

旋毛虫症に特異的な免疫診断法に関する研究

奈良県立医科大学寄生虫学教室

竹上 貴子

STUDIES ON IMMUNODIAGNOSTIC METHODS SPECIFIC FOR TRICHINOSIS

TAKAKO TAKEGAMI

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received September 30, 1994

Abstract: *Trichinella spiralis* muscle larvae possessed both "specific" antigens in stichocyte α -granules, the alimentary tract, and the cuticle surface; and "non-specific" antigens in cuticle inner layer(s), hypodermis, and hemolymph. Thin study was designed to determine immunocytochemically the class of antibodies raised against specific and non-specific antigens. Ultrathin sections of resin embedded *T. spiralis* muscle larvae were immunostained with sera from patients with a wide variety of helminthiasis including trichinosis, paragonimiasis, fascioliasis, trichuriasis, gnathostomiasis, dirofilariasis, anisakiasis, cysticercosis cellulosae hominis, and diphyllbothriasis. Sera from all patients reacted positively against the non-specific antigens. IgG-class antibodies exclusively contributed to the response. On the other hand, patients with trichinosis evoked both IgG-and IgM-class antibodies against specific and non-specific antigens. These results increase the potential usefulness of the specific diagnosis of trichinosis, because they suggest that a test using only IgM-class antibodies may minimize the undesirable effects of contaminating non-specific antigens in the immunodiagnosis of trichinosis.

Index Terms

Trichinella spiralis, muscle larvae, trichinosis, immunodiagnosis, ultrathin section

緒 言

人蓄共通感染症としての旋毛虫 *Trichinella spiralis* は、世界各国に広く分布し、欧米諸国では主に雑食動物であるブタに感染し、ヒトへは熱を加えない自家製ソーセージや生ハムによる感染が多く、食品衛生上大きな問題となっている。日本ではタマ肉の生食による感染が山口¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾によって報告されている。旋毛虫に関しては被囊した感染幼虫の寄生している獣肉を刺身など不完全加熱の形で経口的に摂取されると、小腸内で幼虫が孵化して速やかに発育し、およそ3~5日後には成熟して雌雄の成虫となり、交尾後雌は小腸粘膜深く侵入して幼虫を産出する。幼虫は、血流に乗って骨格筋など全身の横紋筋に運ばれ、およそ20~25日で成長し、通常宿主側から形

成された嚢胞に包まれて、次の宿主に摂取されるのを待つ。

したがって、その臨床症状は、成虫の寄生による腹部の症状と幼虫の筋肉内寄生による症状とに大別され、急性期においては、細菌性下痢症と、慢性期においては、リウマチ性疾患と疑診されやすいというように、診断が極めて困難である。一般に、寄生虫感染を診断する場合、虫体や虫卵を検出することが、確実な方法ではあるが、旋毛虫は胎生(larviparous)であるため、虫卵を産出せず、その検出は不可能である。また、旋毛虫の成虫虫体を、糞便、又は、十二指腸液より検出する事も、他の消化管寄生虫等の場合とは異なり、極めて困難である。このため、最も確実な方法となるのは、筋生検により筋肉内に被囊した幼虫を検出する事である。しかし、過去に

国内で集団発生した、1974年の青森県での症例¹⁾²⁾³⁾⁴⁾、1980年の北海道での症例、1982年の三重県での症例⁵⁾、この合計87例のうち筋生検により虫体が検出されたのは、北海道でのわずか1例にすぎなかった⁶⁾⁷⁾。そこで、本来なら補助的診断法である患者血清を用いた免疫血清学的診断法は、これらの問題を克服するのに最も有力な手段であると言える。

ヒトおよび実験動物が旋毛虫に感染した際、幼虫抗原に対し、検出可能な抗体の上昇を示す⁸⁾⁹⁾。この多細胞動物である旋毛虫幼虫は、20種以上の多数の抗原性を持ち¹⁰⁾、それに対応する抗体も多種類あるが、これらは大きく2種類に分けられる。感染後IgG特異抗体が早期に産生される抗原 rapid responding group (RRG)と遅れて産生される抗原 slow responding group (SRG)とである。前者の抗原には、免疫電顕では体腔液、腸腺顆粒、中腸内腔物、生殖原基細胞質成分、グリコゲン顆粒、角皮下層、側索および正中索、クチャラ内層などが含まれ、後者の抗原には、クチャラ表面、食道内腔物、食道腺顆粒が含まれることが報告されている⁸⁾。旋毛虫症の免疫診断に有用である、いわゆる特異抗原とみなされているのは、感染後遅れて抗体産生を惹起するSRG抗原である。これらの特異抗原を免疫診断に用いるため、種々の精製方法が知られている。例えば、食道腺 α 顆粒は、homogenizationと遠心分離の併用により集めることができ¹⁰⁾、古典的、あるいはモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより更に精製することができる¹¹⁾。また、クチャラ表面抗原は、CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)処理により筋肉幼虫から抽出することができ¹¹⁾¹²⁾、ES(excretory-secretory)産物は、旋毛虫幼虫を培養した上清から集める事ができると報告されている¹³⁾。しかしながら、これらのいずれの方法も非特異抗原の混入は避けられない。そこで、本来好ましくない交差反応として起こるバックグラウンドをできる限り減少させるための方策が必要である。これまでの免疫診断には、補体結合反応¹⁴⁾、ゲル内二重拡散法¹⁵⁾、免疫電気泳動法¹⁶⁾、迅速凝塊反応¹⁷⁾、ラテックス凝集反応¹⁸⁾などがあり、特異抗体を検出するために、抗原と被検患者血清とを反応させてから、標識した二次抗体を反応させ、特異抗体を検出するというものである。その抗原抗体反応の結果は質的、量的に評価されている。しかし、その正確さを考慮した場合、用いる抗原の選択や患者の持つ抗体のタイプの同定、抗原抗体反応の検出方法等更なる改善の必要性があると思われる。

本研究では、旋毛虫症、肺吸虫症、肝蛭症、鞭虫症、顎口虫症、犬糸状虫症、アニサキス症、脳有鉤囊虫症、

広節裂頭条虫症の患者血清中に検出される抗旋毛虫抗体を免疫電顕法にて検索し、旋毛虫症の免疫診断の特異性に関してより優れた検査系を検討した。

材料および方法

1; 旋毛虫幼虫の採集

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。旋毛虫の継代用の感染には著者らの考案したTarTar法¹⁹⁾を用い、免疫電顕用の切片に用いる旋毛虫幼虫の回収には、以下のペプシン消化法を用いた。つまり、感染後4週以上経過したICRマウスの筋肉を細かく碎き、Despommierら²⁰⁾の方法にもとづき、0.5%ペプシン(NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)/0.7%塩酸(NAKALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)中で37°Cにて3時間消化した。消化後の反応液を目の大きさが125 μ mの篩で濾し、旋毛虫用円錐型容器に入れ、室温にて30分間放置し、容器の底に沈んだ旋毛虫幼虫を集めた。採集した旋毛虫幼虫をリン酸緩衝食塩水(Phosphate buffered saline, 以下PBS, pH 7.2)にて繰り返し洗浄し、用い供した。

2; 旋毛虫幼虫組織の超薄切片の作製

上述のごとく採集した旋毛虫幼虫を $\frac{1}{2}$ カルノフスキー固定液(グルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒドの混合液)で固定し、アルコール上昇系列(50%, 70%, 95%, 100%)で脱水後、LR White(London Resin Company Ltd, UK)に包埋し、ダイヤモンドナイフにて厚さ80nmの超薄切片を作製した。

3; 実験に供したヒト血清

1) 旋毛虫症患者血清

1982年三重県四日市市及びその周辺地区にて集団発生した旋毛虫症患者血清(6症例)を実験に供した。集団発生はツキノワグマの筋肉の生食による発症と考えられ、実験に供した6症例とも、ラテックス凝集反応試験(LA)、向流免疫電気泳動(CIE)、幼虫周囲沈降試験(CLP)にて、いずれも陽性を呈し、さらに臨床症状等を考慮した上で旋毛虫症と確定診断されたものである。

2) 各種蠕虫症患者血清

肺吸虫症患者血清(4症例)、肝蛭症患者血清(2症例)、鞭虫症患者血清(重症1症例²¹⁾、軽症5症例)、顎口虫症患者血清(4症例)、犬糸状虫症患者血清(3症例)、アニサキス症患者血清(4症例)、脳有鉤囊虫症患者血清(3症例)、広節裂頭条虫症患者血清(3症例)を本実験に供した。いずれも当教室において虫体あるいは虫卵検出、または血

