

肝蛭体表面の組織化学的研究

吉田安雄*
羽山正義**
赤羽啓栄***

はじめに

肝蛭は元来ウシ、ヤギ、ヒツジなど反すう動物の寄生虫として広く知られてきたが、近年人体寄生例がしばしば報告されている。この疾患の主症状は、腹痛、発熱、衰弱、呼吸器症状などのほか、好酸球、白血球数が著しく増加する疾患である。筆者らは肝蛭症の基礎的資料を得るために、実験的肝蛭症を試み、臨床病理学的立場から検索をし報告してきている(吉田ら 1977年)。一連の肝蛭感染実験において蛍光抗体法(間接法)を行なったところ(未発表)、肝蛭虫体の体表面(tegment)にのみ抗体が選択的に結合することを確認したので、更に抗体結合部位の性状を明らかにするために複合糖質の組織化学的検索を中心に行なった、その光学顕微鏡的観察結果を報告する。

材料および方法

材料としては感染実験に用いたウサギ感染後60日目で死亡した寄生虫体をパラフィンブロック化したものを3 μ に薄切して用いた。固定は4%パラホルムアルデヒド-2%酢酸カルシウム(CAF)溶液で24時間冷固定を行なった。染色方法は通常の組織学的な検索のため、HE, Azan mallory, Elastica, PTAH 染色, 糖質染色法として PAM, PAS, Alcian blue pH2.5 あるいは pH1.0, Scott の臨界電解質濃度理論に基づく Alcian blue 法, high iron diamin (HID) 法, コロイド鉄染色, aldehyde fuchsin 染色及び勝山らの開発した新しい組織化学的粘液染色法である Concanavalin A パラドックス染色法(I, II, III)を行なった。

Concanavalin A パラドックス染色法は勝山らにより開発された染色方法で、レクチンの一種である Concanavalin A がマンノース及びブドウ糖に特異的に結合することを利用し、糖蛋白質に対する結合が酸化還元処理をすることにより変化するという勝山らの実験結果に基づいており、その処理方法により I 型, II 型, III 型の粘液を区別して染め分ける染色法である。

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

** 信州大学医学部第二病理学教室

*** 福岡大学医学部寄生虫学教室

Concanavalin A パラドックス染色手技

I) I型粘液染色法

- ① 脱パラ, 水洗。
- ② 水洗後 PBS に移す。
- ③ Con. A 溶液 20~30分。
- ④ PBS I, II, III 各5分。
- ⑤ HRP 溶液 15~30分。
- ⑥ PBS I, II, III 各5分。
- ⑦ DAB 溶液 5~10分。
- ⑧ 流水水洗。
- ⑨ 脱水, 透徹, 封入。

II) II型及びIII型粘液染色法 (PA-Con A-HRP)

- ① 脱パラ, 水洗。
- ② 水洗後, 蒸留水に移す。
- ③ 1%過ヨウ素酸ナトリウム (PA) 水溶液 (酸化) 10~60分。
- ④ 水洗。
- ⑤ 以下I型粘液染色法に準ずる。

III) III型粘液染色法 (PA-Red-Con A-HRP)

- ① 脱パラ, 水洗。
- ② 水洗後, 蒸留水に移す。
- ③ 1%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (酸化) 10~60分。
- ④ 水洗。
- ⑤ 0.2% NaBH₄ の1% Na₂HPO₄ 水溶液 (還元) 2分。
- ⑥ 水洗。
- ⑦ 以下I型粘液染色法に準ずる。

染色液及び試薬の調製

I) リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)

塩化ナトリウム (NaCl)	72 g
リン酸水素ナトリウム (Na ₂ HPO ₄)	14.8 g
リン酸二水素カリウム (KH ₂ PO ₄)	4.3 g

蒸留水で 2000ml とし, 使用時に 5 倍に希釈する。

II) ConA 溶液 (0.1% Con A の PBS 溶液)

Concanavalin A	0.1 g
PBS	全量 100ml

III) HRP 溶液 (0.0005% HRP の PBS 溶液)

