

旋毛虫感染の免疫学的研究  
—感染経過より見た筋肉幼虫各抗原に  
対する宿主抗体産生について—

奈良県立医科大学寄生虫学教室

水 野 直 人

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON *TRICHINELLA SPIRALIS*  
INFECTION WITH EMPHASIS ON TIME COURSE STUDIES OF ANTIBODY  
RESPONSE AGAINST MUSCLE LARVAE

NAOTO MIZUNO

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received November 28, 1990

Fischer rats were experimentally infected with *Trichinella spiralis* and class-specific antibody response against the infection was followed up until 32 weeks after infection by means of indirect ELISA, immunoelectron microscopy (IEM), and western blotting. By indirect ELISA, the titer of specific IgG against crude antigen of *T. spiralis* muscle larvae increased from 2 weeks after infection, and kept high levels up to 32 weeks, but the titer of specific IgM was very low through the infection course. On the other hand, the titer of specific IgG against excretion and secretion antigen of muscle larvae began to increase from 4 weeks onward, and specific IgM was detectable from 3 weeks onward. These results indicate that different kinetics of antibody response (both IgG and IgM) are induced by different antigens, which was also confirmed by the following two methods. One method is immunoelectron microscopy using resin-embedded larvae as a substrate and infected sera as a staining antibody, which clearly revealed that there are two types of antigen: rapid responding antigens, and slow responding antigens. G class antibodies against the former including the cuticle inner layer, hypodermis, cord, hemolymph, intestinal gland cell granules, glycogen aggregates, discrete areas of genital primordial cell cytoplasm, and midgut occupying substance, were detectable from earlier phase of infection, while G class antibodies against the latter including the cuticle surface, stichocyte granules, and esophagus occupying substance, were detectable from relatively late phase of infection. M class antibodies against rapid responding antigens were undetectable or weak if any, but reactivity of M class antibody against slow responding antigens increased appreciably. The same tendency was observed by the other method, namely western blotting. The rapid responding antigens included ones from bands of pI 4.4~4.7, 4.9~5.4 and 6.3~6.5; the slow responding antigens included ones from bands of pI 4.0 and 5.4.

The present contribution established that muscle larvae of *T. spiralis* contain two major types of antigens (rapid responding antigens and slow responding antigens) and the chronology of class-specific antibody response against each antigen is described, which will

be indispensable for analysing any *Trichinella*-related immune response, especially for application to immunodiagnostic method of the disease.

### Index Terms

*Trichinella spiralis*, antibody response, ELISA, immunoelectron microscopy, western blotting

## 緒 言

寄生虫症の免疫診断法の確立、病態の把握および感染防御機構の解明のためには、寄生虫感染における宿主寄生虫相互作用 (host-parasite relationship) を理解することが必要である。この相互作用のうち重要なもの一つに宿主と寄生虫との間の免疫応答があげられる。よって、寄生虫虫体を構成するどの物質が、いつ抗原として宿主に認識され、宿主と寄生虫との間でいかなる機序の免疫応答が生ずるかを明らかにすることが重要である。本研究では、人畜共通の病原寄生線虫である旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) を用い、宿主と寄生虫との間の免疫応答について解析をおこなった。

旋毛虫は、成虫の体長が雌 2~4 mm, 雄 1.4~1.6 mm, 幼虫の体長が 0.8~1 mm と非常に小さな線虫であり、ブタ、クマなどの筋肉内に被嚢する幼虫を経口摂取することにより感染することから、欧米諸国では食品衛生上重要な寄生虫として古くから重要視されている。

また、旋毛虫は宿主域が広く、マウスやラットなどの実験動物を用いた感染実験が可能なこと、また、その筋肉幼虫は容易にかつ多量に集められることなどから、寄生虫感染の実験モデルとしても研究が進んでいる。その結果、各種抗原の分離精製がおこなわれ、その性質が明らかになってきた。Silberstein and Despommier (1984<sup>1)</sup>, 1985<sup>2)</sup>) は、幼虫の排泄分泌抗原 (ES 抗原: excretory-secretory antigen) のうち分子量 48kDa および 50-55kDa の物質が宿主に防御免疫能を惹起する性質があり、これらの物質は虫体表面、食道腺、消化管に局在することを示した。さらに、これら ES 抗原や虫体表面、食道腺、消化管に局在する抗原は旋毛虫に特異的な抗原であることも知られており (Parkhouse et al., 1981<sup>3)</sup>), 旋毛虫症の免疫診断用抗原として、また、防御免疫源として有用とされている。しかし、これらの抗原は旋毛虫の成長に従い、抗原性の変化する抗原 (stage-specific antigen) でもあり (Mackenzie et al., 1978<sup>4)</sup>, Philipp et al., 1980<sup>5)</sup>, 1981<sup>6)</sup>, Jungery et al., 1983<sup>7)</sup>, Almond et al., 1986<sup>8)</sup>), これらの抗原を免疫診断用抗原や防御免疫源として実用するには、さらに詳細な免疫応

答の解析が必要である。本研究では、間接 ELISA (Indirect Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), ウェスタンブロット法および免疫電顕法を用い、旋毛虫筋肉幼虫各種抗原に対する宿主の抗体産生を追跡し、宿主と寄生虫との間の免疫応答解析のための基礎資料としての応用を検討した。

### 材料及び方法

#### 1. 旋毛虫筋肉幼虫の採集

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た旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) ポーランド分離株 (Polish strain) を使用した。

筋肉幼虫は感染マウス筋肉よりペプシン-塩酸消化法により集めた。すなわち、感染後 4 週以上経過した ICR マウスの筋肉を肉切包丁で細かく砕き、0.5% ペプシン (NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan) - 0.7% 塩酸 (NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan) 中で 37℃ にて 3 時間消化した。消化後の反応液を目の大きさが 125 $\mu$ m の篩で漉し、円錐形容器中に室温で 30 分間放置し、容器の底に沈んだ幼虫を集めた。採集した幼虫はリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, 以下 PBS, pH 7.2) にて繰り返し洗浄した。

#### 2. 抗原

##### 1) 旋毛虫筋肉幼虫粗抗原

筋肉幼虫を PBS 中に浮遊させ、超音波破砕器 (20 kHz, UR-200P, TOMY SEIKO Co. Ltd. Tokyo, Japan) にて 4℃ で 20 分間破砕後、4℃ で 24 時間攪拌した。さらに 4℃ にて 10,000rpm で 20 分間遠心し (KR/180B, KUBOTA SEISAKUSYO Co., Ltd, Tokyo, Japan), 上清をセロファンチューブ (Union Carbide Co., USA) に入れ、4℃ の蒸留水に対して 24 時間透析後、凍結乾燥したものを筋肉幼虫粗抗原とした。なお、同抗原の蛋白量は Lowry et al. (1951<sup>9)</sup>) の方法で測定したところ、乾燥粗抗原量 1 mg 中 200 $\mu$ g であった。

##### 2) 旋毛虫筋肉幼虫 ES 抗原

筋肉幼虫を採取後、直ちに 4℃ の PBS にて十分に洗浄し、37℃ の PBS 中で 3 時間浮遊させた。筋肉幼虫を自然沈下させた後、上清をセロファンチューブ (Union Carbide Co., USA) に入れ、4℃ の蒸留水に対して 24 時

間透析し、さらに、凍結乾燥したものを筋肉幼虫 ES 抗原とした。なお、同抗原の蛋白量は Lowry et al. (1951)<sup>9)</sup>の方法で測定したところ、乾燥重量 1 mg 中 75  $\mu$ g であった。

### 3. 感染ラット血清

Fischer 系ラット (6 週齢, 雄, 260~290g) に、旋毛虫筋肉幼虫 6,000 隻を経口的に感染させた。感染後経時的に心臓より採血し、血清分離後、実験に供した。対照として、感染前血清を用いた。

### 4. 抗クチャラ表面抗体

抗クチャラ表面抗体は、化学固定した筋肉幼虫の表面をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。すなわち、筋肉幼虫を 1/2 カルノフスキー固定液 (2.5% グルタルアルデヒドおよび 2% パラフォルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液) にて 4°C で 1 時間化学固定後、PBS にて十分に洗浄し、カラムに充填した。5mM EDTA (NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan) を含む PBS で処理した後、感染 12 週目のラット血清を加え、室温で 4 時間反応させた。5mM EDTA を含む PBS で洗浄後、虫体表面に結合した抗体を 3M  $MgCl_2$  と 0.6M NaCl の混合液にて溶出させた。溶出液を 1/10 に希釈した PBS に対して、4°C で 24 時間透析し、透析後の蛋白濃度を、分光光度計により測定した波長 280nm における吸光度より求めた。凍結乾燥後、1/10 量の蒸留水に再溶解し、 $\gamma$ -グロブリンの 280nm における分子吸光度  $E_{280}^{1\%} = 14.3$  として (Fasmann, 1976)<sup>10)</sup>、抗クチャラ表面抗体の濃度が 1 mg/ml となるように 1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS にて希釈し実験に供した。

### 5. 間接 ELISA (Indirect Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay)

間接 ELISA は、96 穴マイクロタイタープレート (Falcon 3915, Nippon Becton Dickinson Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いおこなった。筋肉幼虫粗抗原および ES 抗原を、固相化用緩衝液 (0.05M 炭酸緩衝液, pH 9.6) にて 20  $\mu$ g/ml となるように溶解し、96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ入れ、37°C、3 時間で固相化させた。さらに、ウェル表面への蛋白の非特異的吸着を防ぐため、1% BSA を含む固相化用緩衝液を 200  $\mu$ l 加え、37°C、60 分間反応させた。次に、感染前および感染後 1 週、2 週、3 週、4 週、5 週、6 週、7 週、8 週、10 週、12 週 (各 n = 8)、16 週 (n = 7)、20 週、24 週、32 週 (各 n = 3) の各血清を 1% BSA を含む PBS にて 1/500 に希釈し、これを 100  $\mu$ l ずつ加え、37°C、60 分間反応させた。最後に、ペルオキシダーゼ標識

抗ラット IgG または IgM (Organon Teknika-Cappel, West Chester, USA) を 1% BSA を含む PBS にて 1/200 に希釈したものを 100  $\mu$ l ずつ加え、37°C、60 分間反応させた。以上、それぞれの反応段階の終わりに 0.02% Tween 20 を含む PBS (以下 0.02% Tween 20-PBS) で十分洗浄した。基質として、*o*-フェニレンジアミン (*o*-phenylene diamine: OPD, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を、0.2 M リン酸二ナトリウム (dibasic sodium phosphate) 溶液 25 ml と 0.1 M クエン酸溶液 25 ml の混合液に溶解し、使用直前に 30% の過酸化水素水を 10  $\mu$ l 加えることにより活性化後、各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ入れ酵素反応をおこさせた。反応は、20°C の暗所で 30 分間おこなった。100  $\mu$ l の 3N  $H_2SO_4$  を加え、反応を停止させ、分光光度計 (主波長 500nm, 副波長 610nm, MTP12A, Corona Electric, Japan) にて吸光度を測定した (Voller et al., 1976)<sup>11)</sup>。データはすべて平均値  $\pm$  標準偏差で表現し、平均値の差については、Student の t-test を用い有意差水準 1% で検定した。

