

旋毛虫の成虫抗原に関する研究

奈良県立医科大学寄生虫学教室

鈴木秀和

STUDIES ON *TRICHINELLA SPIRALIS* ADULT ANTIGENS

HIDEKAZU SUZUKI

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received September 30, 1992

Summary: A zoonotic nematode, *Trichinella spiralis*, has three distinct developmental stages including muscle larva, adult, and newborn larva. The aim of this study was to define antigenic substances in adult worms of the parasite, and to assess specificity of the antigens by means of immunoelectron microscopy, which would be essential not only for developing better immunodiagnostic antigen but also for understanding of the basic issue of protective immunity. The methods included: 1) preparation of adult worms for ultrathin sections; 2) immunostaining with sera from patients with trichinosis to localize antigenic substances in adult worms; 3) immunostaining with sera from other parasite infections to assess specificity of the antigens; and 4) observation under an electron microscope. Control experiments were performed to confirm specificity by immunostaining.

Subcellular structures that were positive by immunostaining with patients' sera included hypodermis, hemolymph, hypodermal gland, brush border, intersperm substances, exocrine granules of male genital tract, microvilli of ova and fetus cytoplasm. Cuticle inner layers were weakly positive.

The surface of cuticle and stichocyte granules were negative by immunostaining. The class of the corresponding immunoglobulin was predominantly G. These adult antigens were devoid of prominent species specificity because the above-mentioned structures were more or less immunostained by sera from other helminthiasis patients including paragonimiasis, cysticercosis, fascioliasis, trichuriasis, dirofilariasis and anisakiasis.

Index Terms

Trichinella spiralis, adult worms, immunodiagnosis, protective immunity, electron microscopy

緒 言

旋毛虫(*Trichinella spiralis*)は、成虫の体長が雄で1.4~1.6 mm、雌で2~4 mm、幼虫の体長が雌雄共0.8~1.0 mmの小さな線虫であるが、ヒトには旋毛虫に汚染された食肉を経口摂取することにより感染し旋毛虫症(trichinosis)を惹起し、全身に様々な症状を呈する。ことにその急性期においては、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。もともと旋毛虫症は、欧米地域においてその発生の中心をみる重大な人畜共通感染症とされていたが、1974年に青森県下において、わが国では最初のヒト旋毛虫症の集団発生が山口¹⁾によって確認されて以来、1980年には北海道で、1982年には三重県下での集団発生が報告されており、我が国においても無縁の疾患ではないことが明白となった。以上3回の集団発生は、いずれの場合もクマ肉の生食に

よるものと考えられているが、近年の食生活の多様化や、輸入食肉の増加に伴い、今後わが国においても、旋毛虫に対する新たな対応が必要である。とくに早期に疾病を発見するための診断法を確立することは临床上のみならず食品衛生上も重要である。一般に、寄生虫における蠕虫感染症を診断する場合、虫体や虫卵を直接検出することが確実な方法といえるが、旋毛虫は胎生(larviparous)であるため虫卵は産出されない。さらに旋毛虫の成虫虫体を糞便ないしは十二指腸液より検出することは極めて困難である。故に、旋毛虫症の診断で最も確実な方法は、筋生検により幼虫を証明する事となる。しかしながら、上述の3回の集団発生で記録された旋毛虫症症例の合計は87例であるが、そのうち筋生検により実際に虫体が証明されたのは、わずかに北海道の症例の1例にすぎず²⁾、また筋生検を施行し診断するにあたり0.5~1.0g程度の検体を必要とする。この筋肉量は実際問題として、かなりの大量であり通常の穿刺針でこれだけの量を人体から得ることは臨床実務上困難がある。従って旋毛虫症においては、補助診断としての免疫血清学的診断法がきわめて重要な位置を占めることになる。その免疫血清学的診断法の確立のためには宿主が認識する抗原についての詳細な検索が必要である。また、そのような抗原に関する知見は、以下に述べる如く感染防御機序の解明にも必要なものである。

Ooi⁴⁾およびウイ⁵⁾は旋毛虫再感染の抵抗性について検討し、マウスに旋毛虫幼虫を経口感染させ、感染後14日及び42日後さらに200匹を再感染させたところ、再感染に対してマウスの腸内から、ほとんどの成虫が排除される事を示した。また再感染時には腸粘膜に多数の肥満細胞が出現し、成虫の排除に関与することを示唆した。また是永⁶⁾は旋毛虫感染ラットにおいて、感染防御免疫を誘導する胸管リンパ球の同定及び解析をおこない、旋毛虫感染3~4日後に胸管リンパに顕著なリンパ芽球の出現を確認した。さらに細胞移入によりこの時期のリンパ球集団のみが成虫を腸管から排除する免疫に関与することが判明し、次いで胸管リンパ細胞移入による免疫は成虫抗原に対して発現することが、直接成虫で、チャレンジする実験で明らかにされた。感染防御の出現には他に好酸球、肥満細胞が重要な役割を演じていると考えられているが、旋毛虫感染時にはこれらの細胞も腸管から虫体を排除する事に関与することが予想されている。

本研究においては人畜共通の病原寄生線虫である旋毛虫をもちい、成虫における抗原の局在部位を電子顕微鏡下において検索し、また、その抗原の特異性について検討した。また免疫染色の結果を、電子顕微鏡下において

観察するためには、虫体の形態を電子顕微鏡レベルにおいて理解する必要があるので、本研究においては、旋毛虫成虫形態を電子顕微鏡下において詳細に観察した。

材料及び方法

1. 旋毛虫成虫の採集

本研究では弘前大学医学部寄生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。

感染後4週以上経過したICRマウスの筋肉を細かく砕き、Despommier⁷⁾らの方法に基づき、0.5%ペプシン(NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)/0.7%塩酸(NAKALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)中で37℃にて3時間消化した。消化後の反応液を網目の大きさが125 μ mの篩で濾し、円錐型容器に室温で30分放置し容器の底に沈んだ幼虫を集めた。採集した幼虫をリン酸衝化食塩水(Phosphate buffered saline, 以下PBS, pH 7.2)にて繰り返し洗浄した。この様にして採集した旋毛虫筋肉幼虫をICRマウスに300~600隻経口感染させ、感染後6日目にマウスの小腸の上部10~15cmを切開した後PBS中に1~2時間放置し遊出した成虫を採集した。尚、採集前日はマウスを絶食して腸内を空虚とし、腸内の残留物の混入を最小限に留めた。

2. 旋毛虫成虫組織の超薄切片の作製

上述のごとく採集した旋毛虫成虫を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ァイ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%および100%)で脱水後、LR White (London Resion 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。ついで酢酸ウラン・クエン酸鉛による二重染色を施行し、電子顕微鏡下における旋毛虫成虫形態観察に供した。また上述の方法によって作成した超薄切片を以下に述べる免疫染色に用いた。尚、観察にあたってはJEM 1200 EX電子顕微鏡を使用した。

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(4症例)を実験に供した。集団発生はツキノワグマの生食による発症と考えられ、実験に供した4症例の血清はすべてとも、ラテックス凝集反応試験(LA)、向流免疫電気泳動(CIE)、幼虫周囲沈降反応(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診断されたものである。

4. 各種蠕虫症患者血清

肺吸虫症患者血清(2症例), 脳有鉤囊虫症患者血清(2症例), 肝蛭症患者血清(2症例), 鞭虫症患者血清(2症例), アニサキス症患者血清(2症例), 犬糸状虫症患者血清(3症例), を本実験に供した。いずれも当教室において血清免疫学的検査を施行し, ゲル内沈降反応(Ouchterlony法)にて陽性所見が認められ, さらに, 臨床症状, 臨床経過, 及び臨床血液化学的検査等も考慮したうえで, 当該疾患と診断された患者の血清である。

5. 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 et al.⁹⁾の方法に基づいて作製した。即ち, 2%塩化金($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)溶液 1 ml 及び 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 15 nm の金コロイド溶液を得た。

2) プロテイン A-金コロイド複合体の作製

Tanaka らの方法¹⁰⁾に基づき PAG 溶液を作成した。即ち, 0.1 mg 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, 0.005 M 塩化ナトリウム溶液 0.1 ml を加えて溶解した。さらに金コロイド溶液 5 ml 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 0.15 ml 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を通した 0.05% PEG および 0.02% アジ化ナトリウム 5% グリセロール溶液 2.5 ml を入れ, その上に前述のプロテイン A-金コロイド混合液 5 ml を重層し 55,000 g, 4°C, 40 分遠沈した。(HITACHI 65 P, Hitachi Koki Co., Ltd. Tokyo, Japan) 次, 上清 6.5 ml を静かに除去し, 残りの 1 ml を沈殿物とよく混和した。これをプロテイン A-金複合体として, 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 (KUBOTA MICRO II KM 1100, KUBOTA SEISAKUSHO Co., Ltd. Tokyo, Japan) を用い, 8,000 g, 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-金コロイド複合体を用いた超薄切片の免疫電顕的観察 (Fig. 1)

上述のごとく作製した旋毛虫成虫組織の超薄切片に対し各種蠕虫症患者血清を 1% Egg-Albumin-PBS にて

300 倍希釈し, 室温で 30 分間反応させた。1% Egg-Albumin-PBS で洗浄後, プロテイン A-金コロイド複合体を室温で 30 分反応させた。1% Egg-Albumin-PBS 及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。(Fig. 1 Method C 参照)

4) ストレプトアビジン-金複合体の作製 (Fig. 1)

Tanaka et al.¹⁰⁾の方法に基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 (streptavidine, SIGMA, St. Louis, USA) 0.1 mg をプラスチックビーカー内で 5 mM 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 分間攪拌した。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 μm のフィルター (Minisart NML, Nihon Milipore Kogyo K. K., Yonezawa, Japan) で濾過後, 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 を重層し, 25,000 rpm (55,000 g) で 4°C にて 40 分間遠沈後, 上清液 6.5 ml を除去し, 残りの約 1 ml を 4°C 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 11,000 rpm 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。

5) ストレプトアビジン-金複合体を用いた超薄切片の免疫電顕的観察 (Fig. 1)

