

## 寄生蠕虫類の免疫電気泳動法について

辻 守 康

広島大学医学部寄生虫学教室

(昭和49年5月20日 受領)

### はじめに

免疫電気泳動法が Grabar & Williams (1953) によつて確立されて以来, 本法を用いての研究が医学領域などにおいて広く行なわれるようになり, 寄生虫学領域においてもマンスン住血吸虫について Biguet ら(1962 a) および Kent (1963), 糸状虫について Biguet ら(1962 b), 包虫について Kagan & Norman (1963), 肝蛭について Capron ら(1964), 肺吸虫について Capron ら(1965) および辻ら(1968), 日本住血吸虫について Tsuji & Yokogawa (1972) 等の報告があつて多くの興味ある成績が得られている. この免疫電気泳動では各寄生虫によつて得られる泳動像が異なり, それぞれに特有な特異沈降帯 (specific band) を証明することなどから免疫学的な面での種 (species) の鑑別に役立つことが知られるようになり, また最近では患者血清を用いて他の血清反応とともに異所寄生の場合などの補助的診断法として応用することも試み始められている. 本法の利点は他の血清反応, 例えば補体結合反応や凝集反応と異なり泳動板が保存出来ること, 沈降帯をその位置により解析出来ることおよび再現性が高いことであるが, それだけに泳動の条件など技術的問題が重要となる. そこで今回著者は抗原の比較, 支持体の検討など主として免疫電気泳動法の基礎的諸問題についての検討を行なつたのでその結果について紹介する.

### I. 免疫電気泳動の方法

免疫電気泳動法は基本的には Grabar & Burtin (1964) の方法に準じ, それに若干の改良を加えて行なつた. すなわち pH 8.2 のペロナール緩衝液 (パルピタールナトリウム 160 g を 7 l の蒸留水に溶かし, これに 220 ml の 1/10 N-HCl 液を加えさらに蒸留水を補充して全量 10 l とする) に agarose を 0.9% の割合になるように加えて 85~

90°C で加熱溶解したものを支持体としている. この加熱 agarose 液を 11 cm × 6 cm のガラス板上にメスピペットを用いて 10.0 ml (微量法の場合は 7.5 cm × 2.5 cm のスライドガラス上に 3.0 ml, 8.0 cm × 8.0 cm では 9.5 ml) 載せ agarose が固まるまで静置して寒天板をつくる. この寒天板の中心より陰極寄りに直径 5 ~ 4 mm の抗原孔をあけて抗原を充填したのち, 寒天板と泳動槽内のペロナール緩衝液をワットマン No. 1 の濾紙で連結して泳動を行なう. 使用抗原は虫体の 0.1% 食塩水抽出液を用いる. すなわち乾燥虫体を乳鉢に入れて 0.1% 食塩水とともに凍結し, これを乳棒を用いて磨砕しながら融解したのち, 再び凍結する. この凍結融解を 2 日間にわたつて 6 ~ 8 回繰り返して抽出したのち, 30,000 rpm (10,000 rpm でも可), 1 時間冷凍遠心し, その上清をピスキングチューブで 12 時間透析する. 透析後凍結乾燥したものが 0.1% 食塩水抽出抗原粉末で長期保存に耐えるが, 使用の際はこの粉末抗原 20 mg を 0.1 ml の蒸留水に溶かしたのちを用いる. なお, 血清溝は泳動方向と平行に幅 2 mm, 長さ 90 mm とし (微量法では 1 mm × 60 mm), 最も近い抗原孔との距離は 7 mm (微量法では 3 mm) が最適である. 泳動条件は泳動板の両端, すなわち寒天板上の陰陽極の電圧差が  $20 \pm 2$  V/11 cm length になるように直接テスターを用いて調節し, 5 時間 30 分 (微量法では  $20 \pm 2$  V/7.5 または 8.0 cm length, 3 時間) 通電泳動する. 泳動終了後に血清溝の寒天を除去して 1/3 に濃縮した血清を添加する. これらの操作を終えたのち寒天水分が蒸発しないように湿状態の拡散箱に入れて室温で 12 時間, さらに 4°C の氷室に 48 時間静置して毎日そこに出現する沈降帯を観察記録する. その後寒天板をペロナール加生理食塩水 (ペロナール緩衝液 0.5<sup>1</sup> に生理食塩水 9.5 l を加えたもの) に入れて 1 日 1 回液をとり替えながら 3 日間洗滌し, ワットマン No. 1 濾紙 (東洋濾紙 No. 50 でも可) に包んで乾燥後, アミドブラック 10B で染色, 2% 酢酸液で脱色して自然乾燥

本研究の一部は文部省科学研究費および WHO 研究費によつた.