清免疫学的検査を施行し、ゲル内沈降反応(Ouchterlony法およびIEP法)にて陽性所見が認められ、さらに臨床症状、臨床経過、および臨床血液化学的検査等も考慮した上で、当該疾患と診断された患者血清である。

4: 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

金コロイドは、Slotら²²⁾の方法にもとづいて作製した。すなわち、2%塩化金($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)溶液1ml及び蒸留水159ml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9mlと蒸留水31mlの混合液を加えて60°Cで2時間攪拌した。溶液の色調が灰色から赤色に変化した後、2~3分間煮沸し、粒子の直径15nmの金コロイド溶液を得た。

2) プロテインA-金コロイド混合液の作製

Tanakaら²³⁾の方法に基づきプロテインA-金コロイド混合液を作製した。すなわち、0.1mgのプロテインA(Pharmacia Fine Chemicals Co. Uppsala, Sweden)をプラスチックビーカーにとり、5mM塩化ナトリウム溶液0.1mlを加えて溶解した。さらに金コロイド溶液5mlを加え、1~2分間攪拌した。次いで5%ポリエチレングリコール(PEG; 分子量20,000, NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)溶液0.15mlを加えた。次いでプラスチック製の遠沈管に0.45 μm のミリポアフィルター(Minisart NML, Nihon Milipore Kogyo K. K., Yonezawa, Japan)でろ過した0.05%PEGおよび0.02%アジ化ナトリウム(NaN_3)を含む5%グリセロール溶液2.5mlを入れ、その上に前述のプロテインAと金コロイドとの混合液5mlを重ねし55,000g(25,000rpm)で4°Cにて40分間遠沈(HITACHI 65 P, Hitachi Koki Co., Ltd. Tokyo, Japan)した。次に、上清6.5mlを静かに除去し、残りの1mlを沈殿物とよく混和した。これをプロテインA-金コロイド混合液として、4°Cで保存、作製後1週間以内に使用した。使用時には、1%卵白アルブミン加PBS(1% Egg-Albumin-PBS)にて10倍に希釈し、マイクロ遠心機(MR-150, TOMYSEIKO Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用い、8,000g(11,000rpm)で室温にて5分間遠心後、上清をさらに1% Egg-Albumin-PBSにて5倍に希釈して免疫染色に供した。

3) プロテインA-金コロイド混合液を用いた超薄切片の免疫染色

上述のごとく作製した旋毛虫幼虫組織の超薄切片に対し、旋毛虫症及び各種蠕虫症患者血清を1% Egg-Albumin PBSにて100倍希釈し、室温で30分間反応させた。1% Egg-Albumin-PBSで3回洗浄後、プロテ

インA-金コロイド混合液を室温で30分間反応させた。1% Egg-albumin-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、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM 1200 EX)で観察した。

4) ストレプトアビジン-金コロイド混合液の作製

Tanakaら²³⁾の方法に基づいてストレプトアビジン-金コロイド混合液を作製した。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塩化ナトリウム溶液0.1mlに溶解させ、次に0.1M炭酸カリウム(K_2CO_3)溶液でpH6.4に調整した金コロイド溶液5mlを加え1~2分間攪拌した。これに5%PEG溶液0.15mlを加えた。次いで0.05%PEGおよび0.02%アジ化ナトリウムを含む5%グリセロール溶液2.5mlを0.45 μm のミリポアフィルターでろ過後、プラスチック製の遠沈管に入れ、この上に前述のストレプトアビジンと金コロイドとの混合液5mlを重ねし、55,000g(25,000rpm)で4°Cにて40分間遠沈後、上清6.5ml除去し、残りの1mlを沈殿物とよく混和し、これをストレプトアビジン-金コロイド混合液として4°Cで保存、作製後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、マイクロ遠心機を用い8,000g(11,000rpm)で室温にて5分間遠心後、上清を1%BSA-PBSにてさらに5倍に希釈して使用した。

5) フトレプトアビジン-金コロイド混合液を用いた超薄切片の免疫染色

上述のごとく作製した旋毛虫幼虫組織の超薄切片に対し四日市市にて集団発生した旋毛虫患者血清及び各種蠕虫症患者血清を1%BSA-PBSにて100倍に希釈したものを、室温にて30分間反応させた。1%BSA-PBSにて3回洗浄後、ビオチン標識抗ヒトIgG溶液(BIOTIN CONJUGATED GOAT ANTI-HUMAN IgG ANTI-BODY., TAGO INC. CA, USA)または、ビオチン標識抗ヒトIgM溶液(BIOTIN CONJUGATED GOAT ANTI-HUMAN IgM ANTI-BODY., TAGO INC. CA, USA)を200倍に希釈したものを、室温で30分間反応させた。その後切片を1%BSA-PBSにて洗浄し、4)の方法で得たストレプトアビジン-金コロイド混合液を室温で30分間反応させた。さらに、1%BSA-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。

結 果

免疫染色をおこなった電子顕微鏡写真を検討するため

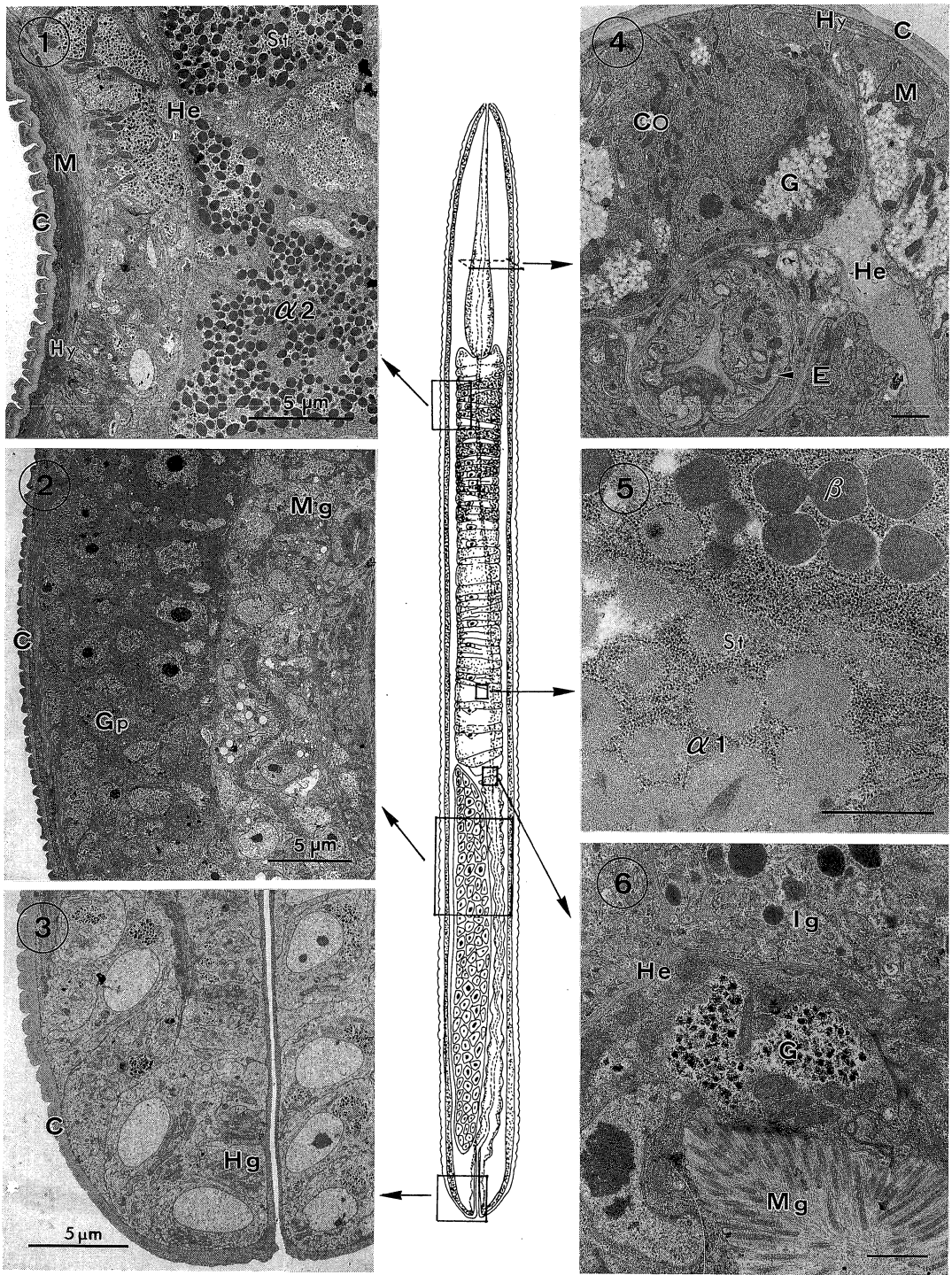


Fig. 1. Schematic illustration of the structure of *Trichinella spiralis* larvae.

