肝蛭症の診断に関する研究

I. 沈降反応抗原

市原 鶴雄・進 貞夫・蔵元 虎蔵

(化学及血清療法研究所)

(昭和 31 年 9 月 10 日受付)

I. 緒 言

近来、肝蛭症の診断に免疫血清学的手技を試みる動きが始まるとともに、肝蛭症診断用抗原に関して多くの研究が報告されるに至った。すなわち、WEINBERG¹⁾ (1909) は肝蛭虫体の生理的食塩水抽出液、FAIRLEY 等²⁾ (1923) は石炭酸生理的食塩水抽出液、又 KELLAWAY³⁾ (1928) はエタノール抽出液をそれぞれ抗原として補体結合反応を試みた。WAGNER⁴⁾ (1935) も亦虫体抽出抗原を用いて補体結合反応を行い、更に皮内反応をも試みた。一方本邦においては、虫体より CASALS 法にて抽出した抗原を用いた吉田等⁵⁾ (1954) の報告がある。

皮内反応に関しては、KELLAWAY の虫体の生理的食塩水抽出抗原は true anaphylactic antigen となり得るという報告を始めとして、虫体のエーテル抽出物を抗原とした、AYGUN 等⁶⁾ (1939)、生理的食塩水可溶成分を抗原とした MAZZOTTI⁷⁾ (1942)、人肝蛭症の診断に応用した MAZZOTTI⁸⁾ (1948)、アセトン抽出物を用いた東等⁹⁾ (1950) の報告がある。その他、SZAFLARSKI 等¹⁰⁾ (1951) は虫体の多糖体及び蛋白分割部を用いて眼瞼皮内反応を綿羊について試み、蛋白分割部に比して多糖体分割部の group-specificity が高いということを述べている。以上の種々の研究は臨床上応用されるまでには至らず、いずれも未だ研究的段階を出ないものである。最近、小野等¹¹⁾ (1952) による虫体の生理的食塩水抽出液を煮沸後濾過して得た濾液を抗原とするもの、又、SOULSBY¹²⁾ (1954) による乾燥虫体の生理的食塩水抽出液を 56°C 45 分間滅菌後の遠沈上清を抗原とするものとの、類属反応の認められない二つの優れた皮内反応法が発表せられ、小野法は本邦において臨床診断上広く実施されるに至った。皮内反応抗原を精製せんとする動きは未だ新しく、SOULSBY¹²⁾ は三塩化醋酸沈澱による精製蛋白抗原の調製を試みた

がよい成績は得られなかつた。前川等¹³⁾ (1954) は虫体の煮沸水抽出液の硫酸沈澱分割を石炭酸処理して、アレルギー反応起因物質を結晶状に得たと述べた。しかし、この結晶状物質は耐熱性の muco あるいは gluco-protein、あるいは peptide ならんと推定している。吉田等⁵⁾ は虫体の蛋白、多糖体及び脂質分割を抽出精製して、綿羊、山羊に皮内反応を試みた。椿等¹⁴⁾ (1955) は Uroquhart type の虫体精製蛋白を、更に多糖体及び脂質分割を皮内反応及び補体結合反応に用いて、Uroquhart type 抗原の優秀性を認めたと述べた。小野等¹⁵⁾ (1955) は多糖体抗原の純化精製を試みた。すなわち、牛肝蛭症の皮内反応において特異的作用を示すという虫体の glycogen 分割について、アルカリ分解、amylase 消化を行つて glycogen を除き、この分割中に、皮内反応において有効な抗原性を示す多糖体の存在を推定した。

皮内反応に関してはかように多くの報告があるが、沈降反応に関しては、HOFFMAN 等¹⁶⁾ (1929) の牛肝蛭症に対する沈降反応の試みがあるも、未だ診断的価値のあるものはみられない。肝蛭症における人工免疫性の成立を証明せんとした実験では、KEAR 等¹⁷⁾ (1935)、UROQUHART 等¹⁸⁾ (1954) の報告がある。前者は乾燥虫体物質をもつて免疫した家兎における獲得免疫の存在を述べ、後者は虫体の生理的食塩水抽出液の明礬精製抗原を免疫原として家兎を免疫し、虫体の精製蛋白抗原との間の人工的特異免疫性の成立を証明した。しかし又、定量的沈降反応により測定し得る如く、比較的多量の沈降素産生が促がされることを報告した。更に、椿等¹⁴⁾ は虫体の Uroquhart type 抗原でモルモットを免疫し、特異的補体結合反応抗体の産生について述べた。著者等がここに報告する実験は、肝蛭症沈降反応に関する虫体抗原の血清学的性状を究明するため試みられたものである。すなわち、肝蛭虫体より抽出し

