

原著

筋肉トリヒナ切片を用いた旋毛虫症の免疫診断

石田 邦夫^{1,2)} 八木 澤 誠²⁾ 稲 葉 孝 志³⁾ 神 谷 晴 夫^{1,4)}

抄録 10%ホルマリンまたはカルノア液で固定された旋毛虫感染マウス筋肉のパラフィン切片が、旋毛虫症の免疫診断抗原として利用可能かどうかを検討した。その結果、これらの両固定液で固定された標本のパラフィン切片は、間接蛍光抗体法 (IFA), 間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法 (IIP), ビオチン化抗体ペルオキシダーゼ標識ビオチン-アビジン反応 (P-BA), ならびに幼虫内沈降反応の抗原として使用可能なことが明らかとなった。

P-BA 法ではカルノア液固定切片を用いた方が、やや良好な成績が得られる傾向を示したが、IFA と IIP では両固定液間に有意な差異は認めなかった。

今後、この様なパラフィン切片は旋毛虫症の診断ばかりでなく、抗原の局在性の検討や、組織切片上に現れる線虫の虫種同定法としても利用可能であると考えられる。

弘前医学 55: 43-48, 2004

キーワード: 旋毛虫症; 免疫診断; 筋肉幼虫; パラフィン切片.

ORIGINAL ARTICLE
REVIEW

IMMUNODIAGNOSIS OF TRICHINELLOSIS BY USING MUSCLE STAGE LARVAL SECTIONS

Kunio Ishita^{1,2)}, Makoto Yagisawa²⁾, Takashi Inaba³⁾, and Haruo Kamiya^{1,4)}

Abstract Formalin-fixed and Carnoy's solution-fixed muscle larval sections of mice infected with *Trichinella nativa* were applied as antigen in the indirect immunofluorescent antibody test (IFA), indirect immunoperoxidase antibody test (IIP), peroxidase-labeled biotin-avidin complex reaction (P-BA), and intra-larval precipitin test (ILP). Carnoy's solution-fixed larval section in P-BA showed more sensitive reaction than those in IFA and IIP. IFA and IIP showed comparative reaction on both sections. It is suggested that the paraffin embedded sections are useful not only for the immunodiagnosis of trichinellosis but also immunohistochemical analysis of antigen and identification of unknown nematode species in paraffin embedded sections.

Hirosaki J. Med. J. 55: 43-48, 2004

Key words: *Trichinella* sp.; immunodiagnosis; muscle-stage larva; paraffin embedded section.

はじめに

旋毛虫症(Trichinellosis)は世界に広く分布する重要な人獣共通寄生虫病の一つである。本邦においても、1974年に青森県下で我が国最初の

人体症例が発見され¹⁾、以来札幌^{2, 3)}ならびに三重県下で⁴⁾本症の集団発生が報告された。また最近では輸入寄生虫症として相次いで報告されている^{5, 6)}。

本症の診断は臨床症状のみからでは困難で

¹⁾ 弘前大学医学部医学科寄生虫学講座

²⁾ 弘前大学医学部附属動物実験施設

³⁾ 弘前大学医学部保健学科検査技術科学専攻

⁴⁾ 別刷請求先: 神谷晴夫

平成 15 年 8 月 29 日受付

平成 15 年 9 月 8 日受理

¹⁾ Department of Parasitology, Hirosaki University School of Medicine

²⁾ Institute for Animal Experiments, Hirosaki University School of Medicine

³⁾ Department of Medical Technology, Hirosaki University School of Health Sciences

⁴⁾ Correspondence: H. Kamiya

Received for publication, August 29, 2003

Accepted for publication, September 8, 2003

あり, 筋生検や免疫血清学的検査を試みる必要がある⁷⁾. 免疫診断法として従来実用に供され, 且つかなり特異性が高いとされているものには, ゲル内沈降反応, 免疫電気泳動, カウンター免疫電気泳動, ラテックス凝集反応, 幼虫周囲沈降反応, 間接蛍光抗体法, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) などを挙げる事ができる^{8,9)}. これらの診断法に用いられる抗原は筋肉内から分離した虫体の抽出液そのもの, この抗原をラテックス粒子やポリスチレンに結合させたもの, あるいは虫体そのもの, などであるが, これらの抗原の作製には特殊な設備, 時間, 労力を要する場合が多い. 一方, 最近では Polymerase chain reaction (PCR) の有用性も示唆されている^{10,11)}.