に、旋毛虫筋肉幼虫の超微形態の知見が必要であるのでこれを理解するために、虫体構造の模式図が Fig. 1 に描かれている。また、模式図構成のもとになった各部分の電顕像も示した。その概略は、以下の如きである。

幼虫は最外層を厚さ 0.9 μm のクチクラ(cuticle; C) で取り囲まれており、その内側に角皮下層(hypodermis; Hy), さらに筋肉層(muscle layer; M)が位置する(Plate 1, 4)。筋肉層は、一対の側索(lateral cord; Co)とその間を2分する位置にある一対の正中索(median cord)により4つに分けられている。虫体の前方部には食道(esophagus; E Plate 4)とそれを取り囲む食道腺(stichosome; St)と呼ばれる長さ約 450 μm の大きな器官が存在する(Plate 1)。この食道腺は形態の異なる α 0, α 1, α 2, β, γ, の5種類の分泌顆粒を持つ約 50 個の食道腺細胞が重層したものである(Plate 1, 5)。虫体の後方部には食道より下降した中腸(midgut; Mg)が生殖原基(genital primordium; Gp)と並走し(Plate 2), やがて後腸(hindgut; Hg)に至る(Plate 3)。中腸は、その起始部が膨大しており、その上皮はbrush border で覆われ、食道と中腸の接合部には腸腺細胞(intestinal gland cell; Ig)が存在する(Plate 6)。また、各臓器間の隙間は、体腔液(hemolymph; He)で満たされており(Plate 1, 4, 6), 散在するグリコーゲン顆粒(glycogen aggregates; G)も観察される(Plate 4, 6)。

今回おこなった金コロイドをマーカーとして用いた

post-embedding 免疫染色法である PAG(protein A-gold)法、ならびに Avidin-gold 法は、従来使用されて来たフェリチン抗体法²⁴⁾、及びペルオキシダーゼ標識抗体法²⁵⁾ に比べ作製が比較的簡単であり、しかも非特異的反応が少なく、金粒子の電子密度が非常に高いゆえ、酢酸ウラニール・クエン酸鉛の二重染色を施しても目的とする抗原の細胞内局在が明瞭に観察できるという長所を持っている。最初におこなった PAG 法は、超薄切片と被検血清とを反応させ、その後プロテイン A-金コロイド混合液と反応させるという2段階の非常に簡便な方法ではあるが、これに用いられるプロテイン A は、Lindmark²⁶⁾によると、ヒトの場合 IgG, IgM の両者に結合すると報告されていることより、前述の PAG 法で検出した抗体は、IgG と IgM の両者を合わせたものと考えられる。感染中に出現する抗体は、IgG, IgM, IgA, IgE 等があり²⁷⁾、それぞれが同一の抗原を認識しているとは限らず、また、各々の出現時期や経過、強さにも差があるものと思われる。そこで次に、ビオチン標識抗ヒト IgG, あるいは IgM を二次抗体として用い、旋毛虫患者血清や他の蠕虫症患者血清の認識する抗原局在部位を IgG と IgM のクラス別に検索可能な Avidin-Gold 法を実施した。なお、対照実験として、正常幼少ヒト血清を用い、PAG 法、Avidin-Gold 法により免疫染色を施したところ、いずれの場合も染色陽性部位は見いだされず、免疫染色の特異性が確認された(Plate 23, 24, 25)。

Table 1. A summary of the antibodies against muscle larval antigens in sera of patients with *Trichinella* and non-*Trichinella* helminthiasis. Intensity of the immunostaining with protein A-gold is rated as positive(+), border line(±), negative(-), not determined(ND)

Localization of antigenic substances		sera									
		Trichinosis	Paragonimiasis	Fascioliasis	Severe trichuriasis	Moderate trichuriasis	Gnathostomiasis	Dirofilariasis	Anisakiasis	Cysticercosis	Diphyllobothriasis
Slow-Responding Group	Stichocyte-α0, α1	+	-	-~±	+	-	-~±	-~±	-	-	-
	granule-α2	+~-	-	-	-	-	-	-	ND	-	
	β	+~-	-	-	±	-	-	-	-	-	
Rapid-Responding Group	EOS	+	-	-	+	-	-~±	-	-	-	
	Cuticle surface	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
	Cuticle inner layer	+	+	+	+	±~-	+	-~±	+~±	±	
	Hypodermis	+	+	+	+	±~-	+	-	-	-	
	Hemolymph	+	+	+	+	±~-	+	±	+~-	±	
MOS&B. B.	+	±	ND	+	-	+	-	±	-		

1)PAG 法を用いた免疫染色法の結果

旋毛虫症, 及び各種蠕虫症患者血清(肺吸虫症, 肝蛭症, 重症鞭虫症, 軽症鞭虫症, 顎口虫症, 犬糸状虫症, アニサキス症, 脳有鉤囊虫症, 広節裂頭条虫症)と旋毛虫幼虫超薄切片とを反応させ, それぞれの抗体の抗原認識部位を PAG 法にて同定し, Table 1 にまとめた. 旋毛虫患者血清 6 例全例と常に反応し, 免疫染色陽性とみなされたのは, クチクラ表面, クチクラ内層, 角皮下層(Plate 7), 食道腺顆粒 $\alpha 0$, $\alpha 1$ (Plate 8), 体腔液(Plate 10), 食道内腔物(esophagus occupying substance; EOS, Plate 9), 腸腺顆粒, brush border(B B, Plate 10), であった. また, 用いた患者血清により, 陽性を呈したり, 陰性を呈したり, 結果が一定でなかった部位は, 食道腺顆粒 $\alpha 2$ (Plate 9), β , γ , cord の顆粒, そしてグリコーゲン顆粒や生殖原基細胞質成分であった. 常に陰性であったのは, 食道のクチクラ(Plate 9), 核, 核小体, ミトコンドリア, 粗面小胞体, 筋繊維(Plate 7)という結果であった.

各種蠕虫症患者血清で免疫染色をしたところ, 食道腺

顆粒 $\alpha 0$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β (Plate 12,13,14), クチクラ表面, 食道内腔物(Plate 13)は, 一つの例外を除いてほとんど免疫染色陰性であった. 例外の一つとは, 重症鞭虫症であり, その陽性染色像は旋毛虫のそれと同じであった(Plate 11). これに対し, クチクラ内層, 体腔液(Plate 11,12,13,14)は, 反応の強さにこそ差はあるものの, 他の蠕虫症患者血清すべてと染色陽性を示した.

