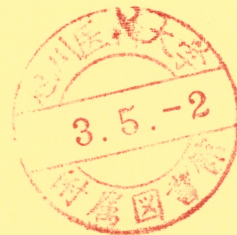

多包虫症の診断および治療への モノクローナル抗体の応用

(課題番号 63480148)



昭和63年度科学研究費補助金 (一般研究B)

研究成果報告書

平成3年3月

研究代表者 久津見 晴彦

旭川医科大学

はしがき

多包虫症 (Alveolar hydatid disease) は多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の幼虫が肝臓などの組織に寄生することによって引き起こされる疾患で、難治性であることから欧州、シベリア、アラスカ、北海道など北方圏の流行地において公衆衛生上重要な問題となっている。しかし、世界的な分布を示し、患者数の多い単包虫症に比べ、基礎および臨床面での研究は立ち後れていると言ってよい。

本研究は科学研究費補助金（一般研究B、昭和63年度～平成2年度）を受け、多包虫症の診断と治療へのモノクローナル抗体の応用の可能性を実験的に検討したものである。

研究組織

研究代表者： 久津見 晴彦 （旭川医科大学・教授）

研究分担者： 中尾 稔 （旭川医科大学・助手）

〃 : 稲岡 徹 （旭川医科大学・助手）

研究経費

昭和63年度	3,400千円
平成元年度	1,600千円
平成2年度	800千円
合 計	5,800千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) 中尾稔、稲岡徹、土井陸雄、久津見晴彦、荒川圭二、大西健児：北海道における多包虫症の疫学（2）旭川市の養豚地帯住民における抗体保有率調査、日本公衆衛生雑誌、35、184-192（1988）
- 2) 久津見晴彦、稲岡徹、大西健児：寄生虫感染に対する Chinese hamster (*Cricetulus griseus*)の感受性（2）日本住血吸虫(*Schistosoma japonicum*)の実験感染、北海道医学雑誌、63、80-84（1988）
- 3) Ohnishi, K. and Kutsumi, H.: Effect of heat shock on the proliferative ability of the germinal layer cells of alveolar hydatid. Ann.Trop.Med.Parasitol., 82, 215-216（1988）
- 4) 久津見晴彦：ベンズイミダゾール系薬剤を主体とした多包虫症の治療試験、厚生省「熱帯病治療薬の開発研究」昭和63年度報告書、92-99.
- 5) 久津見晴彦、宮本健司、稲岡徹：寄生虫感染に対する Chinese hamster (*Cricetulus griseus*)の感受性（3）ユーチゾン処理による小形条虫 *Hymenolepis nana* と鼠鞭虫 *Trichuris muris* の実験感染、北海道医学雑誌、64、492-499（1989）
- 6) 久津見晴彦：ベンズイミダゾール系薬剤による多包虫症治療試験とその基礎的検討、厚生省「熱帯病治療薬の開発研究」平成元年度報告書、69-86.
- 7) Nakao, M., Nakaya, K. and Kutsumi, H.: Murine model for hepatic alveolar hydatid disease without biohazard. Jpn.J.Parasitol., 39, 296-298（1990）
- 8) Nakao, M. and Kutsumi, H.: Hokkaido isolate of *Echinococcus multilocularis*: Sterile hydatid, protoscolices and adults share the common antigens. (Manuscript in preparation)

(2) 学会発表等

- 1) Kutsumi, H. and Nakao, M.: Production of mouse monoclonal antibody to larval *Echinococcus multilocularis*. 12th International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Sep.1988. Amsterdam
- 2) 中尾稔、久津見晴彦、土井陸雄：北海道における多包虫症の疫学－道東地域在住者の抗体保有状況、第35回日本寄生虫学会北日本支部会、1988年10月、山形
- 3) 中尾稔、久津見晴彦：多包虫に対するマウス型モノクローナル抗体について、第35回日本寄生虫学会北日本支部会、1988年10月、山形
- 4) Kutsumi, H., Nakao, M., Inaoka, T., Doi, R. and Ohnishi, K.: Serological and epidemiological survey of multilocular echinococcosis in hog raising areas in Hokkaido, Japan. Sino-Japanese Symposium on Parasitic Zoonoses. Oct.1988. Taipei
- 5) 中尾稔、久津見晴彦、稲岡徹、土井陸雄：畜産業者は多包虫感染のハイリスクグループか？ 第58回日本寄生虫学会大会、1989年4月、東京
- 6) 中尾稔、久津見晴彦、吉田行範、矢崎康幸、石川裕司、中谷和宏：ヒト多包虫組織の生死判定法、第36回日本寄生虫学会北日本支部会、1989年10月、盛岡
- 7) 中尾稔、中谷和宏、久津見晴彦：門脈接種法による肝多包虫症マウスの作製法、第36回日本寄生虫学会北日本支部会、1989年10月、盛岡
- 8) 中尾稔、久津見晴彦：多包虫・北海道分離株の抗原性、第59回日本寄生虫学会大会、1990年4月、福岡
- 9) Nakao, M., Kutsumi, H. and Doi, R.: Seroepidemiologic study of alveolar hydatid disease in Hokkaido, Japan. International Workshop on Advances in Alveolar Hydatid Disease. Jun.1990. Anchorage
- 10) Ishikawa, Y., Namiki, M., Nakao, M. and Kutsumi, H.: Peritoneoscopic diagnosis and medical treatment of alveolar hydatid disease. International Workshop on Advances in Alveolar Hydatid Disease. Jun.1990. Anchorage

- 11) Ohnishi, K. and Kutsumi, H.: Possible formation of calcareous corpuscle by brood capsule in secondary hepatic alveolar hydatid. Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses. Jul.1990. Sendai
- 12) Ishikawa, Y., Namiki, M., Nakao, M. and Kutsumi, H.: Peritoneoscopic diagnosis and medical treatment of alveolar hydatid disease. Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses. Jul.1990. Sendai
- 13) Kutsumi, H., Nakao, M., Ishikawa, Y., Yoshida, Y., Yazaki, Y. and Nakaya, K.: Viable sites of the germinal layers in human hepatic alveolar hydatid. 7th International Congress of Parasitology. Aug.1990. Paris
- 14) 中谷和宏、中尾稔、稲岡徹、久津見晴彦：門脈接種法による ICRマウスの肝多包虫症、第37回日本寄生虫学会北日本支部会、1990年9月、帯広
- 15) 中尾稔、久津見晴彦、土井陸雄：北海道における多包虫症の疫学・礼文島住民の死因調査、第37回日本寄生虫学会北日本支部会、1990年9月、帯広
- 16) 石川裕司、並木正義、中尾稔、久津見晴彦：多包虫症に対するアルベンダゾール経口投与が有効であった1例、第37回日本寄生虫学会北日本支部会、1990年9月、帯広
- 17) 中尾稔、久津見晴彦、稲岡徹、土井陸雄：北海道における多包虫症の疫学－抗体保有率と媒介動物の習性から推定した感染の危険因子、第1回日本疫学会総会、1991年1月、東京
- 18) 土井陸雄、中尾稔、久津見晴彦、稲岡徹：礼文島における多包虫症の疫学、第1回日本疫学会総会、1991年1月、東京

研究成果

I 研究の目的

多包虫症は日本では北海道に集中して発生する人畜共通の寄生虫疾患である。我々が実施した2万人におよぶ血清疫学調査では、抗体陽性者が畜産関係者に集中する傾向を示し、この現象は終宿主動物であるキタキツネが畜産廃棄物等の生ゴミに誘引され、畜産業者の生活環境を感染源の虫卵で汚染するためと想像された。北海道では畜産の大規模化によって生ゴミ等が増加し、キツネに豊富な餌資源を提供している。また、キツネは人為的な環境下でも旺盛な繁殖力を示し、個体数と生息域を増大させつつある。現在、北海道全域で感染キツネが発見されており、今後、患者が漸次増加することは確実視されている。

多包虫症は虫卵の経口摂取後、主に肝臓に病巣が形成され、肺、脳、骨への転移もしばしば観察される。一部の患者においてベンズイミダゾール系薬剤の治療試験が試みられているものの、現状では病巣の外科的切除が唯一の治療法と言える。また、潜伏期間が長期に及ぶため、自覚症状が出現した時点では外科的療法で完治する可能性はきわめて低い。さらに自然治癒例も存在することが予想されるため、活動性の病巣と癒痕性の病巣を血清学および放射線学的に識別する方法が要求されている。

この様に難治性で診断が困難な多包虫症に対して、我々はモノクローナル抗体を診断および治療に応用することを着想し、実験的にその可能性を追求した。主要な目的は以下の通りである。

