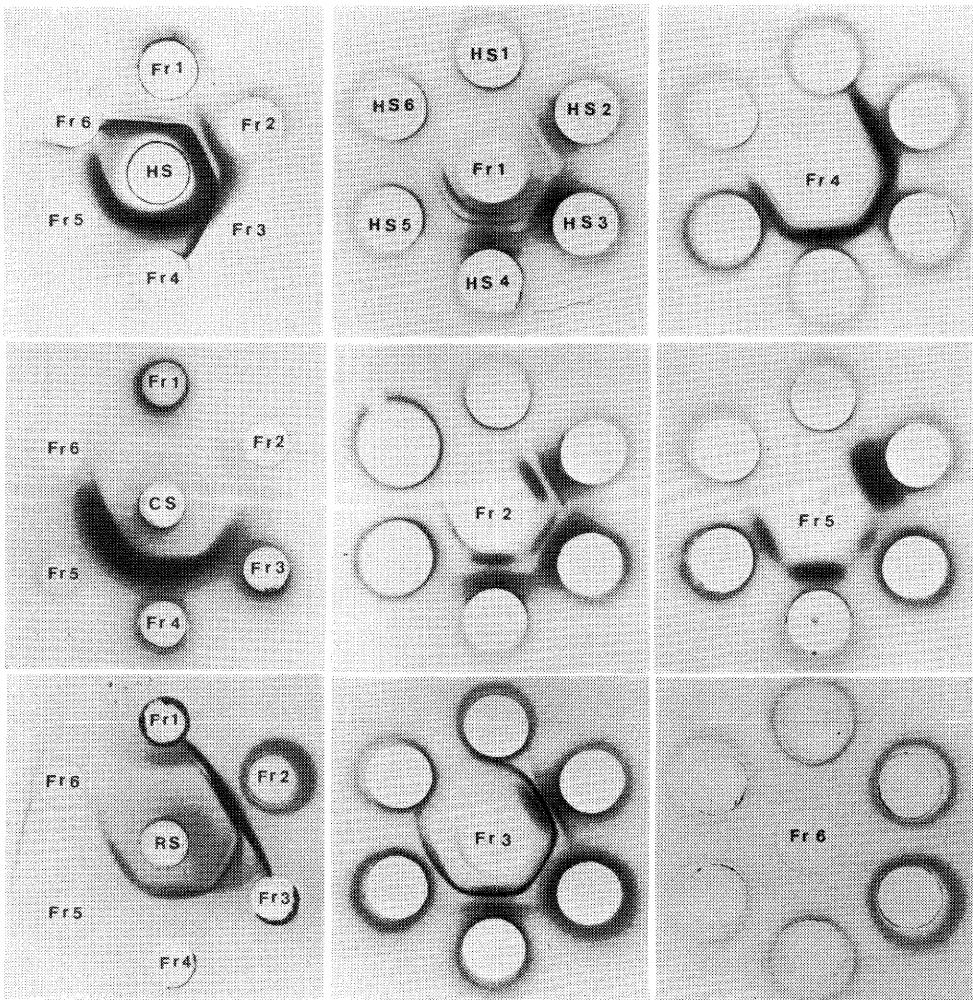


Fig. 5. Ouchterlony reactions with fractionated antigens of *P. westermanni* against infected cat serum, infected human serum and immunized rabbit serum.

RS: immunized rabbit serum, CS: infected cat serum, HS: infected human serum.