2)Avidin-Gold 法を用いた免疫染色法の結果

前述の方法で免疫染色をした結果を Table 2 にまとめた. 旋毛虫患者血清を用いた結果, クチクラについて観察すると, 内層は, 特異的 IgG 抗体と反応する場合は多いのに対し, 特異的 IgM 抗体では, 反応しないか, 反応しても非常に弱い染色結果であった. これとは反対の現象がクチクラ表面で見られ, 抗 IgG 抗体には, ほとんど陰性を示しているのに対し, 抗 IgM 抗体には全例陽性を示した(Plate 15,16). 食道腺の $\alpha 0$, $\alpha 1$ 顆粒では, 半数例が, IgG に反応しなかった(Plate 17)が, IgM には, 全例とも強く反応した(Plate 18). また, 食道内腔物, 中腸内腔物(midgut occupying substance; MOS), 中腸

Table 2. A summary of the class-specific antibodies against muscle larval antigens in sera of patients with *Trichinella* and non-*Trichinella* helminthiasis. Intensity of the immunostaining with avidin-gold is rated as positive(+), border line(\pm), negative(-)

Localization of antigenic substances		sera	Class of Ig										
			Trichinosis	Paragonimiasis	Fascioliasis	Severe trichuriasis	Moderate trichuriasis	Gnathostomiasis	Dirofiliariasis	Anisakiasis	Cysticercosis	Diphyllobothriasis	
Slow-Responding-Group	$\alpha 0, \alpha 1$	G	- ~ +	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
		M	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Stichocyte granule	$\alpha 2$	G	- ~ ±	-	-	±	-	-	-	-	-	-
			M	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		β	G	- ~ +	-	-	±	-	-	-	-	-	-
			M	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	EOS	G	+ ~ -	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		M	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Cuticle surface	G	- ~ +	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		M	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Rapid-Responding-Group	Cuticle inner layer	G	+	+	+	+	± ~ -	+	- ~ ±	+	±	-
			M	- ~ ±	-	-	±	-	-	-	-	-	-
Hypodermis		G	+	+	+	+	± ~ -	+	±	-	-	-	
		M	+ ~ -	-	-	±	-	-	-	-	-	-	
Hemolymph		G	+	+	+	+	± ~ -	+	-	±	±	±	
		M	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	
MOS&B. B.		G	- ~ +	+	+	+	-	+	-	±	-	-	
		M	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	

brush border においても同様に、IgG には殆ど反応しない場合があっても、IgM には常に陽性を示すという結果が得られた(Plate 17, 18)。一方、角皮下層や体腔液では、IgM には、ほとんど反応しないが(Plate 16, 18)、IgG には常に陽性を呈した(Plate 15, 17)。

本法でも他の蠕虫症患者血清との交差反応を検索したところ、クチクラ内層、角皮下層、体腔液は、実験に用いた多くの患者血清と陽性反応を呈し、非特異的抗原とみなされ、この交差反応は主に IgG 抗体が関与していた(Plate 19, 20, 21, 22)。また、特異抗原とされている、食道内腔物、食道腺 α 顆粒、クチクラ表面に対しては重症鞭虫症以外すべて、IgG、IgM とも特異抗体は検出されなかった。

考 察

旋毛虫は、多細胞性であり、多彩な抗原をその虫体内に含有する事は明白である。旋毛虫抗原の研究は、免疫診断用抗原の選択及び感染防御の標的抗原の同定を目的に活発になされている。その代表的なものは虫体と宿主細胞の相互作用の分析、虫体抗原の免疫転写分析(Western blotting)による抗原の分子量²⁸⁾ および等電点¹⁰⁾²⁹⁾³⁰⁾の決定、宿主が認識する抗原の局在部位の同定³¹⁾³²⁾³³⁾、排泄分泌抗原の免疫化学的分析³⁴⁾³⁵⁾等である。現在最も注目を浴びている旋毛虫幼虫抗原のひとつは食道腺顆粒である。旋毛虫の属する鞭虫科の特徴は長い食道に付随する食道腺を有する事であり旋毛虫幼虫も典型的な食道腺を持つ。食道腺は約 50 個の食道腺細胞の重層したものであり、その細胞質は食道腺顆粒と呼ばれる多数の外分泌顆粒を有する。旋毛虫の食道腺顆粒は形態が異なる 5 種類より成り、機能は不明であるが、顆粒成分はラット、ヒト等の感染中に抗原として認識される。また、その抗原性は、種特異性に富み、免疫診断用特異抗原として期待されているだけでなく、感染防御抗原としてもその重要性が認識されつつある。このような虫体内抗原に対して虫体より自らの生理的機能として虫体外部へ排泄される、いわゆる ES 抗原もまた種特異性、感染防御、更には発育段階に応じての特異的な抗原として注目され盛んに研究されてきた³²⁾。さらに、それが旋毛虫症の特異的な免疫診断の抗原として有用であるという報告もなされてきた⁶⁾³³⁾³⁷⁾。ES 抗原は、食道腺 α 顆粒に由来し³⁸⁾、消化管を経て体外に放出され、そして体表面に付着するため、クチクラの表面にはこれと同様の特異的な抗原があることが示されている³⁹⁾。これらの特異抗原を免疫診断に用いる為には、旋毛虫虫体から大量に分離しなければならぬ。そのためには、緒言で述べたように食道腺 α 顆粒

を homogenization と遠心分離により集め、更にアフィニティークロマトグラフィーでの精製、CTAB 処理によるクチクラ表面抗原のみの抽出、または ES 抗原を培養液中から集めるなど種々の方法があるが、残念ながらこれらのいずれの方法も、非特異的抗原の混入無しに、特異抗原のみを集めるということは、ほとんど不可能であると思われる。そこで、本研究では、この混入の問題を簡単な方法を使って回避できる可能性のある事が示唆された。それは、免疫血清学的診断法として、IgM クラスの抗旋毛虫抗体を検出することである。本研究では、旋毛虫幼虫切片に対し、一次抗体として被検患者血清を用い、二次抗体としてビオチン標識抗ヒト IgG 抗体、あるいはビオチン標識抗ヒト IgM 抗体を反応させ、Avidin-Gold を用いてそれぞれのクラスの抗体に反応する旋毛虫幼虫抗原の局在部位を同定した。これによると、旋毛虫症患者血清においては、特異抗原とされるクチクラ表面、食道腺顆粒 $\alpha 0$, $\alpha 1$, EOS は IgG とは反応する場合としない場合とがあるのに対し、IgM とは常に反応し、強い陽性所見を呈した。一方、非特異的抗原とされるクチクラ内層、角皮下層、体腔液は IgG に反応するが、IgM との反応は、非常に弱かった。旋毛虫症以外の蠕虫症の患者血清においても同様の検索を行うと、特異抗原に対しては、重症鞭虫症の一例を除けば、IgG、IgM とも特異抗体は検出されなかった。非特異的抗原に対しては、実験に供した総ての蠕虫症患者血清と交差反応を示すが、その交差反応は主に IgG 抗体によるものであった。それ故、旋毛虫症の為の免疫診断の検査系において、二次抗体として抗-IgM 抗体を用いたならば、旋毛虫の特異抗原と反応する IgM のみを検出することになり、非特異的抗原に対して、観察される交差反応も最小限に押えられると思われる。これとは反対に、IgM のかわりに IgG を検出する検査方法を用いたなら、特異抗原に対して産出された IgG 抗体を検出すると同時に、混在している非特異的抗原に対する IgG 抗体も検出されるため、バックグラウンドの高い検査結果に終わってしまう可能性もある。この様に、旋毛虫症の免疫診断において IgG より、IgM を検出する方が有利である事が、明白となった。

今回 IgM レベルの反応が弱かった原因の一つは、使った蠕虫症患者血清が発症からある程度の時期を経た慢性期のものであり、IgM レベルの反応が経過と共に既に低下しつつある時期のものと考えられる。もうひとつの原因には、蠕虫に共通の非特異的抗原は、一般的に IgM 抗体の産生を惹起しにくいとも思われる。何故なら、旋毛虫に感染したヒトやラットのいずれも感染初期ですら、旋毛虫の非特異的抗原に対して高いレベルでの IgM

抗体産生を呼び起こしていないからである⁴⁰⁾。免疫診断において、IgM 抗体を検出することの有用さは、以前にも報告されている。Auら⁴¹⁾は、ELISA 法において、抗原として、粗抗原を用い、IgM 抗体を検出することによって、旋毛虫症の確実で特異的な方法としたが、その機序に関しては論じておらず、本研究により IgM 抗体の検出により特異性向上の機序が示された。さらに IgM 抗体を検出することの有用性について論ずるなら、診断の特異性を上げるだけでなく、感染初期における false negative の結果を減じる事にもある。つまり特異抗原に対する IgM 抗体は、Fischer ラット血清中では、感染後 4 週前から出現する⁴²⁾。これは、IgG 抗体出現よりも 2 週早い。ヒト旋毛虫症では、同様の IgM から IgG へのクラスの切り替えが、感染後 45 日目頃には起こっていたものと思われる⁴³⁾。それ故、クラスの切り替えが行われる前に、IgM 特異抗体を検出することが、確実性を高めるだけでなく、早期診断にもつながると考えられる。一方、非特異的抗原を含むといわれているクチクラ内層、角皮下層、体腔液由来の抗原⁴³⁾はフォスフォリルコリンを含み⁴⁴⁾⁴⁵⁾、スクリーニングの目的の為に用いられるべきである。以上述べたように、多彩な抗原性をもつ旋毛虫の各々の抗原は、宿主の class-specific な抗体を様々な値で、また、様々な動きで引き起こすと言われている⁴¹⁾。それ故、いかなる抗体が、いかなる抗原に対し反応しているかを充分認識することが免疫診断を実施する上で非常に重要な事となる。