し、最終観察を行なったのち保存標本とする。

II. 支持体としての寒天

寒天電気泳動では支持体の選択如何によつて得られる成績が異なることは知られており、出来ればすべての研究者が同一寒天を用いて実施することが望ましいが、現実には輸送の問題あるいは経済的理由などにより必ずしも世界各国の研究者が同一支持体を使用することは容易ではない。現在他の分野において最も広く用いられているのは Difco の special agar noble であるが、寄生虫学領域殊に蠕虫類の免疫電気泳動ではマンソン住血吸虫や

肝蛭の特異沈降帯の同定が最初に Marque の agarose を用いてなされたことから同製品が使用されることが多い。しかしわが国においては同製品が入手困難な場合もあるので、さきの Difco の special agar noble の他に Nakarai の agarose, Chugai の special agar, Wako の special agar powder A および B, Schuchardt の agarose, Behringwerke の agarose, Sigma の agarose, Oxoid の ionagar, Difco の bactoagar など比較的手し易い支持体との比較を試みた。

その結果は Table 1 にみられる通りで、数年前のもの

Table 1 Comparison of agar and agarose in immuno-diffusion tests with anti-*Paragonimus westermani* serum (1968, 11)

		Agar and agarose gels										
		MA	MA	MA	CA	BA	BA	IA	WAA	SAN	SAN	
		Lot 1	Lot 2	Lot 3		Lot 1	Lot 2			Lot 1	Lot 2	
Gel concentration	Ouchterlony	0.9%	7*	7	5	6	6	7	6	6	5	6
		1.2%	7	7	5	6	6	6	5	5	6	7
		1.5%	6	6	5	5	5	5	5	5	6	6
		1.8%	4	4	4	5	5	5	4	5	4	4
		2.0%	4	4	4	4	4	4	4	5	4	4
Gel concentration	IEP	0.9%	23	23	18	20	20	21	19	19	14	18
		1.2%	20	19	14	17	18	18	18	16	19	21
		1.5%	19	18	13	16	17	18	17	14	17	18

\* Number of precipitin bands

- MA : Marque agarose
- BA : Behringwerke agarose
- WAA : Wako special agar powder A
- CA : Chugai special agar
- IA : Oxoid ionagar
- SAN : Difco special agar noble

Table 2 Comparison of agar and agarose in immunoelectrophoresis with anti-*Fasciola hepatica* serum (1973, 6)

		Agar and agarose gels										
		MA	NA	CA	SA	BA	SGA	IA	WAA	WAB	SAN	BCA
Gel concentration	0.9%	25*	24	24	25	25	25	24	24	24	21	20
	1.2%	22	22	22	22	22	22	21	22	20	23	21
	1.5%	19	19	18	19	19	19	19	18	17	21	18

\* Number of precipitin bands

- MA : Marque agarose
- CA : Chugai special agar
- BA : Behringwerke agarose
- IA : Oxoid ionagar
- WAB : Wako special agar powder B
- BCA : Difco bactoagar
- NA : Nakarai agarose
- SA : Schuchardt agarose
- SGA : Sigma agarose
- WAA : Wako special agar powder A
- SAN : Difco special agar noble