すでに我々は, ホルマリン固定の住血吸虫虫卵の切片標本が卵内沈降反応^{12,13)}, 間接蛍光抗体法^{12,14)}, 間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法¹³⁾ に使用可能であり, 実用的意義の高いことを指摘してきた. 今回は, このようなホルマリン固定, あるいはカルノア液固定筋肉トリヒナ切片が間接蛍光抗体法, 免疫ペルオキシダーゼ酵素抗体法, ビオチン化抗体ペルオキシダーゼ標識アビジン反応, ならびに, 幼虫内沈降反応に応用可能かどうかを検討した.

材料ならびに方法

旋毛虫: 北海道大学獣医学部でホッキョクグマから分離され, 以後実験室内で継代維持されてきた *Trichinella nativa* を使用した.

抗原: 6週齢ddY系マウスに本種を感染させ, 10週後の筋肉内幼虫を保有する筋肉をカルノア液または10%ホルマリンで固定し, 通常のパラフィン包埋を行い, 薄切し, 以下の免疫血清診断法の抗原として用いた. また, 間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法では, このパラフィン切片に加えて, 人口胃液 (0.2% HCl, 0.2% ペプシン) で筋肉を消化して集めた筋肉虫体をカルノア液または10%ホルマリンで固定し, その後, これらの虫体を卵白に包埋し, 薄切した切片を抗原として

用いた.

血清: 患者血清は1979年北海道札幌市でヒグマの肉から感染した8症例のもので, これらの血清は全て幼虫周囲沈降反応陽性で, 使用に供するまで -80°C で冷凍保存されていた³⁾. 健康人血清は東京在住の健康人20人から採取し, -80°C で凍結保存しておいたものである.

間接蛍光抗体法 (Indirect Immunofluorescent Antibody Test; IFA): 筋肉トリヒナのパラフィン切片を抗原とし, Kamiya & Kamiya¹²⁾の方法により実施した. FITC 標識抗ヒト IgG 血清は64倍希釈のものを用いた.

間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法 (Indirect Immunoperoxidase Antibody Test; IIP): 筋肉トリヒナのパラフィン切片, ならびに筋肉から分離した幼虫を卵白中に包埋して得た切片を抗原として, 神谷ら¹⁵⁾の方法により反応を行った. ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 血清は320倍希釈のものを用いた.

ビオチン化抗体ペルオキシダーゼ標識

アビジン反応 (Peroxidase Labeled Biotin-Avidin complex reaction; P-BA): 前述の2法と同様に, パラフィン切片を抗原として, Guesdon et al.¹⁶⁾の方法により実施した. ビオチン化抗ヒト IgG は320倍希釈のものを, また, ペルオキシダーゼ標識アビジンは2048倍希釈のものを用いた.

幼虫内沈降反応 (Intra-larval precipitin Test; ILP): パラフィン切片を抗原として, Kamiya¹³⁾の方法により, 反応を行った.

結 果

IFA

ホルマリン固定標本のパラフィン切片, カルノア液固定標本の切片のいずれかにおいても, 8例の患者血清は, 希釈倍率1:160以上で陽性であった (Table 1). これに対して対照の健康人血清は全例1:10で陰性であった. IFAの特異蛍光はホルマリン固定切片ではクチクラに強く認められ, カルノア液固定切片では, 体腔や体の内部構造に強い特異蛍光が認められた.

Table 1. Distribution of IFA titers in *Trichinella nativa* infected patients and non-infected controls, as determined by using formalin or Carnoy's solution-fixed preparations

IFA titer	No. of cases in infected patients		No. of cases in non-infected controls	
	Formalin*	Carnoy's**	Formalin*	Carnoy's**
1280	1	1	0	0
640	4	4	0	0
320	1	2	0	0
160	2	1	0	0
< 10	0	0	20	20
Total	8	8	20	20

IFA (Indirect Immunofluorescent Antibody) tests were carried out using muscular larval sections fixed in formalin(*) or Carnoy's solution(**).

Table 2. Distribution of IIP titers in *Trichinella nativa* infected patients and non-infected controls, as determined by using formalin or Carnoy's solution-fixed preparations

IIP titer	No. of cases in infected patients				No. of cases in non-infected controls*
	Formalin- I ¹⁾	Formalin- II ²⁾	Carnoy's- I ³⁾	Carnoy's- II ⁴⁾	
12800	2	2	2	5	0
6400	4	4	3	0	0
3200	2	2	3	3	0
100	0	0	0	0	1
< 100	0	0	0	0	19
Total	8	8	8	8	20

IIP: Indirect immunoperoxidase antibody test.