結 語

旋毛虫症における血清学的診断法の特異性を向上させるために、旋毛虫症および各種蠕虫症の患者血清中に検出される抗旋毛虫抗体を PAG 法および、Avidin-Gold 法を用いた免疫電顕法にて検索し、以下の結論を得た。

1) 旋毛虫患者血清が常に認識する抗原の局在部位は、クチクラ表面、クチクラ内層、角皮下層、食道腺顆粒 ($\alpha 0, \alpha 1$)、体腔液、食道内腔物、腸腺顆粒、中腸の brush border であった。

2) 上記のうち、クチクラ表面、食道腺顆粒、食道内腔物は、重症鞭虫症を除く他の蠕虫症患者血清とは反応せず、旋毛虫特異抗原の存在が示された。一方、クチクラ内層、角皮下層、体腔液は使用した多くの蠕虫症患者血清と反応したため、非特異的な抗原性を持つとみなされた。

3) 旋毛虫症患者血清の場合、旋毛虫特異抗原に対しては、IgM 抗体の方が IgG 抗体よりも反応が強く、これとは逆に非特異的抗原に対しては、IgG 抗体の方が IgM 抗

体よりも強い陽性染色像を呈した。

4) 他の蠕虫症患者血清の場合(重症鞭虫症を除く)、特異抗原に対する交差反応は、IgM, IgG とも観察されなかったが、非特異的抗原に対する抗体は、主に IgG であり IgM の反応は極めて弱いということが判明した。

以上の結果より旋毛虫症の免疫診断の特異性を向上させるための検査系としては、IgG よりも IgM の抗旋毛虫抗体を検出すれば、血清診断用の特異抗原に混入しているであろう微量の非特異的抗原の影響が最小限に押えられ、特異抗原に対する IgM 抗体の反応が検出され、免疫診断の特異性が高まるものと結論された。

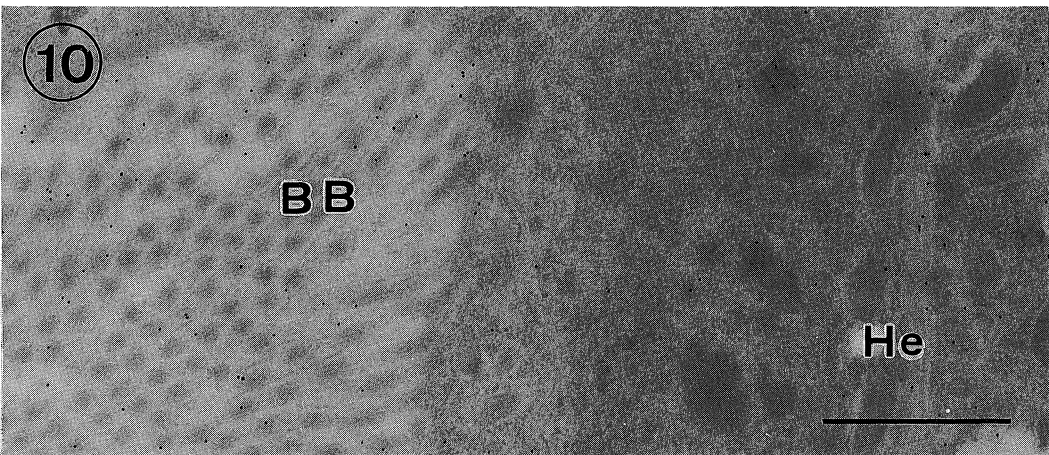
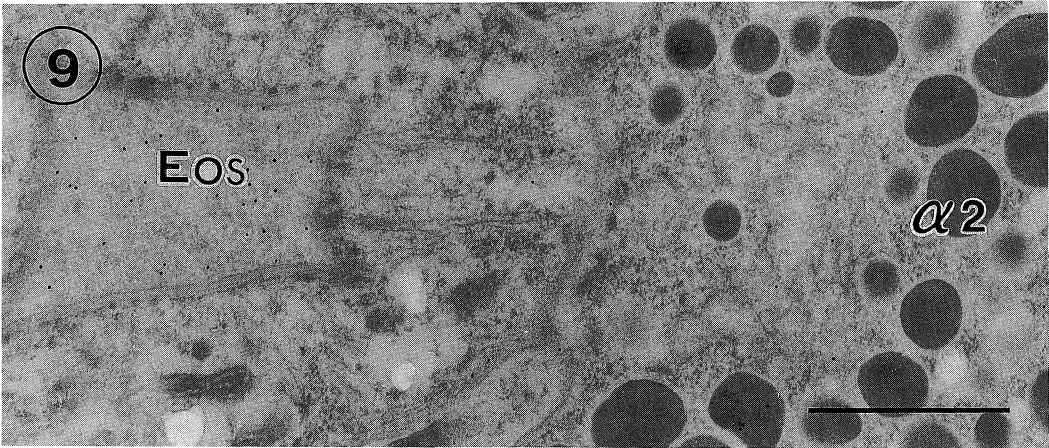
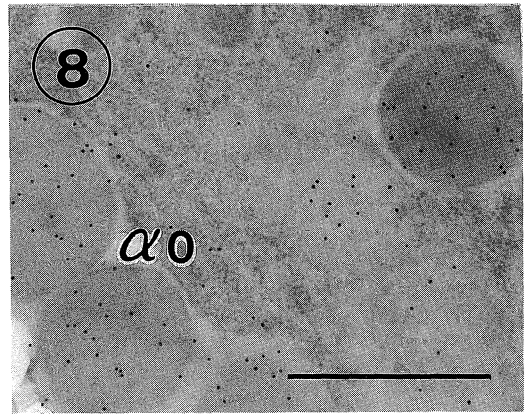
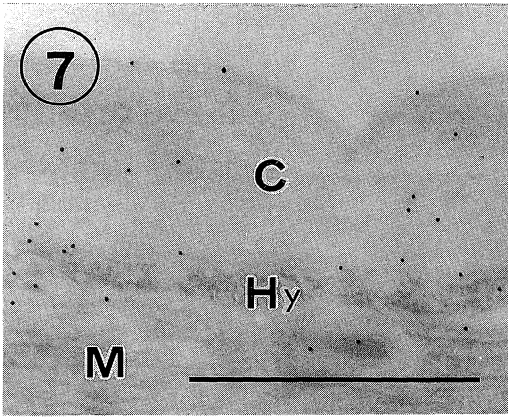
稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った恩師奈良県立医科大学寄生虫学教室荒木恒治教授に深甚なる謝意を表すと共に、御助言、御校閲を賜った細菌学教室榎葉周三教授、第 2 解剖学教室山本浩司教授に深謝致します。また、直接御指導戴きました高橋優三前助教授(現岐阜大学教授)さらに終始御協力下さった本学寄生虫学教室諸兄に感謝致します。