### 6. 金コロイドを標識に用いた免疫染色

#### 1) 金コロイドの作製 (Fig. 1)

Slot et al. (1985)<sup>12)</sup>の方法にもとづいて金コロイドを作製した。すなわち、2% 塩化金 ( $H AuCl_4 \cdot 4H_2O$ ; NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan) 溶液 1 ml および 2 回蒸留水 159 ml を三角フラスコに入れ、60°C で攪拌した。さらに、1% クエン酸ナトリウム溶液 9 ml と 2 回蒸留水 31 ml の混合液を加えて 60°C で 2 時間攪拌した。溶液の色調が赤色に変化した後、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) ストレプトアビジン-金コロイド複合体の作製 (Fig. 2)

Tanaka et al. (1984)<sup>13)</sup>の方法にもとづいてストレプトアビジン-金コロイド複合体を作製した。すなわち、ストレプトアビジン (streptavidin, SIGMA, St. Louis, USA) 0.1mg をプラスチックビーカー内で 5mM 塩化ナトリウム (NaCl) 溶液 0.1 ml に溶解させ、次に 0.1 M 炭酸カリウム ( $K_2CO_3$ ) 溶液で pH 6.4 に調整した金コロイド溶液 5 ml を加え 1~2 分攪拌した。これに 5% ポリエチレングリコール (NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan, 以下 PEG, 分子量 20,000) 0.15 ml を加え、ストレプトアビジン-金コロイド混合液とした。0.05% PEG と 0.02% アジ化ナトリウム ( $NaN_3$ ) を含む 5% グリセロール溶液 2.5 ml を 0.45  $\mu$ m のフィルター (Minisart NML, Nihon Millipore Kogyo K.K., Yonezawa, Japan) でろ過後、プラスチック製の遠沈管に入れ、この上にストレプトアビジン-金コロイド混合液 5 ml を重層

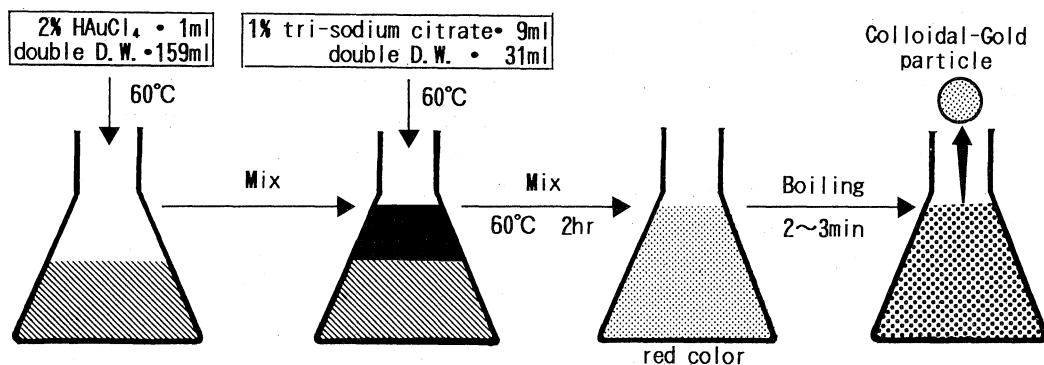


Fig. 1. Preparation of colloidal gold. DW : distilled water

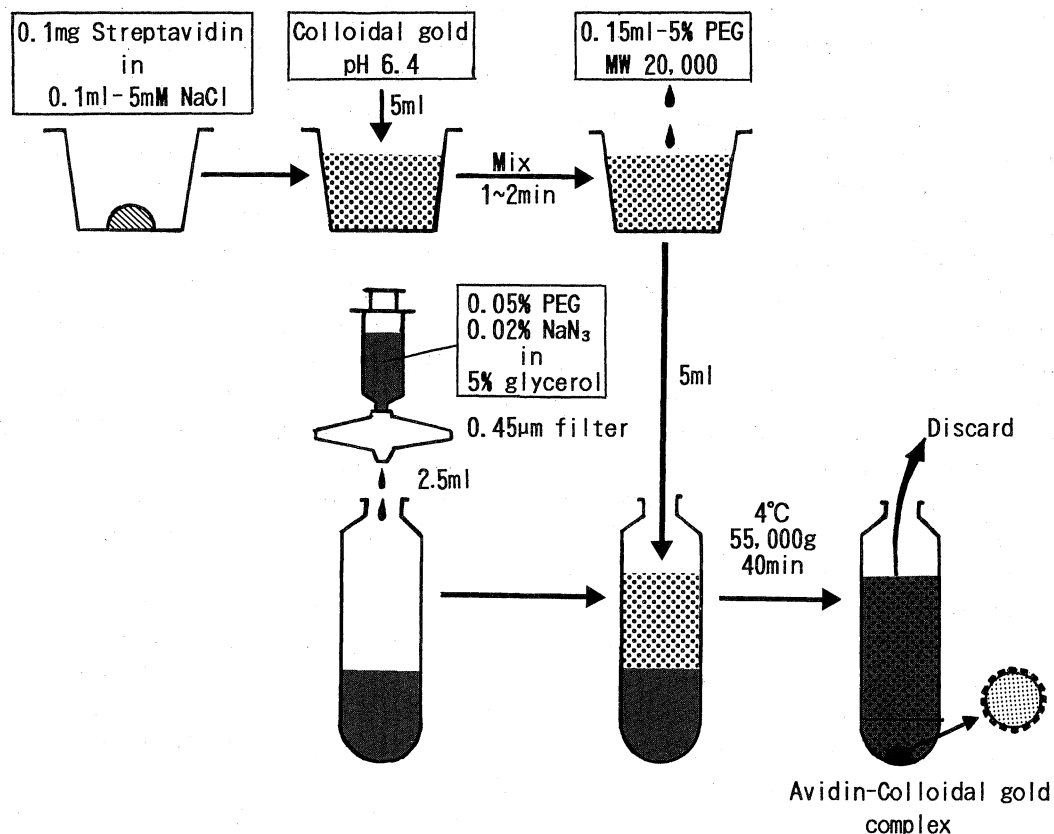


Fig. 2. Preparation of avidin-colloidal gold complex. PEG :polyethylene glycol

し、25,000rpm (55,000g) で4℃にて40分間遠心後、上清約6.5mlを除去し、残りの約1mlを4℃で保存、1週間以内に使用した。免疫染色時には、1% BSAを含むPBS (以下1% BSA-PBS) にて10倍希釈し、マイクロ遠心機 (MR-150, TOMY SEIKO Co., Ltd., Tokyo,

Japan) を用い、11,000rpm で室温にて5分間遠心後、上清を1% BSAを含むPBS にてさらに5倍に希釈して使用した。

3) 免疫染色 (Fig. 3)

筋肉幼虫を1/2カルノフスキー固定、アルコール脱水

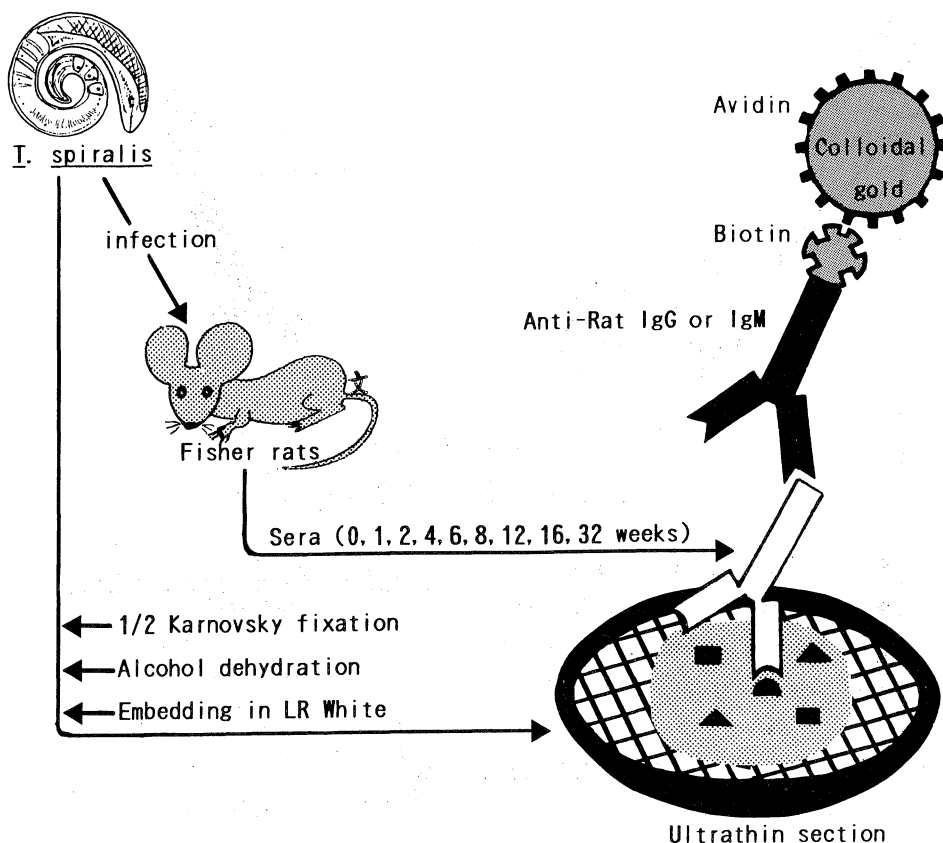


Fig. 3. Procedures of immuno-gold staining.