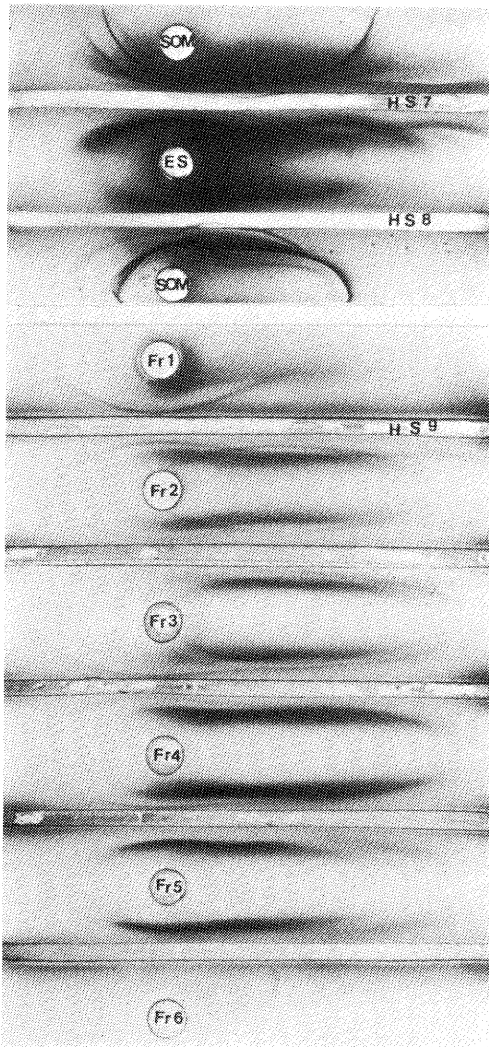


Fig. 6. Immunoelectrophoresis with paragonimiasis patients sera against SOM, ES and fractionated antigens of *P. westermani*. SOM: adult worm extract, ES: excretions and secretions, HS : infected human serum.

よるものは Fr.5 のものと区別が困難で反応も著しく弱い. 患者血清 (12例) の IEP 像の成績は Table 4 と Fig. 6, Fig. 7 に示した. 確認される沈降帯は SOM 粗抗原及び ES 抗原では概ね 2-10本, また分画抗原では Fr.2, Fr.3に多く, 夫々 2-7本と 3-11本でネコ血清と略同じ傾向がみられる. 然し, Fig. 7 にみるように各分画が示す沈降帯の数は感染ネコより人血清に多く, 完成した人肺吸虫症のあるものは感作家兎血清の反応像と似ている. また, Fr.4, Fr.5 による泳動像はいずれも ES 抗原によるそれとよく相似している. 感作家兎血清に対する粗抗原の反応帯 23本の移動域は殆んど全域にわたっており, 感染血清にみられる沈降線のほとんど総てはこの中に含まれるものと思われる.

Ⅲ. 感染後の経過と抗体の産生

4匹のネコで肺吸虫メタセルカリア40個体を与え, 感染後2週毎に26週にわたって採血し, SOM粗抗原寒天平板を用いた一元免疫拡散法によって抗体の希釈倍数による沈降抗体価を測定した. 感染後2倍希釈血清で始めて陽性反応を呈した時期は夫々 2, 4, 6, 8週目であった. はじめて虫卵の排出をみた9-11週目の抗体価は 1:16から 1:64を示した. 以後, 抗体価は直線的に上昇し 14-15週目にはいずれも 1:128から 1:512に達し26週目まで高価を持続した (Fig. 8).

Ouchterlony法でSOM粗抗原に対する沈降帯の出現は2週目からみられ, 同時に行ったES抗原の6週目と比べてその出現が早い. 各分画に対する反応の出方の経過をみると Table 5に示す様に最も早く現われるのがFr.3, Fr.4で2週目から, Fr.5, Fr.6は6週目に, またFr.1は最もおくれて8週目に少数の弱い沈降線が現われる. また, 出現する沈降帯の数や強さは経過に伴って次第に増強がみられ, 特に12週以降は顕著である (Fig. 9). IEPでも同様の傾向がみら

Table 4. Number of bands obtained by immunoelectrophoresis with fractionated antigens of *P. westermani* against various antisera.

Serum	Antigen							
	SOM	ES	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6
Immunized rabbit	23	/	7	11	12	9	5	2
Infected cat	2-9	6	0-3	2-5	2-5	2-5	1-4	0-2
Infected human	2-10	1-9	0-4	2-7	3-11	3-5	2-5	0-2

SOM : Somatic antigen, ES : Metabolic antigen.