上述のごとく作製した旋毛虫成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を 1% BSA-PBS にて 1/200 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 (BIOTIN CONJUGATED. GOAT ANTI-HUMAN IgG ANTIBODY., TAGO INC. CA, USA), (Fig. 1, Method A 参照)。または, ビオチン標識抗ヒト IgM (BIOTIN CONJUGATED. GOAT ANTI-HUMAN IgM ANTIBODY., TAGO INC. CA, USA) (Fig. 1, Method B 参照)。を 1/200 に希釈したものを, 室温で 30 分間反応させた。その後切片を洗浄し, 4) の方法で得たストレプトアビジン-金複合体を室温で 30 分反応させた。さらに, 上記と同様に洗浄後酢酸ウラニールで電子染色し電顕観察に供した。

Method for post-embedding immunostaining

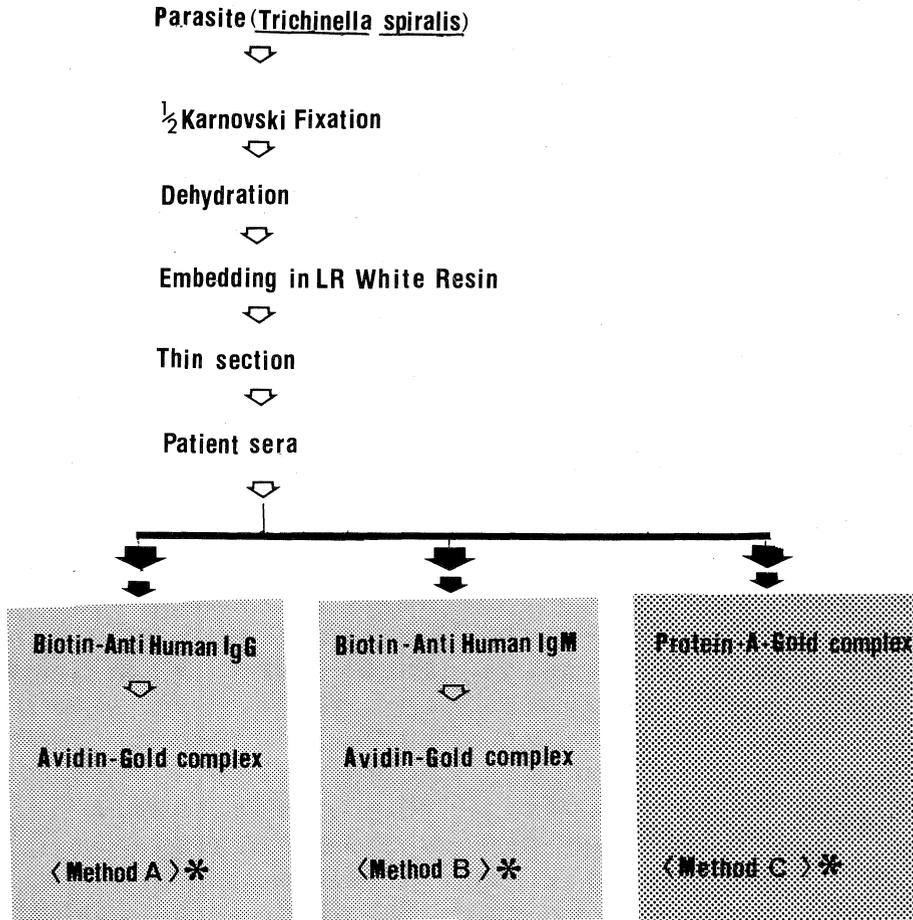


Fig. 1. Adult worms were fixed in half-strength karnovski fixative (a mixture of 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2), dehydrated in ascending concentrations of alcohol, and embedded in LR White resin (London Resin Company Ltd., United Kingdom). Ultrathin sections (80nm) were cut and used as a substrate for immunostaining. Postembedding immunostaining was performed at room temperature, allocating 30 min for each incubation. Sections were incubated with sera diluted at 1 : 200 in phosphate-buffered saline (pH 7.2) with 1% albumin. After washing 3 times, sections were treated with biotin-tagged anti-rat IgG antibody to detect G-class-specific antibodies (Method A), or with biotin-tagged anti-rat IgM antibody to detect M-class-specific antibodies. After antibody labeling, sections were washed and treated with avidin-colloidal gold complex. Method C in a method to detect human IgG by means of protein A-gold complex. After immunostaining the sections were stained with saturated uranyl acetate solution in 50% alcohol for better visualization by electron microscopy.

結 果

1. 旋毛虫成虫の虫体構造

免疫染色を行った電子顕微鏡写真を検討するためには、旋毛虫の虫体構造を電子顕微鏡レベルで観察する必要がある。そこでまず、旋毛虫成虫の虫体構造を検討した。旋毛虫成虫虫体構造の模式図を Fig. 2 に示す。

実体顕微鏡下における観察では、外表は半透明であり、虫体は長い円筒型で両端部が細くなっている。雌雄を比べると、雌は雄よりも大きいことが特徴である。⁹⁾

電子顕微鏡下において観察すると、雌雄とも虫体の体壁(body wall)は角皮(cuticle)、角皮下層(hypodermis)および筋肉層(muscle layer)からなっている。角皮は、細胞外物質であり、虫体の最も外側の表面を覆い、虫体の外部刺激からの保護と虫体成分の漏出防止に役立っていると考えられている。角皮下には、角皮下腺(hypodermal gland)がみられる。筋肉層(muscle layer)の内側は体腔(body cavity)であるが、旋毛虫の体腔は、中胚葉性の覆いがないので、擬体腔(pseudocoelum)と考えられる。擬体腔の中には体腔液(hemolymph)が充満している。体腔液によって虫体器官である、食道(esophagus)、中腸(midgut)等の消化管や雌雄の生殖器官が取り囲まれている。即ち、体腔液はヒトの血液、リンパ液に相当するものと考えられている。

雌雄とも、虫体前半部には、食道(esophagus)及びそれを取り囲む食道腺(stichosome)がある。食道は虫体の前半より始まり食道腺に取り囲まれつつ下降し中腸に至る。電顕的に、食道腺は分節構造を示し、体壁との間に広い隙間がみられた。また、食道腺には食道腺果粒がみられる。食道腺は食道腺細胞が重層してできたものであり、隣接する細胞間隙ははっきりと認識でき、一部細胞質同士が融合し合胞体を形成していると思われる。また、成虫の食道腺には著明な segmentation がみられる。食道腺には、丸くよく発達した仁をもつ明瞭な核があり、細胞質には非常によく発達した粗面小胞体と果粒によって満たされている。ミトコンドリアは散在するが、その他の細胞内小器官は殆ど目立たない。グリコーゲン果粒は殆どみられず、脂肪滴も非常に少ない。果粒は幼虫と同じく canalicular tree に隣接して群集するのがしばしば観察される。果粒は単位膜に囲まれ、電子密度中等度の物質から成り、果粒内結晶は見られない。大きさは大小不同であり最大径は約 750 nm である。成虫の食道腺果粒は機能的、および抗原的に異なる二型(I型, II型)に分けられる。¹¹⁾

食道腺は下降してやがて中腸に至る。旋毛虫成虫の中

腸は一層の上皮からなり、中腸全体が基底膜に取り囲まれ体腔液の中に浮遊して存在する。中腸の上皮には brush border が存在する。

旋毛虫成虫の虫体後半部は、雌雄とも生殖器(genital organ)がその大部分を占める。雌成虫においては、すなわち子宮(uterus)及び受精嚢(seminal receptacle)、卵巣(ovary)によって占められる。子宮は虫体後半より口側に向い細い管状のくだとなって伸びる。途中、食道及び食道腺と平行して走行し、やがて体壁に陰(vagina)となって開口する。子宮は子宮壁に覆われる。受精嚢の中には、精子(sperm)と胎芽(embryo)がみられる。体腔中には、数々の発育段階の卵細胞が存在する。卵細胞の表面には微絨毛(microvilli)が存在する。子宮内には、多数の胎児(fetus)がみられる。陰に近いほど分化の進んだ胎児が存在する。幼若な胎児は卵膜(embryo sheath)によって覆われ、陰に近い所に存在する完成まじかの胎児は、幼虫と同じくクチクラに覆われる。やがて胎児は、新生幼虫(newborn larva)として産出される。

雄成虫においては、生殖器は一本の細管構造であり、一層の基底膜に覆われている。その外側には収縮筋、内側には rachis と呼ばれる支持細胞と、数々の発育段階の生殖細胞からなる。生殖細胞は精巣の遠位端ほど、未熟であるとともに、基底膜に近いほど同じく未熟である。成熟するにつれて、生殖細胞は、より近位端および管腔の内側へ移動する。完成された精子は、管腔を通り精嚢及び射精管へと移動する。精子は幾つかの特徴的な段階を至て、形成される。すなわち、未熟な精子ほど細胞質に空胞が少なく、核の凝集が少ない。逆に成熟した精子には、核膜の凝集が認められ、細胞質周辺にカップ型の空胞が多く出現するという特徴がある。また、雄の生殖器の上皮細胞には細胞質果粒が存在する。

2. 旋毛虫成虫の抗原局在部位

Table 1 にストレプトアビピン-金複合体を用い免疫電顕的観察により得た旋毛虫成虫の抗原局在部位を示す。Gクラス抗体が認識する抗原(ビオチン標識抗ヒト IgG を二次抗体として使用)と Mクラス抗体が認識する抗原(ビオチン標識抗ヒト IgM を二次抗体として使用)、それぞれに区分し表に整理した。それによると、Gクラス抗体が認識する抗原局在部位は、角皮下層(Plate 1, 2, 9)、皮下腺(Plate 2)、ヘモリンフ(Plate 9)、中腸の brush border(Plate 3)、卵子微絨毛、卵膜(Plate 4, 6, 7)、胎児細胞質(Plate 6)、精子間物質(Plate 5)、精子のカップ型膜構造、精嚢上皮の細胞質果粒(Plate 5)、はじめ全身各所に及んだ。それらのうちにおいても、とくに免疫染色強陽性を呈した部位は、雌の虫体の生殖器管においては、