① 細胞融合法によって多包虫に特異的なマウス型モノクローナル抗体を多種類作成し、抗原認識に関してその特性を生化学的および細胞組織学的に調査する。

② 患者血清が認識する抗原特性を調べ、モノクローナル抗体が認識する抗原性と比較検討する。

③ モノクローナル抗体をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーで抗原を精製し、患者血清との反応性を調べる。

④ 患者病巣の組織標本とモノクローナル抗体を反応させ、虫体の生存部位と死滅部位の識別方法を検討する。

⑤ 放射性同位元素で標識したモノクローナル抗体を感染マウスへ静脈注射し、病巣をシンチグラムで画像化する。画像化できた場合、抗体に薬剤を結合させ、治療効果を検討する。

II マウス型モノクローナル抗体の作成

1) 材料と方法

a) 使用した多包虫株と、マウスへの抗原感作法

多包虫は、北海道厚岸町で捕獲したエゾヤチネズミから得た北海道分離株 (Em-AK株) を使用した。脾細胞の供給源としては、Balb/cマウスを使用した。免疫方法は、多包虫の腹腔接種による感染免疫と、凍結融解により殺滅処理した包虫ホモジネート (マウス由来) と Freund 完全アジュバントとの混合物を腹腔に接種する方法を併用した。感染免疫では感染後3ヶ月、包虫ホモジネート免疫では腹腔接種後1ヶ月に脾臓を摘出し、細胞浮遊液を調製した。

多包虫は宿主細胞と虫体が混在しているため、虫体細胞を純粹に分離することは困難である。そのため、マウス以外の動物から得た多包虫では宿主成分が抗原として作用してしまい、免疫源として不適だった。そこで、マウスから得た多包虫ホモジネートでマウスを免疫する方法を採用し、宿主成分が免疫源となることを防いだ。

b) 腫瘍細胞

免疫グロブリン非産生の骨髓腫細胞 (P3X63-Ag8.653) を親細胞とした。腫瘍細胞は、8-azaguanin (15 μ g/ml) と牛胎児血清 (10%) を含む RPMI 1640 で維持し、対数増殖期に入っている状態の細胞を RPMI 1640 で2回遠心洗浄後、融合に用いた。

c) 細胞融合

マウス脾細胞は、0.83%塩化アンモニウム溶液で処理して赤血球を溶解後、RPMI1640で3回遠心洗浄して、細胞を計数した。細胞数比10:1の割合で、脾細胞と腫瘍細胞を混合し、遠心して上清を除いた後、40%ポリエチレングリコールを含むRPMI1640を徐々に加えて細胞塊をほぐし、37℃で7分間静置した。その後、加温したRPMI1640を徐々に加えて遠心洗浄し、無血清培地(SFM101、日水)に細胞を浮遊させた。96穴マイクロプレートに1穴あたり1~2×10⁶/mlの濃度で細胞を植え込み、炭酸ガスインキュベーター(5%CO₂存在下)で培養した。SFM101培地は3日間隔で1/2量を交換し、2週間目に抗体をスクリーニングした(Yabe et al. 1986)。

d) 抗体のスクリーニング

多包虫組織のパラフィン切片を抗原として免疫組織学的に抗体を検出した。チャイニーズハムスターの腹腔で発育させた原頭節形成の見られる多包虫を中性ホルマリンで固定し、メタノール系列で脱水後、キシレンに置換し、パラフィンで包埋した。マイクロトームにより3μmの切片を作成し、スライドガラス上に貼り付けた。切片はキシレンで脱パラフィン後、エタノール系列を通し、最終的にPBSに浸した。この様な切片と培養上清を反応させ、抗原部位と結合した抗体をABC(Avidin: Biotinylated Peroxidase Complex)法で検出した(Hsu et al. 1981)。発色基質は3,3'-diaminobenzidineを使用した。

e) 融合細胞のクローニング

抗体分泌細胞は限界希釈法によりクローニングを行った。feeder cellとして正常Balb/cマウスの胸腺細胞を使用した。選択されたクローンは大量培養し、液体窒素中に保存した。また、一部のクローンはプリスタン処理したBalb/cマウスの腹腔へ接種し、腹水化抗体を得た。

f) ウェスタンブロット法

多包虫の燐酸緩衝液(10mM, pH7.2)抽出液を2% SDS、5% 2-mercaptoethanol存在下で5分間煮沸還元し、電気泳動法(SDS-PAGE、12.5%ゲル)で展

開した。ゲル内蛋白をメンブレン（GVHP、ミリポア）に電氣的に転写し、クローンの培養上清と反応させた。抗体はABC法で検出し、発色基質としては 4-chloro-1-naphthol を使用した。

2) 結果と考察

感染マウスより5クローン、包虫ホモジネート免疫マウスより18クローンを作成した（表1、図1～2）。抗体の反応性を免疫組織学的に観察すると、原頭節と胚細胞層両方に反応するタイプ、原頭節内部だけと反応するタイプ、胚細胞層だけと反応するタイプに大別することができた。ウエスタンブロット法では、ほとんどの抗体が複数のポリペプチドと反応した。これは同一の抗原決定基が複数のポリペプチド上に存在するためと考えられた。これらの抗体はいずれも免疫組織学的には原頭節と胚細胞層両方と反応するタイプに属した。原頭節内部、もしくは胚細胞層と反応するタイプの抗体はウエスタンブロット法で明瞭なバンドを検出することができなかった。単一のポリペプチドと反応した抗体は、EM05（図7）とEM09（図1）で、それぞれ分子量50kDa、16kDaのポリペプチドと反応した。

多包虫は胚細胞が外生出芽的に宿主の組織内へ突出して増殖し、非好適宿主では原頭節形成がみられることは稀である。そのため、画像診断や薬物のミサイル両方には胚細胞層に特異的な抗体が理想的と考えられた。また、虫体の生死判定を免疫組織学的に判定する場合も、胚細胞層を検出できる抗体が利用価値が高いと推察された。

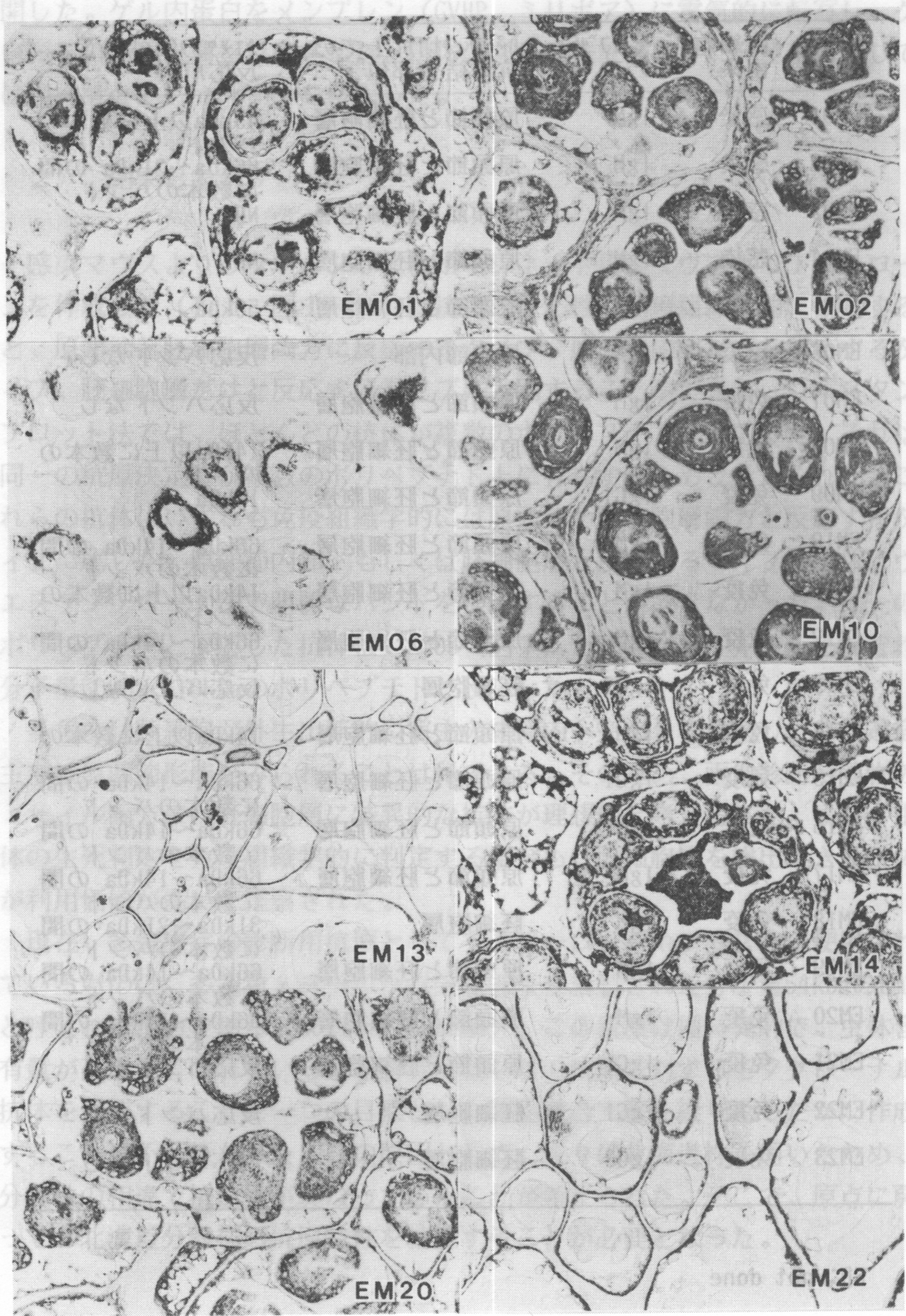
現在、多包虫症の診断用抗原として主にヨーロッパやアラスカで使用されているものは、多包虫・ヨーロッパ分離株より精製された分子量54kDaのEm2と呼ばれる蛋白である（Gottstein 1985）。この抗原は種特異的で、虫体含有量が高いと言われている。本研究では、この抗原に対するモノクローナル抗体を作成することを一つの目標とし、細胞融合実験を繰り返したが、作成することは不可能だった。この原因として、我々は北海道株を用いたため、分離株の相違で抗原性が異なっていたことが考えられた。そこで、原点に戻って、北海道分離株の抗原特性を精査することが必要となった。