西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horse Radish Peroxidase)	0.5mg
PBS	全量 100ml

IV) DAB 溶液

3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	3 mg
トリス緩衝液 (pH7.0, 0.05M)	全量 10ml
3%過酸化水素水を上記溶液 10ml あたり 1 滴加える	

染色結果, I 型とは Con A-HRP 染色 (HRP; Horse radish peroxidase) にのみ陽性のもの, II 型とは PA-Con A-HRP 染色にのみ陽性のものをいい, III 型とは酸化後 II 型と同様強い反応性を示すが, 酸化後の還元により, 更に Con A 反応性が高まるものをいう。更に III 型粘液は短時間酸化 (10分) した場合 III 型反応を示すにもかかわらず, 長時間酸化 (60分) では Con A 反応性を失ってしまう不安定 III 型を 60分酸化で Con A 反応性を消失しない安定型と区別している。今回の実験では酸化時間は 10分とし, 不安定 III 型の検出だけ試みた。

結果及び考察

肝蛭の体表面 (外被) の顕微鏡的構造は, 外層から surface coat, surface membrane, distal cytoplasm, basement membrane, muscle の 5 層から形成されていると考えられている (Fig. 1)。

染色性の観察結果は, PAM 染色では basement membrane は黒色に染色され, surface membrane は淡黒色調を示した (Fig. 2.)。PAS 染色では surface membrane は赤色の強陽性を示し, basement membrane 及び distal cytoplasm も陽性を示した。しかし, surface coat は淡赤色調で弱陽性~陰性であった (Fig. 3A)。

一般に, Cestoda 及び Fasiola などの surface membrane は mucopolysaccharides 及び mucoprotein で覆われていると考えられ, glycocalyx (Bennet) あるいは surface coat と呼ばれている。surface coat は PAS 染色と強く反応すると現在までの研究で考えられていた (Stirewalt) が, 今回の筆者らの検索では PAS 染色はむしろ弱陽性であった。Concanavalin A-HRP (Con A-HRP) 染色では surface coat 及び distal cytoplasm は褐色に染色され Con A に強い親和性を示した (Fig. 3B)。PAS-Con A-HRP. (PAS 反応後の Con A 反応性: この場合 Con A 反応性は III 型) 染色法では surface membrane は PAS 染色陽性を示すが (Fig. 4), surface coat は Con A と強く結合し褐色に染色され不安定 III 型粘液の存在を示した。PA-Reduction-Con A-HRP 染色でも surface coat は明瞭な褐色の染色性を示した (Fig. 5.)。Alcian blue pH 2.5 染色及び colloidal iron 染色では, surface coat の外側に濃青色の染色性を示す層が認められ surface coat は 2 層構造として観察された (Fig. 6A, 6B.)。この層は High iron diamine. (HID)-AB pH 2.5 の重染色法では, AB pH 2.5 の単染色と同様の染色結果を示し, HID で染色さ

Table. 1 各種染色性における肝蛭体表面の染色性

	surface coat		surface	distal		basement	muscle
	outer	inner	membrane	cytoplasm	membrane		
Azan mallory Elastica	red	red	blue	red	blue	blue	red
PTAH	BV	V~B	BV	BV~V	B		BV
PAM	+	-	++	-	##		-
PAS	+	+~±	##	+	++		+~-
Alcianblue pH 2,5	++	-	-	-	-		-
critical electrolyte concentration (CEC) concentration of MgCl ₂ (Mole)	0.00	##	++	##	+	++	+
	0.025	##	++	##	+	++	+
	0.05	++	+	++	+	++	+
	0.10	++	±	+	-	+	-
	0.15	++	-	±	-	+	-
	0.20	++	-	±	-	-	-
	0.30	+	-	-	-	-	-
	0.45	+	-	-	-	-	-
	0.65	+	-	-	-	-	-
	0.80	-	-	-	-	-	-
1.00	-	-	-	-	-	-	
Alcian blue pH 1.0	±	-	-	-	-		-
HID	±	-	-	-	-		-
Colloidal iron	##	+	+~++	±	-		±
ConA-HRP-DAB	##	##	+?	-	±		-
PA-ConA-HRP-DAB	##	##	+?	-	-		-
PA-R-ConA-HRP-DAB	++	++	+?	-	-		-
Sudan black B	+?	-	-	-	-		-
Tetrazonium	++	+	+	+	+		+