Table 1. Antigenicity of Simple Antigens

(1)

Serum No.	B antigen dilution											A.C.
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
3	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
4	—	—	±	±	±	±	±	—	—	—	—	—
5	—	—	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
6	—	—	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
7	—	+	+	+	+	+	±	±	±	—	—	—
8	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S.C.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(2)

Serum No.	L _{1-a} antigen dilution													A.C.
	10	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100	120		
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	—	
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	
8	#	#	#	#	#	#	+	+	+	+	+	+	—	
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
S. C.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

(3)

Serum No.	L _{1-b} antigen dilution													A.C.
	10	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100	120		
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
7	#	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
8	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
S.C.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

た多糖体及び脂質分劃を沈降原として、牛肝蛭症血清について沈降反応を行い、その反応原性に関連して肝蛭症における血清学的検討を試みた。

II. 実験材料及び実験方法

1) 血清

供試血清としては、肝蛭症感染牛血清、非感染牛血清及び血清対照として生後1週間以内の犢血清が使用された。血清対照は実験の確実性を知るために必ず併用した。

2) 沈降原

a) 多糖体抗原 (抗原 B)

屠畜牛より採取した新鮮な成熟肝蛭虫体を滅菌生理的食塩水でよく洗滌し、凍結融解を反覆し、磨砕器で完全に磨砕した。この磨砕材料に8% 3 塩化醋酸を添加し、2~5°C で24時間抽出した。濾過後上清を流水中で透析し、内液が中性になつてから、それに3倍量の純アセトンを加えて沈澱を集めた。この3 塩化醋酸及びアセトン処理を、4% 三塩化醋酸に不溶性の沈澱が出なくなるまで反覆した。最後に得られた沈澱は帯微黄褐色粉末で、これをアセトン、アルコール及びエーテルの順序でそれぞれ頻回洗滌後、真空乾燥して純白色粉末を得た。これを多糖体抗原 (抗原 B) とする。この抗原は Biuret 反応、Ninhydrin 反応、Xanthoprotein 反応、Millon 反応及び Glyoxyl 反応陰性で、Molish 反応、Phloroglucin 反応、Benedict 反応、Fehling 反応、Orcin 反応及び Resorim 反応陽性である。

b) メタノール可溶性脂質抗原 (抗原 L₁)

前項と同じ前処理を行つた磨砕材料を凍結乾燥し、乾燥物量の30倍量の精製メタノールで30°C、7日間抽出し、上清を分離してこれを抗原 L_{1-a} とした。これを2~5°C に2日間放置して生ずる沈澱を除去した上清を抗原 L_{1-b} とした。抗原 L_{1-b} を得るときには多量の沈澱が生じた。

c) エタノール可溶性脂質抗原 (抗原 L₂)

メタノール可溶性脂質抗原と同様な方法で、精製エタノールで抽出し、抗原 L_{2-a} 及び L_{2-b} を得た。抗原 L_{2-b} を得るときにはあまり沈澱は生じなかつた。

3) 抗原稀釈法

抗原 B は生理的食塩水で100倍から倍進稀釈法で102400倍まで稀釈調整した。抗原 L は生理的食塩水で5倍、10倍、15倍……と Table 1. に示されたように遞減的に稀釈調整した。一般に、沈降

[illegible][illegible]

原の着色度が強いと沈降輪の判別が困難となる。この抗原 L を生理的食塩水で稀釈する場合着色しやすいので、この稀釈に際しては着色度が可及的に少いよう充分留意して急速に行つた。多糖体脂質混合抗原 (抗原 M) は抗原 B 及び L を混合調製したものである。すなわち、各稀釈度の抗原 L 液でそれぞれ抗原 B を 100 倍から 102400 倍まで倍進稀釈法にて調製した。