表1 作成した多包虫に対するモノクローナル抗体

クローン名	脾細胞由来	グロブリンクラス	パラフィン切片上での抗体結合部位	ウイスタンブロットの反応バンド
EM01	感染	IgM	原頭節と胚細胞層	45kDa以上に数本のバンド
EM02	感染	IgM	原頭節と胚細胞層	66kDa~21kDa の間に数本のバンド
EM03	感染	IgM	原頭節と胚細胞層	ND
EM04	感染	IgM	原頭節と胚細胞層	ND
EM05	感染	IgM	原頭節と胚細胞層	50kDa
EM06	免疫	IgA	原頭節内部	反応バンドなし
EM07	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	反応バンドなし
EM08	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	14kDa以上に数本のバンド
EM09	免疫	IgG1	原頭節と胚細胞層	16kDa
EM10	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	66kDa~14kDa の間に数本のバンド
EM11	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	14kDa以上に数本のバンド
EM12	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	66kDa~14kDa の間に数本のバンド
EM13	免疫	IgG3	胚細胞層	反応バンドなし
EM14	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	14kDa以上に数本のバンド
EM15	免疫	IgG1	原頭節と胚細胞層	66kDa~14kDa の間に数本のバンド
EM16	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	66kDa~14kDa の間に数本のバンド
EM17	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	66kDa~14kDa の間に数本のバンド
EM18	免疫	IgM	胚細胞層	31kDa~21kDa の間に数本のバンド
EM19	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	66kDa~14kDa の間に数本のバンド
EM20	免疫	IgM	原頭節と胚細胞層	66kDa~14kDa の間に数本のバンド
EM21	免疫	IgG1	原頭節と胚細胞層	反応バンドなし
EM22	免疫	IgG1	胚細胞層	反応バンドなし
EM23	免疫	IgG3	胚細胞層	反応バンドなし

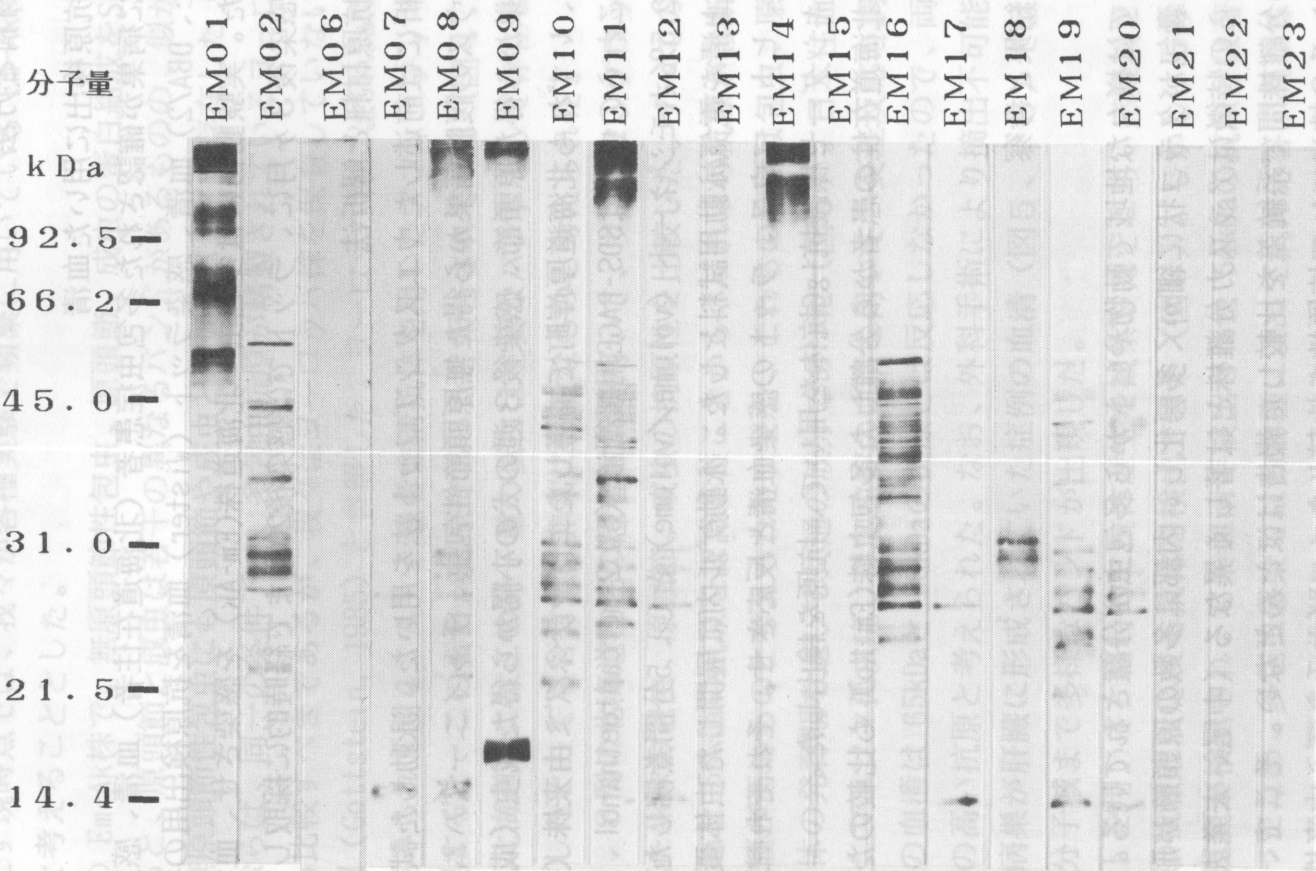
ND: not done

図1 免疫組織学的に観察したモノクローナル抗体の反応部位



の抗原が検出され、65kDaと56kDaの抗原蛋白が主成分のはっきりした条帯を呈した。その後、北海道株の種内変異を多くの分離株で検討しなくてはならないが、とりあえず現時点で、我々各種分離株を用いて代表的な株と検討することとした。

図2 ウェスタンブロット法で観察したモノクローナル抗体の反応性



Ⅲ 北海道分離株の抗原特性

1) 材料と方法

a) 抗原検出に用いた血清

外科的に病巣が確認された多包虫症患者（北海道在住者）血清、感染マウス(Balb/c、DBA/2)血清、感染ラット（Wister）血清を抗原検出用の抗体として用いた。実験動物には多包虫・北海道株(Em-Ak)を感染させ、血清をマウスでは感染後3ヶ月に、ラットでは感染後20週まで経時的に採取した。

b) 抗原材料と解析法

抗原解析には前述したウエスタンブロット法を用いた。泳動した試料は、Balb/cマウスの腹腔病巣から得た無原頭節性包虫、チャイニーズハムスターの腹腔病巣から得た原頭節、感染後3週の犬の小腸から得た成虫（成熟片節なし）で、いずれも北海道厚岸町で捕獲したエゾヤチネズミ由来株（Em-Ak）である。これらの虫体はSDS-PAGE用緩衝液（5% 2-mercaptoethanol、2% SDS）で、10～2.5%ホモジネート（volume/volume）とし、5分間煮沸した後、遠心して、上清を電気泳動用試料とした。泳動ゲル内に展開した虫体蛋白は膜に転写後、ヒト、マウス、ラットの感染血清と反応させ、それぞれに特異的なペルオキシダーゼ標識抗IgG抗体を用いて、抗原を検出した。