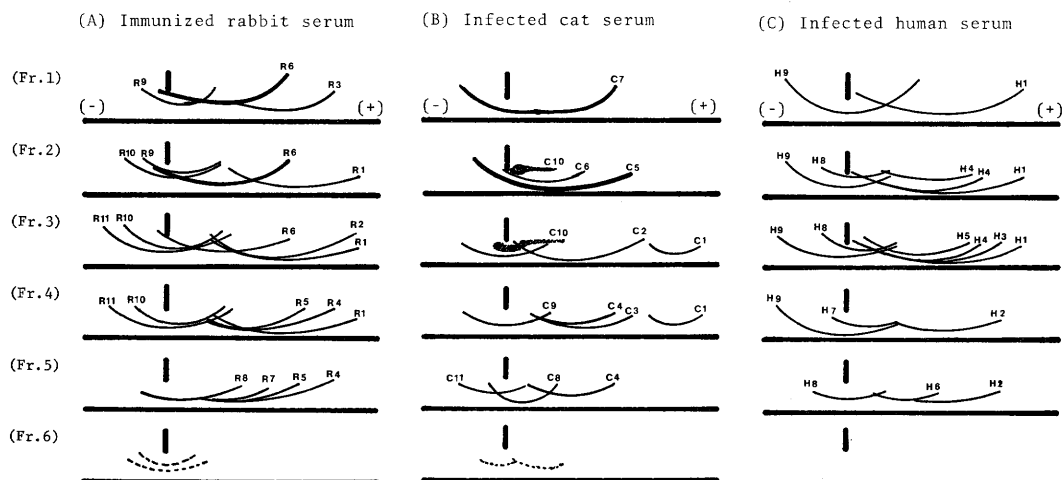


Fig. 7. Immunoelectrophoretic patterns of fractionated antigens against infected human and cat sera and immunized rabbit serum.

れ、特に12週以降に前述のような各分画の特長をもった泳動帯像を示すようになる。また、沈降帯の数は感染後いずれの時期に於ても常に Fr.2, Fr.3, Fr.4 に最も多い。

Fig. 8. Change of precipitating antibody titer in cats experimentally infected with *P. westermani*.

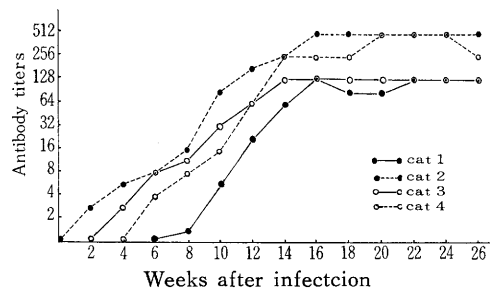


Table 5. Result of Ouchterlony test with fractionated antigens of *P. westermani* against sera from cat serially collected after infection.

Fractions	Sera from cat serially collected after infection												
	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Fr. 1	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	3	3
Fr. 2	0	0	2	2	2	2	4	4	4	4	4	5	5
Fr. 3	0	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4
Fr. 4	0	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
Fr. 5	0	0	0	2	2	2	3	4	4	4	4	4	4
Fr. 6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SOM	0	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4
ES	0	0	0	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3

SOM : Adult worm extract, ES : Excretions and secretions, 0~5 : Number of precipitin bands.