B: brown BV: bluish violet

れる層は認められなかった, したがって surface coat の2層構造の外側はシアル酸がほとんどであると考えられる。

従来肝蛭の体表面は5層と考えられていたが, surface coat の外側に存在する陰性荷電(シアル酸)層を加えると6層構造をなしているとも考えられる (Table 1. Fig. 1)。

蛍光抗体法で肝蛭体表面に特異的な反応を示したことに着目して行なった組織学的性状についての顕微鏡的, 観察は電顕的考察を加えなかったが組織化学的染色法により, ある程度肝蛭外被の構造と性状を明らかにすることができた。その染色結果と蛍光抗体法による免疫染色の結果とを照合し観察すると, surface coat から distal cytoplasm にかけての外被は蛍光抗体法による陽性部位にほぼ一致することがわかった。つまり肝蛭の抗原として大きな役割を荷う部分が体表面に存在し, それは Con A と強い親和性を持つ糖蛋白質であるということが証明できた。更に, 筆者らは surface coat の外側に colloidal iron あるいは AB-pH2.5 と強い結合を示し, 陰性に荷電している層の存在を確認すると共に, この層がどのような役割を荷っているかという興味深い知見も得られた。

以上, 筆者らが検索した肝蛭体表面層の糖タンパク質の分布は免疫学的, あるいは生存環

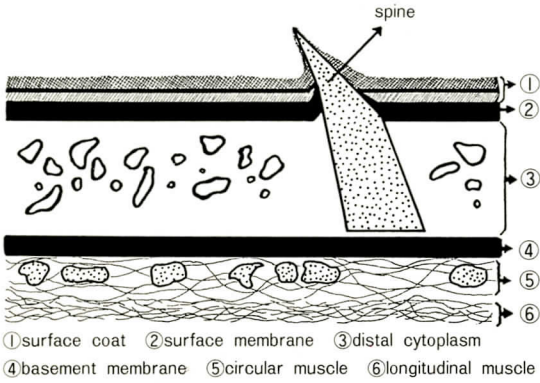


Fig. 1 肝蛭体表面の模式図

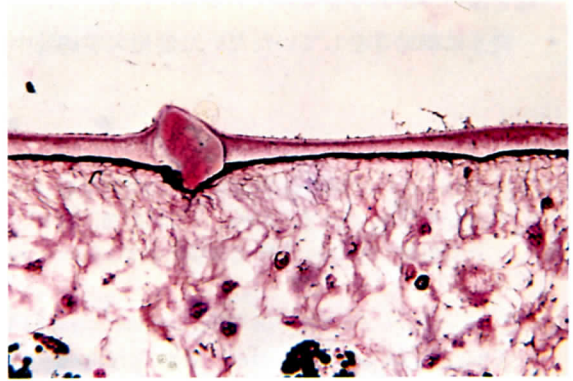


Fig. 2 PAM染色×400

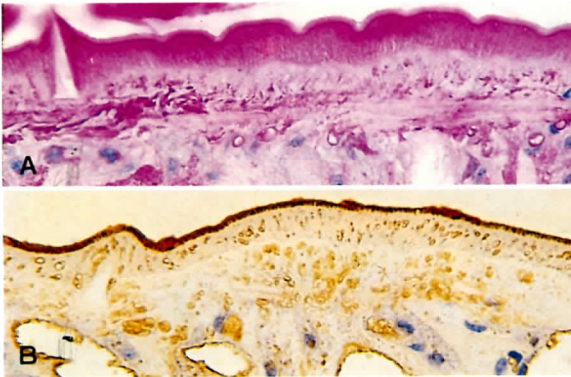


Fig. 3 A. PAS B. Con A-HRP
×400

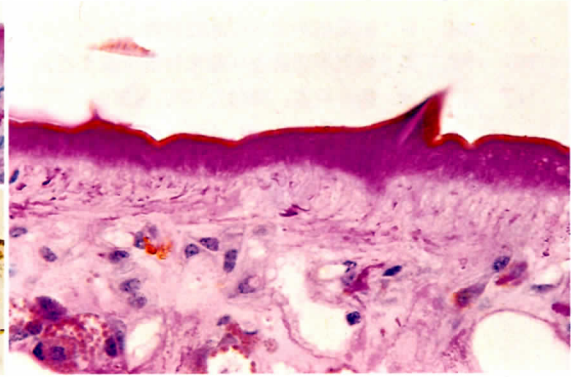


Fig. 4 PAS-ConA-HRP
×400

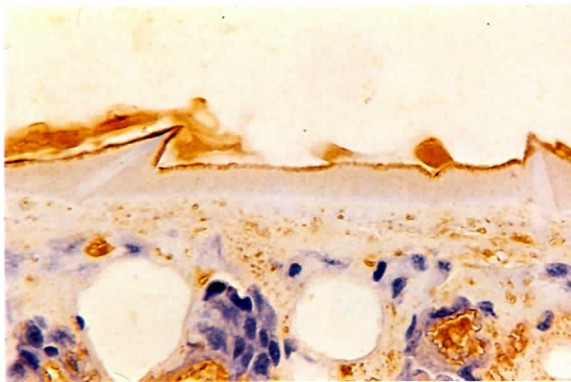