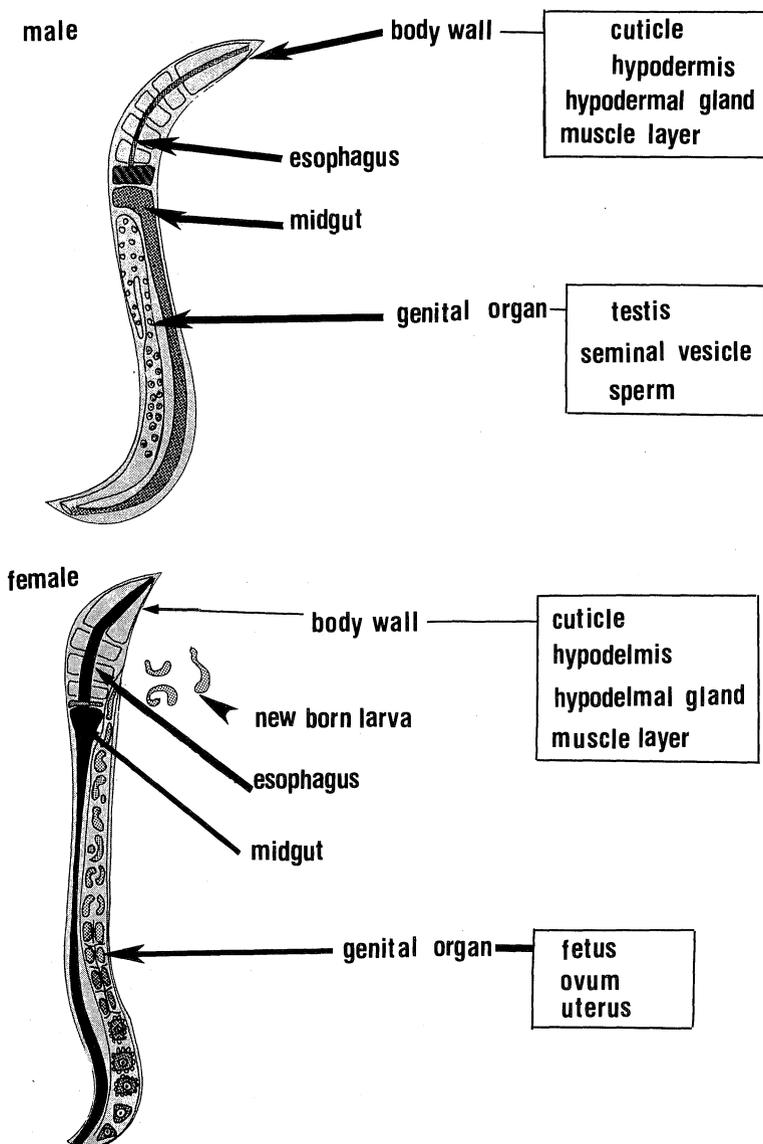


Fig. 2. Longitudinal views of adult worms of *Trichinella spiralis* are reconstructed for orientation purposes from many electron micrographs. The body wall in consisted of cuticle, hypodermis and hypodermal glands. The stichosome is a prominent exocrine organ which occupies anterior one third of the worm. The adults have two kinds of stichocyte granules. The posterior two thirds of the male adult was occupied by the reproductive organs, including the testis and the seminal vesicle. Both were long tubular structures folded in two near the ampular portion of the midgut and running parallel to each other with numerous sperms inside the tube. The vagina was a fine tubular structure running longitudinally between the body wall and the stichosome. It began from the uterus and ended at the vaginal opening. The uterus was a huge organ occupying two thirds of the bodylength. The digestive organ in composed of the esophagus, midgut and hindgut which run longitudinally from the mouth to the anus.

Table 1. A summary of the immunostaining of adult worms of *T. spiralis*. Anatomical structures of *T. spiralis*, results of immunostaining and corresponding class of immunoglobulins were shown. (+) indicates positive staining and (-) indicates negative staining

Anatomical structure	Class of Ig	Immunostain
Inner layers of body cuticle	G	±
	M	-
Surface of body cuticle	G	-
	M	-
Hypodermis	G	+
	M	-
Hypodermal gland	G	+
	M	-
Hemolymph	G	+
	M	-
Muscle fibers	G	-
	M	-
Stichocyte granules	G	-
	M	-
Brush border of the midgut	G	+
	M	-
Microvilli of ovum	G	+
	M	-
Embryo sheath	G	+
	M	-
Embryo cytoplasm	G	+
	M	-
Intersperm space	G	+
	M	-
Cupshaped structures of sperm	G	+
	M	-
Exocrine granules of the male genital tract	G	+
	M	-

胎児の卵膜、卵子微絨毛、雄の生殖器官においては、精囊上皮の細胞質果粒である。クチクラ内層には弱い染色性が得られたが、旋毛虫成虫の最外層を形成するクチクラ表面は、ほとんど反応せず、旋毛虫症患者が認識する抗原物質が、極めて少ない事が判明した。また、二つの型の食道腺果粒にも染色性がみられなかった(Plate 8)、同じく、細胞核、筋繊維等についても免疫染色陰性であった。

次に、ビオチン標識抗ヒト IgM を用いた場合、M クラス抗体が認識する抗原局在部位については結果として、上述したビオチン標識抗ヒト IgG と異なり、金ストレプト-アビジン複合体に染色される部位は旋毛虫成虫全身各所を通じほとんど存在しなかった。なお、対照として正常幼少ヒト血清を一次抗体として、実験に供し、ビオチン標識抗ヒト IgG およびビオチン標識抗ヒト IgM を二次抗体として用い、同様の方法で、免疫染色したもの

Table 2. A summary of cross reactivity of adult antigens with the other helminth. Adult worms were immunostained with sera from helminthiasis patients including 1) paragonimiasis, 2) cysticercosis, 3) fascioliasis, 4) trichuriasis, 5) dirofilariasis and 6) anisakiasis to detect cross reactive antigens. The immunostaining intensity is rated as positive(+), negative (-), predominantly positive but sometimes negative (+/-), or predominantly negative but sometimes positive(-/+)

Location of antigens	Immunostaining results					
	parago-nimiasis	Cysti-cercosis	Fascio-liasis	Trichu-riasis	Dirofila-riasis	Anisa-kiasis
* Cuticle inner layers	-	-/+	-/+	-	-	-
* Hypodermis	-/+	+	+	+	+	+
* Hypodermal gland	+	+	+	+	+	+
* Hemolymph	-/+	+	+	-/+	-	+
* Brush border of the midgut	+/-	-/+	+	+/-	-/+	-
* Microvilli of ovum	+	+	+	+	+	+
* Embryo sheath	+	+	+	+	+/-	+
* Intersperm space of sperm	+	+	+	+	+	+
* Granules of the male genital tract	+	+	-/+	-/+	-	+

については、いずれの場合も染色されなかった。

3. 旋毛虫成虫抗原の特異性の検討

Table 2 に結果を示す。各種蠕虫症患者血清(肺吸虫症、有鉤囊虫症、肝蛭症、鞭虫症、犬糸状虫症、アニサキス症、の7種類の疾患血清)と、成虫切片を反応させた。これにより旋毛虫症以外の各種蠕虫感染症との交差反応の有無を確認し、旋毛虫成虫抗原の特異性を検討した。旋毛虫成虫における抗原の局在部位とそれに対応する抗体がGクラスであることが判明しているため、交差抗原として本実験で注目したのはTable 2 に示すものであり、交差抗体として検出したのはGクラスのみである。

脳有鉤囊虫症患者血清による免疫染色結果を、Plate 10 および 14 に示す。Plate 10 においては、角皮下腺、角皮下層が免疫染色陽性であることを示す。また、Plate 14 において、卵膜が免疫染色に強い陽性所見を示しているのが確認できた。肝蛭症患者血清による結果は、Plate 11 および 13 に示した。即ち、角皮下腺、角皮下層、体腔液、卵子微絨毛等が陽性像を示した。また、肺吸虫症患者血清による結果を、Plate 12 に、鞭虫症患者血清による結果を、Plate 15 に示した。

総括すると、クチクラ内層については、脳有鉤囊虫症患者血清が弱く反応を示すのみで、それ以外の患者血清では免疫染色されず交差抗原の存在が確認できなかった。虫体の体壁に存在する皮下腺の膜構造(Plate 10,11), 幼若卵子の周囲に存在する卵子微絨毛(Plate 13), 隣接する精子細胞の間を埋める精子間物質らは、いずれの血清とも常に交差反応を示した。その他、クチクラを裏打ちする角皮下層(Plate 10,11), 擬体腔を埋める体腔液(Plate 12,13,15), 胎児の表面に存在する卵膜(Plate 14), 雄生殖器官の精囊上皮細胞質果粒(Plate 12)も、一部の例外を除き交差反応を示した。中腸の brush border は、交差反応の程度が少なかった。

考 察

本論文により旋毛虫成虫における旋毛虫症患者が認識する抗原の局在部位が、電顕レベルで明らかにされた。すなわち、成虫を構成する成分で抗原となり得るものの存在場所が解明できた。従来、抗原の研究は抗原分子の分子量や等電点の検索に力点を置いておこなわれてきたため、本実験のごとく抗原の局在部位に関する報告はあまり例をみないが、このような知見は、免疫診断用の抗原の検定ならびに採取、感染防御機序を免疫学的に解明するのに貴重な知見となり得るものと思われる。

その抗原の局在部位は Table 2 に示すごとく成虫の多岐の構造にわたっている事が本実験により判明した。免疫染色陽性は二次抗体として抗 IgG を用いた時のみに得られ、抗 IgM を用いた時には得られないので、Table 2 に示す抗原に対応する抗体は IgG であり、IgM クラスの抗体は関与していないものと思われる。感染ラットが認識する成虫抗原の局在部位については、既に奥田等¹²⁾により発表されているが、本論文と類似の所見が得られている。その故、ラットは今後旋毛虫症の免疫学的実験モデルとしての使用が可能であろう。ただひとつ両者の結果の異なる点はヒト患者血清では、成虫の食道腺果粒が、免疫染色されなかったことである。これがヒトでは、抗原として認識されなかったためなのか、または、採血の時期にはすでに抗体価が下がっていたためなのかは、今後の研究課題であろう。幼虫の場合、食道腺果粒抗原が、最も強い抗原物質であり、また種特異性に富み感染免疫を惹起するので、特に注目され、当教室において研究されてきたが¹³⁾¹⁴⁾、成虫に成長してから食道腺果粒が、本論文に示すごとく抗原性を低下させる事は、食道腺果粒の機能を考察する上で興味深い。疾病を早期に発見し、適確な診断を得ることは、寄生虫症に限らずその後の治療を考慮するうえでも重要であると言える。

