肝 吸 虫 に 関 す る 研 究

(I) 抗原の精製及び沈降反応について

松 田 忠 泰

群馬大学医学部衛生学教室 (主任 沢田 利貞 教授)

緒 言

肝吸虫の免疫学的研究は数少なく、竜治は肝吸虫症患者の血清に対して、罹患者の肝臓から採取した虫体のアルコール抽出液を以て補体結合反応を行ない、中等度又は重篤な感染の場合に60%反応陽性であったことを報告している。また桑原、武藤は肝吸虫症患者の補体結合反応を行ない、感染の初期や軽度の感染では反応陰性であったが、慢性のものでは反応陽性であったと報告している。森は肝吸虫体乾燥粉末1gに10mlの割合に生理的食塩水を加え、滅菌乳鉢中で磨砕したものを42°C 3時間保温後遠心沈澱 (4,000r.p.m. 30分) して得た上清を抗原として、家兎に2ml 宛3回 (注射間隔4日) 静注し、静注後得た血清と前記の抗原との沈降反応を行なったところ、抗原稀釈倍数1,000倍まで陽性であり、また、虫体抗原を以て免疫した家兎の抗血清に対して、肝蛭及び肺吸虫虫体抗原は特異な沈降反応を示すが、蛔虫及び条虫虫体抗原は反応しない。即ち、各種吸虫間には共通抗原性の存在することを報告している。

実験材料及び方法

粗抗原の調製

肝吸虫症の流行地岡山県産鯉科の淡水魚、モツゴ (*Pseudorasbora Parva*) より得たメタセルカリアを成犬に経口的に投与して肝吸虫を感染させ、40日乃至60日後に感染犬を撲殺剖検して肝臓を取り出し、肝臓より肝吸虫の虫体を可及的無菌操作のもとにあつめ、得た虫体を滅菌水で数回洗滌した後、濾紙で水分を除き、次に凍結乾燥を行なって乾燥虫体を得た。

これを乳鉢で磨砕して得た乾燥粉末 (1461mg) に生理的食塩水 (20ml) を徐々に加えながら乳鉢で約30分間 (室温18°C) 磨砕した後、これを遠心沈澱 (3,500r.p.m.

m15分間) して上清(1)と沈澱(1)とに分けた。得た上清(1)を流水透析 (5°C, 22時間) 後 pH を7.0に補正して凍結乾燥して抗原A (260mg) を得た。沈澱(1)は更に前記と同様に生理的食塩水 20ml を徐々に注加しながら乳鉢で磨砕したものを遠心沈澱 (3,500r.p.m. 15分間) して上清(2)と沈澱(2)に分けた。上清(2)は抗原Aを得た場合と同様の操作を行なって抗原B (90mg) を得た。沈澱(2)は生理的食塩水15ml を加え、乳鉢で磨砕後 Sonic disintegrator による曝射 (10KC, 10°C) を行ない、次に遠心沈澱 (3,500r.p.m. 10分間) を行なって上清(3)と沈澱(3)とに分けた。上清(3)は抗原Aの場合と同様の操作を行ない抗原C (160mg) を得た。沈澱(3)は生理的食塩水10ml を加え100°C, 60分間加熱処理後遠心沈澱 (3,500r.p.m. 10分間) を行なって上清(4)と沈澱(4)に分けた。次に上清(4)を流水透析 (5°C 22時間) 後凍結乾燥して抗原D (5mg) を得た (Diagram I)。以上の方法によって得た4種の抗原A, B, C, Dを以て実験を行なった。

(1) 肝吸虫感染家兎血清と4種抗原 (A, B, C, D) との沈降反応

肝吸虫感染家兎血液は人工感染後60日目に撲殺し、剖検の際に採血したもので、同時に肝臓内の肝吸虫寄生を確認した。沈降反応は重疊法により、4種抗原 A, B, C, D の粉末を各々生理的食塩水で100倍より10,000倍に稀釈し、実験を行なった。なお、反応は30分, 60分, 90分, 120分の結果を観察した。

沈降反応の結果を各抗原別にみると抗原Aについて10,000倍まで陽性、抗原Bについては1,000倍まで陽性で、10,000倍では陰性であった。抗原Cについては10,000倍まで陽性、抗原Dについては1,000倍まで陽性であったが10,000倍では陰性であった (表1)。なお、対照の正常家兎血清と4種抗原 A, B, C, D との反応は何れも陰性であった。

Diagraml. Fractionation of adult worms

表1 4種抗原 (A, B, C, D) による
肝吸虫感染家兎血清との沈降反
応

抗原 の種類	抗原 の 稀釈度	沈 降 反 応 の 強 さ			
		30分後	60分後	90分後	120分後
A	100	±	+	+	+
	1,000	-	+	+	+
	10,000	-	-	+	+
	Cont.	-	-	-	-
B	100	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+
	10,000	-	-	-	-
	Cont.	-	-	-	-
C	100	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+
	10,000	-	+	+	+
	Cont.	-	-	-	-
D	100	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+
	10,000	-	-	-	-
	Cont.	-	-	-	-

(2) 肝吸虫患者血清と抗原 (A, B, C, D) との沈降反応

抗原 A, B, C, D は前述の如く生理食塩水を以て稀釈し, pH を 7.0 に補正し遠心沈澱 (4,000r.p.m. 10分間) を行なって得た上清を 200倍から 12,800倍まで稀釈した. 肝吸虫症患者血清は糞便検査 (MIFC集卵法) により肝吸虫卵を確認した患者 3 名より得た血清を使用した.