Fig. 5 PA-Reduction-Con A-HRP
×400

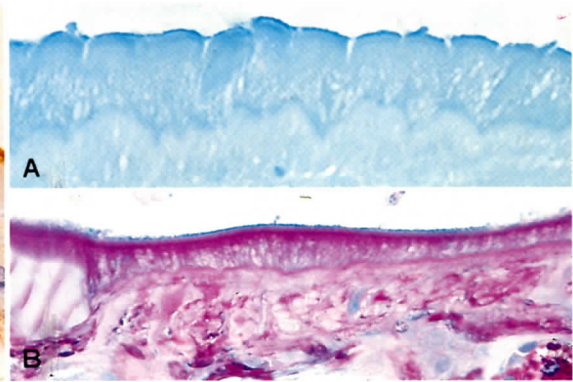


Fig. 6 A. Alcian blue pH 2.5×400
B. Colloidal iron-PAS ×400

境と深いかかわりをもっているものと考えられる。

終りに御助言をしていただいた信州大学病院中央検査部勝山努助教授に深謝します。

文 献

- 1) Ross, J.G. (1966): Single experimental infection of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* J. Comp. Path., 76, 67-81.
- 2) 吉田安雄: 肝蛭症に関する実験的研究(1) ウサギにおける血液学的性状の推移. 寄生虫誌, 26, 5.
- 3) Hiroshige AKAHANE: Biochemical studies of Fascioliasis (2) Dynamics of Sequential Changes of Serum Protein and Serum Protein Fractions in Rabbits Infected with *Fasciola* sp. Jap. J. Parasit., 30(1), 31-36, 1981
- 4) Katsuyama T. Spicer S.S.: J. Histochem. Cytochem. 24, 233-250, 1978
- 5) 小川和郎ら: 新組織化学, 朝倉書店, 1975
- 6) 岡本耕造: 顕微鏡的組織化学(上) 4版, 165-194, 医学書院, 1976
- 7) 勝山 努: 医学のあゆみ, 101(3), 126-127, 1977
- 8) 勝山 努: 組織細胞化学の基礎技術と応用, 日本組織細胞化学会編, 1978
- 10) 寺島 寛: 病理形態検査(臨床技術全書 8巻), 医学書院, 136, 1978
- 11) 羽山正義: 衛生検査, 28(3), 270, 1979

(1983年 9月30日 受付)