寄生虫疾患である旋毛虫症の確定診断は虫体を検出することであり、現在までのところその方法は、筋生検であるといえるが緒言において述べた通りその検出率は僅少であり、さらに、旋毛虫感染後全身の横紋筋組織に移行するまで1週ないし2週を要するため早期診断法としては実現性に乏しい。また虫体を多量に取りこんだ重症感染の場合はともかく、軽症の感染の場合は、更に検出は困難となる。特にヒトへの感染源となるブタ肉の旋毛虫の検査は食品衛生上重要であるが、数多くのブタ肉を生検で検査するには無理がある。従って本来は補助的診断法である免疫血清学的診断法が、旋毛虫症の場合極めて重要となり、時には診断的拠り所となり得る。

旋毛虫症における免疫血清学的診断の方法については現在までのところ多種多様な血清学的手法が試みられている。すなわち、補体結合反応¹⁵⁾ゲル内二重拡散法¹⁶⁾免疫電気泳動法、免疫電気向流法¹⁷⁾迅速凝塊反応¹⁸⁾ラテックス凝集反応¹⁹⁾などであるが、いずれの場合も特異性の高い優れた抗原を必要とする。旋毛虫の成虫は腸管に、幼虫は筋肉内に寄生するが、これは旋毛虫が同一の宿主に成虫と幼虫が寄生する特異な寄生虫であり、他の蠕虫に比して抗原の多様性があることを意味する。従って旋毛虫の免疫診断はこの点で他の寄生虫より難しくなる。従来、旋毛虫の免疫血清診断には、成虫より比較的採取が容易である幼虫が広く用いられており現在までのところ、幼虫を用いた抗原について、免疫診断用抗原の研究が進んでいる。例えばモノクローナル抗体を用いて旋毛虫幼虫の特異抗原の分離精製は、Gamble²⁰⁾ Homan²¹⁾ Niimura²²⁾ らによりおこなわれ、それぞれヒト旋毛虫症の免疫診断に有用な抗原として発表されている。当教室においては²³⁾²⁴⁾幼虫の抗原の特異性について検討し、クチクラ表面や食道腺の α 顆粒に種特異的な抗原局在を指摘した。Parkhouse^らは(1981)²⁵⁾虫体表面や食道腺、消化管に局在する抗原や幼虫の排泄分泌抗原(ES抗原; excretory-secretory antigen)は、旋毛虫に特異的な抗原であるとした。また、Silberstein and Despommier (1984, 1985)は、幼虫の排泄分泌抗原のうち、分子量 48 kDa および 50 ~ 55 kDa の物質が宿主に防御免疫能を惹起する性質があり、これらの物質は幼虫虫体表面、幼虫の食道腺、消化管に局在することを示した²⁶⁾²⁷⁾。

しかしながら現在のところ成虫抗原の免疫診断への応用については何らの発表がない。それ故に、本研究では、成虫抗原の特異性の検定をおこなった。本論文の結果の項に示すごとく、それによると成虫抗原のほとんどは、他の多種の蠕虫疾患患者の血清によって、程度の差こそあれ陽性に免疫染色される結果が得られ、旋毛虫に特異

的な抗原の存在が示されなかった。しかしそれ故、成虫抗原は、寄生虫症を広く検知するためのスクリーニング用抗原としての価値があると思われる。

旋毛虫の抗原局在部位の特徴的なことは、幼虫では特定の細胞小器官に抗原が局在しているが²⁸⁾、成虫においては、細胞質全体にびまん性に、抗原の局在部位がみられる事である。さらにこのような成虫抗原の局在の様式はフォスホリルコリンに対するモノクローナル抗体による染色に極めて類似するものである²⁹⁾。フォスホリルコリンは、蠕虫、原虫等、広い範囲の寄生虫種³⁰⁾³¹⁾のさまざまな生体成分と結合し、ハプテンとして、抗原性を得ることが知られている。そのため広い交差反応性を招来する原因となる。このことは成虫抗原が幼虫抗原と異なり、特異性を欠くという本論文における結果に一致する。

幼虫のES抗原は種特異性の高い抗原とされているが、これは虫体を培養液中で、インキュベートして得られるものであり³²⁾³³⁾、主に生殖器、消化管や食道腺由来の物質と思われる³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾。成虫のESを集めた場合は消化管物質及び食道腺及び生殖器からの分泌物が得られるはずであるが、成虫の消化管および雌雄の生殖器に交差反応性の強い抗原が検出されたことは、成虫のES抗原が種特異性を欠くということを示唆させる。事実、成虫のES抗原を用いて特異的免疫診断に成功したという報告は著者が知る限りない。

寄生虫、とりわけ吸虫(Trematoda)、条虫(Cestoidea)、線虫(Nematoda)、に大きく分類される蠕虫(Helminths)は一般に強い宿主特異性を示す。つまり、これらはごく限られた好適な宿主動物においてのみ発育や成熟が可能であり、非好適な宿主動物に寄生(あるいは侵入)できないか、したとしても早晩死滅してしまうか正常な発育ができない事を示している。この宿主特異性を決定する要因は多くの場合不明であるが、宿主内での寄生持続には、宿主の免疫機構からのがれる必要がある事とは言うまでもない。線虫の一種である旋毛虫は宿主特異性が少なく、ヒト、ブタ、イヌ、クマ、ネコ、ネズミ、イノシシ、ウサギ、等、ほぼすべての哺乳動物に感染する¹⁾。この事は宿主免疫が全く無効でなく、逆に宿主は旋毛虫虫体成分に対して抗体を産生し、再感染に対して強い防御反応を示す事となり得る。Crum(1977)³⁷⁾らは、その再感染に対する防御反応は免疫された血清、T細胞、mesenteric lymph node cell を動物に投与する事により移入可能としている。また、その機序については腸管より成虫を早期に排除する事、新生幼虫の数を減少させる事、生殖能力を障害する事、等を推定している。成虫を腸管より早期に排除する事について、是永

(1988)³⁸⁾は、旋毛虫感染後3~4日後に胸管リンパに出現するリンパ球が、この防御免疫に関与する事を示した。

最近、旋毛虫新生児の抗原性が注目されているが³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾、防御免疫の標的抗原については全く不明であった。本論文で用いた免疫電顕法で旋毛虫成熟胎児に関してヒトが認識する抗原の存在が確認できた。胎児の生長に重要な役を担う卵膜にも抗原性が陽性である事が確認できた。成虫体内にある抗原は防御免疫の標的抗原になりにくい、これが何らかの形で胎児の生成を阻害するならば、免疫された宿主が再感染した場合に観察される旋毛虫新生児の数減少という現象を説明することができる。また、新生児が宿主の肺循環に入った時に宿主免疫機序により殺虫される事が報告されている。⁴²⁾

好酸球は宿主特異性機構の一翼を担う重要な細胞として注目されている。⁴³⁾これは感染防御を介したものであり、リンパ球のほかに好酸球が重要な役割を演じていると考えられている。Yoshimura(1988)⁴⁴⁾らは、線虫類の一つである広東住血線虫(Angiostrongylus cantonensis)を用いて、好酸球が非固有宿主内での本線虫の殺滅に極めて重要な役割を果たしている事を指摘している。好酸球による排虫機序については様々な見解があるが、旋毛虫の新生児の場合、好酸球の主要塩基性蛋白により殺虫される事が知られている。⁴⁵⁾チャイニーズハムスターでの実験で、旋毛虫感染時における好酸球については腸粘膜内では感染5~7日目に、筋肉内では感染2週と5週後にピークが認められているが¹⁾、感染5~7日目は感染して成長した成虫が腸管から排除され始める時期であるので粘膜内で増加した好酸球は成虫排除に大きな役割を果たしていると思われる。成虫を免疫学的に排除する能力が宿主により異なる事が知られているので⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾、認識抗原を今後さらに色々な宿主毎に、検索する事が必要であろう。

好酸球遊走因子放出能を比較した実験によると、幼虫のES抗原が最も強く、成虫のES抗原が最も弱い事が指摘されている。⁵¹⁾

成虫のES抗原は抗原性が強い事が、本実験で示されたが、好酸球を介した感染防御には直接関与していない可能性がある。Schistosomulaの体表面に好酸球が抗体依存性に接着し、schistosomulaを殺虫する事が知られている。⁵²⁾旋毛虫成虫虫体表面には抗原性物質の存在が確認できなかった。これは幼虫表面が食道腺 α 果粒と抗原性を共有し種特異性が高く、なおかつ高い抗原性を呈示するのと好対称である。¹³⁾¹⁴⁾成虫表面にこのような抗原性を欠くことは成虫が宿主の抗体依存性細胞障害(ADCC)による、免疫攻撃から逃避するには、好都合であ

ると思われる。これは幼虫から成虫へと成長する過程で表面の抗原性をかえて宿主の免疫攻撃よりの、巧妙な逃避機構と思われる。

本研究により成虫の体腔液(hemolymph)にも強い抗原性が確認された。体腔液は線虫の偽体腔内の体液であり高等動物の血液とリンパ液の役割を担うものである。このような存在場所では宿主免疫攻撃の標的には成り得にくく、感染防御に関する役割は不明である。しかしながら体腔液の抗原性は交差反応性に富むので虫体が腸粘膜内で死亡し、遊出した体腔液が宿主の抗体産生を促進し、これが他の交差抗原と反応し、間接的に防御効果が生じている可能性がある。

以上のごとく本論文では、旋毛虫成虫における抗原物質の局在部位が示され、その抗原性の種特異性が検討された。旋毛虫成虫の強い抗原物質は主に、消化管、皮下腺と生殖器にみられES抗原の主成分と思われる。その抗原性は種特異性を欠くので、寄生虫症の免疫診断においてスクリーニング用抗原としての利用価値があるものと思われる。また抗原の存在場所により宿主の免疫の標的抗原の可能性について検討を行った。

結 語

人畜共通の病原寄生線虫である旋毛虫について、成虫における抗原の局在部位を、免疫電顕的に検索し、さらに、その抗原の特異性および感染防御への関与について検討し、以下の結論を得た。

(1)旋毛虫成虫において、ヒトが認識する抗原物質が存在すると考えられる部位は、角皮下層、皮下腺、体腔液、卵膜、精囊上皮の細胞質顆粒はじめ虫体の全身各所に及んだ。とくに雌雄の生殖器官においては、強い染色性がみられ、抗原物質が豊富に存在することが示唆された。