- 1) Sections of formalin-fixed larvae embedded in egg albumin.
- 2) Sections of formalin-fixed infected muscle.
- 3) Sections of Carnoy's solution-fixed larvae embedded in egg albumin.
- 4) Sections of Carnoy's solution-fixed infected muscle.

* Identical results were obtained from four kinds preparations (Formalin- I & II and Carnoy's- I & II)

Table 3. Distribution of P-BA titers in *Trichinella nativas* infected patients and non-infected controls, as determined by using formalin or Carnoy's solution-fixed preparations

P-BA titer	No. of cases in infected patients		No. of cases in non-infected controls***
	Formalin*	Carnoy's**	
25600	1	4	0
12800	1	4	0
6400	6	0	0
< 100	0	0	20
Total	8	8	20

P-BA: Peroxidase labeled Biotin-Avidin complex reaction.

* Sections of 10% formalin fixed-infected muscle.

** Sections of Carnoy's solution-fixed infected muscle.

*** Identical results were obtained from either formalin or Carnoy's solution-fixed preparations.

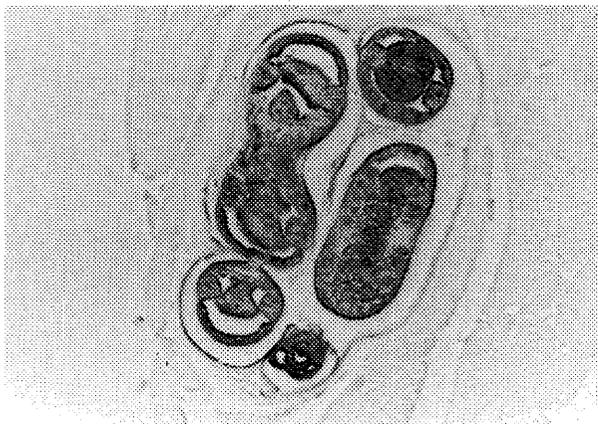


Fig. 1 P-BA (peroxidase labeled biotin-avidin complex) positive reactions in the section of Carnoy's solution-fixed infected muscle. Note prominent reaction products in the internal organs of *Trichinella nativa* larvae. $\times 400$.

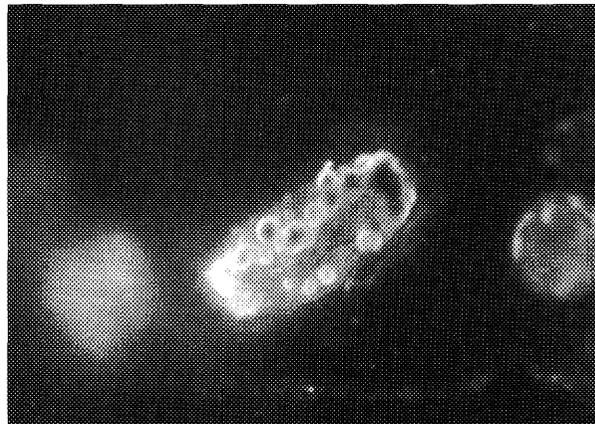


Fig. 2 ILP (intra-larval precipitin) positive reactions, as shown by IFA following ILP reaction, in the section of Carnoy's solution-fixed infected muscle. Note specific fluorescence in line with the droplet-like precipitates in the larval section of *T. nativa*. $\times 400$

IIP

患者血清8例のIIP抗体価の分布はTable 2の通りで、IFAより感度が高く、患者全例が1:3200以上で陽性であった。対照の健康人血清は1例が1:100を示した他は、全て1:100で陰性であった。

ホルマリンやカルノア液で固定した筋肉のパラフィン切片をそのまま用いても、また、筋肉内幼虫を人工消化して分離し、これをそれぞれの固定液で予め固定し、その後、卵白に包埋した切片を用いても、IIP抗体価には有意な差異が認められなかった。ホルマリン固定標本とカルノア液固定標本を用いたIIPの特異染色部位はIFAで認められた所見とほぼ同様であった。