重層法，抗原減量法に準じて実施した。被検血清は特に記す以外はすべて 56°C 30 分加温して非働性としたものを用い，一度非働性にしたものは，次回使用に際しては 56°C 10 分加温した。抗原稀釈液は調製後 30 分以内に使用した。判定は抗原重層後 1 時間及び 1 時間半の 2 回にわたって行つた。

成績の判定には卍, 卐, 卐, 十, 土, 一の 6 段階

抗原 B と 4 種類の抗原 L をそれぞれ混合して、

Table 2. Antigenicity

Serum No.	L _{1-a}	B												L _{1-b}	B											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A.C.		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A.C.
1	10	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	10	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	±	+	+	+	±	-	-	-	-	15	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-	20	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	30	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-
2	10	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	10	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	15	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	±	+	+	+	±	±	-	-	-	-	20	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	±	+	+	+	±	±	-	-	-	-	30	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	10	±	#	#	#	#	#	+	-	-	-	-	-	10	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	15	±	#	#	#	#	#	+	-	-	-	-	-	15	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	20	±	+	+	#	#	+	+	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	±	+	+	#	#	+	+	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	10	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	10	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-	15	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-	20	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-
5	10	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	10	-	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	15	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	15	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	20	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	30	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	10	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	10	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	15	+	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	15	-	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	20	+	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	20	-	±	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	30	+	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	30	-	±	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-
8	10	-	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	10	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	15	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	15	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	20	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	20	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	30	-	-	±	+	#	#	#	#	#	#	#	-	30	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9	10	-	-	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	10	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. C.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

N.B. B antigen dilution 1: 100×2ⁿ

S. C. Normal serum

A. C. Antigen control

of Complex Antigens

L 2-a	B											C	L 2-b	B											C	Serum No.
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	
30	-	-	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-	30	-	-	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-	1
40	-	-	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-	40	-	-	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
50	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	50	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
60	-	-	-	±	±	+	+	±	-	-	-	-	60	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
30	-	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	30	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	2
40	-	±	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-	40	-	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
50	-	-	±	+	+	+	+	±	±	-	-	-	50	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
60	-	-	-	+	+	+	±	±	-	-	-	-	60	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
30	+	#	#	#	#	#	+	-	-	-	-	-	30	±	#	#	#	#	#	+	-	-	-	-	-	3
40	+	#	#	#	#	#	±	-	-	-	-	-	40	±	#	#	#	#	#	+	-	-	-	-	-	
50	±	#	#	#	#	+	±	-	-	-	-	-	50	±	+	#	#	+	+	+	-	-	-	-	-	
60	±	#	#	#	#	+	±	-	-	-	-	-	60	±	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	+	+	+	+	±	±	±	±	-	30	-	-	±	+	+	+	+	+	±	-	-	-	4
40	-	-	+	+	+	+	+	±	±	±	±	-	40	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
50	-	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	50	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
60	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	60	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
30	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	30	-	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-	5
40	-	-	-	+	+	+	+	+	±	±	±	-	40	-	±	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	
50	-	-	-	+	+	+	+	±	±	±	±	-	50	-	±	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	
60	-	-	-	+	+	+	+	±	±	±	±	-	60	-	±	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	
30	±	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	-	30	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+	±	-	6
40	±	±	#	#	#	#	#	#	#	+	-	-	40	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	-	
50	±	±	#	#	#	#	#	#	#	+	-	-	50	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	-	
60	±	±	+	#	#	#	#	#	#	+	+	-	60	-	-	#	#	#	#	#	#	#	+	-	-	
30	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	30	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	7
40	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	40	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	
50	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	50	±	+	#	#	#	#	#	#	#	#	+	-	
60	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-	60	±	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+	-	
30	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	30	-	+	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	8
40	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	40	-	-	+	#	#	#	#	#	#	#	#	-	
50	-	-	±	#	#	#	#	#	#	#	#	-	50	-	-	±	#	#	#	#	+	+	+	+	-	
60	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	60	-	-	-	±	#	+	+	+	+	+	+	-	
30	-	-	±	±	+	+	+	±	±	-	-	-	30	-	-	-	±	±	±	±	±	-	-	-	-	9
40	-	-	±	±	+	+	+	±	-	-	-	-	40	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-	
50	-	-	±	±	+	+	+	±	-	-	-	-	50	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	
60	-	-	±	±	+	+	+	±	-	-	-	-	60	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-	30	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	10
40	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-	40	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-	
50	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
60	-	-	-	±	+	±	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S. C.
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Table 3. Changes of the Reactions by Time