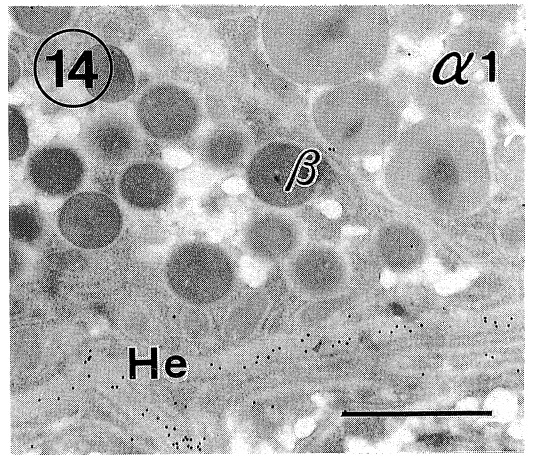
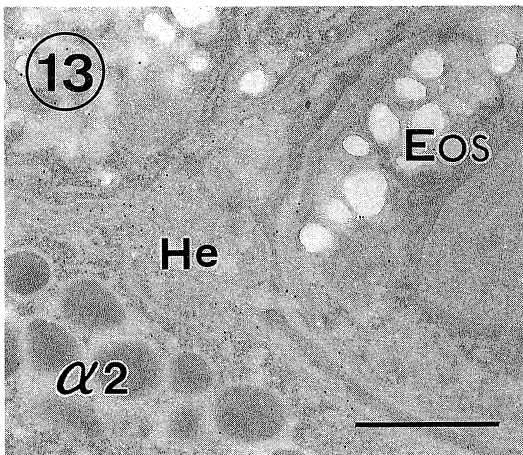
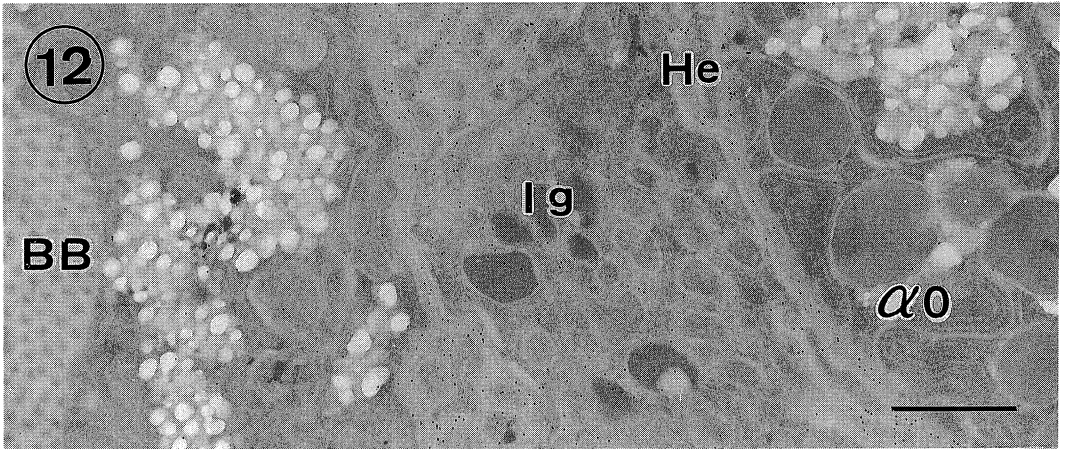
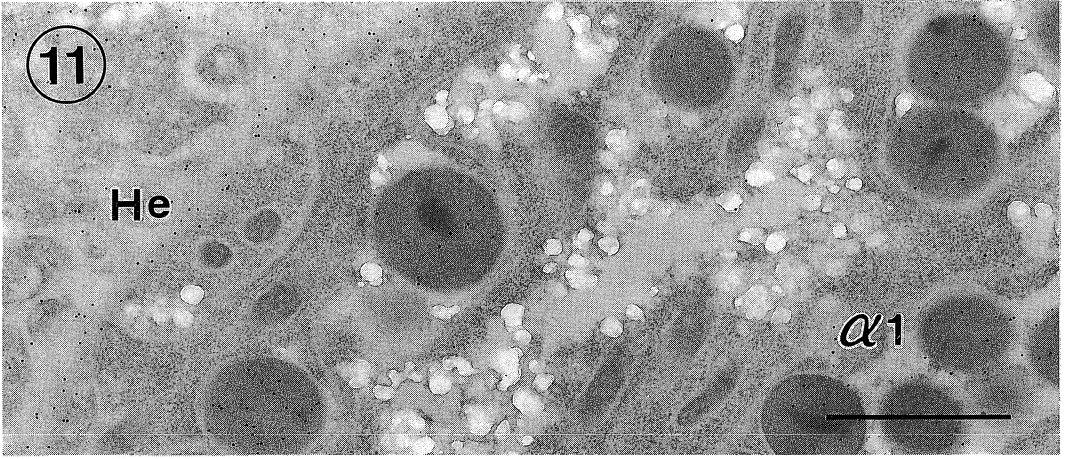
なお、本研究は文部省科学研究費一般研究 B(No. 02454173)の一部によって行われた。

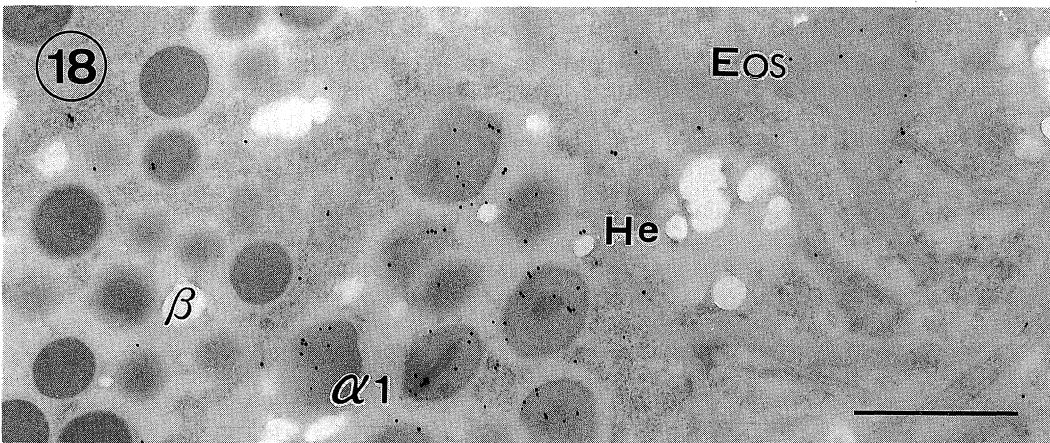
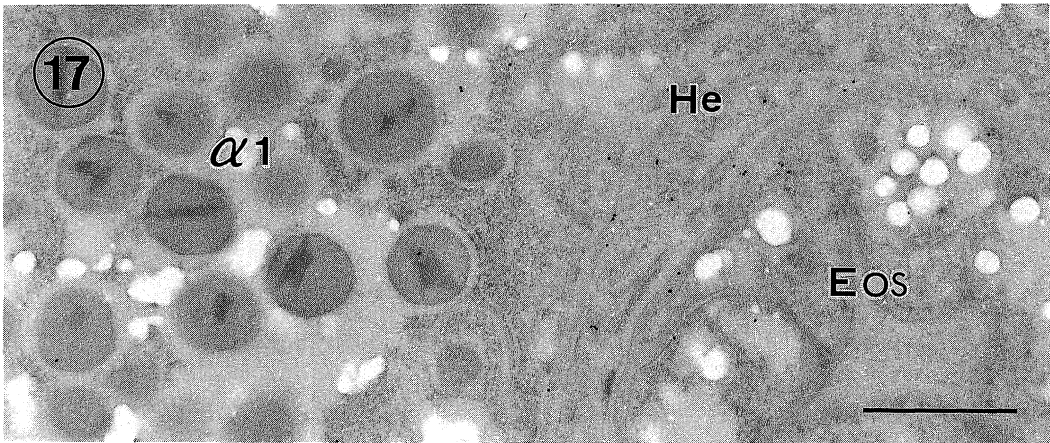
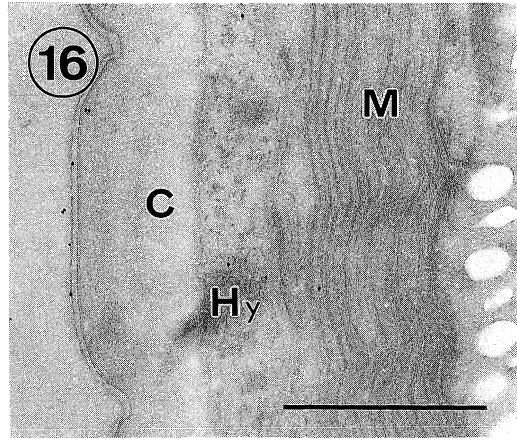
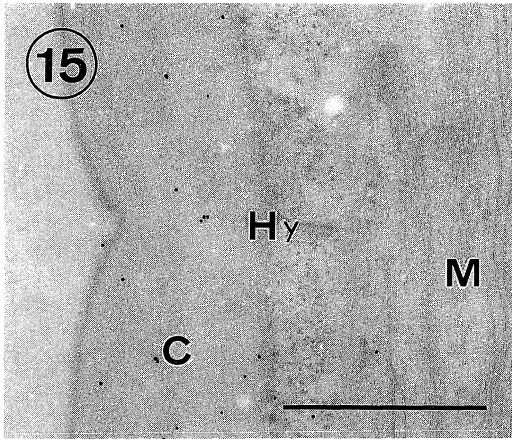
文 献