後、LR White (London Resin Company Ltd, UK) に包埋し、ダイヤモンドナイフにて80nmの超薄切片を作製した。この切片に対し、感染前および感染後1週、2週、4週、6週、8週、12週、16週、32週に採取したラット血清 (n = 3) を1% BSA-PBSにて1/2,500に希釈したものを、室温にて30分間反応させた。1% BSA-PBSにて3回洗浄後、ビオチン標識抗ラットIgG (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) またはビオチン標識抗ラットIgM (Zymed Laboratories Inc. California, USA) を1% BSA-PBSにて1/200に希釈したものを、室温で30分間反応させた。上記と同様に洗浄後、ストレプトアビジン-金コロイド複合体を室温で30分間反応させた。1% BSAを含む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。

また、抗ククラ表面抗体を1次抗体として、2次抗体にビオチン標識抗ラットIgGを用い同様に染色をおこなった。

7. 等電点電気泳動により分離した物質のウェスタンブロット法による分析 (Fig. 4)

1) 等電点電気泳動

等電点電気泳動はpH3.5~9.5のアンフォラインを含む、5%ポリアクリルアミド平板ゲル (LKB Ampholine PAG plates No. 1804-101, LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden) を用い、5mAの定電流で、4℃にて4時間おこなった。試料は、1検体につき、旋毛虫粗抗原20μgを20μlの蒸留水で溶解し泳動に供した。

2) ウェスタンブロット法

泳動終了後のポリアクリルアミド平板ゲルからPVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (NIHON MILLIPORE KOGYO K. K., Yonezawa, Japan) へのタンパクの転写は、転写用緩衝液 (25mM Tris-192mM Glycine-20% methanol pH8.3) 中で、60Vの定電圧で4℃にて4時間おこなった。転写後のPVDF膜を短冊状に切り、一本をクマシープリリアントブルーR (SIGMA, St. Louis, USA) にて染色した。残りを、非

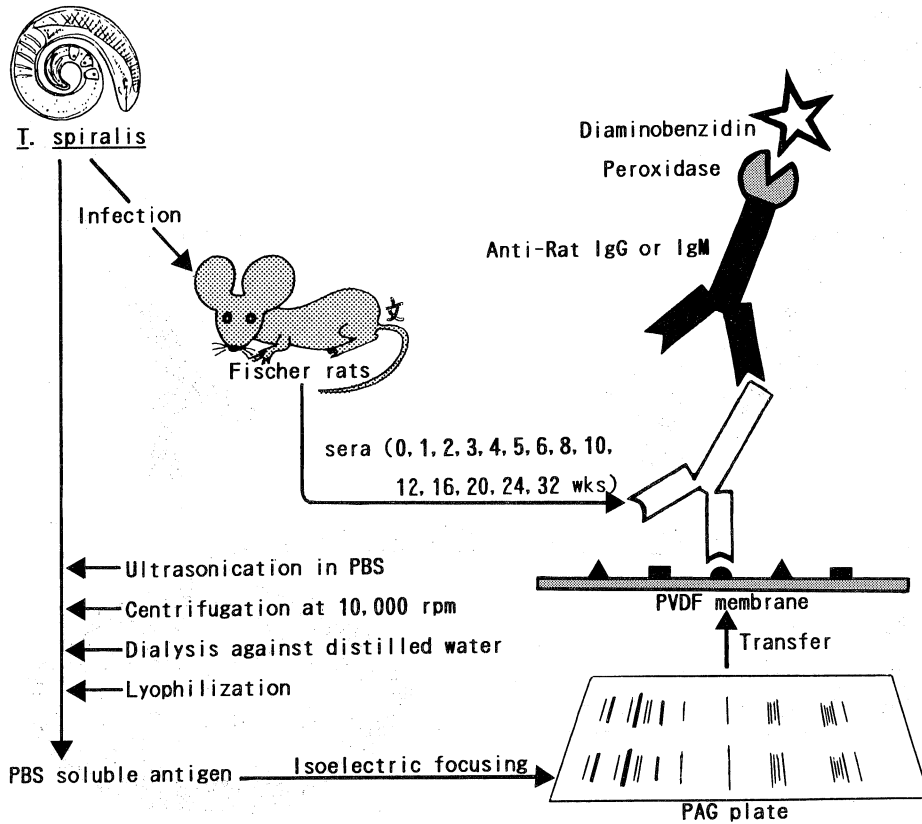


Fig. 4. Procedures of Western blotting.

PBS: phosphate buffered saline

PVDF: polyvinyliden difluoride

PAG: polyacrylamide

特異的吸着を防ぐため3% BSAを含むPBS(以下3% BSA-PBS)で37℃にて1時間処理した後、0.02% Tween 20-PBS中で3回洗浄した、これに感染前および感染後1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週、10週、12週、16週、20週、24週、32週のラット血清(n=3)を3% BSA-PBSにて1/300に希釈したものを1次抗体として、37℃にて60分間反応させた。次に上記と同様に0.02% Tween 20-PBSで洗浄した後、3% BSA-PBSで1/300希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラットIgGまたはIgM(Organon Teknika-Cappel, West Chester, USA)を2次抗体として37℃にて60分間反応させた。洗浄後、基質液に浸し、室温で発色反応をおこない、15分後、蒸留水で洗浄することにより反応を停止させた。なお、基質液は、3mgのジアミノベンチジン(diaminobenzidine tetrahydrochloride, NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)を50mM トリス-塩酸

緩衝液(pH 7.2) 10mlに溶解させ、使用直前にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10μlを加え活性化させたものを用いた。

また、抗クチクラ表面抗体を1次抗体として、2次抗体にペルオキシダーゼ標識抗ラットIgGを用い同様にウェスタンブロッティングをおこなった。

## 結 果

### 1. 間接 ELISA

1) 筋肉幼虫粗抗原に対する旋毛虫感染ラットIgG抗体の感染後の動態(Fig. 5)

旋毛虫感染ラットにおける筋肉幼虫粗抗原に対するIgG抗体の感染後の動態をFig. 5に示す。感染後1週目では吸光度は $0.026 \pm 0.022$ であり、感染前の吸光度 $0.012 \pm 0.011$ との間に有意差は認められなかった。感染後2週目には吸光度は $0.112 \pm 0.013$ と有意に上昇し、感染後3週目 $0.134 \pm 0.018$ 、4週目 $0.143 \pm 0.031$ 、5週目

0.136±0.027, 6 週目 0.127±0.037, 7 週目 0.125±0.032, 8 週目 0.142±0.061, 10 週目 0.131±0.042 と同様の値を推移した。この後, さらに上昇し, 12 週目 0.201±0.058, 16 週目 0.198±0.061, 20 週目 0.235±0.072, 24 週目 0.167±0.034, 32 週目 0.269±0.028 と高い値を示した。

2) 筋肉幼虫粗抗原に対する旋毛虫感染ラット IgM 抗体の感染後の動態 (Fig. 5)

筋肉幼虫粗抗原に対する IgM 抗体の感染後の動態は, 感染前の吸光度 0.007±0.014 に対し, 感染後 1 週目の吸光度は 0.010±0.008, 2 週目 0.007±0.007, 3 週目 0.018±0.018 であり, 有意差は認められなかった。この後, 吸光度は感染後 4 週目には 0.043±0.028, 5 週目には 0.052±0.020, 6 週目には 0.051±0.031, 7 週目には 0.060±0.022, 8 週目には 0.053±0.024, 10 週目には 0.050±0.022, 12 週目には 0.050±0.034, 16 週目には 0.047±0.026, 20 週目には 0.038±0.026 と有意に上昇した。以後, 吸光度は感染後 24 週目には 0.025±0.016, 32 週目には 0.013±0.011 と感染前の吸光度との間に有意差は認められなかった。

3) 筋肉幼虫 ES 抗原に対する旋毛虫感染ラット IgG 抗体の感染後の動態 (Fig. 6)

旋毛虫感染ラットにおける筋肉幼虫 ES 抗原に対する IgG 抗体の感染後の動態を Fig. 6 に示す。感染前の吸光度は 0.005±0.010 であった。感染後 1 週目の吸光度は 0.006±0.007, 2 週目 0.018±0.020, 3 週目 0.022±0.016 であり, 感染前の吸光度との間に有意差は認められなかった。この後, 吸光度は感染後 4 週目には 0.040±0.024 と有意に上昇し, 以後, 感染後 5 週目 0.085±0.039, 6 週目 0.116±0.053, 7 週目 0.157±0.043, 8 週目 0.179±0.059, 10 週目 0.333±0.134, 12 週目 0.634±0.258, 16 週目 0.596±0.325, 20 週目 1.004±0.411, 24 週目 0.736±0.287, 32 週目 0.994±0.317 と急激に上昇した。

4) 筋肉幼虫 ES 抗原に対する旋毛虫感染ラット IgM 抗体の動態 (Fig. 6)

筋肉幼虫 ES 抗原に対する IgM 抗体の感染後の動態については, 感染後 1 週目の吸光度は 0.014±0.017, 2 週目 0.004±0.006 であり, 感染前の吸光度 0.007±0.010 との間に有意差は認められなかった。感染後 3 週目には吸光度は 0.069±0.063 と有意に上昇し, その後吸光度は, 4 週目には 0.087±0.030, 5 週目には 0.112±0.040, 6 週目には 0.120±0.050, 7 週目には 0.097±0.034, 8 週目には 0.094±0.050, 10 週目には 0.071±0.037, 12 週目には 0.077±0.063, 16 週目には 0.069±

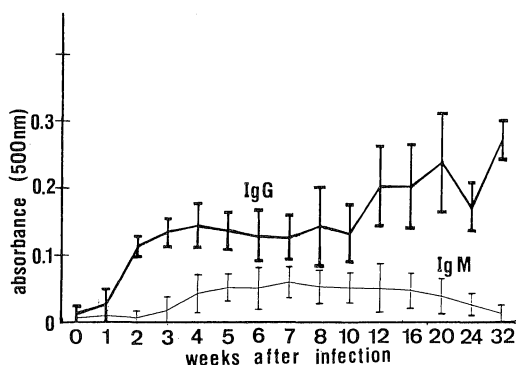


Fig. 5. Kinetics of class-specific antibody response against crude antigen of muscle larvae in Fischer rats infected with *T. spiralis* at zero time. (mean ± SD.)

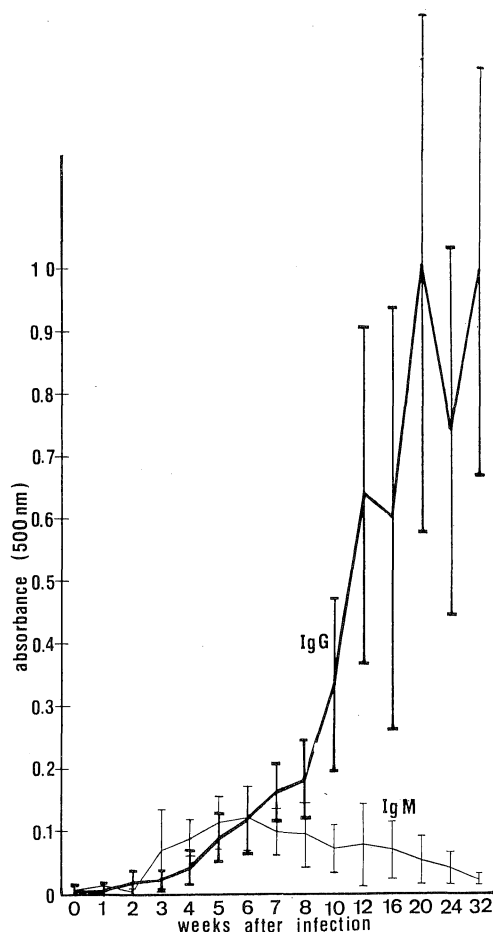


Fig. 6. Kinetics of class-specific antibody excretory and secretory antigen of muscle larvae in Fischer rats infected with *T. spiralis* at zero time. (mean ± SD.)

0.044, 20 週目には  $0.052 \pm 0.037$ , 24 週目には  $0.040 \pm 0.024$ , 32 週目には  $0.028 \pm 0.008$  と, 感染前の吸光度との間に有意差が認められた.