Serum No.	Reaction with B antigen					Reaction with Mantigen				
	Appeared	Maximum	Decreased	Disappeared	Reaction area in Maximum	Appeared	Maximum	Decreased	Disappeared	Reaction area in Maximum
3	※	60	240	※※	+~ 6	※	60	240	※※	+~ 6
6	30	45	180	330	2~ 6	20	45	180	330	2~ 6
7	※	180	240	※※	+~+	※	120	180	※※	+~+
8	20	90	150	300	2~ 6	※	45	300	※※	2~+
11	※	120	210	※※	+~+	※	90	210	※※	+~+
12	※	※	※	120	4	※	※	※	120	4~ 5
13	45	90	120	270	2~ 6	45	90	120	300	2~ 6
14	※	60	240	330	1~ 6	※	90	180	360	1~ 7
17	30	150	210	※※	2~ 6	30	45	180	300	1~+
20	※	90	180	※※	+~+	※	45	210	※※	+~+
21	※	60	150	210	3~ 5	※	45	120	210	3~ 6
25	※	60	150	360	1~ 9	※	60	150	※※	1~+
28	※	60	150	300	+~ 9	※	30	120	330	+~ 9
29	20	45	120	180	2~ 5	※	45	180	210	2~ 6
31	※	60	300	※※	1~ 6	20	150	330	※※	1~ 6
32	20	60	210	300	2~ 6	20	90	180	300	1~+
34	20	90	180	※※	+~ 7	20	60	210	※※	+~+
37	※	90	240	※※	+~+	※	60	300	※※	+~+
38	※	30	240	240	2~ 5	※	90	240	300	2~ 6
40	20	90	180	240	+~ 8	20	90	180	300	1~ 9

N. B. Figures indicate the time (minutes).

Reaction areas are indicated by the precipitation titer (1: 100×2ⁿ).

"※"...Indicates that the reaction appeared already after the minutes.

"※※"...Indicates that the reaction did not disappear yet after six hours.

"+~"...Indicates the positive reaction in n=0.

"+~+"...Indicates the positive reaction in n=10.

混合抗原とした場合の抗原性を調べたところ、Table 2. に示すような成績が得られた。抗原 B は 100 倍より倍進稀釈法に従い、抗原 L は先ず L₁ は弱反応の終価と考えられる 15 倍乃至 20 倍、L₂ は 40 倍乃至 50 倍に混合稀釈して混合抗原を調整した。抗原 B に対する反応はいずれも阻止されることなく反応度増大し、更に L_{1-a}、L_{2-a}、L_{2-b} との混合抗原においては、抗原 B に対して反応しなかつた No. 1, 9, 10 に対しても明瞭な反応が発現した。L_{1-b} との混合抗原においては、全く抗原性の増大は認められなかつた。これらの各種混合抗原はいずれも、健康牛血清及び血清対照に対する反応は陰性であつた。

2) 反応発現と反応持続時間

抗原 B 及び M に対する反応を行つた場合、それぞれ反応が発現し始めてから完全に消失するまでの時間的経過を明らかにして、反応の最適判定時間を知るために、以下の実験を試みた。すなわち、陽性血清 20 例、陰性血清 3 例を用い、抗原重層後 10 分から 6 時間に至るまで、反応の消長を観察した。Table 3. から、抗原 B 及び M の両反応系を通じ

て、大約次のようなことが推定された。No. 13 のみには 45 分を要したが、反応発現開始は遅くとも 30 分以内にみられる。反応極期は 60 分乃至 90 分の間におとずれ、その極期は 90 乃至 240 分の間、すなわち抗原重層後 150 乃至 300 分附近後まで持続する。極期の持続時間と消失時間との間には、全く相関は認められなく、6 時間に至るも尚沈降輪が明瞭に残っている例が相当みられた。更に又、極期における反応域の広いものは反応持続時間も長い。尚、両反応系における反応の時間的消長には有意の差は認められなかつた。対照として用いた健康牛血清には、全く反応は認められなかつた。

3) 各種抗原の反応に対する血清加温の影響

16 例の陽性血清及び 3 例の陰性血清について、それぞれ 63°C、3 乃至 15 分加温して、抗原 B 及び M の反応に対する血清加温の影響を調べた。尚、56°C、30 分加温した際の反応を対照として行つた。対照と 63°C、3 分加温との間には、両者抗原の反応に対する反応消長の差異は全く認められなかつた。加温時間が長くなるに従つて、反応域が狭くなり、

Fig. 1. Influence of Heating of Serum on the Reactions with B and M Antigens

N. B. Antigen dilution 1: 100×2ⁿ.
 Figures indicate serum number.
 Each serum are heated at 63°C for the following time; 3, 5, 7, 10 and 12 minutes.
 C: Control (56°C, 30 minutes).