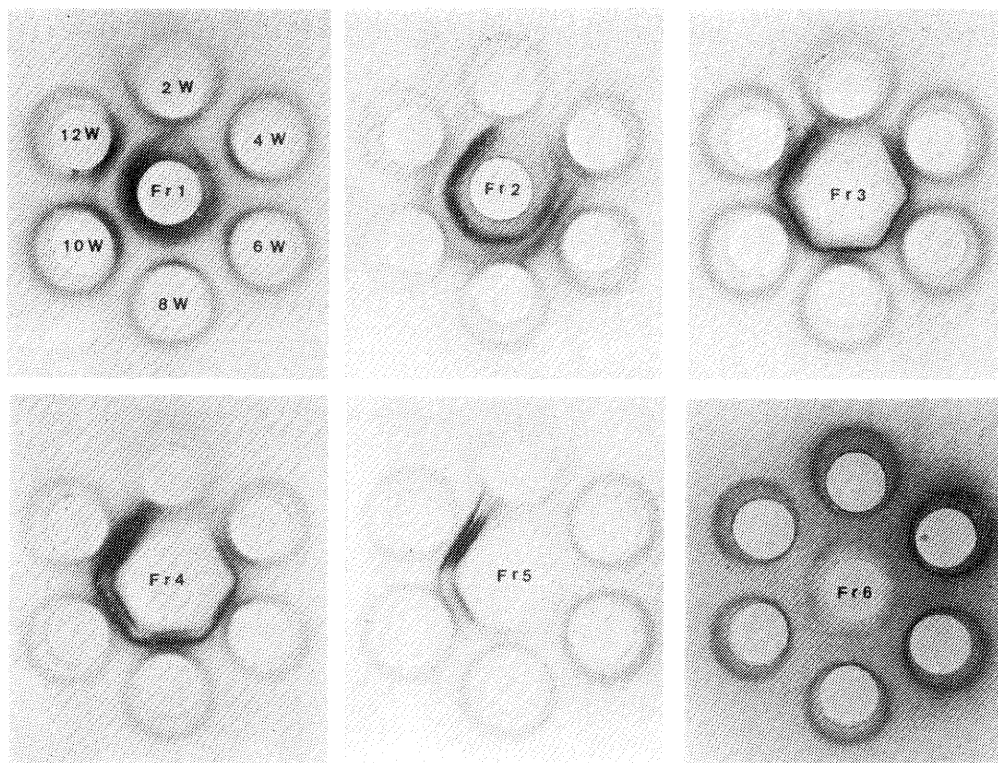


Fig. 9. Ouchterlony reactions with sera from cat serially collected at two week intervals against fractionated antigens of *P. westermani*. Outer well numbers represent weeks after infection.

考 察

Grabar and Williams (1953) が免疫電気泳動法を確立し、さらに Biguet *et al.* (1962) が Manson 住血吸虫の泳動像の検討を行って以来、各種の寄生蠕虫に対しても種の鑑別や抗原構造の解明に応用されるようになった。

著者はウェステルマン肺吸虫感染による宿主の抗体産生の経過とその反応系を追究するため、肺吸虫成虫抽出液を Sephadex G-200 にて分画し、感染血清との間にゲル内沈降反応を行い、その抗原性と感染経過による抗体抗原系の推移を観察した。抽出粗抗原はゲル濾過によって 6 つの分画にわけられるが、虫体を構成する蛋白は分子量 30,000 の小さいものから 700,000 以上の大きいものまで質的に違った蛋白から構成され、その全蛋白量の 75% は 10 万以下の分子量蛋白と考えられる。

SOM 粗抗原の抗血清に対する IEP 像をみると感作家兎血清では約 23 の沈降帯がみられるが、感染ネコ血清や患者血清ではその数が 1~10 本で反応系の数は

少なく、虫体構成蛋白のすべてに対応する抗体が出来るとは考えられない。分画別の感染血清に対する反応をみると最初に溶出される分子量の大きい Fr.1, Fr.2 では沈降帯の出現率は低く、不定で一般的に云って反応の強さも弱いものが多い。これに反して分子量がこれより小さい Fr.3, Fr.4, Fr.5 では常に陽性率が高く、しかも沈降帯は強くその数が多い。又、前者では電氣的易動度が低く、沈降帯は抗原孔附近か、これに近い陽極側に見られるのが特長である。Fr.4, Fr.5 の沈降帯のなかには易動度が高く陽極近くに現われるものが見られる。

感作家兎血清では一般に Fr.1, Fr.2, Fr.3 に対し強い沈降帯がみられるのが普通である。

感染の場合に形成される抗体系は Fr.4, Fr.5 と云った分子量の低い分画に対応するものが主体となることが考えられる。ES 抗原は acrylamide gel 電気泳動像から見ても Fr.4, Fr.5 に近く、しかも感染血清に対する IEP 像も両者は類似していることから考えて抗原構造が似通っている。肺吸虫の感染寄生により宿主の抗体産生には虫体の分泌排泄物がある時期には