2. 免疫電顕

旋毛虫筋肉幼虫の虫体構造の模式図を Fig. 7 に, また, 食道-中腸接合部の縦断電顕像を Plate. 1 に示した. 虫体外壁は, 外層よりクチクラ (Cuticle), 角皮下層 (hypodermis) および筋肉層 (muscle layer) より成る. 虫体前半内部には, 食道 (esophagus) およびこれを取り囲むスティコソーム (stichosome; 食道腺) が存在し, 後半内部には, 中腸 (midgut) と生殖原基 (genital primordium) が並走する. 食道と中腸の接合部には腸腺細胞 (intestinal gland cell) が存在する. スティコサイト (stichocyte; 食道腺細胞) 内に存在する顆粒には,  $\alpha 0, \alpha 1, \alpha 2, \beta$  および  $\gamma$  の 5 種類が存在する (Plate. 2). これら各虫体構造物に対する旋毛虫感染ラットの感染後の抗体反応を, Table にまとめた.

1) 筋肉幼虫各抗原局在部位に対する感染ラット IgG 抗体反応の感染後の動態

筋肉幼虫の LR White 包埋切片に対する感染ラット IgG 抗体の反応を検索した結果, 反応は感染後 2 週目より確認された. また, IgG 特異抗体が早期より出現する抗原の局在部位 (Rapid Responding Group) と遅れて出現する抗原の局在部位 (Slow Responding Group) とのふたつに大別できた. 早期より特異抗体の出現する抗原局在部位には, 体腔液 (hemolymph, Plate. 3, 4), 腸腺の顆粒 (intestinal gland cell granules, Plate. 3), 中腸内腔物 (midgut occupying substance; MOS), 生殖原基の細胞質成分 (discrete areas in genital primordium cell), グリコーゲン顆粒 (glycogen aggregates, Plate. 3, 4), 角皮下層 (Plate. 3), 側索および正中索 (cord), クチクラ内層 (cuticle inner layer, Plate. 3) などがああり, これらの抗原局在部位に対する抗体反応は感染後 2 週目より出現した. その反応は, 感染後 4~6 週目まで非常に強いものであり, 感染後 6~8 週目より減弱し始めるが, 感染後 32 週目においても尚十分に確認できるものであった (Plate. 7).

一方, 遅れて特異抗体の出現する抗原局在部位として, クチクラ表面 (cuticle surface, Plate. 7), 食道内腔物 (esophagus occupying substance; EOS), スティコサイトの  $\alpha 0, \alpha 1, \alpha 2, \beta$  および  $\gamma$  顆粒 (stichocyte  $\alpha 0, \alpha 1, \alpha 2, \beta$  and  $\gamma$  granules, Plate. 5, 6, 7) が認められる. クチクラ表面, 食道内腔物, スティコサイトの  $\alpha 0, \alpha 1, \alpha 2$  および  $\gamma$  顆粒に対する反応は感染後 6 週目より, また, スティコサイトの  $\beta$  顆粒に対する反応は感染後 8 週目

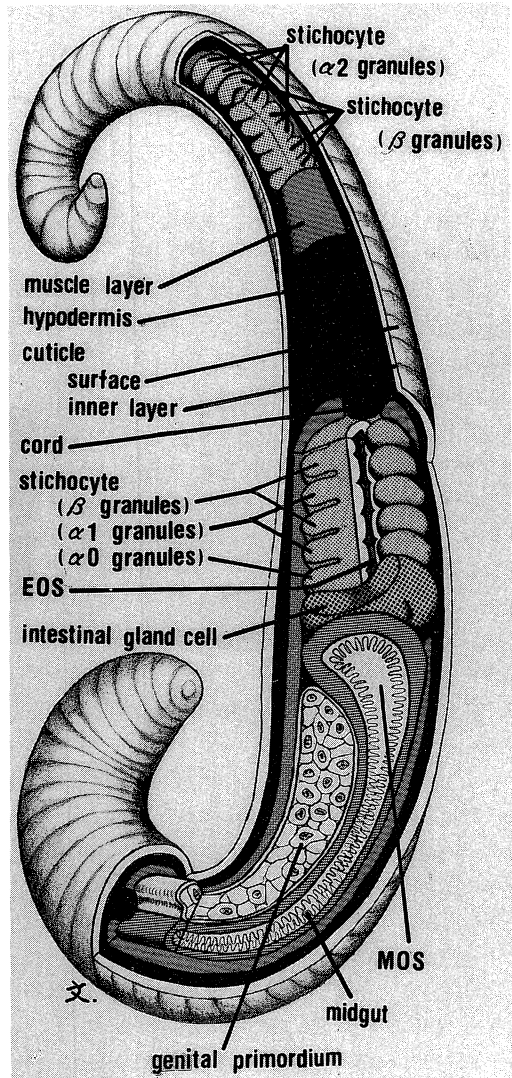


Fig. 7. Schematic illustration of the structure of *Trichinella spiralis*.

より出現した. クチクラ表面およびスティコサイトの  $\alpha 0, \alpha 1$ , では感染後 12 週目に, スティコサイトの  $\alpha 2$  顆粒では感染後 16 週目に反応は最強になり, その後, 減弱するものの感染後 32 週目においても尚強い反応が認められた (Plate. 7). 食道内腔物およびスティコサイトの  $\gamma$  顆粒に対しては感染後 6 週目から 32 週目まではほぼ同程度の反応が認められた. スティコサイトの  $\beta$  顆粒に対する反応は感染後 32 週目まで増強傾向を示したが, スティコサイトの  $\alpha 0, \alpha 1, \alpha 2$  および  $\gamma$  顆粒に対する反応よりも弱かった.

2) 筋肉幼虫各抗原局在部位に対する感染ラット IgM



Table A summary of the chronology of class-specific antibody response in Fischer rats infected with *T. spiralis* at 0 week. Immunostaining intensity is rated as strongly positive(++), positive(+), negative(-), predominately positive but sometimes negative(+/-), predominantly negative but sometimes positive(-/+)

Localization of antigenic substances	Ig class	Weeks after infection									
		0 w	1 w	2 w	4 w	6 w	8 w	12 w	16 w	32 w	
Hemolymph	G	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Intestinal gland cell granules	G	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MOS	G	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	M	-	-	-/+	+	+	+	+/-	-/+	-/+	
Discrete areas in genital primordial cell	G	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	M	-	-	+	+/-	+/-	-/+	-	-	-	
Glycogen aggregates	G	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	M	-	-	-	+/-	+/-	-/+	-/+	-/+	-/+	
Hypodermis	G	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	M	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+	-	-	-	
Cord	G	-	-	+	+	+	+	-/+	-/+	-/+	
	M	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+	-	-	-	
Cuticle	inner layer	G	-	-	+	+	+	+	+	+	
		M	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+	-	-	
	surface	G	-	-	-	-	-/+	-	+	+	+
		M	-	-	-	+	+	+	+	-	-
EOS	G	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	M	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
Stichocyte granules	$\alpha 0, \alpha 1$	G	-	-	-	-	+	+	+	+	+
		M	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	$\alpha 2$	G	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+
		M	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-/+
	$\beta$	G	-	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+	+
		M	-	-	-	-	+	+	-/+	-	-
	$\gamma$	G	-	-	-	-	+	+	+	+	+
		M	-	-	-	+	+	+	+	+	-/+

抗体反応の感染後の動態

IgG 特異抗体が感染早期に出現する抗原局在部位のうち、中腸内腔物、生殖原基細胞質成分、グリコーゲン顆粒、角皮下層、側索および正中索、クチクラ内層に対する IgM 特異抗体は、IgG 特異抗体と同様、感染後 2 週目に検出された。しかし、その反応は IgG 特異抗体と比べて非常に弱く、感染後早期より減弱し始め、感染後 32 週目にはそのほとんどの部位で検出できなかった (Plate. 10)。また、体腔液、腸腺の顆粒に対する IgM 特異抗体は本法においては検出できなかった (Plate. 8, 9, 10)。

一方、IgG 特異抗体が遅れて出現するクチクラ表面、食道内腔物およびスティコサイトの各顆粒では、IgM 特異抗体においても感染後 4 週目と遅れて検出された (Plate. 8, 9)。しかし、IgG 特異抗体と比べ早くより出現

した。これら IgG 特異抗体が遅れて出現する抗原に対する IgM 特異抗体の反応は、IgG 特異抗体が早期に出現する抗原に対する IgM 抗体の反応に比べ強く、感染後 8 ~ 16 週目より減弱傾向にあるものの、食道内腔物およびスティコサイトの各顆粒においては、感染後 32 週目においてもなお確認できた (Plate. 10)。

3. ウェスタンブロッティング

1) 等電点電気泳動により分離した筋肉幼虫抗原に対する感染ラット IgG 抗体反応の感染後の動態 (Fig. 8) 筋肉幼虫抗原を等電点電気泳動後、PVDF 膜に転写し、クマジーブリリアントブルー R にて染色した場合、pI 3.5~9.5 の間にすくなくとも 18 本のバンドが確認された (Fig. 8, lane C)。また、転写された抗原に対する感染ラット IgG 抗体の反応は感染後 2 週目より確認で

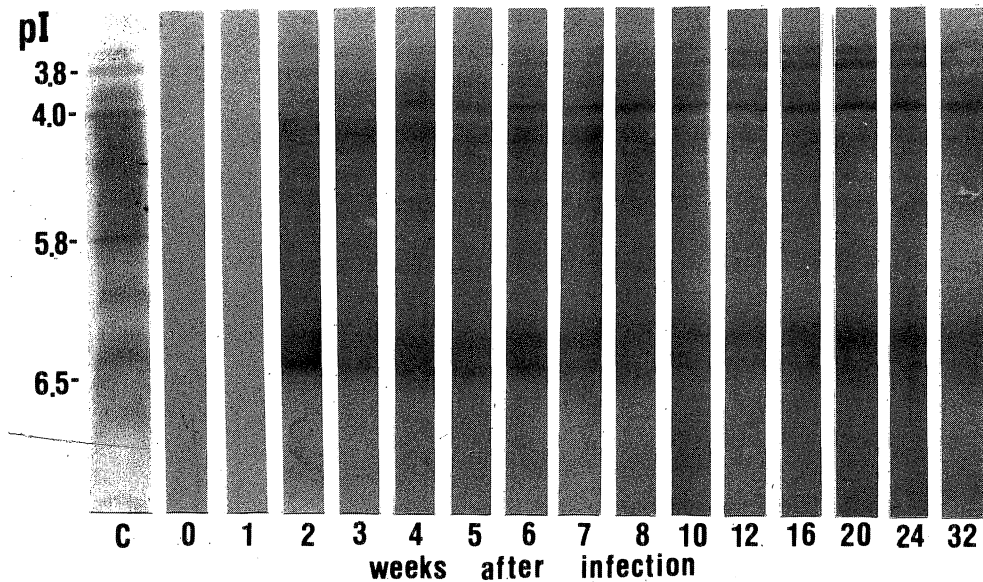


Fig. 8. Western blot analysis of chronology of IgG antibody response against PBS soluble antigen of *T. spiralis* in Fischer rat after infection. lane C: PBS soluble antigen of *T. spiralis* transferred to PVDF membrane were stained with coomassie brilliant blue R.