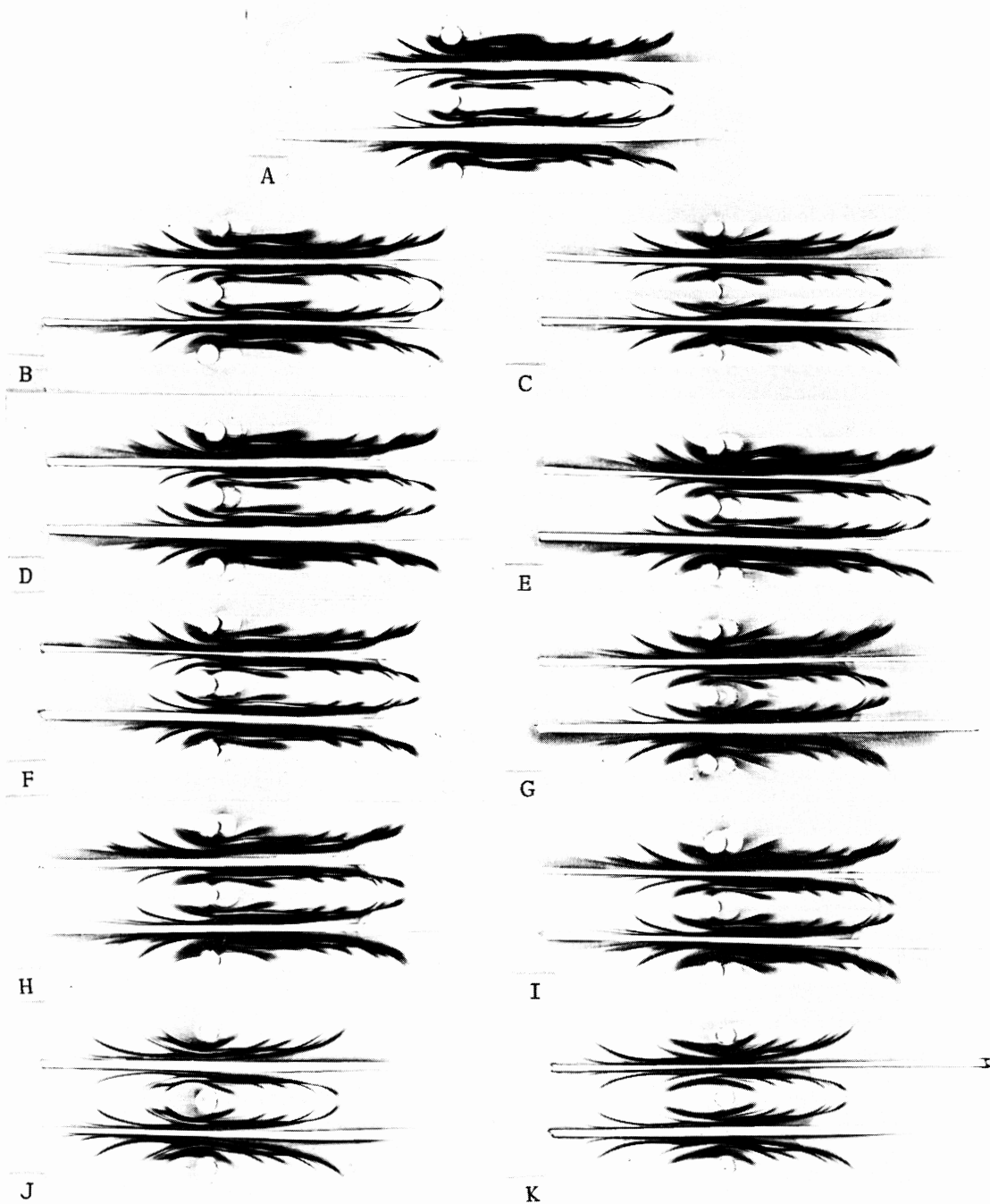


Photo 1 Comparison of agar and agarose in immunoelectrophoresis with anti-*Fasciola hepatica* serum

A : Marque agarose  
 B : Nakarai agarose  
 D : Schuchardt agarose  
 F : Sigma agarose  
 H : Wako special agar powder A  
 J : Difco special agar noble

C : Chugai special agar  
 E : Bheringwerke agarose  
 G : Oxoid ionagar  
 I : Wako special agar powder B  
 K : Diafco bactoagar

のはその製品により Ouchterlony, 免疫電気泳動とも出現沈降帯数は可成り異なっていたが, 最近のものは Table 2 にみられる如くその差はあまり認められない。しかし同一製品でも各 Lot により成績は異なり, さらにまた免疫電気泳動での各沈降帯の位置すなわち易動度は Photo 1 にみられる如く agarose とそれ以外とは異なっている。ここに示した成績は肝蛭感作血清と同抗原間の比較成績であるが, 他の各種肺吸虫, 豚蛔虫, 犬蛔虫, アニサキスあるいは人血清などを材料として行なった検討でも同じような結果が得られている。従つて他の研究者の成績, 殊に特異沈降帯の同定などの追試をする場合には報告と同じ支持体を使用して同一条件で実験を行なうべきであることはいままでもないが, さらに本実験前にプール血清などを用いて各 Lot のチェックを実施する必要がある。また寒天は吸湿性があるので開封後はその保存に細心の注意を払うべきであることもいうまでもない。なお支持体の濃度であるが, special agar noble は1.2%にするのが適当とされているが agarose の場合は0.9~1.0%が良いようで, 著者らは現在0.9%に統一して行なっている。

以上の如く最近の製品では出現沈降帯数の差が殆んど認められないのでどの支持体を用いても良いように思われるが, 免疫電気泳動ではその数のみではなく泳動像をも問題とするので易動度の異なる agarose と agar の成績を同一解釈することは好ましくない。すでに記した如く寄生蠕虫類の分野では Marque の agarose が広く用いられていることおよび詳細については後述するが支持体内に抗原あるいは血清を混入するため低温で処理を行なう two-dimensional immunoelectrophoresis では45°Cで操作可能である agarose (agar は50°Cでゲル化する)を用いなければならないこともあつて著者はすべ

て agarose 系統のものを支持体として使用している。

なお, これら支持体を用いた際の泳動条件は従来微量法で1.0~1.5 mA/cm width, 150~180分通電, あるいは8 V/cm width, 90分通電することなどが行なわれていたが, 出力端子電圧差では寒天の被覆量の少しの誤差によつても泳動像が異なるので, 寒天板上の陰陽極差が20±2 V/every length になるように直接テスターを用いて調節し, それぞれの寒天板の長さに適した時間, 泳動を行なうことが必要である。