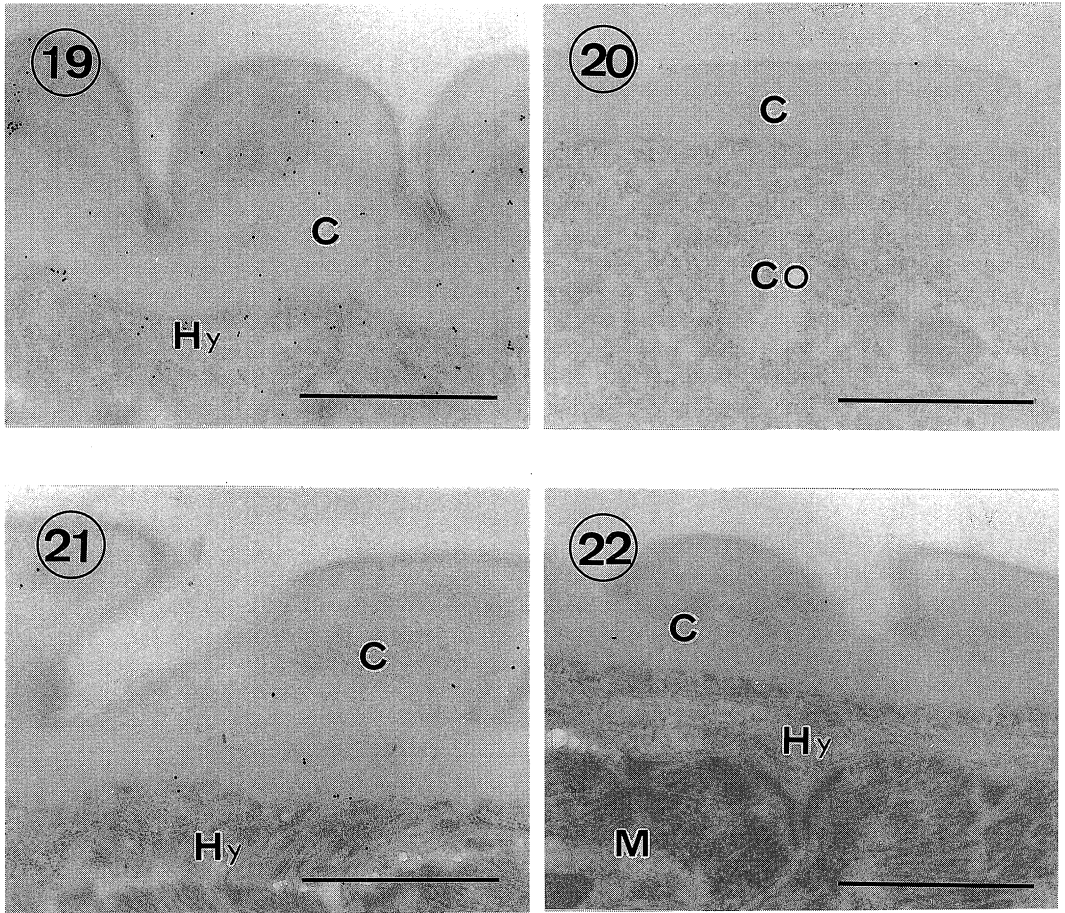
- 1) 山口富雄：寄生虫誌。24(2 補)：57, 1975.
- 2) 大淵宏道，遠藤尚和，山下純一，武藤純一，及川慶一，照井良彦：秋田農村医師会誌。21：30, 1975.
- 3) 山口富雄，高田伸弘，八木沢誠，小山内はるみ，稲葉孝志，黄文雄：寄生虫誌。24(増)：41, 1975.
- 4) 山口富雄，高田伸弘，八木沢誠，稲葉孝志，小山内はるみ，花田勝美，村山芳郎，佐々木義楼，後藤昭平，大淵宏道，遠藤尚和，照井良彦：日本医事新報 No. 2668：16, 1975.
- 5) 山口富雄：寄生虫誌。32(補)：82, 1983.
- 6) 小沢英輔，杉下和夫，横川宗雄，小林仁：寄生虫誌。29(増)：58, 1980.
- 7) 小沢英輔，杉下和夫，横川宗雄，小林仁：感染・炎症・免疫 11：233-240, 1981.
- 8) Takahashi, Y., Uno, T., Yamada, S., Nakajima, M. and Araki, T.: Exp. Parasitol. 68: 414-422, 1989.
- 9) Takahashi, Y., Mizuno, N., Uno, T., Aisaka, A. and Araki, T.: J. Parasitol. 76: 230-239, 1990.
- 10) Despommier, D. D. and Laccetti, A.: J. Parasitol. 67: 332-339, 1981.

- 11) Pritchard, D. I., Crawford, C. R., Duce, I. R. and Behnke, J. M. : *Parasit. Immunol.* 7 : 575-585, 1985.
- 12) Grecnis, R. K., Crawford, C., Pritchard, D. I., Behnke, J. M. and Wakelin, D. : *Parasit. Immunol.* 8 : 587, 1986.
- 13) Lim, P. L. and Choy, W. F. : *Immunology* 69 : 443-448, 1990.
- 14) Stroebel, H. : *Muench. Med. Wochenschr.* 58 : 672-674, 1911.
- 15) 山口富雄, 小山内はるみ, 吉田 忠 : *寄生虫誌* 25 (2 補) : 77, 1976.
- 16) Despommier, D. D., Muller, M., Jenks, B. and Fruitstone, M. : *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 23 : 41-44, 1974.
- 17) Bozicevich, J., Tobie, E., Thomas, E. H., Hoyem, H. H. and Ward, S. B. : *Public Health Report* 66 : 806-814, 1951.
- 18) Yamaguchi, T., Yagisawa, M., Inaba, T., Huang, W. H. and Isida, K. : *Program and Summary of Sino-Japanese Seminar on Parasitic Zoonoses 1982.* p117-124, 1982.
- 19) Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Takahashi, Y. and Araki, T. : *Jpn. J. Parasitol.* 42 : 128-129, 1993.
- 20) Despommier, D. D. : *Intext Educational Publishers.* New York, p239-254, 1974.
- 21) 西山利正, 森田 博, 瀬川武彦, 陳 維章, 八木純, 山田祥次, 高橋優三, 荒木恒治, 高山眞一, 越村 修 : *寄生虫誌* 33(5) : 467-473, 1984.
- 22) Slot, J. W. and Geuze, H. J. : *J. Cell Biol.* 38 : 87-93, 1985.
- 23) Tanaka, H., Haga, S., Takatsuki, K. and Yamaguchi, K. : *Cancer Res.* 44 : 3493, 1984.
- 24) Singer, S. T. : *Nature(lond)* 183 : 1523, 1959.
- 25) Nakane, P. K. and Pierce, G. B. : *J. Histochem. Cytochem.* 14 : 929, 1967.
- 26) Lindmark, R., Thoren-Tolling, K. and Sjoquist, J. : *J. Immuno. Meth.* 62 : 1-13, 1983.
- 27) Maizels, R. M., Mario, P. and Ogilvie, B. M. : *Immunol. Rev.* 61 : 109-136, 1982.
- 28) Herrera-Esparza, R., Rfo-Castaneda, A. D., Avalos-Diaz, E. and Herrera-Dioadado, R. M. : *Exp. Parasit.* 63 : 233, 1987.
- 29) Despommier, D. D. and Laccetti, A. : *Exp. Parasit.* 51 : 279-295, 1981.
- 30) Despommier, D. D. : *Parasite. Immunol.* 3 : 261-272, 1981.
- 31) Takahashi, Y., Uno, T., Nishiyama, T., Yamada, S. and Araki, T. : *J. Parasitol.* 74 : 270-274, 1988.
- 32) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Yagi, J. and Araki, T. : *Jpn. J. Parasitol.* 37 : 63-68, 1988.
- 33) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Wada, T. and Araki, T. : *J. Electron Microsc.* 39 : 155, 1990.
- 34) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. : *J. Immunol.* 132 : 898, 1984.
- 35) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. : *J. Parasitol.* 71 : 516, 1985.
- 36) Silberstein, D. S. : *in* *Antigens, Trichinella and Trichinosis* (Campbell, W. C., ed.). Plenum Press, New York and London, p309-334, 1983.
- 37) Mizuno, N., Takahashi, Y., Uno, T., Suzuki, H. and Araki, T. : *Jpn. J. Parasitol.* 40 : 260, 1991.
- 38) Despommier, D. D. and Muller, M. : *J. Parasitol* 62(5) : 775-785, 1976.
- 39) Parkhouse R. M. E., Philipp, M. and Ogilvie, B. M. : *Parasit. Immunol.* 3 : 339, 1981.
- 40) Capo, V., Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. : *J. Parasitol.* 72(6) : 931-938, 1986.
- 41) Au, A. C. S., Ko, R. C., Simon, J. W., Ridell, N. J., Wong, F. W. T. and Templer, M. J. : *Trans. Roy. Soci. Trop. Med. & Hyg.* 77 : 412-415, 1983.
- 42) 水野直人 : *奈医誌* 41 : 651-669, 1990.
- 43) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Tokuda, T., Shimazu, K. and Araki, T. : *J. Electron Microsc.* 40 : 136-142, 1991.
- 44) Takahashi, Y., Mizuno, N. and Araki, T. : *Jpn. J. Tropical Med. & Hyg.* 20 : 88, 1992.
- 45) Takahashi, Y., Wieger, H. and Pak, L. L. : *Amer. Soci. Parasit.* 79 : 604-609, 1993.