更に同時に弱反応を示すようになることは、両抗原を通じて共に顕著であつた。Fig. 1. に示したように、反応は 63°C, 10 分加温により殆んど消失する。しかし、16 例の陽性血清中 No. 8 のみは、10 分加温においても抗原 M に対して弱反応を示した。

4) 最適比法による反応の検討

前述したように、肝蛭虫体各成分の沈降原性について種々検討した結果、抗原 M が反応原として優れている事が解つた。そこで沈降反応実施に際して、該抗原の反応における反応の場を検討しておくことは有意義である。以下、混合法総合法によつて反応の場を求めた。術式は、先ず抗原は抗原 M を前述の方法により稀釈し、血清は倍進稀釈法により 128 倍まで稀釈し、二次元的に混合後、37°C に放置し、各経過時間毎における反応様相をみた。最もすみやかに発現するのは、抗原の 400 倍乃至 1600 倍稀釈と血清の原液乃至 2 倍稀釈の範囲であつた。10 例の陽性血清における結果をみると、大体 2 時間で反応が認められ、24 時間後に最高に達した。健康血清及び血清対照には、反応は認められなかつた。Table 4. 及び Fig. 2. に示したように、主として、抗原側についてみると抗原の 400 倍乃至 1600 倍稀釈が最もすみやかに反応が発現することから、該抗原の反応の最適比はこの範囲内にあることが解つた。

IV. 総括及び考察

寄生虫症の免疫血清学的反応において、虫体の多

糖体、脂質及び蛋白質の各分劃いずれも抗原性を示すことが解つている。著者等は肝蛭症を対象として、虫体の多糖体及び脂質分劃の沈降原性の問題を追求して、両物質共に沈降原性を有するという成績を得た。

実験に供した抗原は多糖体抗原 (抗原 B), メタノール可溶性脂質抗原 (抗原 L₁), エタノール可溶性脂質抗原 (抗原 L₂) の 3 物質であつて、いずれも抗原性を示すが、脂質抗原では L₁ は L₂ より抗原性がやや弱く、とくに低温条件にて生成してくる沈澱物質を除去したものについてみると、完全な抗原性の低下が抗原 L₁ に認められた。このことは脂質として総称されている沈降原性物質の、メタノール、エタノールの両溶媒に対する溶解度に相当の差があることを意味していると考えられる。しかして又、脂質抗原中の特異的沈降原性物質の純化の可能性を示すものと推察される。次に、多糖体及び脂質抗原を適当な比に混合して、あるきまつた組成をもつ Complex 抗原をつくると、各抗原それぞれ单独の場合よりも、更に良好な沈降原性を示すことが証明された。この実験結果は、それぞれ抗原性の弱い全く性状の異つた物質でも、それらのある一定の比を有する Complex 抗原に調製すると、抗原力増強作用あるいは抗原力相乗作用を示す場合があるということの一つ提示であらう。これらの抗原の類属反応性の問題については、稿を改めて述べたい。

多糖体抗原及び Complex 抗原による反応様相の

Table 4. Box Titration with M Antigen

Serum No.	Serum dilution	Passed time (hours)	2											16										
			Antigen dilution											Antigen dilution										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A.C.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A.C.
13	1		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	4		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	64		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	128		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
17	1		-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	4		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	64		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	128		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

N. B. Antigen dilution 1: 100×2^n .

Fig. 2. Box Titration with M Antigen

N. B. Antigen dilution 1: 100×2^n .

Figures indicate serum number.

Curves of No. 13, 14 and 15 are out of figure at 24 hours.