### III. 使用抗原

現在著者らは寄生虫体の0.1%食塩水抽出液を抗原として用いているが, ここで同じ蛋白抗原で皮内反応, 補体結合反応, 血球凝集反応などの抗原として広く用いられ, すぐれた成績を得ているペロナール緩衝生理食塩水抽出抗原(VBS 抗原, pH 8.6)の免疫電気泳動抗原としての適否が問題となる。そこで数例のウェステルマン肺

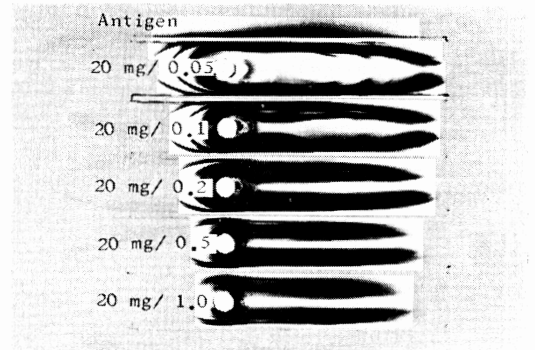


Photo 2 Comparison of immunoelectrophoretic patterns obtained by using different concentrations of *Fasciola hepatica* antigen

Serum: anti-*Fasciola hepatica* serum.

Table 3 Comparison of 0.1% NaCl and VBS antigens in immunoelectrophoresis with anti-*Paragonimus westmani* sera

		Rabbit No.				
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
0.1% NaCl antigen	P. westmani	17	23	23	23	23
	P. miyazakii	8	13	9	13	12
	P. ohirai	8	13	10	13	13
VBS antigen	P. westmani	8	15	10	12	12
	P. miyazakii	4	5	6	7	7
	P. ohirai	5	8	6	8	7

\* Number of precipitin bands

Table 4 Comparison of 0.1% NaCl and ES antigens in immunoelectrophoresis with anti-*Paragonimus spp* sera

		Immunized rabbit serum		
		<i>P. westermani</i>	<i>P. miyazakii</i>	<i>P. ohirai</i>
0.1% NaCl antigen	<i>P. westermani</i>	23*	14	14
	<i>P. miyazakii</i>	13	22	13
	<i>P. ohirai</i>	13	13	22
ES antigen	<i>P. westermani</i>	10	5	6
	<i>P. miyazakii</i>	5	8	5
	<i>P. ohirai</i>	6	4	11

\* Number of precipitin bands

吸虫感作家兎血清を用いて0.1%食塩水抽出抗原とVBS抗原の比較を行なった。なお、抗原材料としてウェステルマン肺吸虫のほか、宮崎肺吸虫、大平肺吸虫についてもそれぞれ両抽出抗原を作成し検討した。VBS抗原の製法は横川ら(1955)の方法に準じ、そのstock antigen(×100抗原)を凍結乾燥して得た粉末抗原20mgを0.1mlの蒸溜水に溶かしたものを泳動用抗原とした。その結果はTable 3にみられる如く、VBS抗原ではその沈降帯出現数は0.1%食塩水抽出抗原の場合の約半数であった。また0.1%食塩水抽出抗原の使用時における蛋白量は肝蛭成虫抗原の場合、0.1ml中約12mgであるが、抗原濃度を変えて検討した結果ではPhoto 2にみられる如く各沈降帯の数および染色性は抗原稀釈とともに減少していた。現在の抗原使用量は径4mmの標準抗原孔で0.02mlすなわち抗原粉末として4mgが必要であり、その量はかなり多い。しかし低濃度抗原を使用するには現時点では未だ問題が残されているようである。

なお、虫体培養を生理食塩水中で32°C、4時間行なった際の培養液を遠心沈澱して得られる虫体のexcretion and secretion抗原すなわちES抗原についても検討を行なったが、その結果はTable 4の如くで、培養液中に抗原性のあることは認められたが、これを免疫電気泳動の抗原として使用するには今後力価基準の検討などが必要である。

#### IV. 血清処理

被検血清はOuchterlony法では抗原孔の直径4mmに対して血清孔の直径12mmと大きくしてあるので血清を処理せずそのまま使用しているが、免疫電気泳動では血清を1/3に濃縮して使用している。すなわち血清溝には約0.3ml(微量法の場合は約0.1ml)量の血清が入

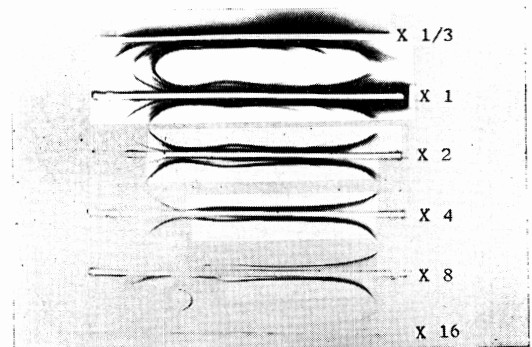


Photo 3 Comparison of immunoelectrophoretic patterns obtained by different concentrations of anti-*Fasciola hepatica* serum.