(2)以上の抗原に対応する抗体は、IgGクラスであり、IgMクラスの抗体の関与は少ないものと考えられた。

(3)旋毛虫成虫の最外層である角皮(クチクラ)表面やクチクラ内層においては、ヒトが認識する抗原物質は極めて少ないことが判明した。

(4)旋毛虫成虫の抗原の特異性を検討するため、旋毛虫症以外の各種蠕虫症患者血清と旋毛虫との交差反応の有無を検索し、旋毛虫成虫抗原の特異性を検討した。それによると、旋毛虫成虫抗原は、肺吸虫症、脳有鉤囊虫症、肝蛭症、鞭虫症、犬糸状虫症、アニサキス症の患者血清と交差反応を示した。交差反応を示さない種特異性を想定させる抗原の局在が、クチクラ内層に免疫電顕的に示された。

(5)旋毛虫胎児細胞質の抗原は、旋毛虫新生児が、肺へ

移行した時の防禦免疫の標的抗原になり得るものと思われる。

(6)幼虫から成虫へ成長するに従い体表面にヒトが認識できる抗原物質を欠く事は、宿主の防禦免疫から逃れる巧妙な術と思われる。

(7)旋毛虫成虫の抗原性の特徴は交差反応性に富む事である。それ故、ヘモリンフや卵膜など虫体内における抗原物質により惹起された抗体は交差反応により成虫への感染防禦効果を示す事ができる。

謝 辞

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、御指導、御校閲を賜りました細菌学教室、榎葉周三教授ならびに第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恩師高橋優三助教授、ならびに終始研究に御協力下さった本学寄生虫学教室諸兄に感謝致します。

本論文の要旨は第45回日本寄生虫学会西日本支部会(平成元年倉敷市にて開催)。第59回日本寄生虫学会(平成2年福岡市にて開催)。第46回日本寄生虫学会西日本支部会(平成2年松山市にて開催)。第49回日本電子顕微鏡学会(平成3年吹田市にて開催)。第61回日本寄生虫学会(平成4年三鷹市にて開催)の席上にて発表した。

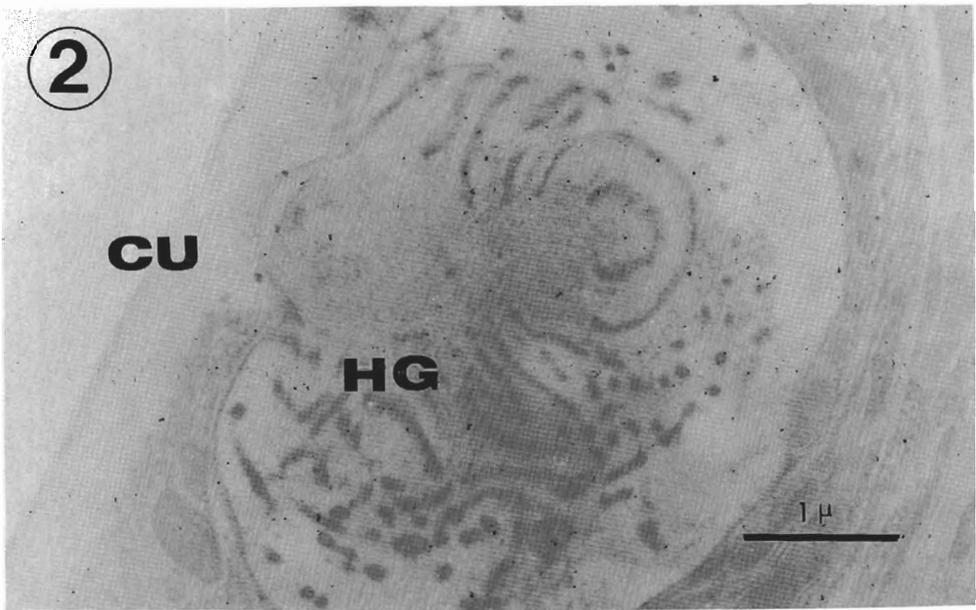
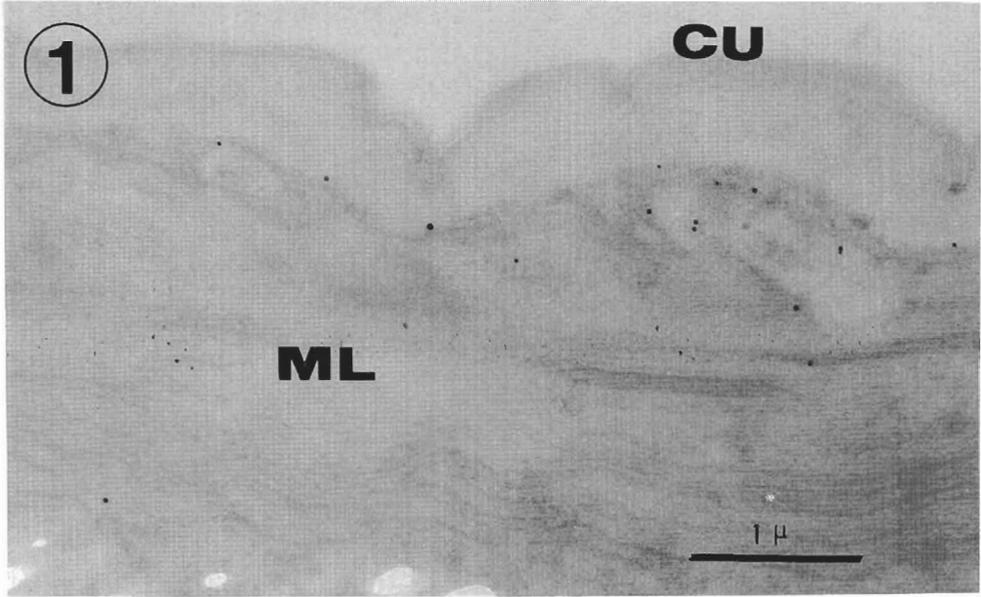
なお、本研究は文部省科学研究費一般研究B(No. 02454173)の一部によって行われた。

文 献

- 1) 山口富雄：日本における旋毛虫ならびに旋毛虫症。南山堂，東京，p 273-276, 1989.
- 2) 小沢英輔，杉下和夫，横川宗雄，小林 仁：寄生虫誌。29(増)：58, 1980.
- 3) 小沢英輔，中田邦也，横川宗彦，小林 仁：感染・炎症・免疫11：233-240, 1981.
- 4) Ooi, H. K., Kitaguchi, T., Kamiya, M. and Ohbayashi, M.: Proceedings of Sino-Japanese Symposium on Parasitic Zoonoses 1986. p 120-125, 1986.
- 5) ウイ ホンキエン，神谷政男，大林正士：寄生虫誌。36(1.補)：39, 1987.
- 6) 是永正敬：寄生虫誌。37(増)：30, 1988.
- 7) Despommier, D. D.: Intext Educational Publishers. New York, p 239-254, 1974.
- 8) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Tokuda, C. and Araki, T.: Jpn. J. Parasitol. 38:

- 285-289, 1989.
- 9) Slot, J. W. and Geuze, H. J. : J. Cell Biol. 38 : 87-93, 1985.
 - 10) Tanaka, H., Haga, S., Takatsuki, K. and Yamaguchi, K. : Cancer Res. 44 : 3493, 1984.
 - 11) Takahashi, Y., Mizuno, N., Shimazu, K. and Araki, T. : J. Parasitol. 78 : 518-523, 1992.
 - 12) 奥田浩継, 高橋優三, 水野直人, 鈴木秀和, 中島敏勝, 荒木恒治 : 寄生虫誌. 41 : 152, 1992.
 - 13) 高橋優三, 荒木恒治 : 遺伝 43 : 52-55, 1989.
 - 14) Takahashi, Y., Mizuno, N., Uno, T., Tokuda, C. and Araki, T. : J. Parasitol. 76 : 290-293, 1990.
 - 15) Stroebel, H. : Muench. Med. Wochenschr. 58 : 672-674, 1911.
 - 16) 山口富雄, 小山内はるみ, 吉田 忠 : 寄生虫誌. 25 : (2補)77, 1976.
 - 17) Despommier, D. D., Muller, M., Jenks, B. and Fruitstone, M. : Amer. J. Trop. Med. Hyg. 23 : 41-44, 1974.
 - 18) Bozicevich, J., Tobie, E., Thomas, E. H., Hoyem, H. H. and Ward, S. B. : Public Health Report. 66 : 806-814, 1951.
 - 19) Yamaguchi, T., Yagisawa, M., Inaba, T., Huang, W. H. and Isida, K. : Program and Summary of Sino-Japanese Seminar on Parasitic Zoonoses 1982. p 117-124, 1982.
 - 20) Gamble, H. R. and Graham, C. E. : Amer. J. Vet. Res. 45 : 67-74, 1984.
 - 21) Wieger, L. Homan, Anja, C. G. and Derksen, Frans van Knapen : Parasitol. Res. 78 : 112-119, 1992.
 - 22) Niimura, M., Kobayashi, M. and Kojima, S. : Parasitol. Res. 74 : 271-276, 1988.
 - 23) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Tokuda, C., Shimazu, K. and Araki, T. : J. Electron. Microsc. 40 : 136-142, 1991.
 - 24) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Yamada, S., Nakajima, M. and Araki, T. : Exp. Parasitol. 68 : 414-422, 1989.
 - 25) Parkhouse, R. M. E., Philipp, M. and Ogilvie, B. M. : Parasit. Immunol. 3 : 339, 1981.
 - 26) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. : J. Immunol. 132 : 898, 1984.
 - 27) Silberstein, D. S. and Despommier, D. D. : J. Parasitol. 71 : 516, 1985.
 - 28) Takahashi, Y., Uno, T., Furuki, J., Yamada, S. and Araki, T. : Parasitol. Res. 75 : 19-25, 1988.
 - 29) Takahashi, Y., Mizuno, N. and Araki, T. : Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 20 : 88, 1992.
 - 30) McWilliam, A. S., Stewart, G. A. and Allen, W. : Comparative Biochem. and Physiol. 85B : 627-633, 1986.
 - 31) Lai, R. B. and Ottensen, : Transaction of Royal Tropical Medicine and Hygiene 63 : 652-655, 1989.
 - 32) Berntzen, A. K. : Trichinellosis (Kim, C. W., ed.). Intext Educational Publishers, New York, p 25-30, 1974.
 - 33) Murrell, K. D., Vannier, W. E. and Ahmed, A. : Exp. Parasitol. 36 : 316-330, 1974.
 - 34) Hogarth-Scott, R. S. : Immunology 10 : 217-223, 1966.
 - 35) Oglvie, B. M., Maizels, R. M. and Philipp, M. : Fortschritte der Zoologie, Band 27, Zb 1. Bakt. Suppl. 12, Immune Reactions to Parasites. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York, p 113-116, 1982.
 - 36) Jackson, G. J. : J. infect. Dis. 105 : 97-117, 1959.
 - 37) Crum, E. D., Despommier, D. D. and McGregor, D. D. : Immunology 33 : 787, 1977.
 - 38) Kazura, J. W. and Grave, D. I. : Nature 274 : 588-589, 1978.
 - 39) Ching Hua Wang and Bell, R. G. : Parasite. Immunol. 9 : 465-475, 1987.
 - 40) Ching Hua Wang and Bell, R. G. : J. Parasitol. 74 : 880-882, 1988.
 - 41) Lee, T. D. G. and Befus, D. : J. Parasitol. 75 : 124-128, 1989.
 - 42) Binaghi, R. A. : in Trichinellosis. Proceeding of the 5th International Conference on trichinellosis, p 1-5 september 1980, Noordwijk aan Zee, The Netherlands. Edited by : Kim, C. W. : Ruitenber, E. J. : Teppema, J. S. Chertsey, Surry, UK ; Reed-books Ltd, 1981.
 - 43) Marti, H. P., Murrell, K. D. and Gamble, H. R. : Exp. Parasitol. 63 : 68-73, 1987.
 - 44) Yoshimura, K., Sugaya, H., Kawamura, K. and Kumagai, : Parasite. Immunol. 10 : 411-423, 1988.
 - 45) Wassom, D. L. and Gleich, G. J. : Amer. J. Trop. Med. Hyg. : 860-863, 1979.