沈降反応の結果を各抗原別にみると,

患者血清 No 2. に於ては, 抗原 A による反応は 800 倍まで陽性であったが 1,600 倍は疑陽性

3,200 倍では陰性であった。抗原B, C, Dについては共に 400 倍まで陽性で 800 倍では陰性であった。

患者血清No.4に於ては、抗原Aによる反応は1,600 倍まで陽性であるが3,200倍では疑陽性、6,400倍で陰性であった。抗原Bによる反応は400 倍まで陽性、800倍まで疑陽性、1,600倍で陰性であった。抗原Dによる反応は800倍まで陽性、1,600倍では陰性であった。

患者血清No.7に於ては、抗原Aによる反応は800 倍まで陽性で、1,600 倍では陰性であった。

患者血清と抗原 B, C, D との沈降反応は抗原Aとの反応より弱く、抗原 Bによる反応は400~800 倍まで陽性で、1,600 倍では陰性、抗原Cによる反応は400倍まで陽性で、800倍では疑陽性乃至陰性、抗原Dによる反応は200倍~1,600倍まで陽性で、3,200倍では陰性であった。

なお、対照の健康人血清と4種抗原(A, B, C, D)との沈降反応の結果は何れも陰性であった。

なお、感染後60日目の家兎血清(No.1, No. 3, No. 4)とA, B, C, D各抗原との沈降反応を同様の方法で行なった所、前述の結果と同様抗原Aによる反応が最も強く、その強さはA, B, C, Dの順であった。以上肝吸虫罹患家兎血清及び肝吸虫症患者血清と4種抗原A, B, C, Dとの沈降反応の結果は抗原Aによる反応が最も強く現われた(表2)。

(3) 抗原A, B, C, Dの濾紙電気泳動

試料は前述の方法により得た4種の抗原A,

表2 4種抗原(A, B, C, D)による患者血清及び感染家兎血清との沈降反応

番 号	抗 原	稀 釈 度	沈 降 反 応 の 強 さ						
			200×	400×	800×	1,600×	3,200×	6,400×	12,800×
患者血清 No. 2	A		++	++	+	±	—	—	—
	B		++	++	—	—	—	—	—
	C		++	++	—	—	—	—	—
	D		++	++	—	—	—	—	—
	Cont.		—	—	—	—	—	—	—
患者血清 No. 4	A		++	++	+	+	±	—	—
	B		++	++	+	+	—	—	—
	C		++	++	±	—	—	—	—
	D		++	++	+	—	—	—	—
	Cont.		—	—	—	—	—	—	—
患者血清 No. 7	A		++	++	+	—	—	—	—
	B		++	++	—	—	—	—	—
	C		++	++	—	—	—	—	—
	D		++	++	+	+	—	—	—
	Cont.		—	—	—	—	—	—	—
家 兎 No. 1	A		+++	+++	+++	+	±	—	—
	B		+++	+++	+	±	—	—	—
	C		+++	+++	±	—	—	—	—
	D		+++	+++	+	—	—	—	—
	Cont.		—	—	—	—	—	—	—
家 兎 No. 3	A		+++	+++	++	+	±	—	—
	B		+++	+++	±	—	—	—	—
	C		+++	+++	±	—	—	—	—
	D		+++	+++	+	—	—	—	—
	Cont.		—	—	—	—	—	—	—
家 兎 No. 4	A		+++	+++	++	+	+	—	—
	B		+++	+++	+	—	—	—	—
	C		+++	+++	±	—	—	—	—
	D		+++	+++	+	—	—	—	—
	Cont.		—	—	—	—	—	—	—

B, C, Dの各2mgをVeronal Buffer(pH8.6)に溶解(不溶部分も含む)したもので、糖及び蛋白部分の観察を行なった。電気泳動装置はGrassman型を採用し、緩衝液はVeronal Buffer(Sodium diethyl barbiturate 10.3g, Diethyl barbituric acid 1.84g)を蒸溜水を以て1,000mlとしたものを使用し、濾紙は東洋濾紙のNo.51(30×2cm)を使用した。電気泳動は濾紙巾1cm当り0.35mAの電流で5時間30分、室温の泳動条件で行なった。蛋白質の確認には森、平井、島尾のB.P.B染色、糖の確認にはSchiffの試薬を使用し、何れもDensitometerを用い直接濾紙上で呈色度を測定した。