また、北海道在住の患者から分離した多包虫株(Em-Ko)も比較のために使用した。

2) 結果と考察

北海道では様々な地域で動物やヒトから多包虫が分離されている。北海道分離株は嚢包がタラコ状に細かく多房化し、内部に多数の原頭節が形成される。これらの特徴はアラスカ分離株とは著しく異なる（中尾、未発表）が、北海道の分離株間で系統差を比較した報告はほとんどない。そこで、我々が保有している2株について抗原性を比較した。エゾヤチネズミ由来株(Em-Ak)とヒト由来株(Em-Ko)の原頭節を比較したところ、両者とも患者血清で同様

の抗原が検出され、65kDaと56kDaの抗原蛋白が主要なものであった（図3）。今後、北海道株の種内変異を多くの分離株で検討しなくてはならないが、とりあえず現時点では、我々が各種実験で頻繁に用いている Em-Ak株を代表的な株と考えることとした。

この Em-Ak株で、無原頭節性包虫、原頭節、成虫の蛋白組成をSDS-PAGEで調べると、原頭節と成虫は若干の異なるバンドがあるものの、似かよっていた。無原頭節性包虫にも原頭節や成虫と共通のバンドが存在した（図4）。本来ならば、同一の条件下で、多包虫抗原が精製されているヨーロッパ分離株とも比較すべきであるが、我々はヨーロッパ株を保有していないため、既報告例（Gottstein, 1985）と参照した。ヨーロッパ株には54kDaに主要なバンドがみられ（図4、A）、患者血清抗体を用いたアフィニティークロマトで精製すると、この蛋白が抗原であったと報告されている（図4、B）。しかし、北海道株にはこの分子量の蛋白は主要なバンドとして存在せず、かりに存在したとしても含有量は非常に微量なものと考えられた。

次に、8例の北海道在住の患者血清を用いて、ウエスタンブロット法により、Em-Ak株の包虫、原頭節、成虫の抗原性を比較した。すべての患者血清が65kDaと56kDaの抗原を認識したことから、これらの抗原が診断用抗原として価値が高いものと考えられた。また、これらの抗原は包虫、原頭節、成虫と虫体の発育期を通じて共通の成分であった（図5）。日本住血吸虫症、肝蛭症、マンソン孤虫症、単包虫症の血清を用いて、交差反応を調べたが、これらの血清は65kDaと56kDaの抗原とは反応しなかったので、両抗原は種特異性の高い抗原と考えられた。なお、外科手術により摘出不可能なほどの巨大な病巣が肝臓に形成されていた症例の血清（図5、P6）では、低分子から高分子域まで多様なバンドが出現した。

ラットを用いて、経時的に抗体産生を観察したところ、感染後2週目より、65kDaの抗原と反応する抗体を検出できた（図6）。しかし、ラットでは50kDaの抗原が検出され、ヒト血清で検出された54kDaの抗原とは著明に反応しなかったため、多包虫感染では動物種によって抗体応答が異なることが判明した。なお、感染が後期になると反応バンドの数が増加するため、感染が進行するに連れて宿主は様々な抗原刺激を受けることが推測された。ラット

の様に多包虫に対してあまり好適な宿主でない場合、包虫周囲の炎症反応が強く、感染後期には包虫の一部が死滅し、膿瘍化することがある。多包虫が死滅した場合、多様な虫体成分が抗原刺激となることが予想されるため、反応バンドが増加する現象は、虫体の一部で死滅することを意味しているものと考えられた。なお、65kDa 抗原は感染初期から後期にかけて常に検出できるため、診断用抗原として利用できると考えられた。ただし、この実験の感染源は包虫ホモジネートであったため、通常の虫卵による感染経過を反映していないかもしれない。

系統マウスにおいては、多包虫の発育が良好でなく、原頭節形成がほとんどみられない Balb/c, C57BL/6で、低分子から高分子領域まで多数のバンドが出現した(図7)。一方、多包虫の発育が良好で、原頭節形成もみられる DBA/2 では、反応バンドの数が少なく、65kDa と 56kDaの抗原を検出することができた。この様に同一種の動物においても、系統差で抗体応答が異なることが明かとなった。ハイブリドーマの作成源としている Balb/cにおいても病巣の形成状態によって抗体産生が異なることが予想されるため、適切な融合細胞のクローンを得ることは非常に困難であると思われた。一部のクローンで 50kDaの抗原と単一に反応するもの(図7、Em05)が得られたが、この 50kDa 抗原はヒト血清では反応性のない抗原であるため、Em05を抗原精製用のリガンドとするには不適であると思われた。

以上の検討から、血清診断用の抗原を精製するためには、北海道株が保有する 65kDaもしくは 56kDa抗原に特異的なモノクローナル抗体の作成が必要となった。また、ヨーロッパ株で報告されている 54kDa抗原(Em2a)は北海道株には存在せず、多包虫の抗原性の種内変異があるものと思われた。ウエスタンブロット法によって北海道株で検出できた65kDaと56kDa抗原は通常の蛋白染色で出現する主要な蛋白バンドと一致せず、虫体成分としてはきわめて微量なものであった。従って、仮にこれらの抗原に対するモノクローナル抗体が作成できたとしても、微量の抗原しか精製できないことが予想された。

図3

多包虫・北海道株の原頭節
における抗原性の比較

Em-Ak : エゾヤチネズミ
由来株

Em-Ko : ヒト由来株

P6, P3, P7 : 患者血清

矢印 : 患者血清で必ず
観察されるバンド
(65kDaと56kDa)