きた。さらに、免疫電顕の場合と同様、IgG抗体が早期より反応するバンドと、遅れて反応するバンドとの二つに分けられた。

感染後2週目の血清では、pI 4.4~4.7の間に3本、pI 4.9~5.4の間に3本、pI 6.3~6.5の間に3本の計9本のバンドに強い反応が認められた。その他、pI 3.7, 3.8, 3.9, 4.0および4.1のバンドにも弱い反応が確認できた。pI 4.4~4.7, 4.9~5.4, 6.3~6.5の各3本、計9本のバンドにおける反応は感染後4週目より減弱しはじめ、感染後32週目ではpI 6.3~6.5の間の3本のバンドに対する反応は確認できるが、pI 4.4~4.7, 4.9~5.4の6本のバンドに対する反応はほぼ消失した。

一方、pI 4.0のバンドに対する反応は感染後4週目より増強し始め、10週目に最強になり、また、pI 3.7および3.8のバンドに対する反応は感染後8週目より増強し始め、12週目に最強となり、その後、それぞれ減弱するものの、感染後32週目にも尚はっきりと確認できた。

2) 等電点電気泳動により分離した筋肉幼虫抗原に対する感染ラットIgM抗体反応の感染後の動態 (Fig. 9)

等電点電気泳動後、PVDF膜に転写された筋肉幼虫抗原に対する感染ラットIgM抗体の反応は感染後3週目に出現した。この時期には、pI 3.9, 4.0にそれぞれ1本および6.3~6.5の間に2本の計4本のバンドに反応が認められた。これらのバンドに対する反応は感染後5週目

以降減弱し、感染後12週目にはほとんど確認できなかった。また、感染後5週目より10週目にかけpI 4.6のバンドに弱い反応が認められた。

3. 抗クチクラ表面抗体の認識する抗原の免疫電顕法およびウェスタンブロット法における検索

#### 1) 免疫電顕法

感染後12週目の血清より精製した抗クチクラ表面抗体にて筋肉幼虫のLR White包埋切片を染色した場合、クチクラ表面に強い反応が認められた (Plate 11)。さらに、虫体内部構造であるスティコサイトの $\alpha$ 顆粒 (Plate. 11, 12) や食道内腔物 (Plate. 12) に対しても、クチクラ表面と同様に強い反応が認められた。よって、クチクラ表面は、スティコサイトの $\alpha$ 顆粒や食道内腔物と抗原性を共有することが示された。

#### 2) ウェスタンブロット法 (Fig. 10)

抗クチクラ表面抗体を、PVDF膜に転写した筋肉幼虫抗原に対して反応させた場合、pI 3.8, 4.0, 4.4~4.7, 4.9~5.4, 6.3~6.5のバンドに反応が認められた。特にpI 4.0およびpI 5.4のバンドに対しては強い反応が認められた (lane 2)。よって、クチクラ表面抗原は主にこの2本のバンドに存在すると考えられる。

## 考 察

寄生蠕虫感染症を診断する場合、虫卵や虫体を直接検

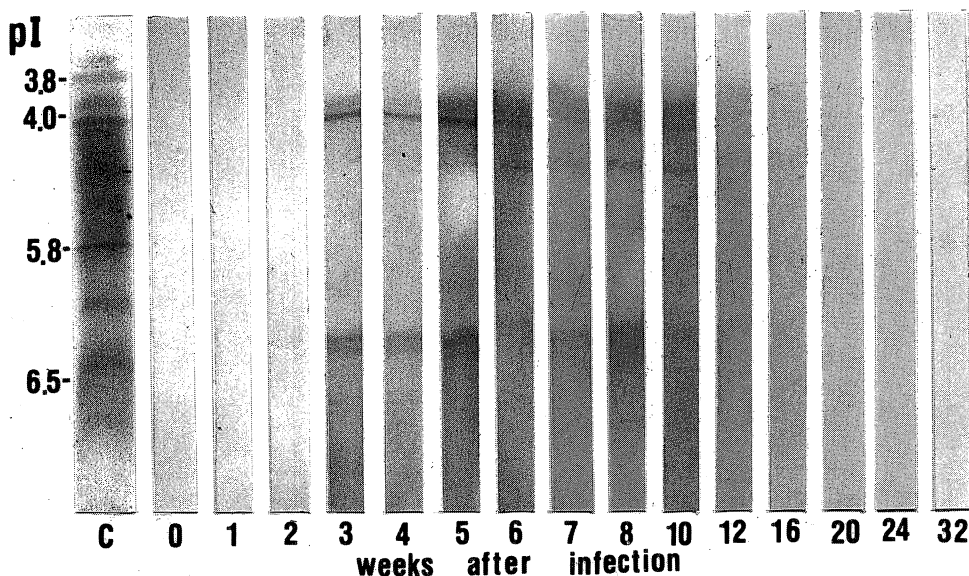


Fig. 9. Western blot analysis of chronology of IgM antibody response against PBS soluble antigen of *T. spiralis* in Fischer rat after infection. lane C: PBS soluble antigen of *T. spiralis* transferred to PVDF membrane were stained with coomassie brilliant blue R.

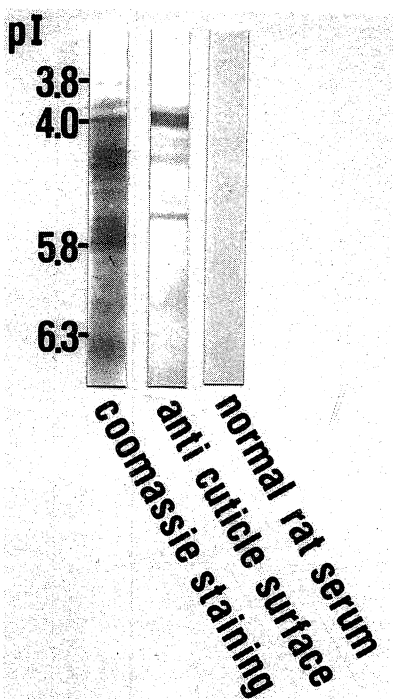


Fig. 10. Western immunoblot analysis of PBS soluble antigen of *T. spiralis* muscle larva recognized by immunoaffinity purified anti cuticle surface antibody.

出することが確実な方法であるが、これは困難なことが多い。本研究で扱った旋毛虫では、急性期である消化管侵襲期（成虫寄生期）には、虫体は小腸粘膜に深く侵入しており、また、胎生 (laviparous) であるため虫卵は産出されず、産出された幼虫は直ちに血流あるいはリンパ流によって宿主の体内を移行する。よって、糞便検査により虫卵や虫体を検出することはできない。また、慢性期である筋肉内被囊期に虫体を検出するには筋肉生検に因らねばならず、侵襲的であり、検出率に問題があるなど欠点が多い。よって、免疫診断法が本寄生虫感染症の診断法として重要な位置を占めることになる。この免疫診断法をより確実なものにするには、特異性および感受性に優れた抗原を分離精製することが必要である。このように寄生虫感染症の免疫診断用抗原として有用な抗原を得るためには、宿主と寄生虫との間の免疫応答を詳細に検討する必要がある。

本研究では、宿主と寄生虫との間の免疫応答の一端を明らかにするため、まず、間接 ELISA により筋肉幼虫粗抗原および ES 抗原に対する IgG および IgM 特異抗体の感染後の動態を検索した。その結果、筋肉幼虫粗抗原に対しては、IgG 特異抗体は感染後 2 週目に急激に上昇した。これは、Ottesen et al. (1975)<sup>14)</sup> および西山 (1987)<sup>15)</sup> がラットを用いておこなった実験の結果と一致する。これに対し、特異性に優れているとされる ES 抗原に対しては、IgG 特異抗体は感染後 4 週目と、遅れて上

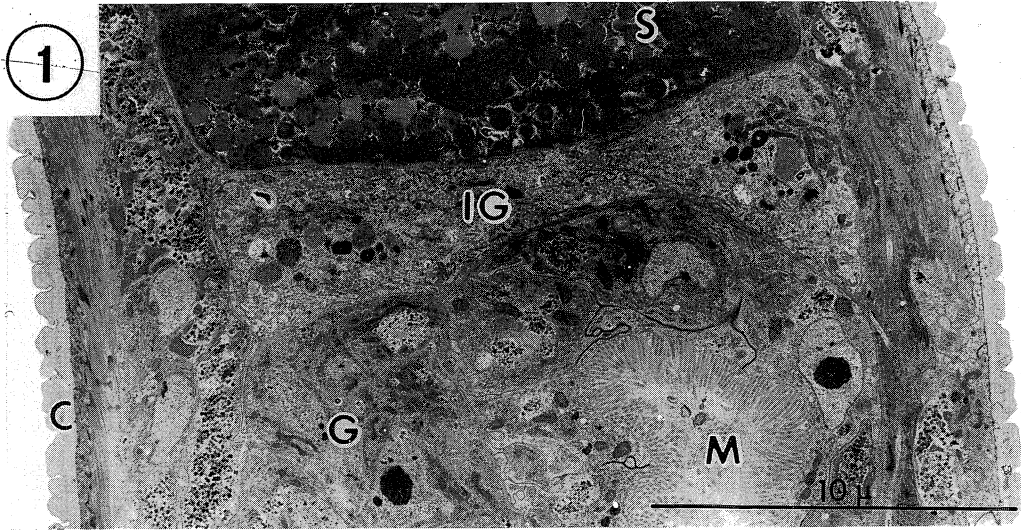


Plate 1. Longitudinal section through the stichosome (S), the intestinal gland (IG), the genital primordium (G), and the midgut (M). C: cuticle

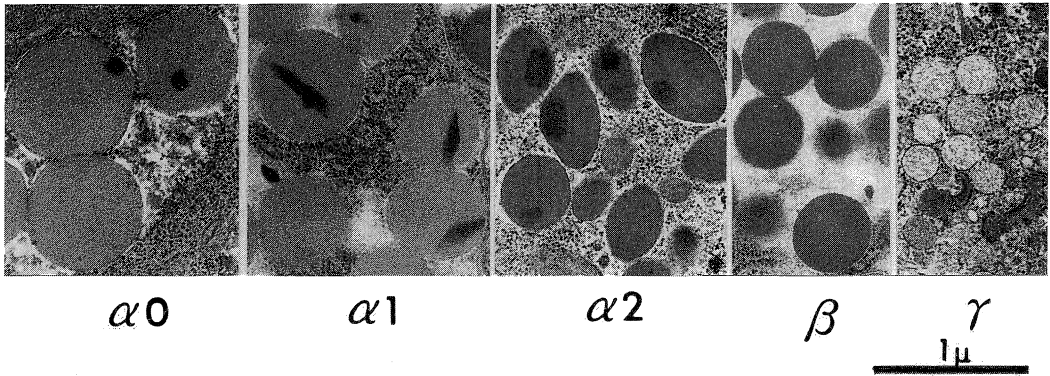


Plate 2. Five types ( $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) of stichocyte granules.