Antigen: *Fasciola hepatica* antigen (20mg/0.1ml)

るので、血清溝1本の場合はあらかじめ0.9ml(微量法では0.3ml)の被検血清を凍結乾燥し、使用時に0.3ml(微量法は0.1ml)の蒸溜水を加えたものを1/3濃縮血清として血清溝に添加する。この場合の適正血清濃度に関する検討も抗原の場合と同様に行なったが、その結果はPhoto 3にみられる如くで、出現沈降帯数は血清稀釈とともに減少した。実際に診断の目的で虫卵陽性の患者血清を用いて行なった場合もTable 5の如く1/3濃縮血清では全例に沈降帯が証明されたが、生血清では10%弱が陰性であった。もし検査血清の量が不足で止むを得ない場合には、抗原孔と血清溝の距離を3~4mm(微量法では1.5~2mm)に近づけて生血清を用いることが試みられている。また、血清濃縮は1/3が適当で、これ以上に濃縮すると血清が粘状となり拡散が悪くなる。

なお、感作血清、患者血清を保存する場合には、理由は不明であるが凍結乾燥を行なうよりはむしろその血清

Table 5 Comparison of precipitin bands with neat and concentrated sera of patients in immunoelectrophoresis.

Paragonimiasis			Schistosomiasis		
Case No.	Neat	1/3 conc.	Case No.	Neat	1/3 conc.
1	10*	12	1	10	11
2	8	9	2	8	9
3	7	9	3	7	8
4	6	7	4	7	8
5	4	6	5	5	7
6	4	5	6	6	6
7	3	5	7	5	6
8	3	5	8	4	6
9	4	4	9	2	3
10	4	4	10	2	2
11	3	4	11	0	2
12	3	4			
13	3	4			
14	2	4			
15	3	3			
16	2	3			
17	1	3			
18	2	2			
19	0	2			
20	0	2			

\* Number of precipitin bands

を無処理のまま分注して-20°C (出来ればさらに低温)の凍結庫に保存する方が抗体価の減少が少なく好ましい。

また、著者らは現在免疫家兎血清を得るための感作法として腋窩部注射を行なっている。本法は1966年パスツール研究所で検討を行なっていた方法で、0.1%食塩水抽出抗原粉末2mgを約0.5mlの生理食塩水で溶かし、これを Freund の complete adjuvant 0.5~1.0ml とともによく攪拌して懸濁液とし、これを家兎の腋窩部に週1回づつ左右交互に注射する方法である。本法は従来の注射法に比し抗原量は1/10と少なく、また膿瘍をつくることもないので家兎が長期使用に耐え、しかも従来の方法同様、7~10回の注射で十分な抗体を得ることが出来る。

V. 吸収試験

免疫電気泳動でしばしば共通抗原による沈降帯が出現することはすでに辻 (1971) が報告しているが、これら

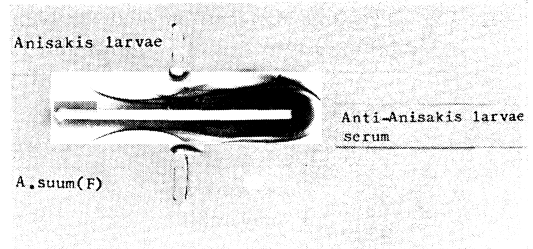


Photo 4 Immunoelectrophoresis of anti-Anisakis larvae serum by the Trough cut method

の類属的な反応を除外あるいは判別して使用抗原に特有に認められる特異沈降帯を証明する方法としては、検査血清をあらかじめ他種抗原で吸収し、その吸収後血清を反応に用いるいわゆる吸収試験によるものと、Photo 4の如く血清溝を短かくして2つの抗原孔を溝をはさんで対称的にあけ、それぞれに異種抗原を入れて沈降帯の両者の繋がりを見る方法、さらには抗原孔を中心に2本の血清溝をつくり、そのうちの一つの溝に検査血清を、他の溝に他種抗原を添加して反応させ、その沈降帯を検討する方法などがあるが、著者らは主として吸収試験を行なっている。すなわち、まず検査血清1mlに対し吸収を行なう他種の0.1%食塩水抽出抗原粉末20mgを混入してよく溶解したのち37°Cで3時間反応させ、次いでこれを4°Cの氷室に12時間放置したのち3,000rpm5分間遠心沈澱する。この上清が吸収後血清であるが、この血清を使用する際には他の血清同様1/3に濃縮している。吸収試験の際の吸収用抗原粉末の量に関しては、これまでの検討結果では被吸収血清1mlに対し10mgでは不十分で、20mgが必要であつた。吸収が完全に行なわれているか否かは、Photo 5の如く検査抗原と同時に吸収に用いた他種抗原も対称的において、そこに沈降帯