分子量

kDa

66

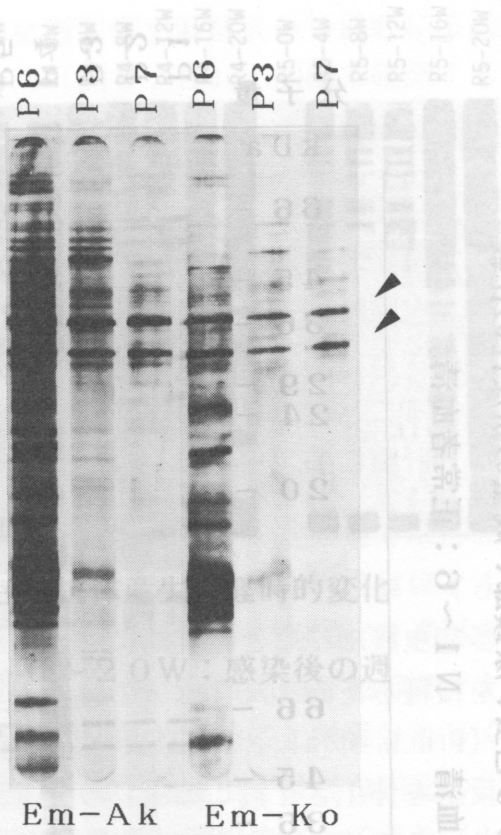
45

36

29

24

20



Em-Ak Em-Ko

図4

多包虫・北海道株
(Em-Ak)とヨー
ロッパ株の比較

Cyst : 包虫

Proto. : 原頭節

Adult : 成虫

ヨーロッパ株は
Gottstein(1985)
の結果を転載した。

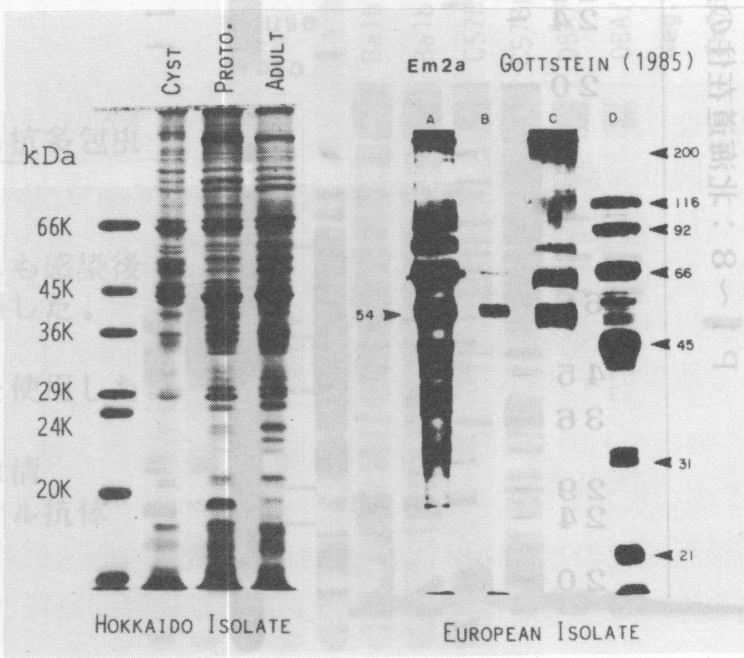
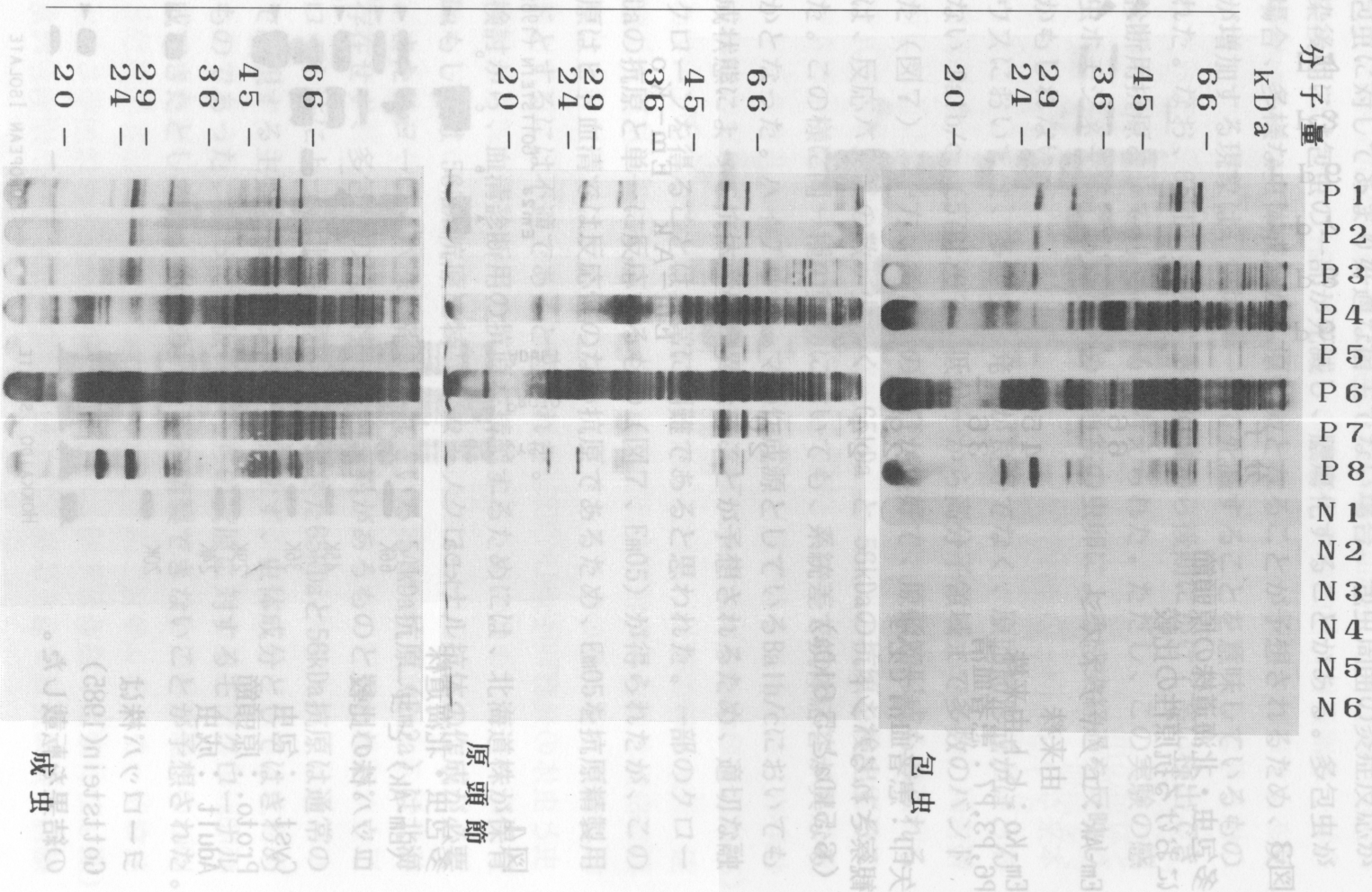