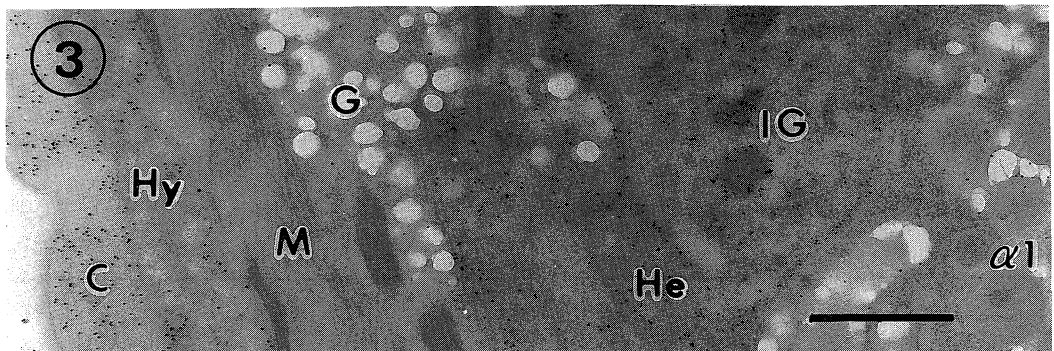


Plate 3. Immunostaining with IgG from 2 weeks postinfection. Cuticle (C) inner layer, hypodermis (Hy), glycogen aggregates (G), hemolymph (He) and granules in intestinal gland cell (IG) are positive but cuticle surface and stichocyte  $\alpha_1$  granules ( $\alpha_1$ ) are negative. M: myofibril

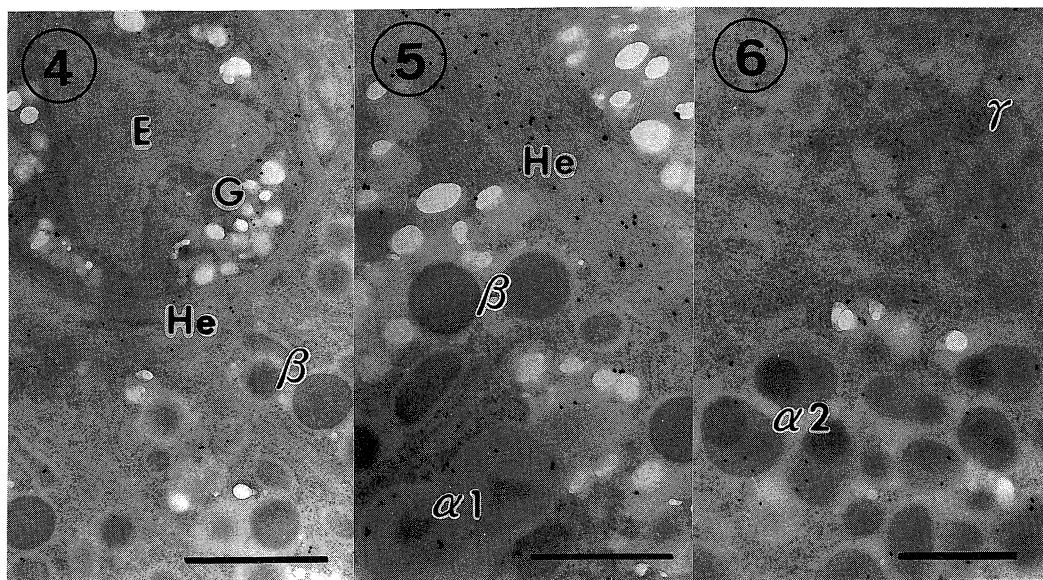


Plate 4. Immunostaining with IgG from 4 weeks postinfection. Hemolymph (He) and glycogen aggregates (G) are positive but stichocyte  $\beta$  granules ( $\beta$ ) and esophagus occupying substance (E) are negative.

Plate 5. Immunostaining with IgG from 6 weeks postinfection. Hemolymph (He) and stichocyte  $\alpha 1$  granules ( $\alpha 1$ ) are positive but stichocyte  $\beta$  granules ( $\beta$ ) are negative.

Plate 6. Immunostaining with IgG from 6 weeks postinfection. Stichocyte  $\alpha 2$  ( $\alpha 2$ ) and  $\gamma$  granules ( $\gamma$ ) are positive.

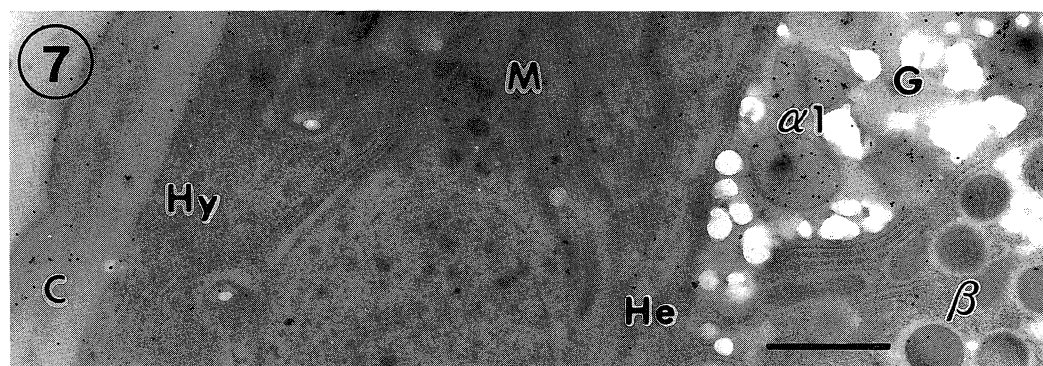


Plate 7. Immunostaining with IgG from 32 weeks postinfection. Cuticle (C) surface, stichocyte  $\alpha 1$  granules ( $\alpha 1$ ) are still positive, but staining on cuticle inner layer, hypodermis (Hy), hemolymph (He) and glycogen aggregates (G) are getting weaker. Stichocyte  $\beta$  granules ( $\beta$ ) are weakly positive. M: myofibril.



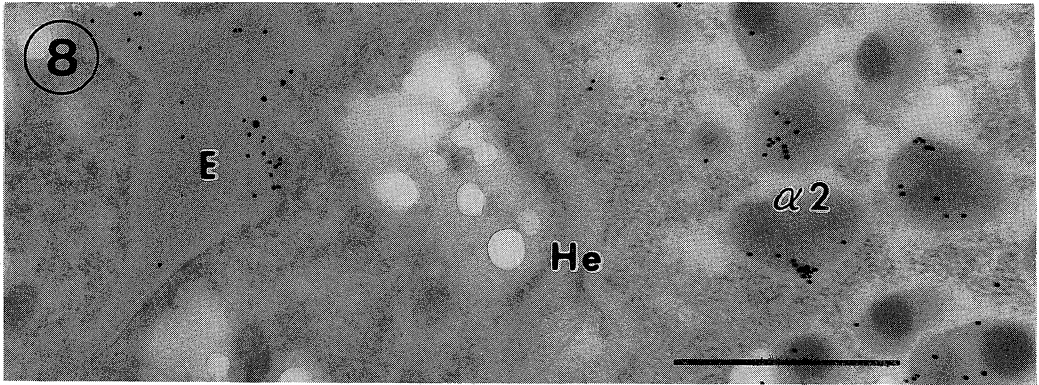


Plate 8. Immunostaining with IgM from 4 weeks postinfection. Esophagus occupying substance (E) and stichocyte  $\alpha 2$  granules ( $\alpha 2$ ) are positive but hemolymph (He) is negative.

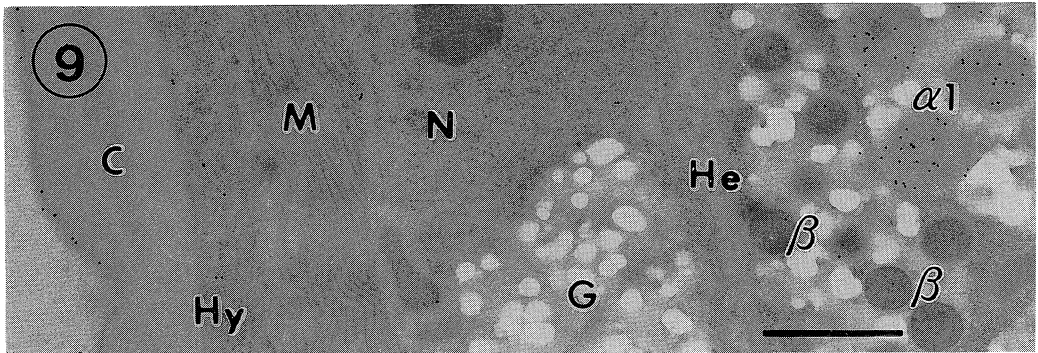


Plate 9. Immunostaining with IgM from 6 weeks post infection. Cuticle (C) surface and stichocyte  $\alpha 1$  granules ( $\alpha 1$ ) are positive, and hypodermis (Hy) and stichocyte  $\beta$  granules ( $\beta$ ) are weakly positive. But glycogen aggregates (G) and hemolymph (He) are negative. M: myofibril, N: nucleus.

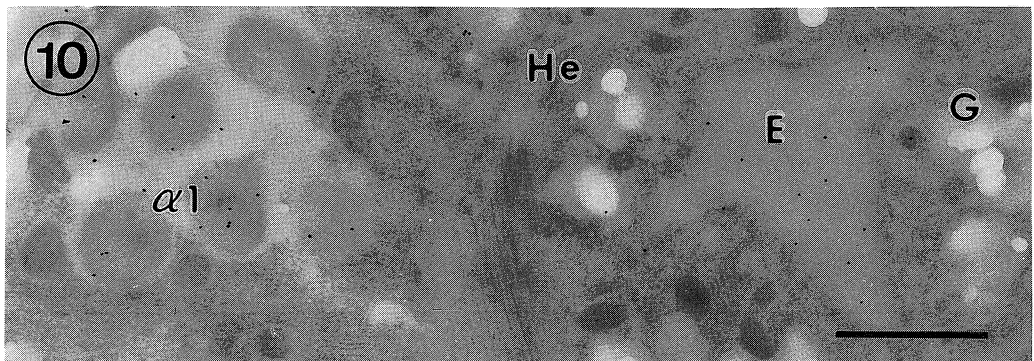


Plate 10. Immunostaining with IgM from 32 weeks postinfection. Esophagus occupying substance (E) and stichocyte  $\alpha 1$  granules ( $\alpha 1$ ) are still positive. Hemolymph (He) and glycogen aggregates (G) are negative.