Explanation of plates

- Plate 1. Longitudinal section through the upper stichosome(St), including stichocyte $\alpha 2$ granules ($\alpha 2$), cuticle(C), hypodermis(Hy), muscle layer(M), and hemolymph(He),
- Plate 2. Longitudinal section through the midgut(Mg) and the genital primordium(Gp). C: cuticle
- Plate 3. Longitudinal section through the hindgut(Hg). C: cuticle
- Plate 4. Transverse section through the esophagus(E), cord(Co) and glycogen aggregates(G). C: cuticle, Hy: hypodermis, M: muscle layer, He: hemolymph
- Plate 5. Longitudinal section through the lower stichosome(St), including stichocyte $\alpha 1$ granules ($\alpha 1$) and stichocyte β granules(β).
- Plate 6. Longitudinal section through the intestinal gland(Ig) and the midgut(Mg). He: hemolymph, G: glycogen aggregates.

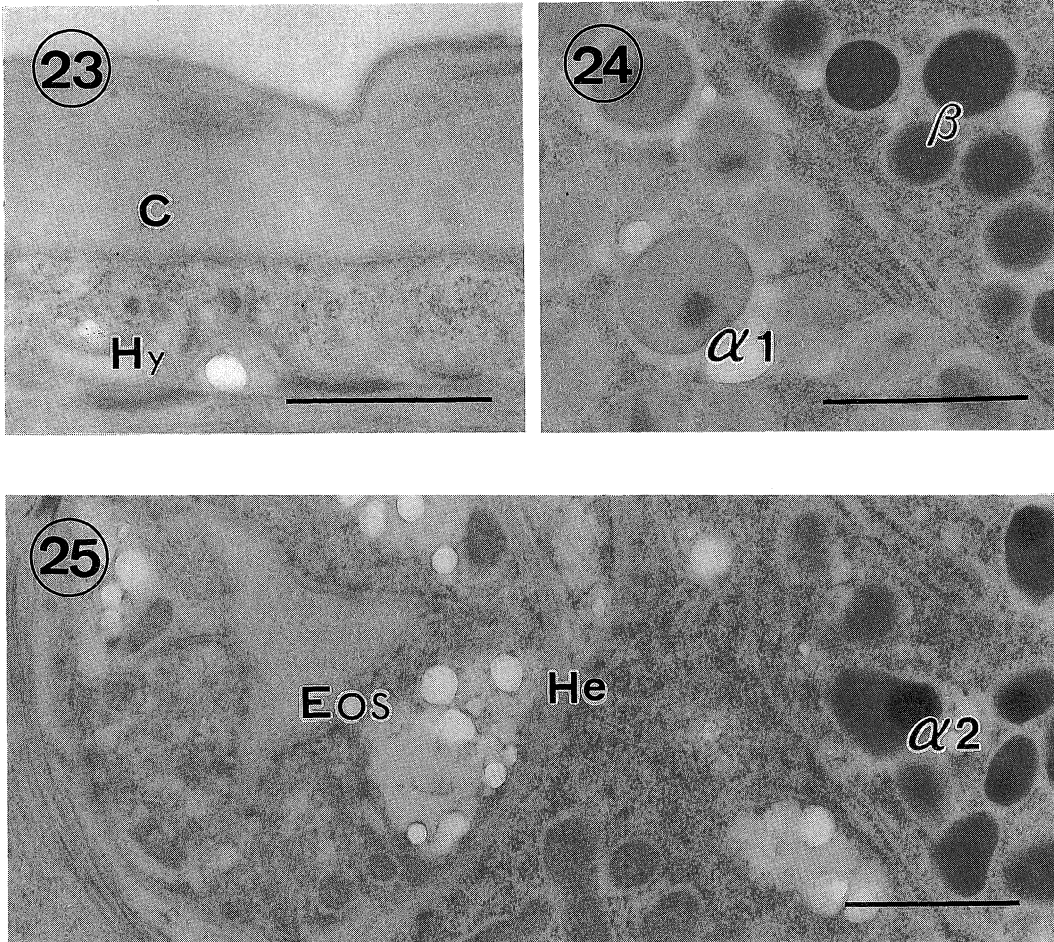


Plate 7. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Cuticle(C) surface and inner layer, hypodermis(Hy) are positive but muscle layer(M) is negative for immunostaining with sera from patients with trichinosis.

Plate 8. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Stichocyte $\alpha 0$ granules($\alpha 0$) are positive for immunostaining with sera from patients with trichinosis.

Plate 9. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Esophagus occupying substance (EOS) is positive but the esophagus cuticle and stichocyte $\alpha 2$ granules ($\alpha 2$) are negative for immunostaining with sera from patients with trichinosis.

Plate 10. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Brush border(BB) of the midgut and hemolymph(He) are positive for immunostaining with sera from patients with trichinosis.

Plate 11. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Stichocyte $\alpha 1$ granules($\alpha 1$) and hemolymph(He) are positive by immunostaining with serum from a patient with severe-trichuriasis.

- Plate 12. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Granules of the intestinal gland(Ig), Hemolymph(He) are positive but brush border(BB) of the midgut, stichocyte $\alpha 0$ granules($\alpha 0$) are negative by immunostaining with sera from patients with paragonimiasis.
- Plate 13. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Hemolymph (He) is positive but esophagus occupying substance (EOS) is negative by immunostaining with sera from patients with fascioliasis.
- Plate 14. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with protein A-gold method. Hemolymph (He) is positive but stichocyte $\alpha 1$ ($\alpha 1$) and β (β) granules are negative by immunostaining with sera from patients with fascioliasis.
- Plate 15. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Cuticle(C) inner layer is positive but surface is negative by immunostaining with IgG in trichinosis sera.
- Plate 16. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Cuticle(C) surface is positive but inner layer is negative by immunostaining with IgM in trichinosis sera.
- Plate 17. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Hemolymph (He) is positive but stichocyte $\alpha 1$ granules($\alpha 1$) and esophagus occupying substance(EOS) are negative by immunostaining with IgG in trichinosis sera.
- Plate 18. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Stichocyte $\alpha 1$ granules($\alpha 1$) and esophagus occupying substance(EOS) are positive but hemolymph(He) is negative by immunostaining with IgM in trichinosis sera.
- Plate 19. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Cuticle(C) and hypodermis(Hy) are positive by immunostaining with IgG in severe-trichuriasis serum.
- Plate 20. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Cuticle(C) and cord(Co) are negative by immunostaining with IgM in severe-trichuriasis serum.
- Plate 21. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Cuticle(C) and hypodermis(Hy) are positive by immunostaining with IgG in anisakiasis sera.
- Plate 22. An immunoelectron micrograph of muscle larvae with avidin-gold method. Cuticle(C) and hypodermis(Hy) are negative by immunostaining with IgM in anisakiasis sera.
- Plate 23. Immunostaining by protein A-gold method using control sera from healthy infants. No effective staining is observed.
- Plate 24. Immunostaining by avidin-gold method using IgG in control sera from healthy infants. No effective staining is observed.
- Plate 25. Immunostaining by avidin-gold method using IgM in control sera from healthy infants. No effective staining is observed.