図5 多包虫・北海道株 (Em-Ak) における包虫、原頭節、成虫の抗原性の比較

P 1 ~ 8 : 北海道在住の患者血清 N 1 ~ 6 : 正常者血清



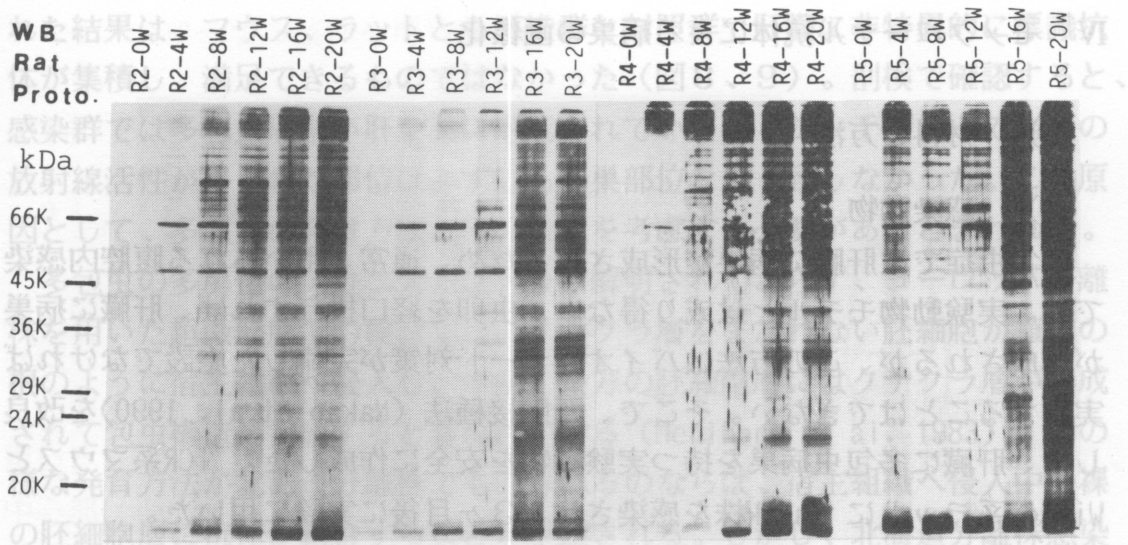


図6 ラットにおける抗多包虫抗体産生の経時的変化

R 2～5：ラット個体番号 0～20W：感染後の週
泳動試料は原頭節を使用した。

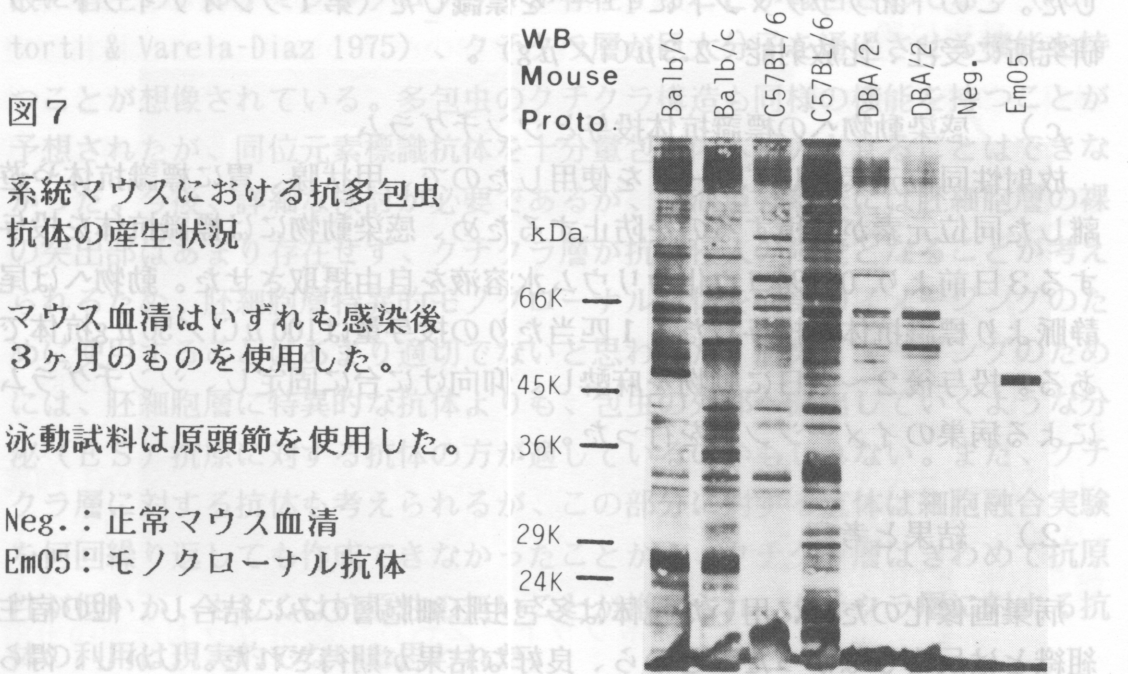


図7

系統マウスにおける抗多包虫抗体の産生状況

マウス血清はいずれも感染後3ヶ月のものを使用した。

泳動試料は原頭節を使用した。

Neg.：正常マウス血清

Em05：モノクローナル抗体

IV モノクローナル抗体による病巣の画像化

1) 材料と方法

a) 感染動物

多包虫症では肝臓に病巣が形成されるため、通常、用いられる腹腔内感染では、実験動物モデルとは成り得ない。虫卵を経口投与すれば、肝臓に病巣が形成されるが、この方法はバイオハザード対策が完備した施設でなければ実施することはできない。そこで、門脈接種法 (Nakao et al. 1990) を改良して、肝臓に多包虫病巣を持つ実験動物を安全に作成した。ICR系マウスとWister系ラットに Em-Ak株を感染させ、3ヶ月後に実験に用いた。

b) モノクローナル抗体のアイソトープ標識

多包虫胚細胞層と特異的に結合する Em22 抗体 (IgG1) を、ハイブリドーマを接種した Balb/c マウスの腹水より、DEAEアフィゲルブルーにより精製した (Bruck et al., 1982)。精製抗体をパピインで消化し、iodoacetamide で反応を停止させ後、Fab フラグメントを DEAEアフィゲルブルーにより精製した。この Fab フラグメントに I^{131} を標識した (第 I ラジオアイソトープ研究所に受注、比放射能: $2.3 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$)。

c) 感染動物への標識抗体投与とシンチグラム

放射性同位元素としてヨードを使用したので、甲状腺、胃に標識抗体や遊離した同位元素が集積するのを防止するため、感染動物には標識抗体を投与する3日前より 0.1% ヨウ化カリウム水溶液を自由摂取させた。動物へは尾静脈より標識抗体を投与した。1匹当たりの投与量は $100 \mu\text{Ci} / 50 \mu\text{g}$ 抗体である。投与後2~3日に動物を麻酔し、仰向けに台に固定し、シンチグラムによる病巣のイメージングを行った。

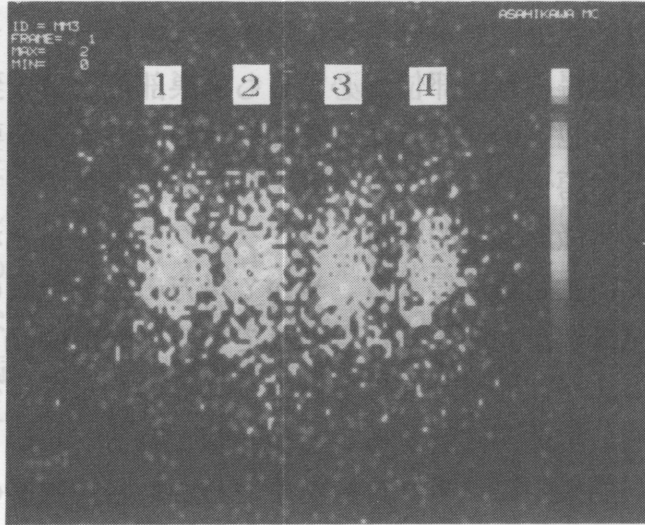
2) 結果と考察

病巣画像化のために用いた抗体は多包虫胚細胞層のみに結合し、他の宿主組織とは反応しなかったことから、良好な結果が期待された。しかし、得ら

れた結果は、マウス、ラットとも感染群と対照群で肝臓に非特異的に標識抗体が集積し、満足できるものではなかった（図8、9）。剖検で確認すると、感染群では多包虫病巣が肝全葉に形成されていたが、シンチグラムで強度の放射線活性が得られた部位は必ずしも病巣部位とは一致しなかった。この原因として、多包虫の発育方法とその構造を考慮する必要があると思われた。

多包虫の多房化のメカニズムは十分に解明されておらず、ヨーロッパ分離株を用いた超微形態学的検討では、クチクラ層をまとわない胚細胞が植物の根のように宿主組織へ侵入し、やがて後方の胚細胞層にはクチクラ層が形成されて包虫構造が完成すると言われている（Mehlhorn et al. 1983）。このような発育方法が北海道分離株でもみられるのならば、宿主組織へ侵入中の裸の胚細胞層に抗体が結合することが予想される。しかし、北海道分離株感染動物では、病巣中にクチクラ層をまとわない胚細胞層の突出構造はほとんど観察できず、クチクラ構造のある小嚢包が外部へ突出し、多房化を進展させる組織像が観察された（中尾ら、未発表）。また、包虫細胞を包むクチクラ層には、胚細胞層を宿主の炎症反応から防ぐ機能と同時に、栄養分もしくは老廃物を輸送させる機能があるものと思われる。単包虫では包虫内部の包虫液に宿主のアルブミンやグロブリンが存在することが報告されており（Coltorti & Varela-Diaz 1975）、クチクラ層が巨大分子を通過させる機能を持つことが想像されている。多包虫のクチクラ構造も同様の機能を持つことが予想されたが、同位元素標識抗体を十分量包虫内へ侵入させることはできなかった。今後、詳細な検討が必要であるが、北海道分離株には胚細胞層の裸の突出部はあまり存在せず、クチクラ層が抗体侵入の障壁となることが考えられるため、胚細胞層特異的モノクローナル抗体を病巣のイメージングのために使用することはあまり適切でないと思われた。病巣イメージングのためには、胚細胞層に特異的な抗体よりも、包虫の外部へ漏出していくような分泌（ES）抗原に対する抗体の方が適しているのかもしれない。また、クチクラ層に対する抗体も考えられるが、この部分に対する抗体は細胞融合実験を何回繰り返しても作成できなかったことから、クチクラ層はきわめて抗原性が低いか、もしくは抗原性の無いことが推察され、クチクラ層に対する抗体の利用は現実的でないと思われた。

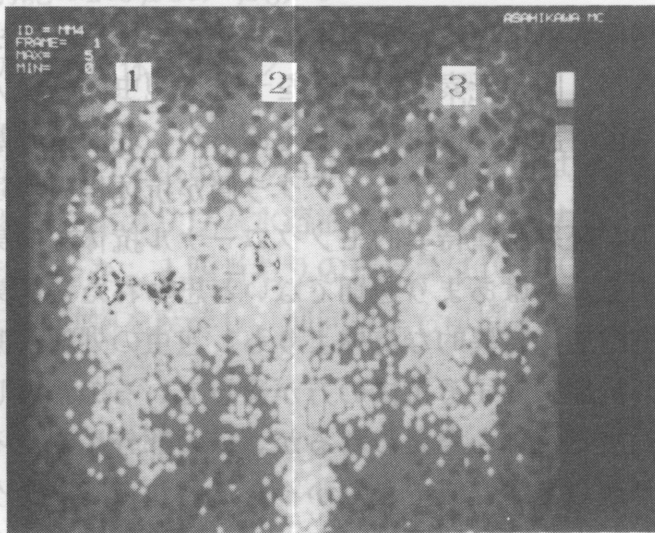
動物位置



1~2 : 正常マウス 3~4 : 感染マウス

図8 マウスのシンチグラフィ

動物位置



1 : 正常ラット 2~3 : 感染ラット

図9 ラットのシンチグラフィ

V モノクローナル抗体を用いた虫体の生死判定法

1) 材料と方法

a) ヒト多包虫病巣

ヒト多包虫症病巣において虫体の生存部位と死滅部位を識別することは、薬剤による治療効果もしくは自然治癒を検討する上で重要であるため、モノクローナル抗体を虫体の生死判定に利用する方法を検討した。