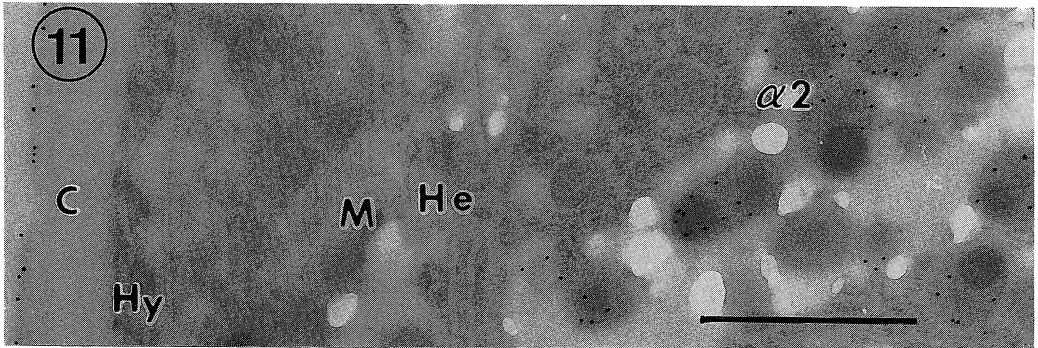


Plate 11. Immunostaining with anti cuticle surface antibody. Cuticle (C) surface and stichocyte  $\alpha 2$  granules ( $\alpha 2$ ) are positive. M: myofibril, He: hemolymph, G: glycogen aggregates.

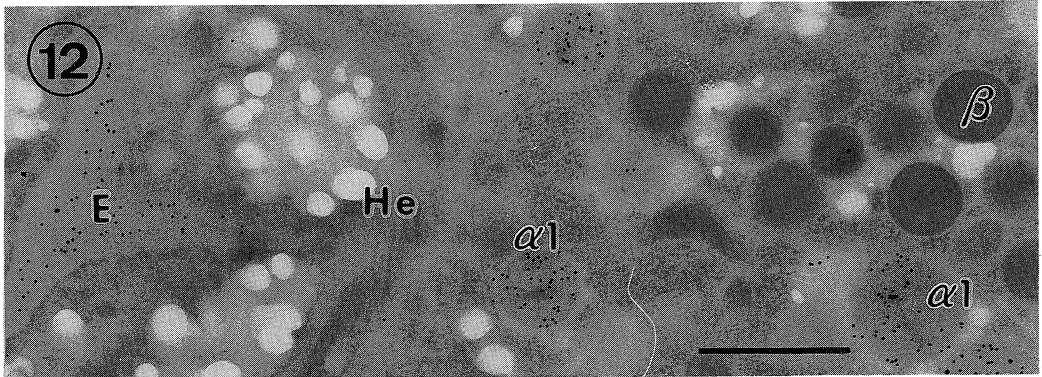


Plate 12. Immunostaining with anti cuticle surface antibody. Stichocyte  $\alpha 1$  granules ( $\alpha 1$ ) and esophagus occupying substance (E) are positive.  $\beta$ : stichocyte  $\beta$  granules, He: hemolymph, G: glycogen aggregates.

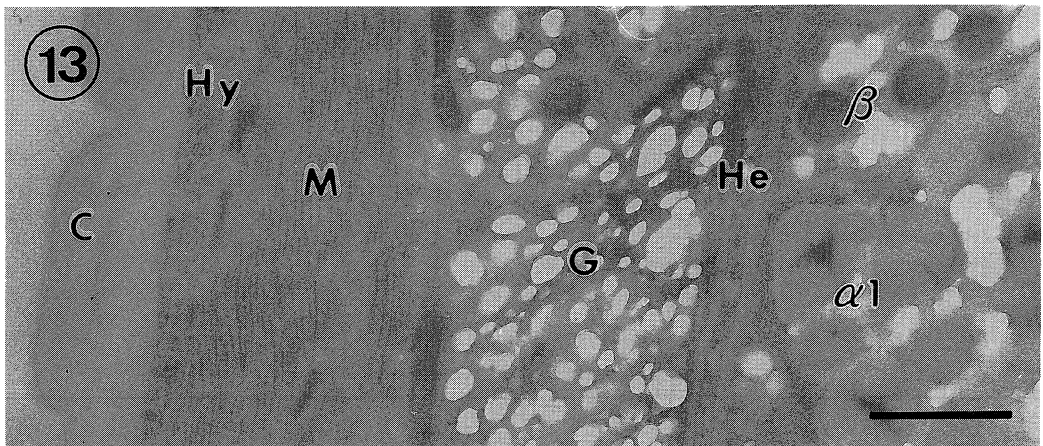


Plate 13. Immunostaining with control normal sera. No effective staining was observed. C: cuticle, Hy: hypodermis, M: myofibril, G: glycogen aggregates, He: hemolymph,  $\alpha 1$ : stichocyte  $\alpha 1$  granules,  $\beta$ : stichocyte  $\beta$  granules.

昇し始めるが、以後、急激な上昇を示した。Almond and Parkhouse (1986)<sup>16)</sup>はマウスにおいてES抗原に対するIgG特異抗体は感染後10日目ごろより上昇すると報告しているが、その上昇の程度は低く、40日までの追跡であることより、本研究の結果と直接比較できない。一方、IgM特異抗体は、筋肉幼虫粗抗原に対しては、4週目から20週目にかけ有意な上昇が認められたが、感染後24週目以降は有意差が認められなかった。これに対し、ES抗原に対するIgM特異抗体は感染後3週目より有意な上昇を示し、32週目においてもなお有意差が認められ、その上昇のレベルも粗抗原に対するIgM特異抗体に比べ顕著なものであった。これらの結果から、旋毛虫抗原に対する宿主の抗体産生の感染後の動態は、その認識する抗原により各々異なることが示唆された。

よって、各抗原に対するIgGおよびIgM特異抗体の感染後の変化を免疫電顕法とウェスタンブロット法によってさらに詳細に検討した。その結果、旋毛虫筋肉幼虫の各抗原に対する特異抗体はすべて同じ時期に産生されるのではないことが確認された。すなわち、旋毛虫筋肉幼虫抗原は、特異抗体が感染後早期に産生される抗原と遅れて産生される抗原とに大別され、前者の抗原には、免疫電顕では体腔液、腸腺の顆粒、中腸内腔物、生殖原基細胞質成分、グリコーゲン顆粒、角皮下層、側索および正中索、クチクラ内層などが、ウェスタンブロット法ではpI 4.4~4.7, 4.9~5.4, 6.3~6.5の各間3本計9本のバンドが含まれ、後者の抗原には、免疫電顕法ではクチクラ表面、食道内腔物、スティコサイトの各顆粒が、ウェスタンブロット法ではpI 3.7, 3.8および4.0の3本のバンドが含まれることが明らかになった。また、IgG特異抗体が早期に産生される抗原では、そのIgM抗体の反応は認められないか、または、非常に弱いものであった。

本研究の結果を免疫診断に関して文献的考察をおこなうと、旋毛虫症の免疫診断用抗原として現在までに、ES抗原、クチクラ表面やスティコサイト顆粒に存在する抗原が感受性および特異性に優れており、有用であるとされている。すなわち、感染および非感染ブタ血清の各種抗原に対する反応性をELISA法により検索したところ、ES抗原 (Gamble et al., 1983<sup>17)</sup>, Gamble and Graham, 1984<sup>18)</sup>, Arriaga et al., 1989<sup>19)</sup>, スティコサイト顆粒由来の抗原 (Seawright et al., 1983)<sup>20)</sup>およびクチクラ表面とスティコサイト顆粒の共通抗原 (Arriaga et al., 1989)<sup>19)</sup>を用いた場合に、感染ブタにおける特異抗体検出率が高いこと、また、非感染ブタ血清による交差反応が排除されることを示している。また、著者らはヒトにおいても、旋毛虫症患者血清、他の寄生虫症患者血清およ

び正常ヒト血清の反応性を免疫組織化学的に検索したところ、食道内腔物、クチクラ表面やスティコサイト顆粒に存在する抗原は旋毛虫症血清全例と反応し、しかも、交差反応は重症の鞭虫症患者血清との間に確認されたのみであり、これらの抗原がヒト旋毛虫症の免疫診断用抗原としても有用であることを報告している (Takahashi et al., 1990)<sup>21)</sup>。しかし、上述したように、本研究の間接ELISAの結果、ES抗原に対する特異抗体は、IgG抗体で感染後4週目より、IgM抗体で感染後3週目よりと、粗抗原に対する特異抗体よりも遅れて検出されることが示され、また、免疫電顕法の結果、クチクラ表面および食道内腔物に対する特異抗体の検出時期はIgGで6週目、IgMで4週目、また、スティコサイト顆粒に対してはIgGで6~8週目、IgMで4週目であることが示されたので、これらの抗原は感染後遅れて特異抗体の産生される抗原であると考えられる。よって、これらの抗原を免疫診断用抗原として用いる場合、感染初期の血清では偽陰性の結果を生ずることとなり、診断上注意が必要であることが示唆された。また、IgGとIgMとで検出される時期が異なるため、検出する抗体のクラスについても十分に考慮する必要があることが示唆された。

次に、初感染や感染初期の感染症を診断するには、一般的にIgMクラスの特異抗体を検出することが有効であるとされているが、本研究の免疫電顕の結果、早期よりIgG特異抗体の出現する抗原のうち、体腔液、腸腺の顆粒に対しては、IgM特異抗体が検出されず、また、中腸内腔物、生殖原基の細胞質成分、グリコーゲン顆粒、角皮下層、側索および正中索、クチクラ内層などに対しては、検出されても抗体価の低いことが明らかにされた。本研究では、血清中の抗体を各クラスに分けず実験に用いたため、血清中の他のクラスの抗体の濃度、特にIgGクラスの抗体の濃度の影響をうけ、IgM抗体の検出レベルが低くなったと思われる。しかし、実際に血清を免疫診断に用いる場合、抗体を各クラスに分けて用いることはすくないので、結局、これらの幼虫虫体構造物由来の抗原は初感染や感染初期の診断用抗原としては不適切であると思われる。一方、クチクラ表面、食道内腔物およびスティコサイト顆粒に対してはIgM特異抗体の検出される時期が遅れるものの、抗体価は高く、感染後32週目においてもなお検出されたので、これらの構造物由来の抗原は初感染を診断する免疫診断用抗原として有用であると考えられる。また、間接ELISAの結果からも、同様の理由で、粗抗原よりもES抗原が初感染の証明において優れているといえる。