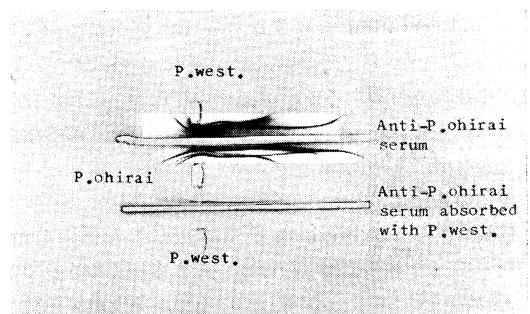


Photo 5 Immunoelectrophoresis of Paragonimus ohirai by absorption technique

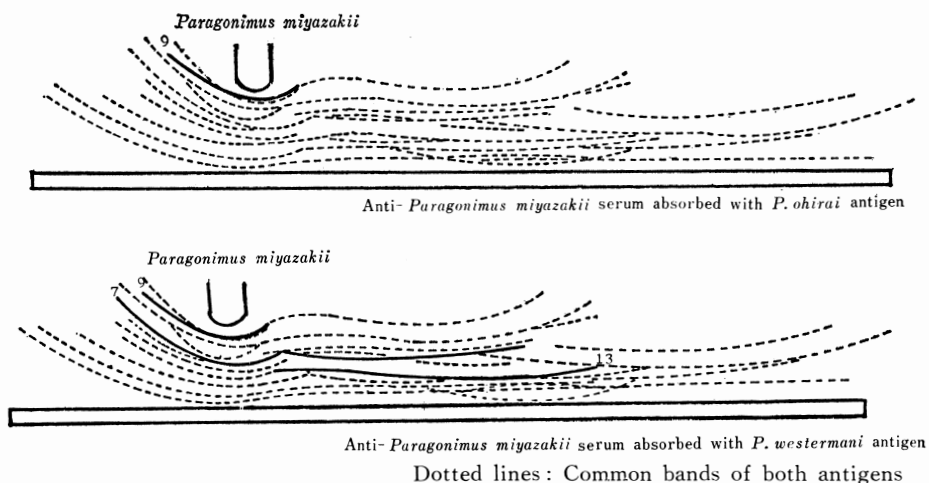


Figure 1 Immunoelectrophoresis diagram of *Paragonimus miyazakii* with anti-*P. miyazakii* serum after different absorption procedures

Table 6 Results of immuno-diffusion tests for schistosomiasis and paragonimiasis

Ouchterlony		Immunoelectrophoresis		
No. exam.	No. posit.	No. exam.	No. posit.	No. specific band posit.
Schistosomiasis				
83*	81 (97.6%)	21*	21 (100 %)	17 (81.0%)
Paragonimiasis				
46**	46 (100 %)	46**	46 (100 %)	38 (82.6%)

\* Eggs positive for *Schistosoma japonicum*

\*\* Eggs positive for *Paragonimus westermani*

が出現しないことを確認する。

吸収試験を用いて行なった各種蠕虫類の比較成績の一例を示すと Figure 1 の通りである。これは宮崎肺吸虫感作家兎血清をウェステルマン肺吸虫抗原および大平肺吸虫抗原で吸収したもので、点線で示した沈降帯は吸収により消失したのも、すなわち両種肺吸虫に共通な沈降帯であり、実線で示したものは吸収後も残存した宮崎肺吸虫に特有な沈降帯である。この結果ウェステルマン肺吸虫抗原で吸収した場合には No. 7, 9, 13 の 3 本の沈降帯が残存し、大平肺吸虫抗原で吸収した場合には No. 9 の 1 本の沈降帯が吸収後も証明されたわけである。従って宮崎肺吸虫の特異沈降帯はこの No. 9 沈降帯と判断される。なお、虫卵陽性患者血清での特異沈降帯出現頻度は Table 6 に示す如く、日本住血吸虫症で 21 例中 17 例 (81.0%)、肺吸虫症で 46 例中 38 例 (82.6%) であり、特異沈降帯の確認はそれぞれの疾患を診断する上で大い

に役立つている。

#### VI. 免疫電気泳動法の応用

これまでに述べた免疫電気泳動法はその条件、方法が適切であれば寄生虫学領域において基礎的研究のみならず臨床診断の面にも役立つのであるが、出現沈降帯数の多寡や染色性の強弱のみによつて抗原あるいは抗体価の量的判断は必ずしもなし得ない。この点を補う目的で他の領域ではここ 4~5 年来 Laurell (1965) の法に改良を加えて two-dimensional immunoelectrophoresis の検討が行なわれている。著者も最近本法を試み始め、その条件設定の検討は未だ完全に終えていないが、現在は一次泳動と二次泳動を同じ条件で行ない、そこに出現する分画毎の面積比を求めている。すなわち 8.0 cm × 8.0 cm のガラス板上に agarose で寒天板をつくり、抗原孔をあけて抗原を充填する。この抗原を既述の如く寒天板上の陰陽極の電圧差が  $20 \pm 2$  V/8.0 cm length にな