北海道在住の29歳女性より外科的に摘出された新鮮な多包虫病巣を実験に用いた。病巣は肝右葉で、内部はほとんどが黄白色の病巣で占められており、中心部は液化していた(図10)。

b) 実験動物への移植

直接的に虫体の生死を判定するための方法として、病巣を多包虫に好適な実験動物に移植し、その後の虫体の発育を観察する方法がある。今回の実験ではこの方法を検討するとともに、病巣のどの様な部位が虫体の生存部位であるのかも確認した。

肝臓内部の病巣(図11)、及び表層部に露出している病巣(図12)を移植材料とした。移植のための病巣は約5mm角に細切し、滅菌PBSで洗浄後、ネブタール麻酔下のチャイニーズハムスターの腹腔内へ外科的に移植した。移植後の動物は1~5ヶ月後に剖検し、多包虫の発育を観察した。

また、病巣内部のホモジネートも作製し、チャイニーズハムスターの腹腔に接種した。

c) 免疫組織学的検討

動物に移植した病巣の一部は、中性ホルマリンで固定し、常法によりパラフィン包埋し、切片を作成した。脱パラフィン後、ビオチン標識胚細胞層特異的 Em22 抗体を反応させた。抗体結合部位はペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで検出した。発色基質は 3,3'-diaminobenzidine を使用した。また、通常のHE、PAS、マッソントリクローム染色も併用し、炎症と繊維化の度合についても観察した。

2) 結果と考察

多包虫の生死を判定する場合、なるべく早く結果が得られることが望ましい。動物への移植実験では、1ヶ月後に判定が可能であった。1ヶ月経過した移植病巣で虫体が生存していると判定されたものでは、移植病巣は異物反応によりカプセル状に包み込まれていたが、そこから抜け出すように透明な包虫が出芽していた(図13、矢印)。この出芽部位には既に未熟な繁殖胞が形成されていたため、移植された病巣部位の包虫は生存していたと判定した。移植後2ヶ月を過ぎると、包虫は増大して内部に原頭節が形成されるため、生存は容易に確認できた。移植病巣から包虫が出芽しなかったものでは、腹腔内に移植病巣の瘢痕組織がみられ、虫体が死滅していたと判定した。

移植実験の結果を病巣の部位別にまとめると、肝表層部を移植した動物では全例に包虫の発育が認められたが、内部病巣を移植したものでは全く包虫が発育しなかった(表2)。この結果から、肝表層部では包虫が生存していたが、内部は既に死滅していたと推測した。

組織学的所見では、肝表層部は包虫周囲の炎症が活発だったが(図14)、病巣内部は炎症が終息し、強度の繊維化が認められた(図15)。胚細胞特異的モノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に染色すると、対照のチャイニーズハムスターで発育した包虫では、胚細胞層のみが染色され、クチクラ層、原頭節、繁殖胞は染色されなかった(図16、矢印)。一方、ヒトの病巣では、肝表層部の包虫で貧弱な胚細胞層が染色された(図17、矢印)が、病巣内部の包虫ではほとんど胚細胞層が染色されなかった。

ヒトは多包虫に対して好適な宿主ではないため、ヒトに寄生した多包虫組織は発育不全状態となっている。そのため病巣を肉眼的に観察しても、虫体の生死を判別することは容易ではない。今回の結果から、動物への移植実験によって比較的簡単に多包虫の生死を判別できることが分かった。この方法は今後、薬剤の治療効果の判定に応用できるものと思われる。例えば、腹腔鏡によって肝の生検組織が得られれば、これを動物へ移植し、虫体の生死を判定することが可能である。また、術前の患者にしばらくの間、薬剤を投与し、術後の切除肝を動物に移植して薬剤の効果を確認することも可能である。

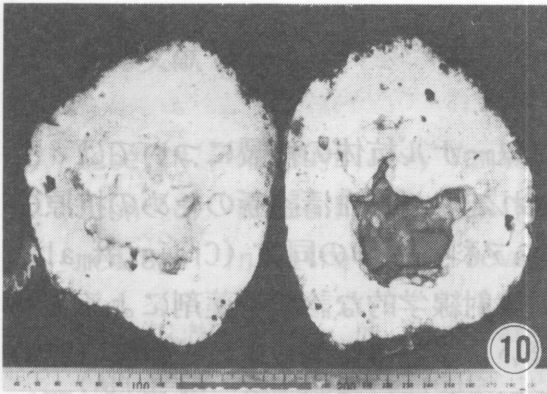
しかし、動物への移植実験は実施できないこともあるので、病理組織によって虫体の生死が判定できれば理想的である。今回の結果は、病理組織による虫体の生死判定に関して非常に示唆に富むものであった。移植実験により虫体の生存が確認できた部位では包虫周囲の炎症反応が強く、これは虫体が抗原物質を放出しているためと考えられた。また、虫体が死滅していたと判定された部位では炎症は終息し、繊維化が著しかった。このように炎症の度合を考慮すれば、ある程度、組織標本のみで虫体の生死を判定することが可能であった。また、虫体が生存していた病巣部位ではモノクローナル抗体で免疫組織学的に胚細胞層を確認できたので、これも虫体の生死判定に関して有望な方法になると考えられた。

今回の移植実験では、ヒト病巣でマクロ的に多包虫の生存部位を知ることができたことも大きな成果であった。巨大な肝病巣は中心部が液化しており、液化部位は虫体が死滅していると容易に想像できるが、その周囲の硬いスポンジ様の部位は虫体が生存していると考えられていた。そのため、液化した空洞部位を低濃度のアルコールやホルマリンで洗浄して虫体を殺滅する治療法も実施されたことがあった。しかし、今回の観察から、ヒトの巨大病巣はそのほとんどが虫体の死骸であるということが分かり、かつて行われた治療法は虫体の殺滅に関する限りあまり意味の無いことと思われた。多包虫は外性出芽的に組織へ浸潤する性質があり、特にヒトでは中心部位はやがて死滅して、虫体のクチクラ層と宿主の結合織から成る癒痕組織を残すのであろう。換言すれば、進行したヒト多包虫症とは後遺症とも言えるだろう。このような病態像を示す多包虫症を薬剤治療の対象とした場合、仮に虫体を殺滅する特效薬が出現したとしても、病巣が巨大な患者を内科的に完治させることは不可能で、外科的に切除することが唯一の治療法となるだろう。

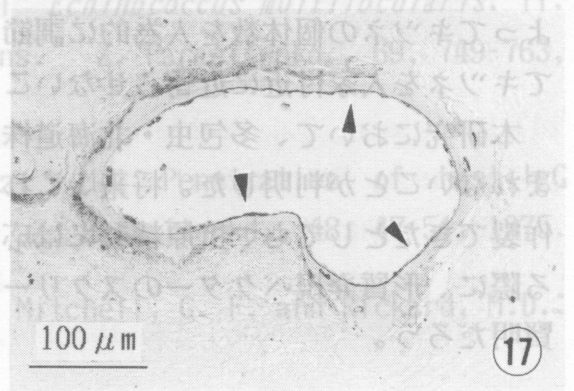
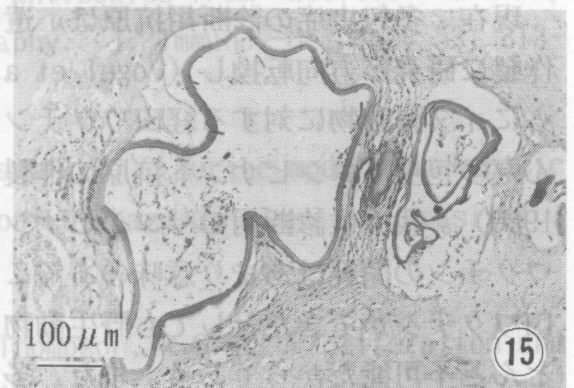
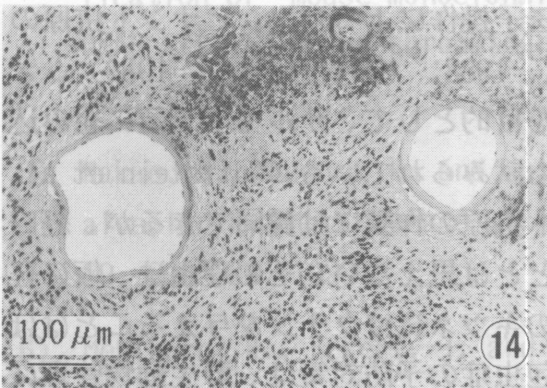
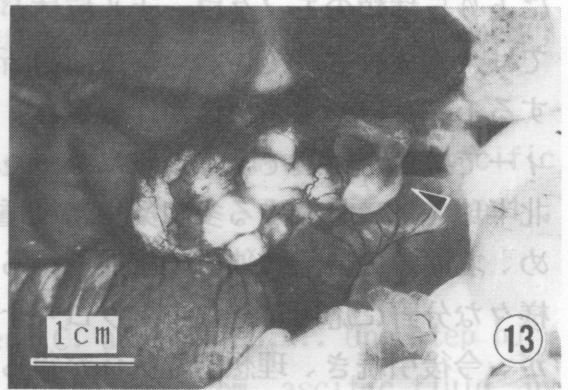
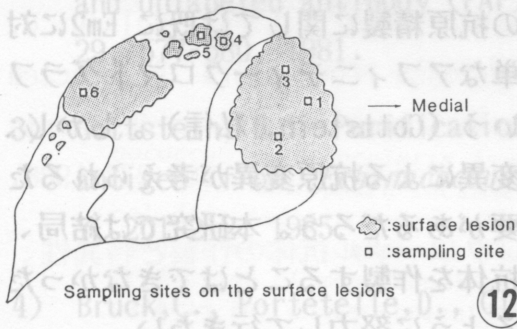
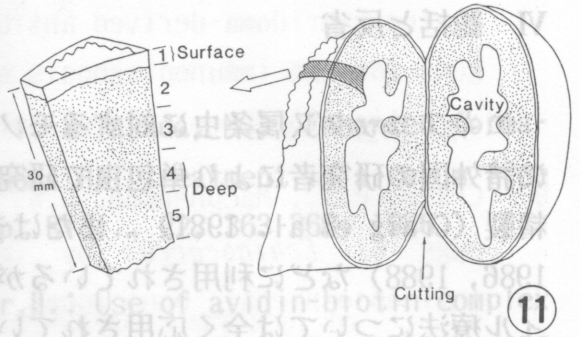
表2 チャイニーズハムスター腹腔内へのヒト多包虫病巣移植実験