- 46) **Bell, R. G., Adams, L. S. and Ogden, R. W.** :
Exp. Parasitol. 58 : 345-335, 1984.
- 47) **Wassom, D. L., Brooks, B. O., Cypess, R. H. and David, C. S.** : Exp. Parasitol. 55 : 153-158, 1983.
- 48) **Wassom, D. L., David, C. S. and Gleich, G. J.** :
Immunogenetics 9 : 491-496, 1979.
- 49) **Wakelin, D.** : Parasite. Immunol. 2 : 85-89, 1980.
- 50) **Bell, R. G., McGregor, D. D. and Adams, L. S.** :
Exp. Parasitol. 53 : 301-314, 1982.
- 51) **Bartermez, S. H., Dodge, W. H. and Bass, D. A.** : Immunology 45 : 605, 1982.
- 52) **McKean, J. R., Anwar, A. R. E. and Kay, A. B.** : Exp. Parasitol. 51 : 307-317, 1981.



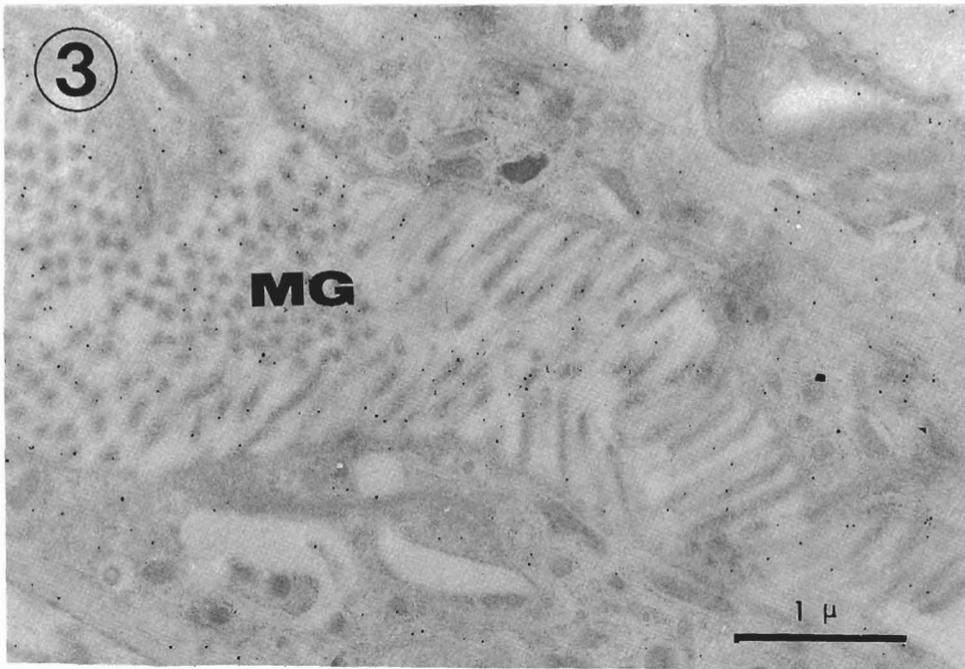
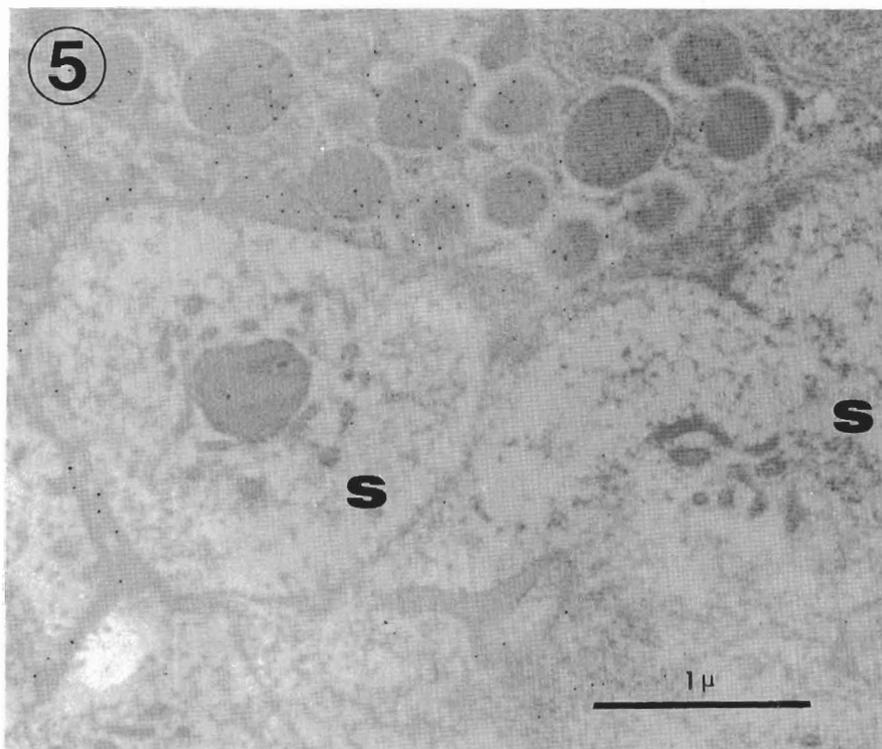
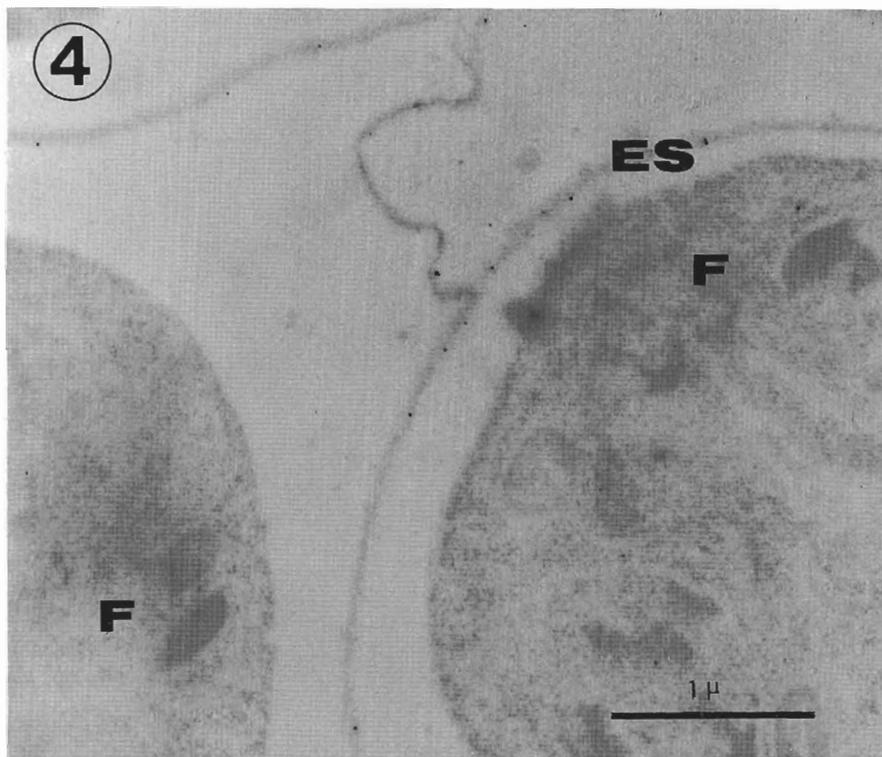
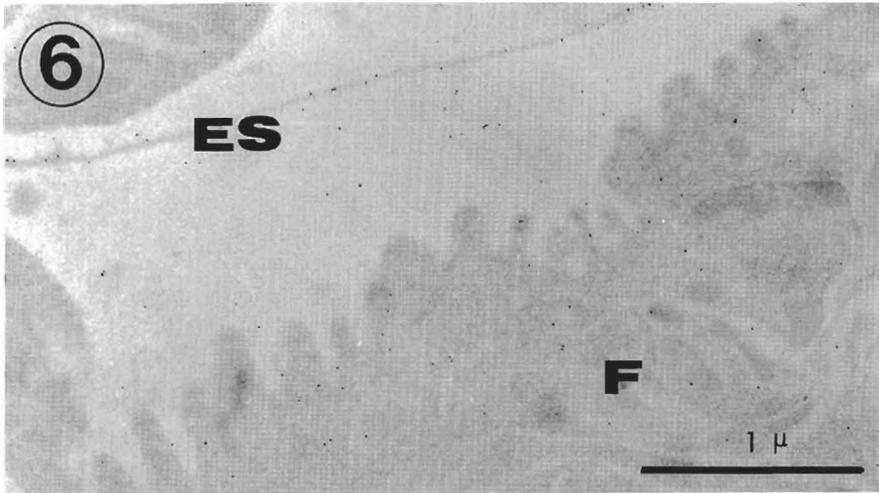


Plate. 1. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. The section included cuticle(Cu), hypodermis and muscle layers(ML). The surface of cuticle and muscle layers were negative by immunostaining but hypodermis was positive.