抗原の泳動像については蛋白部分は原点の部

分に1個のPeakと陽極側に1個の大きいPeakが認められ、糖質部分は反対に陰極側に1個の大きいPeakと僅かに原点の部分に1個のPeakが認められた(図1)。

図1 Paper Electrophoresis Antigen A.
Material 2mg
Filter Paper 2×30 cm (Origin 15cm)
0.35mA/cm. 260V. 5.5hrs.
Veronal Buffer pH. 8.6 $\mu=0.05$

図2 Paper Electrophoresis Antigen B.
Material 2mg
Filter Paper 2×30 cm (Origin 15cm)
0.35mA/cm. 260V. 5.5hrs.
Veronal Buffer pH. 8.6 $\mu=0.05$

抗原Bの泳動像は原点に残って泳動しない蛋白部分を認めたが糖質部分は陰極側に僅かに泳動したPeakを認めた(図2)。

抗原Cの泳動像は蛋白部分は濾紙上では認められず、糖質部分は陰極側と原点に各1個のPeakを認めた(図3)。

抗原Dの泳動像については糖質部分、蛋白部分は重なって原点に1個と陰極側に1個のPeakを同じ位置に認めた(図4)。

図3 Paper Electrophoresis Antigen C.
Material 2—5mg
Filter Paper 2×30 cm (Origin 15cm)
0.35mA/cm. 260V. 5.5hrs.
Veronal Buffer pH. 8.6 $\mu=0.05$

図4 Paper Electrophoresis Antigen D.
Material 2mg
Filter paper 2×30 cm (Origin 15cm)
Veronal Buffer pH. 8.6, $\mu=0.05$
0.35mA/cm 260 V, 5.5hrs

以上により抗原 B 及び抗原 C では蛋白部分よりも糖質部分の方が量的に多く含有されているように考えられる。また、各々抗原 A, B, C, D は電氣的に蛋白部分及び糖質部分とに分割し得ることを知った。

小 括

肝吸虫体より 4 種抗原 A, B, C, D を作り、肝吸虫感染家兎血清及び患者血清と沈降反応を

行なった所、抗原 A による反応が最も強く、次に抗原 B, C, D の順であった。抗原 A は濾紙電気泳動によって蛋白及び糖の存在が認められ、電氣的に糖質部分及び蛋白部分に分離可能であることが分った。また、抗原 C は他の抗原と異なり糖の存在のみが認められる特異な抗原であり、家兎免疫血清とは強く反応するが患者血清とは弱い反応しか呈さない。

(本論文の文献は(Ⅱ)にまとめて掲載いたします)
(特別掲載)

STUDIES ON CLONORCHIS SINENSIS

Tadayasu Matsuda : Department of Hygiene School of Medicine,
Gunma University (Director : Pr of. T. Sawada)

(I). PREPARATION OF ANTIGENS AND PRECIPITIN TESTS.

Adult clonorchis sinensis were obtained from dogs, infected experimentally. Four antigens (A, B, C, D.) were fractionated from adult worms by chemical method.

The tests were conducted on the serum of dogs infected with clonorchis sinensis, men suffering from clonorchiasis, the sera of healthy dogs and men, with the 4 antigens (A, B, C, D.) prepared from the adult worms of clonorchis sinensis. Among 4 antigens, Antigen A, used as test antigen, showed the best satisfying results and other, B, C, D also fairly good results.

By paper electrosis, protein and polysaccharide in 4 antigens were studied.

(Ⅱ) 皮 内 反 応 に つ い て

緒 言

肝吸虫卵を糞便中より検出することは、他種寄生虫卵の検出より、多大の労力と時間が必要であって、多数の人々の肝吸虫卵検査は極めて実施困難であると言っても過言ではない。

Trichinosis, Filariasis, Schistosomiasis等の診断には糞便検査及び血液検査にまさる皮膚反応による診断方法の研究が多くの研究者によって行なわれ実用可能な方法が研究されている。

Clonorchiasis に於て、富永は 5 % の肝吸虫体乳剤を抗原として肝吸虫症患者 130 名について皮膚反応を行なった所 5 分後大多数のものに

腫脹、発赤を認めた。なお、5 % の肺吸虫乳剤及び日本住血吸虫乳剤の濾液では軽度の皮疹を生ずるのみで、肝吸虫乳剤による腫脹、発赤と明らかに区別ができたと述べている。森は肝吸虫乳剤を遠心沈澱して得た上清を pH7.0 に補正し、次に 56°C 30 分間非働化し、これを 1 万倍マーズン加生理的食塩水で 1,000 倍に稀釈したものを抗原として有病地の住民 507 名に皮膚反応を行ない、併せて集卵法、塗抹検査法及び T, M 反応を実施した所、皮膚反応及び T, M 反応はかなり高い診断的価値があったと報告している。また森は肝臓ダストマ虫体抗原を 10,000 倍稀釈液を用いて皮膚反応を行ない、陽性の中