以上に述べたように、本研究で免疫電顕法により旋毛



虫筋肉幼虫各抗原に対する特異抗体の感染経過による推移をIgGおよびIgMについて検索した結果は、旋毛虫症の免疫診断をより確実なものにするための重要な資料となった。しかし、これらの結果を実用化するには、有用な抗原を分離精製する必要がある。抗原の分離精製には抗原である物質の生化学的性質を利用することが一つの手段である。そのため、本研究では、有用性の高い抗原の一つであるクチクラ表面抗原について、生化学的性質のひとつである等電点を同定した。すなわち、固定した筋肉幼虫の虫体表面をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにて抗クチクラ表面抗体を精製し、ウェスタンブロット法により抗クチクラ表面抗体の反応する抗原物質の等電点を同定した。その結果、pI 4.0および5.4のバンドに強い反応が認められ、これらのバンドにクチクラ表面抗原が存在することが確認された。さらに、ウェスタンブロット法にて等電点で分けられた筋肉幼虫各抗原に対する特異抗体の感染経過による推移を検索した結果、抗クチクラ表面抗体の強く反応した2本のバンドのうち、pI 4.0のバンドに対するIgG抗体の反応は感染後4週目より認められ、遅れてIgG特異抗体の出現する抗原に属し、免疫電顕法の結果と一致した。一方、pI 5.4のバンドに対する反応は感染後2週目と早期より出現し、免疫電顕法の結果と矛盾する。この理由として、ひとつの抗原局在部位にひとつの抗原のみ存在するとは限らず、同様にひとつのバンドにひとつの抗原のみ存在するとは限らないため、このような不一致が生じたものと考えられる。また、免疫電顕における化学固定等による抗原性の失活や、ウェスタンブロット法に用いた抗原の精製時における変性や喪失など、両実験に用いた抗原の抗原性が完全に一致していないことも原因として考えられる。いずれにせよ、これら2本のバンドより特異性に優れたクチクラ表面の抗原が分離精製できるものと考えられ、これらのバンドに対する特異抗体の感染経過による推移を追跡した結果は、分離精製した抗原を用いた免疫診断法をより確実なものにする重要な知見となる。

本研究では、筋肉幼虫各抗原に対する特異抗体がすべて同じ時期に産生されるわけでないことを示したが、現在の段階では、このことを説明する確実な理由を見出すことはできない。しかし、様々な理由が推測される。特に旋毛虫の生活史における各抗原の代謝や機能と関係すると考えられる。というのは、抗体産生は抗原が宿主に呈示され、宿主がこれを認識して初めて生じるのであるから、抗体産生の時期は主に抗原呈示の時期すなわち各抗原の産生、分泌、排泄などの時期に相関するからである。そして、各物質の代謝や機能が明らかになれば、

宿主寄生虫相互関係が詳細に検討できる。たとえば、Silberstein and Despommier (1984)<sup>21)</sup>およびGamble (1985)<sup>22)</sup>はアフィニティークロマトグラフィーにて精製したES抗原が、また、Grencis et al. (1986)<sup>23)</sup>は界面活性剤であるCTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)にて抽出したクチクラ表面抗原が宿主の防御免疫源として有用であることをマウスを用いた免疫実験で示しているが、さらにこれらの抗原の代謝や機能が明らかになれば、感染防御機構が解明され、より確実な感染防御法の確立につながるであろう。それにもかかわらず、これらの抗原物質の代謝や機能についてはほとんど明らかにされていない。しかし、スティコサイト顆粒抗原が食道を通じ、虫体外に分泌され、ES抗原の主要成分として放出されること (Despommier et al. 1974)<sup>24)</sup>、クチクラ表面抗原とスティコサイト顆粒抗原が抗原性を共有すること (McLaren et al., 1987<sup>25)</sup>、Takahashi et al. 1990)<sup>26)</sup>、筋肉内に被嚢した幼虫より放出される抗原により、宿主が長期にわたり免疫刺激を受けること (Pritchard 1985)<sup>27)</sup>など断片的な事象が示されてきており、これらの事象はES抗原やクチクラ表面およびスティコサイト顆粒に存在する抗原の代謝や機能を説明する基礎的知見となる。本研究において、クチクラ表面、スティコサイト顆粒および将来ES抗原となると思われる食道内腔物に存在する抗原は免疫電顕法でいずれも遅れて特異抗体の産生される抗原に分類され、また、ウェスタンブロット法で抗クチクラ表面抗体の反応する二つのバンドのうちpI 4.0のバンドも感染後遅れて特異抗体が出現する抗原であることが明らかにされた。このため、宿主に防御免疫能を付与する抗原は感染後遅れて産生または放出されるという共通の性質をもつと考えられる。そして、このことも、上述したようにこれらの抗原の旋毛虫感染における機能を説明する基礎的知見となり、この抗原物質の機能が解明されれば、感染防御機構が説明され、より有効な感染防御法の開発につながると思われる。

以上に考察したように、本研究の結果すなわち各抗原に対する特異抗体の感染経過による推移を抗体クラス毎に検索した結果は、免疫診断用抗原の開発および感染防御法の確立の際、重要な基礎資料となるものと思われる。

## 結 語

旋毛虫筋肉幼虫抗原に対する抗体産生の感染経過による変化を、間接ELISA、免疫電顕法およびウェスタンブロット法を用いて検索し、以下の結論を得た。

(1)筋肉幼虫粗抗原およびES抗原に対する抗体産生を間接ELISAにより経時的に分析すると、粗抗原に対す

る IgG 特異抗体は感染後 2 週目より検出され、以後、高値を維持するが、IgM 特異抗体は感染後 4 週目より 20 週目にかけてわずかに上昇するのみであった。一方、ES 抗原に対する IgG 特異抗体は感染後 4 週目より検出され、以後、さらに上昇を続けた。また、ES 抗原に対する IgM 特異抗体は感染後 3 週目より 32 週目にかけて明らかな上昇を示した。

(2)免疫電顕法により筋肉幼虫各抗原に対する抗体産生を経時的に分析すると、早期より IgG 特異抗体の検出される抗原と遅れて IgG 特異抗体の検出される抗原とに大別された。遅れて IgG 特異抗体の検出される抗原に対する IgM 特異抗体の反応は強く感染後長期にわたって検出されるが、早期より IgG 特異抗体の検出される抗原に対する IgM 特異抗体は前者に比べ早期に検出されるもののそのレベルは低かった。

(3)ウェスタンブロット法により筋肉幼虫各抗原に対する抗体産生を経時的に分析すると、早期より IgG 特異抗体の反応が認められる抗原と遅れて IgG 特異抗体の反応が認められる抗原とに大別された。

(4)特異性に優れたクチャラ表面抗原に対する抗体を感染血清より精製し、その反応性を免疫電顕法により検索した結果、クチャラ表面以外に、スティコサイトの  $\alpha$  顆粒や食道内腔物に反応が認められ、これらの虫体構造物に共通の抗原性が存在することが確認された。さらに、ウェスタンブロット法によりこの抗体の反応する抗原は、pI 4.0 および pI 5.4 のバンドに存在することが認められた。

以上の結果より、旋毛虫症の有用な免疫診断法の開発には、抗原の特異性と共に、対応する抗体のクラスとその検出される時期を考慮することが重要であることが示された。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った恩師奈良県立医科大学寄生虫学教室荒木恒治教授に深甚な謝意を表すと共に、御校閲賜った第 2 解剖学教室山本浩司教授、細菌学教室榎葉周三教授に深謝いたします。さらに研究に終始御協力下さった本学寄生虫学教室諸兄姉に感謝致します。

本論文の要旨は第 30 回日本熱帯医学会総会（昭和 63 年 10 月長崎市にて開催）、第 44 回日本寄生虫学会西日本大会（昭和 63 年 11 月出雲市にて開催）、第 58 回日本寄生虫学会大会（平成元年 4 月東京にて開催）および第 45 回日本寄生虫学会西日本大会（平成元年 10 月倉敷市にて開催）の席上にて発表した。

## 文 献

- 1) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. : J. Immunol. **132**: 898, 1984.
- 2) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. : J. Parasitol. **71**: 516, 1985.
- 3) Parkhouse, R. M. E., Philipp, M. and Ogilvie, B. M. : Parasit. Immunol. **3**: 339, 1981.
- 4) Mackenzie, C. D., Preston, P. M. and Ogilvie, B. M. : Nature **276**: 826, 1978.
- 5) Philipp, M., Parkhouse, R. M. E. and Ogilvie, B. M. : Nature **287**: 538, 1980.
- 6) Philipp, M., Taylor, P. M., Parkhouse, R. M. E. and Ogilvie, B. M. R. : J. Exp. Med. **154**: 210, 1981.
- 7) Jungery, M., Clark, N. W. T. and Parkhouse, R. M. E. : Mol. Biochem. Parasitol. **7**: 101, 1983.
- 8) Almond, N. M., McLaren, D. J. and Parkhouse, R. M. E. : Parasitology **93**: 163, 1986.
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : J. Biol. Chem. **193**: 265, 1951.
- 10) Fasman, G. D. : in Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 2, CRC press, Ohio, p383, 1976.
- 11) Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. E. : Trans. Roy. Soci. Trop. Med. and Hyg. **70**: 98, 1976.
- 12) Slot, J. W. and Geuze, H. J. : Europ. J. Cell Biol. **38**: 87, 1985.
- 13) Tanaka, H., Haga, S., Takatsuki, K. and Yamaguchi, K. : Cancer Res. **44**: 3493, 1984.
- 14) Ottesen, E. A., Smith, T. K. and Kirkpatrick, C. H. : Int. Archs. Allergy Appl. **49**: 396, 1975.
- 15) 西山利正 : 奈医誌. **38**: 398, 1987.
- 16) Almond, N. M. and Parkhouse, R. M. E. : Parasit. Immunol. **8**: 391, 1986.
- 17) Gamble, H. R., Anderson, W. R., Graham, C. E. and Murrell, K. D. : Vet. Parasitol. **13**: 349, 1983.
- 18) Gamble, H. R. and Graham, C. E. : Amer. J. Vet. Res. **45**: 67, 1984.
- 19) Arriaga, C., Muniz, E., Morilla, A. and Ortega-Pierres, G. : Exp. Parasitol. **69**: 363, 1989.

- 20) **Seawright, G. L., Despommier, D. D., Zimmerman, W. and Isenstein, R. S.** : Amer. J. Trop. Med. Hyg. **32**: 1275, 1983.
- 21) **Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Wada, T. and Araki, T.** : J. Electron Microsc. **39**: 155, 1990.
- 22) **Gamble, H. R.** : Exp. Parasitol. **59**: 398, 1985.
- 23) **Grencis, R. K., Crawford, C., Pritchard, D. I., Behnke, J. M. and Wakelin, D.** : Parasit. Immunol. **8**: 587, 1986.
- 24) **Despommier, D. D.** : *in* Trichinellosis (Kim, C., ed). Intext Educational Publishers, New York, p239, 1974.
- 25) **McLaren, D. J., Ortega-Pierres, G. and Parkhouse, R. M. E.** : Parasitology **94**: 101, 1987.
- 26) **Takahashi, Y., Mizuno, N., Uno, T., Tokuda, C. and Araki, T.** : J. Parasitol. **76**: 290, 1990.
- 27) **Pritchard, D. I.** : J. Helminth. **59**: 71, 1985.