P-BA

P-BAにおける患者血清ならびに健康人血清の抗体価分布はTable 3に表示した。IIPと同様にP-BAの感度はIFAに比べると著しく高い。8例の患者血清は全て1:6400以上で陽性であり、対照は全て1:100で陰性であった。

ホルマリン固定とカルノア液固定の切片を比べると、カルノア液固定標本の方が一般に抗体価が高く、安定した成績が得られる傾向がみられた。

特異染色部位は主として幼虫の内部組織に認められ (Fig. 1), P-BAでは背景の非特異的染色が極めて弱いのも特徴の一つであった。

ILP

カルノア液固定筋肉切片を用いて、ILPを行ったところ、37°Cで2日間反応後に、幼虫体切片上に滴状の沈降物形成が認められた。これをIFAによって染色したところ、Fig. 2に示す様に、特異蛍光が沈降物に一致して認められ、これが抗原抗体複合物であることが証明された。

考 察

すでに、神谷らは日本住血吸虫卵に耐熱性抗原が存在することに着目して、ホルマリン固定組織切片を蛍光抗体法^{12,14)}や間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法¹⁵⁾に応用し、これによる免疫診断が可能であることを報告してきた。また、旋毛虫でも、Kamiya¹⁷⁾は耐熱性抗原が筋肉内幼虫に存在することを明らかにし、自然乾燥筋肉内旋毛虫幼虫が幼虫周囲沈降反応(circumlarval precipitin reaction; CLP)の抗原として利用できることを明らかにしている。

今回の結果、感染動物筋肉のホルマリン固定

あるいはカルノア液固定材料のパラフィン切片がIFA, IIP, P-BA, ILPの全ての反応に利用可能であることが明らかになった。ただ、この方法の他種寄生虫症との交叉反応性については今後の検討にまたねばならないが、本抗原を用いたIIPやP-BAは極めて鋭敏な血清反応と言えよう。特に、P-BAはIFAやIIPに比べると手技がやや複雑であるという難点を有するものの、切片の非特異的染色が少なく、得られる抗体価が高い利点がある。また、ILPは定量性にやや欠けるが、標識抗ヒトIgG血清を必要とせず、手技が簡単であることなどの利点から発展途上国など器材に恵まれない流行地では、幼虫周囲沈降反応と同様に実用性が高い診断法と考えられる。

今回のIFAとIIPの成績では、ホルマリン固定とカルノア液固定材料との間に、特異染色の局在性に若干差異を認めた。つまり、ホルマリン固定標本ではクチクラに強い反応が認められ、カルノア液固定標本では体腔や内部器官に強い反応が認められたからである。これらは、いずれも耐熱性抗原であるという共通点はあるものの、それぞれの固定液に対する反応性が異なることから、抗原の物理化学的性状にはかなり差異のあることも考えられよう。パラフィン切片を用いたIFA, IIP, P-BAは、さらに今後、虫体組織内抗原の局在性の検討や、組織切片上にしばしば現れる線虫の虫種同定のための診断法の一つとしても利用可能なものと期待される。しかし、この場合、特に、固定液の差による免疫学的反応性の差に注意を払う必要があるものと考えられる。

尚、感染マウスの筋肉をそのまま固定液に浸漬して固定した標本のパラフィン切片と虫体を人工胃液で消化し、分離した虫体を予め別々に固定し、しかる後にアルブミンで包埋したものの切片標本との間に、成績に差異を認めなかったことから、パラフィン切片を用いる限り、前者がより簡便で実用性が高いものと考えられる。しかし、背景の非特異的染色をできるだけ減少させる目的からすれば、後者の効用も大き

いかかもしれない。

結論として、ホルマリン、またはカルノア液固定材料のパラフィン切片を用いたIIPやP-BA, ILPは、簡便且つ実用性の高い旋毛虫症の免疫診断法として、特に、研究設備の完備していない流行地において、有用となるものと考えられる。ただ、今後、他種寄生虫症との交叉反応の有無の検索とともに、治療後の抗体価の消長についての検討も必要となるものと思われる。

結 論

10%ホルマリンまたはカルノア液で固定された旋毛虫感染マウス筋肉のパラフィン切片が旋毛虫症の免疫診断抗原として利用可能かどうかを検討した。その結果、これらの両固定液で固定された標本のパラフィン切片は、間接蛍光抗体法(IFA)、間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法(IIP)、ビオチン化抗体ペルオキシダーゼ標識ビオチン-アビジン反応(P-BA)、ならびに幼虫内沈降反応の抗原として使用可能なことが明らかとなった。