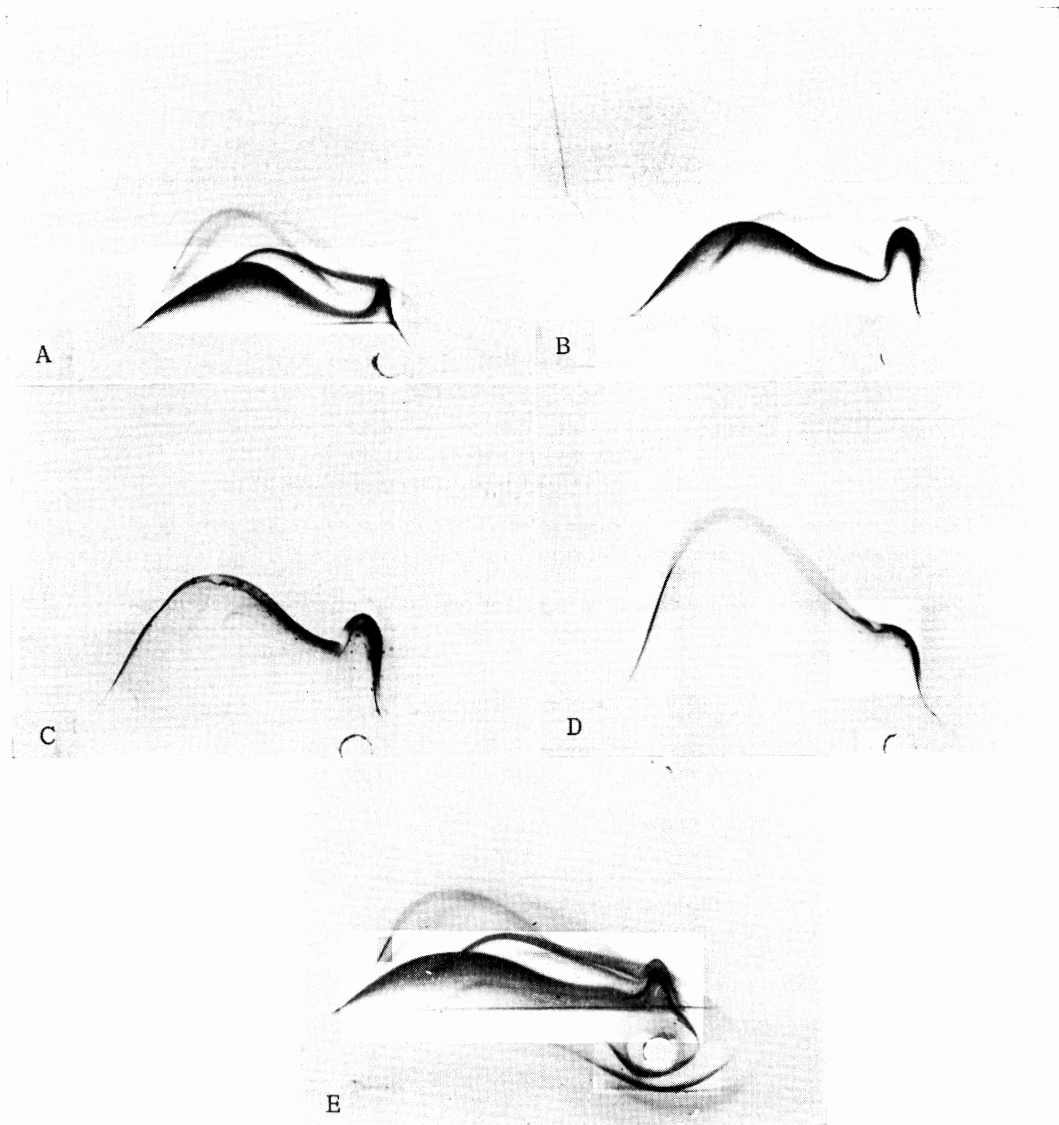


Photo 6 Comparison of two-dimensional immunoelectrophoretic patterns obtained by using different concentrations of *Fasciola hepatica* antigen

- A : 2.5 mg/0.1 ml antigen and 4 % serum in agarose
- B : 5 mg/0.1 ml antigen and 4 % serum in agarose
- C : 10 mg/0.1 ml antigen and 4 % serum in agarose
- D : 20 mg/0.1 ml antigen and 4 % serum in agarose
- E : 20 mg/0.1 ml antigen and 10 % serum in agarose

るよう調節し、3時間通電一次泳動をする。泳動終了後に抗原孔より3mmの距離で泳動方向と平行に寒天を切り、泳動が行なわれなかった部分の寒天を除去する。この除去した部分にその量と等量だけ被検血清を4%の割合に混入した加温 agarose を再被覆する。これらの操作