Plate. 2. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. This is a transverse section of hypodermal gland(HY) with membranous structures. The hypodermal gland is located in the cord which underlies cuticle(CU). The membranous structures of the gland was strongly positive by the immunostaining. The surface and inner layers of cuticle were negative by immunostaining. Connective tissue that surrounded the hypodermal gland was also positive by the immunostaining probably due to hemolymph.

Plate. 3. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. The midgut(MG) has brush border that were positive by the immunostaining. Epithelial cells of the midgut were also positive but with less staining intensity.





- Plate. 4. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. Each embryo was surrounded by the sheath(ES) which exhibited strong immunostaining. Undifferentiated cells of embryos(F) were negative by the immunostaining.
- Plate. 5. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. The male worm has a testis with epithelial cells and matured sperms(S). The epithelial cells has intracytoplasmic granules which will be exocytosed in to the lumen of the testis. The cytoplasmic granules were strongly positive by the immunostaining. Inter-sperm space was also positive probably due to the substance derived from the exocytosed granules.
- Plate. 6. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. The embryos(F) were devoid of effective staining but the embryonic sheath(ES) was positive by immunostaining.
- Plate. 7. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. The fetus(F) is almost matured. The cuticle is being formed. Its cytoplasm and the embryonic sheath(ES) were positive by immunostaining.

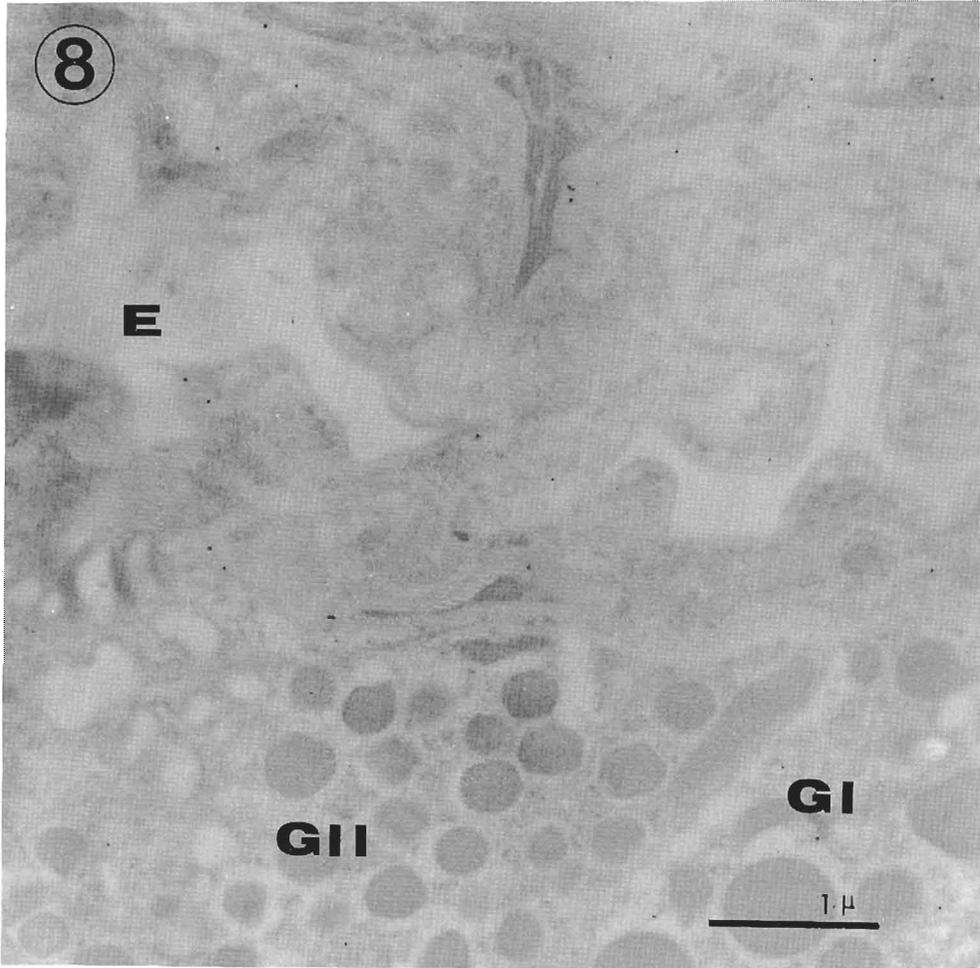


Plate. 8. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. The adult stichocytes contain two kinds of granules, namely, Type I (G I) and Type II (G II). Both of granules were negative by immunostaining. The adult esophagus(ES) is devoid of substances that occupy its lumen. Therefore no antigenic substance was detected in the lumen. The hemolymph surrounding the esophagus was positive by immunostaining.

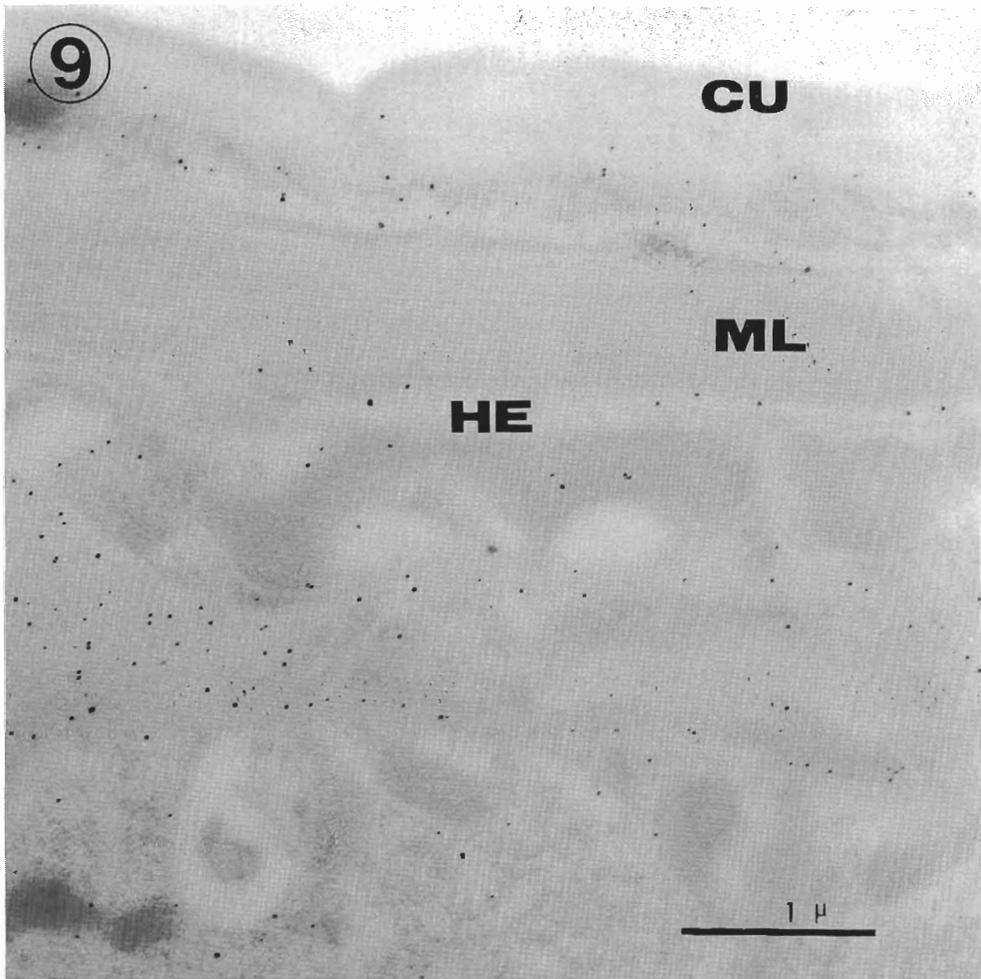
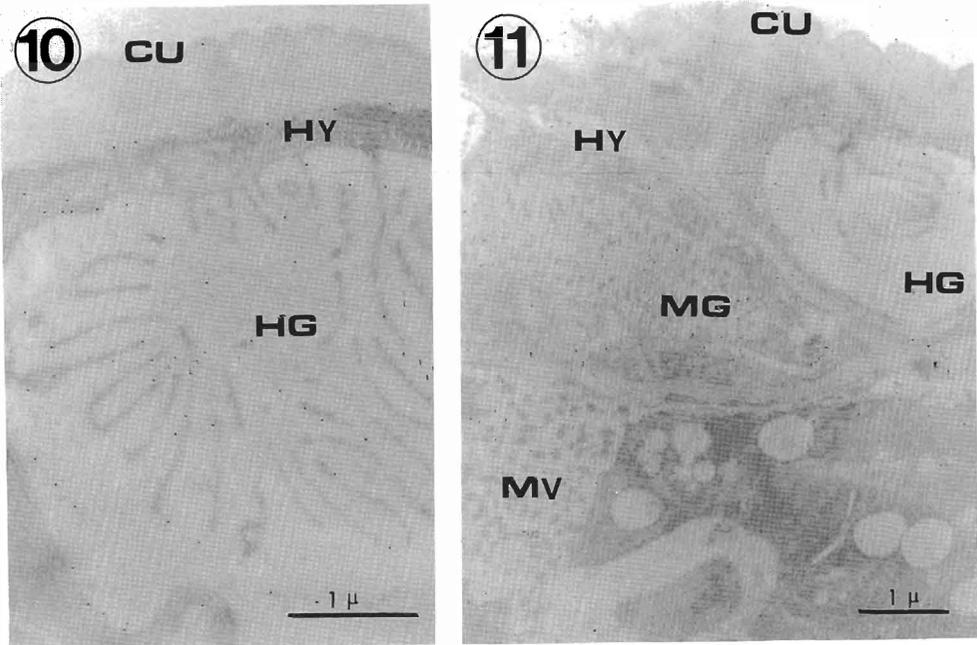
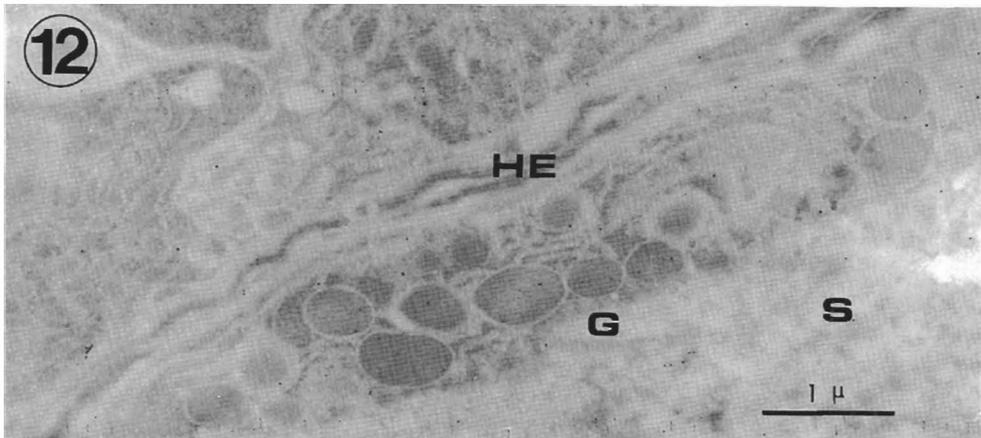