時間的消長について、その検討結果をみると反応極期は反応開始後 60 分乃至 90 分後に現われることから、本反応の成績判定は、これに従つて 60 分及び 90 分後の 2 回にわたつて行えば最も好結果を示すと考えられる。この反応に参与している抗体は割合に熱に対する抵抗性が強く、 63°C 、5 分の加温では、反応消失するもの少く、 63°C 、10 分の加温によつて漸く殆んど反応消失がみられる。

肝蛭症の沈降反応において、抗原抗体反応の様相を考慮するために試みられた定量的な検討に関しては、その詳細な血清学的論述は別報するが、Complex

抗原による反応の最適比の域は、抗原側においては抗原濃度 400 倍乃至 1600 倍の間に存在することが解つた。この点に関しては、更にこれらの前後の比率を細分して 2 次元的な検討を行うことが必要であるが、一応、この反応の適比は、抗原側においては 1600 倍稀釈の点に求めて差支えない結果が得られた。

寄生虫症の診断を免疫血清学的反応によつて行わんとする試みが始まつてから、すでに久しいものがある。免疫血清学的反応を診断に応用するに際して、最も問題となるべきものの一つは、抗原の精製の問

Table 5. Cross Absorption Tests of Fasciola and Paramphistomum Antigens

<div><div></div><div>Absorbed with</div></div> <div>Precipitation before absorption</div> <div>Precipitinogen</div>		Precipitation after absorption				No. of cases
		Paramphistomum		Fasciola		
		Whole homogenate of parasite	M antigen	Whole homogenate of parasite	M antigen	
F	+	+	+	—	—	26
P	+	—	—	+	+	
F	+	+	+	—	—	7
P	—	—	—	—	—	
F	—	—	—	—	—	4
P	+	—	—	+	+	
F	—	—	—	—	—	3
P	—	—	—	—	—	

N.B. F....Fasciola antigen
P....Paramphistomum antigen

Table 6. Precipitin Tests after Absorption

Serum No.	Precipitinogen	Absorbed with	Precipitin titer before absorption	Precipitin titer after absorption			
				Paramphistomum		Fasciola	
				Whole homogenate of parasite	M antigen	Whole homogenate of parasite	M antigen
11	F		8	6	6	—	—
	P		7	—	—	4	5
15	F		6	5	4	—	—
	P		5	—	—	3	2
17	F		4	4	4	—	—
	P		5	—	—	3	4
39	F		7	5	4	—	—
	P		7	—	—	4	4
S C	F		—	—	—	—	—
	P		—	—	—	—	—

N.B. Precipitin values are indicated by n in antigen dilution 1: 100×2ⁿ.
F....Fasciola antigen
P....Paramphistomum antigen

題であることは今更論を俟たない。寄生虫症においては、反応原は主として虫体物質として得られている。これに関して現在まで報告された肝蛭症を対象とする試みは、皮内反応、補体結合反応、沈降反応であつて、虫体物質の血清学的性状について、多くの興味ある研究が行われている。しかしながら、これらの研究は皮内反応原及び補体結合反応原について詳しく、沈降原に関しては知見が少ない。沈降原としては、とくに蛋白抗原に関しては UROQUHART 等¹⁸⁾の知見がみられるが、多糖体及び脂質抗原については十分な報告は見当たらない。以上述べられた実験結果によつて、精製多糖体及び脂質抗原について、

それらの沈降原としての血清学的性状がいささか明確になつたものと考えられる。

V. 結 論

牛肝蛭症の免疫血清学的反応の考察の一環として、肝蛭虫体成分を沈降原として、沈降反応について検討を試みた。

(1) 多糖体抗原、メタノール可溶性脂質抗原、エタノール可溶性脂質抗原のいずれも沈降原性を示し、とくに、多糖体及び脂質両抗原を適当な比でもつて混合した Complex 抗原は、最も良好な沈降原性を示す。メタノール可溶性脂質抗原はエタノール

可溶性脂質抗原に比べて若干抗原性が弱い。

(2) 多糖体抗原及び Complex 抗原の両反応系における反応の時間的消長には殆んど差がみられず、遅くとも 30 分以内に反応発現し、反応極期は 60 分乃至 90 分後の間に現われる。反応開始後 6 時間を経過しても、尚反応持続するものが相当みられる。