移植病巣	動物数	陽性数 (%)
表層と深部 (図11)		
No.1 (表層)	1	1 (100)
No.2	2	0 (0)
No.3	2	0 (0)
No.4 (深部)	2	0 (0)
No.5 (深部)	1	0 (0)
表層 (図12)		
No.1 ~ 6	6	6 (100)
内部ホモジネート*	5	0 (0)

* 図11の No.2~3に相当する領域の病巣を滅菌PBS中でワーリングブレンダーにより細切し、動物の腹腔へ接種した。



Sampling sites classified according to depth of the lesion



VI 総括と反省

エキノコックス属条虫に対するモノクローナル抗体の作製については、主に諸外国の研究者により単包虫で研究されており、血清診断のための抗原の精製 (Craig et al. 1981)、またはテニア科条虫卵の同定 (Craig et al. 1986, 1988) などに利用されているが、放射線学的な診断や薬剤によるミサイル療法については全く応用されていない。多包虫に関しては、伊藤(1989)により5種類のモノクローナル抗体が作製されているが、その応用面に関しては全く検討されていない。血清診断用の抗原精製に関しては既に Em2 に対するモノクローナル抗体が作製され、簡単なアフィニティークロマトグラフィーで抗原が精製できるようになったという (Gottstein, 私信)。しかし、北半球各地に分布する多包条虫には種内変異による抗原変異が考えられるため、北海道の分離株独自の抗原を得る必要があるだろう。本研究では結局、様々な分野に応用可能なモノクローナル抗体を作製することはできなかったが、今後引き続き、理想的な抗体が得られるように努力して行きたい。

現在、多包虫症の診断用抗原は、遺伝子操作によるリコンビナント抗原の作製に研究が方向転換し (Vogel et al. 1988; Müller et al. 1989)、さらにイヌ科動物に対する経口ワクチンを目的として、サルモネラ菌に組み込んだ多包虫リコンビナント抗原の作製も試みられている (Gottstein et al. 1990)。我々は診断用のリコンビナント抗原の作製には賛同できるが、経口ワクチンの開発はあまり意味のあることとは思えない。その理由は、仮に経口ワクチンができたとしても野生動物のキツネにワクチンを与えることはほとんど不可能だからである。また、多包虫症の予防対策は、野生動物管理によってキツネの個体数を人為的に調節すること、生ゴミの適切な処理によってキツネを人家付近に近寄らせないこと等で実行可能だと考えるからである。

本研究において、多包虫・北海道株には診断用に適した抗原が微量しか含まれないことが判明した。将来、これら抗原に対するモノクローナル抗体が作製できたとしても、抗原精製には応用せず、リコンビナント抗原を作製する際に、形質発現ベクターのスクリーニング用プローブとして利用するのが賢明だろう。

VII 参考文献

- 1) Yabe, N., Matsuya, Y., Yamane, I. & Takada, M.: Enhanced formation of mouse hybridomas without HAT treatment in a serum free medium. *In vitro Cell. Develop. Biol.*, 22, 363-368, 1986.
- 2) Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577-580, 1981.
- 3) Gottstein, B.: Purification and characterization of a specific antigen from *Echinococcus multilocularis*. *Parasite Immunol.*, 7, 201-212, 1985.
- 4) Bruck, C., Portetelle, D., Glineur, C. and Bollen, A.: One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE affi-gel blue chromatography. *J. Immuno. Methods*, 53, 313-319, 1982.
- 5) Nakao, M., Nakaya, K. and Kutsumi, H.: Murine model for hepatic alveolar hydatid disease without biohazard. *Jpn. J. Parasitol.*, 39, 296-298, 1990.
- 6) Mehlhorn, H., Eckert, J. and Thompson, R.C.A.: Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. II. Ultrastructural investigations. *Z. Parasitenkd.*, 69, 749-763, 1983.
- 7) Coltorti, E.A. and Varela-Diaz, V.M.: Penetration of host IgG molecules into hydatid cysts. *Z. Parasitenkd.*, 48, 47-51, 1975.
- 8) Craig, P. S., Hocking, R. E., Mitchell, G. F. and Rickard, M.D.:

Murine hybridoma-derived antibodies in the processing of antigens for the immunodiagnosis of hydatid(*Echinococcus granulosus*) infection in sheep. Parasitol., 83, 303-317, 1981.

- 9) Craig, P.S., Macpherson, C.N. and Nelson, G.S.: The detection of eggs of *Echinococcus* by immunofluorescence using a specific anti-oncospherical monoclonal antibody. Am.J.Trop.Med.Hyg., 35, 152-158, 1986.
- 10) Craig, P.S., Macpherson, C.N., Watson-Jones, D.L. and Nelson, G. S.: Immunodetection of *Echinococcus* eggs from naturally infected dogs and from environmental contamination sites in settlements in Turkana, Kenya. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 82, 268-274,1988.
- 11) 伊藤美夫： 多包虫抗原に対するモノクローナル抗体の作製と特異性、北海道医学雑誌、64、484-491、1989.
- 12) Vogel, M., Gottstein, B., Müller, N. and Seebeck, T.: Production of a recombinant antigen of *Echinococcus multilocularis* with high immunodiagnostic sensitivity and specificity. Mole.Biochem. Parasitol., 31, 117-126, 1988.
- 13) Müller, N., Gottstein, B., Vogel, M., Flury, K. and Seebeck, T.: Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mole. Biochem. Parasitol., 36, 151-159, 1989.
- 14) Gottstein, B., Müller, N., Cryz, S.J., Vogel, M. Tanner, J. and Seebeck, T.: Humoral and cellular immune response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. Parasite Immunol., 12, 163-174, 1990.

VIII 学会発表抄録および原著

12th International Congress for Tropical Medicine and Malaria
Sep. 1988 Amsterdam

PRODUCTION OF MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY TO LARVAL *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*

Kutsumi H., & Nakao M.

Dept. Parasitology, Asahikawa Medical College, Japan.

Alveolar hydatidosis caused by the larval stage of *Echinococcus multilocularis* is a refractory zoonosis in the Northern Hemisphere including Japan. For the serological diagnosis in humans, the crude antigens are mostly used in several assays. Presented work deals with the production of monoclonal antibody to larval *E. multilocularis* for characterization and standardization of the antigens.

The spleen cells from infected BALB/c mouse were fused with myeloma cells (P3X63-Ag8.653) by PEG, and hybrid cells were grown in serum free medium (1). ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase Complex) method using paraffin section of alveolar hydatid was chosen as a screening assay. Two types of antibody reacted with the brood capsule and protoscolex were identified (Figs 1 & 2), and these cells were cloned by limiting dilution. Biochemical and immunological properties of the antigens purified by using monoclonal antibody will be discussed.

Reference

1 Yabe N et al. In Vitro 1986; 22: 363.