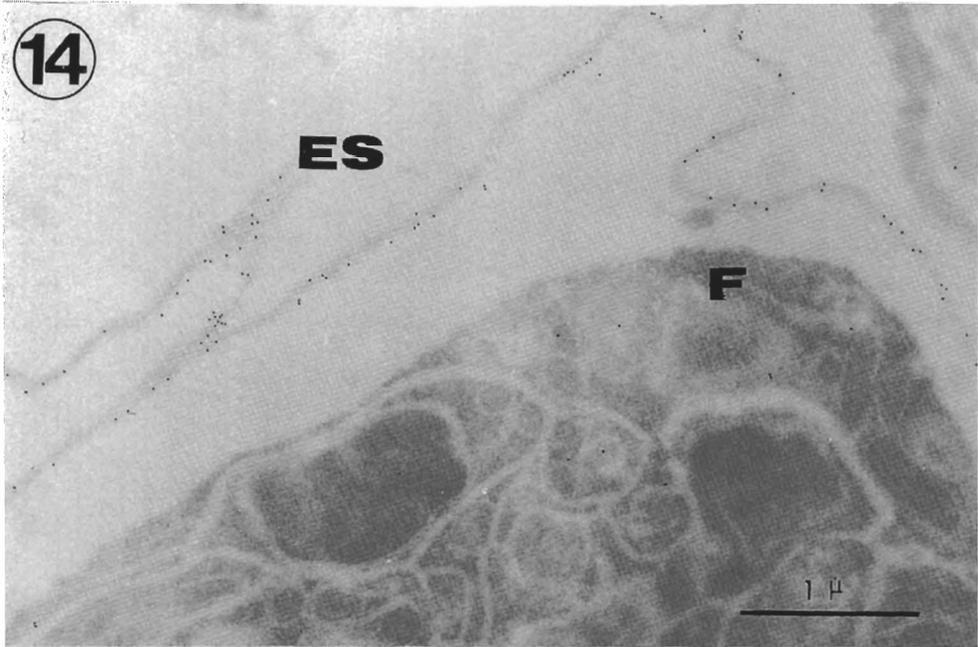
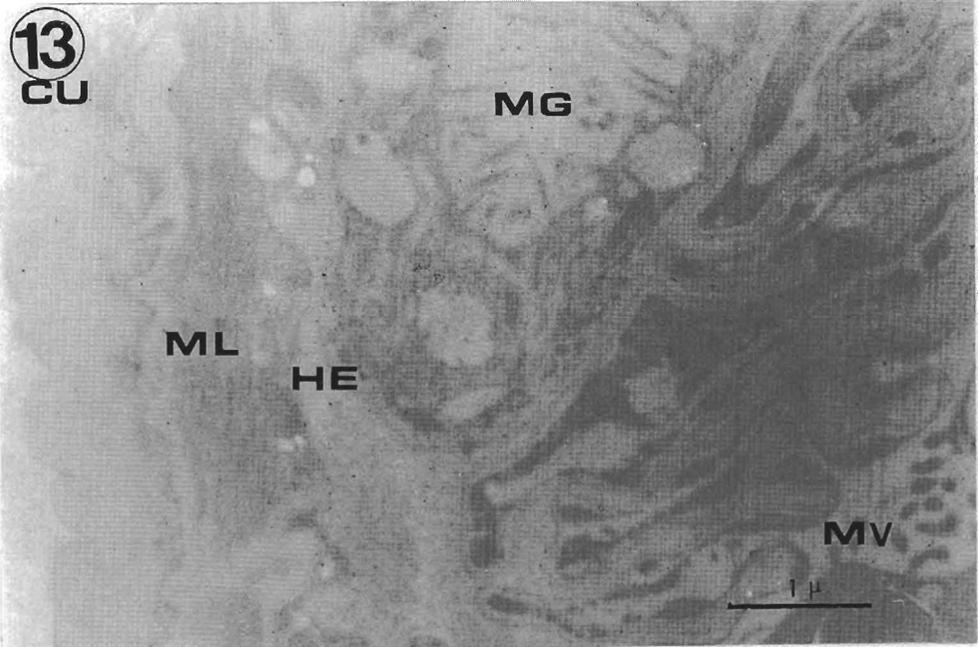
Plate. 9. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with patient sera. The section was cut longitudinally including cuticle(Cu), hypodermis, muscle layers(ML), hemolymph(HE), and stichosome. The surface cuticle was negative by immunostaining. The inner layers of cuticle muscle layers were devoid of effective staining. Most dense staining was observed in the hemolymph. In this particular micrograph, the stichosome was weakly positive by immunostaining.



- Plate. 10. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with sera from patients with cysticercosis. The sera positively immunostained hypodermal gland(HG) especially its membranous structures. The hypodermis(HY) was positive and the cuticle inner layers were negative by immunostaining.
- Plate. 11. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with sera from patients with fasciolariis. The sera positively immunostained hypodermal gland(HG), hypodermis (HY), brush border of the midgut(MG), Hemolymph(MV), and microvilli(MV) of ovum. cuticle inner layers and surface were negative immunostaining.



- Plate. 12. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with sera from patients with paragonimiasis. The epithelium of the seminal vesicle has intracytoplasmic exocrine granules(G), which were positive by immunostaining. The lumen of the seminal vesicle accommodate sperms(S) whose surfaces were also positive by immunostaining. Hemolymph which bathes the seminal vesicle was very weakly positive by the immunostaining.



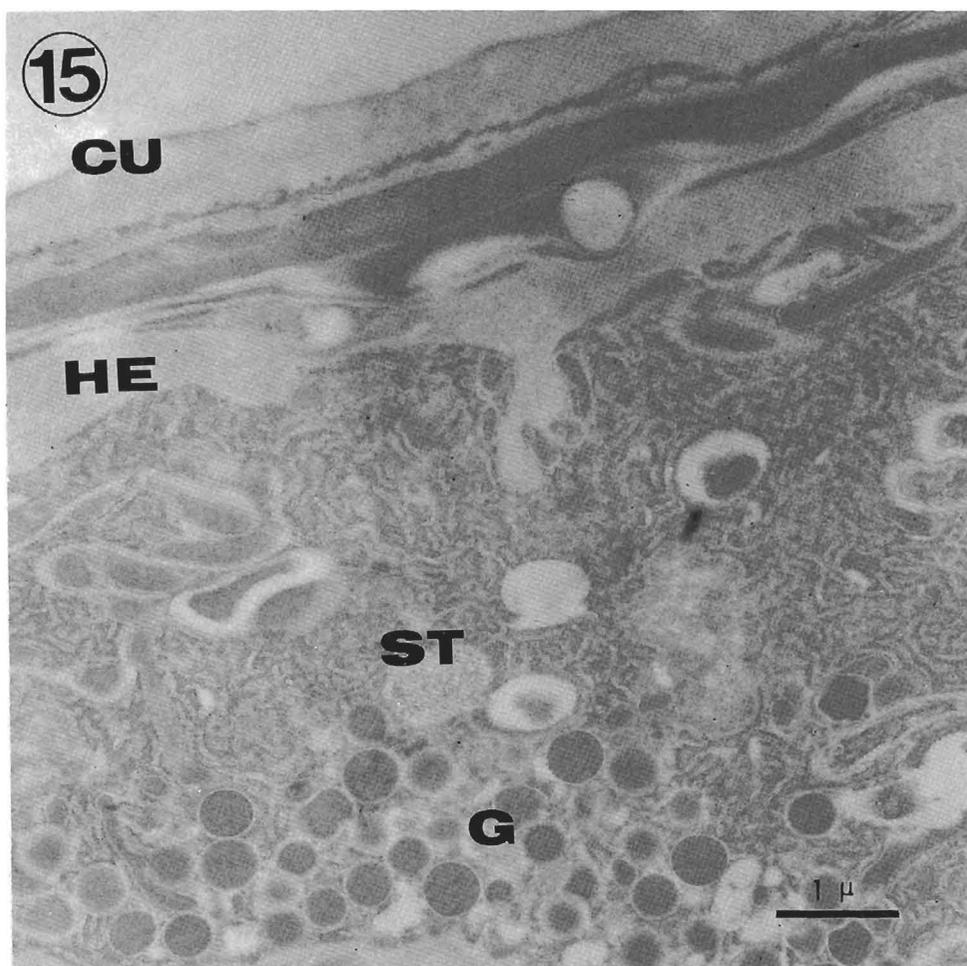


Plate. 13. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with sera from patients with fascioliasis. The sera positively immunostained brush border of the midgut(MG), its surrounding hemolymph(HE), and microvilli(MV)of ovum. In this particular micrograph, inner layers of the cuticle(CU) was positively immunostained. Muscle layers(ML) were negative by immunostaining which acted as a negative built-in-control.

Plate. 14. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with sera from patients with cysticercosis. The embryonic sheath(ES) was strongly positive by immunostaining. The cytoplasm of fetus exhibited only weak staining.

Plate. 15. An electron micrograph of an adult worm of *T. spiralis* which was immunostained with sera from patients with trichuriasis. The sera only weakly immunostained hemolymph. The surface and inner layers of the cuticle(CU) were negative by immunostaining. Cytoplasm of the stichosome(ST) were devoid of efficient staining. Granules were negative by immunostaining.