有意な役割を果していることが想像される。

Yogore (1965) も感染後の経過の長い感染血清では ES 抗原による沈降帯のすべては SOM 抗原による反応系のなかに含まれると述べている。

横川 (1961) や滝沢 (1964) の研究によるとネコ体内に於けるウェステルマン肺吸虫の発育は 2 週後脱囊幼虫は腹腔内に、3 週目胸腔に、6 週目には肺に移行して虫囊腫の形成が始まり 9-10 週目に排卵、13 週目には完全な成熟虫体となることを観察している。同時にまた発育途上にして死亡、吸収されて行く虫体のあることも否定は出来ない。

SOM 抗原寒天平板を用いた一元免疫拡散法によって感染ネコについて感染後の沈降抗体価の推移をみると、2 週目から沈降帯があらわれ直線的に上昇して 14~15 週で最高の価を示すようになるが、沈降帯が最初に出現する時期は Fr.3, Fr.4 で最も早く、Fr.2, Fr.5 がこれに続き Fr.1, Fr.6 は 6~8 週におくられて出現する。経過が古くなったものの中にはこの分画 (Fr.1, Fr.2) にも強い反応帯を示し感作血清と似た像を示すものもある。各分画とも沈降帯の数は抗体価の上昇にともなって増加する。また、経過に従って新しく追加される反応帯が各分画にみられる。この様に虫体の発育に伴って抗体価は上昇し、新しい抗体抗原系が順次追加されて行く姿がある。これは恐らく虫体の発育に従って虫体構成物質や排泄分泌物の量的、質的变化にもとづくものと考えられる。河野ら (1975) はウェステルマン肺吸虫抽出液の Sephadex G-100 分画について検討し、この肺吸虫に特異沈降帯を呈する抗原活性は第 1 フラクションで認められ、それは可成り高分子のものであることを報告している。辻 (1974) はこの特異沈降帯は泳動原点附近で弧状を示し、肺吸虫症患者の 82.6% に証明されることを記載している。

こう云った種に特有な沈降帯の問題と共に IEP 上に現われる各々の反応帯のもつ意義、特に各発育段階に特有な沈降帯の解析は今後の重要な問題であろう。

ま と め

ウェステルマン肺吸虫成虫抽出粗抗原 (SOM)、飼育液抗原 (ES) 及び Sephadex G-200 で分別した 6 分画抗原について各抗原と感染ネコ血清、患者血清、感作家兎血清との間にゲル内沈降反応を行い、出現する沈降帯像を比較検討して次の様な成績を得た。

1. 虫体粗抗原のゲル濾過により 6 つの分画に分別される。その分子量は 30,000 から 700,000 以上にわたる多種蛋白より構成されるが、全蛋白質量の 76% が分子量 10 万以下のもので占められる。

2. 肺吸虫の感染により粗抗原に対する沈降抗体価、沈降帯の数は次第に増加、増強されるが、虫体成熟後最高に達する。

3. Polyacrylamide gel 電気泳動像から ES 抗原構成は第 4、第 5 分画に相似することを認め、これは IEP でも同様の傾向がみられる。また、IEP でみる各分画で出現する沈降帯像には夫々の特長がみられるが、第 1 分画による沈降線は抗原孔及びそれに近い陽極側に現われ、分画の順に更に陽極側に向って位置する沈降線が増加する。

4. 感染血清での出現率は第 3、第 4、第 5 分画で最も高率で、反応が強く数も多い。第 3、第 4 分画は感染初期から現われ、第 2、第 5 分画がこれに次ぐ。第 1 分画に対する沈降帯の出現は不定で一般に更におくられて現われる。一方、第 6 分画では反応のみられるものが少ない。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜った長崎大学熱帯医学研究所、片峰大助教授、貴重な御助言、御協力を惜しまれなかつた宮崎医科大学石井明教授に深く謝意を表する。