P-BA法ではカルノア液固定切片を用いた方が、やや良好な成績が得られる傾向を示したが、IFAとIIPでは両固定液間に有意な差異は認めなかった。

今後、この様なパラフィン切片は旋毛虫症の診断ばかりでなく、抗原の局在性の検討や、組織切片上に現れる線虫の虫種同定法としても利用可能であると考えられる。

文 献

- 1) 山口富雄, 高田伸弘, 八木澤誠, 稲葉孝志, 小山内はるみ, 花田勝美, 村山芳郎 他. わが国で初めて発症をみた旋毛虫症について. 日本医事新報 1975;No.2668:16-21.
- 2) Ohbayashi M, Yamaguchi T. An outbreak of human trichinosis in Hokkaido, Japan. Program and Summary of Sino-Japanese Seminar on Parasitic Zoonoses 1980;82-6.
- 3) 手林明雄, 村越敏雄, 箭原修, 相川忠弘, 阿部庄作, 村尾誠, 神谷晴夫他. 長期間冷凍された熊肉によって集団発生した旋毛虫症. 日本医事新報

- 1981;No2971:46-9.
- 4) Yamaguchi T, Yagisawa M, Inaba T, Huang W H, Ishida K. Epidemiological aspects of trichinellosis in Japan. Program and Summary of Sino-Japanese Seminar on Parasitic Zoonoses 1982;117-24.
 - 5) 楠原康弘, 前野芳正, 古川博, 長瀬啓三, 浅野慎介, 長谷川みどり, 川島司郎. ビルハルツ住血吸虫と旋毛虫が重複感染した1症例. 藤田学園医学会誌1998;22:195-7.
 - 6) 塩田恒三, 有蘭直樹, 吉岡徹郎, 石川和弘, 藤竹純子, 藤井逸人, 立岡良久他. 強い筋炎症状を呈した輸入旋毛虫症の1例. 感染症学雑誌1999;73:76-82.
 - 7) 神谷晴夫, 稲葉孝志. 骨格筋症候群 その他の神経疾患を含めて 炎症性ミオパチー 寄生虫性ミオパチー 旋毛虫症. 日本臨床別冊骨格筋症候群(上巻) 2001;269-73.
 - 8) Kagan IG. Serodiagnosis of parasitic disease. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, editors. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986. p.467-87.
 - 9) 山口富雄. 旋毛虫症. 病理と臨床 1983; 1:1427-32.
 - 10) Caballero-Garcia ML, Jimenez-Cardoso E. Early detection of *Trichinella spiralis* infection by the polymerase chain reaction in blood samples of experimentally infected mice. Parasite 2001;8(2 Suppl):S229-31.
 - 11) Noeckler K, Reiter-Owona I, Heidrich J, Protz D, Rehmet S, Sinn G, Ammon A. Aspects of clinical features, diagnosis, notification and tracing back referring to *Trichinella* outbreaks in north Reine, Westphalia, Germany 1998. Parasite 2001;8(2 Suppl):S183-5.
 - 12) Kamiya H, Kamiya M. Preliminary application of a formalin fixed tissue section to the indirect fluorescent antibody test and intraoval precipitin reaction for the diagnosis of schistosomiasis japonica. Jpn J Vet Res 1980; 28:155-60.
 - 13) Kamiya H. Technique of the intraoval precipitin (IOP) reaction by using formalin fixed tissue section for the diagnosis of schistosomiasis. Jpn J Parasitol 1981;30:161-5.
 - 14) Kamiya H, Suzuki T, Matsuda H, Tanaka H. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) on formalin-fixed liver-egg sections for the diagnosis of schistosomiasis. Southeast Asian J Trop Med Publ Hlth 1982;13:249-56.
 - 15) 神谷晴夫, 鈴木俊夫, 松田肇, 田中寛. 間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法による日本住血吸虫症の免疫診断. 寄生虫誌 1981;30:587-96.
 - 16) Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of Avidin-Biotin interaction in immunoenzymatic technique. J Histochem Cytochem 1979;27:1131-9.
 - 17) Kamiya H. Immunodiagnosis of trichinosis: An application of air-dried *Trichinella spiralis* muscle larvae in the microprecipitin test. Jpn J Parasit 1982;31:401-6.