(3) 多糖体抗原及び Complex 抗原による反応は、比較的熱に対する抵抗性が強く、63°C、10 分の血清加温により漸く殆んど消失する。

(4) Complex 抗原の反応における反応の場は大きく、抗原側における最適比の域は、多糖体濃度 400 倍乃至 1600 倍の間に存在する。尚、エタノール可溶性脂質は稀釈度 50 倍とした混合割合が最適である。

稿を終るに臨み、竹屋所長に敬意を表し、御指導並びに御校閲を賜わった熊本大学医学部六反田教授及び岡村教授に深謝の意を表します。尚、本実験遂行中、種々御協力を戴いた所員各位に感謝致します。

(附) 肝蛭、双口吸虫抗原の交叉的吸収試験について、肝蛭症沈降反応の類属性検討のため、先ず、双口吸虫を対象として実験を試みたので、その成績

を略記する。

(1) 吸収抗原：試験に用いた抗原は、肝蛭及び双口吸虫の夫々新鮮虫体全乳剤と抗原 M である。

(2) 方法：牛血清 (56°C、30 分加温) 1 cc に虫体乳剤 1 g 添加、37°C、2 時間保存、氷室 1 夜放置、遠心分離、双口吸虫抗原 M に対する沈降素の完全吸収を確認後 (吸収不充分の場合は吸収操作を反覆)、肝蛭抗原 M にて沈降反応混合法実施、16 時間目に成績判定。吸収原が抗原 M の場合は、2 倍稀釈血清 1 cc に双口吸虫抗原 M 1 cc 添加。予備試験に予め肝蛭及び双口吸虫抗原 M にて定量的混合法を行い、該試験による沈降素の消長は血清の同一稀釈度にて比較。該試験と交叉的に、肝蛭抗原による吸収試験を上記と同術式にて実施。

(3) 実験成績：肝蛭、双口吸虫混合感染牛を含む累計 40 例について試みたところ、Table 5. に示す成績が得られた。吸収処置血清はいずれも他種抗原に対する反応性には大きな変化は示さず、吸収抗原に対する反応は認められなかつた。この吸収処置による沈降素価の消長は Table 6. の如くであつた。これにより、肝蛭抗原 M と双口吸虫抗原 M は互いに特異的沈降原性を発揮することが解つた。

〔文献は第Ⅲ報に記載する〕

STUDIES ON THE DIAGNOSIS OF FASCIOLIASIS I. ANTIGENS FOR THE PRECIPITATION TEST

Tsuruo ICHIHARA, Sadao SUSUMI and Torazo KURAMOTO

The Chemo-Sero Therapeutic Research Institute, Kumamoto

(Received for Publication Sept. 10, 1956)

The serological features of antigens of *Fasciola hepatica* were investigated by the precipitation test. An attempt was made to prepare a more purified antigen which would distinguish affected animals from the nonaffected more definitely. The purified polysaccharide, methanol soluble lipid, and ethanol soluble lipid, all extracted from the mature parasites, were used as the antigen in the test.

The purified polysaccharide (B) was prepared by treating trichloroacetic acid extraction and the fractionation with acetone. The lipid fractions (L) were respectively prepared by the following methods, i. e. L1-a was extracted with methanol at 30°C for a week, L1-b was prepared by removing the precipitates produced from L1-a at low temperature for two days. L2-a and L2-b were extracted with ethanol

by the same process described above. Sera of *Fasciola hepatica* infested cattle were tested with the precipitation and found to contain the precipitin which responded to these antigens. They were used individually but proved unsatisfactory for the test. Among the L antigens, L_{1-b} had the weakest response. It was considered that this phenomenon was due to the difference in the solubility of the two solvents for antigenic lipid fractions. The complex antigen (M) prepared by mixing B with L, however, presented excellent reactivity.

The optimum proportion ratio of the two components in M antigen was found by the two dimensional method. This reaction area was wide, and the optimum proportion area on the antigen side covered a B antigen dilution ranging from 400 to 1600 when L(L₂) dilution was 1:50.

The precipitin, reacted with these antigens, was relatively thermostable, i. e. it resisted at 63°C for seven minutes, and disappeared at 63°C for ten minutes.

The antigen of *Paramphistomum cervi* prepared by the same process as the *Fasciola hepatica*, was used to test whether this parasite and *F. hepatica* had a common antigen or not. As a result, no alliance in reaction existed between the two antigens.