文 献

- 1) 阿部喜美子, 瀬野信子 (1957): 糖類の分離, 定量. 実験化学講座 23, 丸善, 421-422.
- 2) Andrews, P. (1965): The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96, 595-606.
- 3) Capron, A., Vernes, A., Tsuji, M. and Afchain, D. (1969): Human and experimental paragonimiasis: Antigenic structure and host parasite relationship for species of the genus *paragonimus*. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 44, 709-732.
- 4) 浜島房則, 斎藤 奨, 辻 守康 (1972): ウェステルマン肺吸虫感作血清と各発育期抗原による免疫電気泳動像

- の比較. 寄生虫誌, 21(補), 33
- 5) 今井淳一 (1965): 寒天ゲル内拡散法による肺吸虫抗原の検討. 寄生虫誌, 14, 346.
 - 6) 今井淳一 (1972): ウェステルマン肺吸虫の抗原分析に関する研究. 1. 成虫体抽出液の抗原活性と理化学的性状に及ぼす加熱の影響. 熱帯医学, 14(3), 111-123.
 - 7) 今井淳一 (1972): 補体結合反応およびゲル内反応を指標とした肺吸虫抗原分画の検討. 寄生虫誌, 21(補), 34.
 - 8) Kagan, I. G. & Norman, L. (1963): Analysis of helminth antigens by agar gel methods. Ann. N. Y. Acad., 113, 130-153.
 - 9) 片峰大助, 今井淳一, 岩本 功 (1968): 肺吸虫症の免疫学的研究, 一肺吸虫症に於ける寒天ゲル内沈降反応一. 熱帯医学, 10(1), 28-38.
 - 10) 河野英子, 土肥博雄, 辻 守康 (1975): ウェステルマン肺吸虫分画抗原による免疫電気泳動像. 寄生虫誌, 24(2), (補), 42-43.
 - 11) Lowry, O. H., Rosebrouch, N.J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
 - 12) Neilson, J.T.M. (1969): Gel filtration and Disc electrophoresis of a somatic extract and excretions and secretions of *Haemonchus contortus* larvae. Exp. Parasit., 25, 131-141.
 - 13) Pharmacia Fine Chemicals (1966): Sephadex gel filtration in theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden.
 - 14) Sawada, T., Takei, K. & Yoneyama, K. (1964): Studies on the immunodiagnosis of paragonimiasis. 1. The precipitin reaction with crude and fractionated antigens. J. Infect. Dis., 114, 311-314.
 - 15) 滝沢明祐 (1964): ウェステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899 好適及び非好適宿主体内に於ける発育について. 寄生虫誌, 13(3), 19-37.
 - 16) 寺野由剛, 長谷部保彦 (1972): 抗体量の測定法 (4), 一元免疫拡散による Becker 法. 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 164-171.
 - 17) 辻 守康, 横川宗雄, Capron, A. & Biguet, J. (1967): 3種肺吸虫 (*P. westermani*, *P. miyazaki*, *P. ohirai*) の免疫電気泳動像の比較. 寄生虫誌, 16, 541-542.
 - 18) 辻 守康, 横川宗雄, Capron, A. (1968): 肺吸虫感染動物血清に於ける免疫電気泳動像について. 寄生虫誌, 17, 596.
 - 19) 辻 守康 (1975): 数種寄生蠕虫類の感作血清による免疫電気泳動の比較研究. 寄生虫誌, 24, 227-236.
 - 20) 宇井信生 (1967): ゲル濾過による分子量決定への応用. 新しい生物物理化学研究法(上), 化学増刊28, 259-273.
 - 21) Yogore, M.G., Lewert, R.M. & Madraso, E.D. (1965): Immunodiffusion studies on paragonimiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 14(4), 586-591.
 - 22) 横川宗雄 (1961): 肺吸虫の終宿主体内における発育, 終宿主体内移行経路に関する新知見を中心として. 日本医事新報, 1963, 19-25.