は血清中の抗体が不活化しないように45°C前後で行なう必要があるため、迅速に行なう。次に血清加寒天側を陽極側として $20 \pm 2$  V/8.0 cm length で3時間通電二次泳動をする。あとは通常の免疫電気泳動の場合と同様拡散箱に入れて室温で12時間、4°Cで48時間反応させ、ベ



ロナール加生理食塩水で3日間洗滌，乾燥したのちアミドブラック染色を行なう。Photo 6 に示したものは肝蛭抗原と同感作血清との間で基礎的検討を行なつた two-dimensional immunoelectrophoresis の泳動像で，A が2.5 mg，B が5 mg，C が10 mg，D が20 mg とそれぞれ抗原量を違えたもの，またE は支持体内の血清混入量を4%ではなく10%の割にしたものである。

免疫電気泳動ではまた，組織化学の染色法を併用し，沈降帯に關する酵素活性を証明するいわゆる酵素免疫電気泳動法 (enzymic immunoelectrophoresis) が Uriel (1961) の報告以来試みられている。本法は今までに述べた泳動法と異なり抗原は生きた虫体をそのまま直接磨碎してすぐに使用することが必要である。また変性を避けるために泳動槽内で冷却エーテルを灌流させて9°C内外で泳動を行なうとともに，拡散および洗滌など泳動後の操作もすべて4°Cの氷室で行なう。これまでに寄生虫学領域では本法を用いて Tran Van Ky ら (1967, 1968) が旋毛虫幼虫で9つ，マンソン住血吸虫成虫で16，肝蛭成虫で12，ウェステルマン肺吸虫成虫で14の酵素活性を認め報告している。

### む す び

最近寄生虫学領域においても免疫電気泳動法が広く用いられるようになって来たが，本法は実施条件により得られる泳動像が異なるために結果の比較検討の際に困惑することも稀れではない。そこで本法の確立を目的として支持体の検討や抗原の比較など主として免疫電気泳動法を用いて寄生蠕虫類に関する研究を行なう際に必要な基礎的諸問題についての検討を行ない，以下の如き見解を得た。

1) 支持体としては agarose 系統のものが好ましいと思われ，その濃度は0.9~1.0%が適当である。しかし同一製品でも各 Lot により成績が異なるので Lot 毎にチェックする必要がある。

2) 抗原としては虫体の0.1%食塩水抽出抗原の乾燥粉末20 mgを0.1 mlの蒸留水に溶かしたものが良いと判断される。

3) 血清は使用時に1/3に濃縮したものが出現沈降帯数が多く，虫卵陽性患者血清の場合でも生血清では10%弱が陰性であつたが1/3濃縮血清では全例に沈降帯が認められた。

4) 特異沈降帯を証明するには，被吸収血清1 mlに對し吸収を行なう他種抗原粉末20 mgを混じり37°Cで3

時間，さらに4°Cで12時間反応させたのち，遠心沈澱して得られる上清を用いて免疫電気泳動を行なういわゆる吸収試験を行なえばその目的は達せられる。日本住血吸虫卵陽性者血清およびウェステルマン肺吸虫卵陽性者血清について検討した結果，それぞれの約80%の症例に特異沈降帯が認められた。

本論文の要旨の一部は18回電気泳動学会春季大会(1968)，40回日本寄生虫学会大会宿題報告(1971)および28回日本寄生虫学会西日本支部大会(1972)で発表した。

### 文 献

- 1) Biguet, J., Capron, A. et Tran Van Ky, P. (1962 a) : Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. I. Étude électrophorétique et immunoelectrophorétique. Caractérisation des antigènes spécifiques. Ann. Inst. Past., 103, 763-777.
- 2) Biguet, J., D'haussy, R., Capron, A., Tran Van Ky P. et Aubry, M. (1962 b) : Les antigènes de *Onchocerca volvulus*. I. Étude immuno-électrophorétique préliminaire. Bull. Soc. Path. exot., 55, 845-855.
- 3) Capron, A., Biguet, J., Tran Van Ky, P. et Rose, G. (1964) : Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica*. Mise en évidence d'anticorps sériques par immunoelectrophorèse. Press Méd., 72, 3103-3107.
- 4) Capron, A., Yokogawa, M., Biguet, J., Tsujii, M. et Luffau, G. (1965) : Diagnostic immunologique de la paragonimose humaine. Mise en évidence d'anticorps sériques spécifiques par immunoelectrophorèse. Bull. Soc. Path. exot., 58, 474-487.
- 5) Grabar, P. et Williams, C. A. (1953) : Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. Biophys Acta, 10, 193-194.
- 6) Grabar, P. and Burtin, P. (1964) : Immunoelectrophoretic analysis. 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 302 pp.
- 7) Kagan, I. G. and Norman, L. (1963) : Analysis of helminth antigens (*Echinococcus granulosus* and *Schistosoma mansoni*), Ann. N. Y. Acad. Sci., 113, 130-153.
- 8) Kent, N. H. (1963) : Comparative immunochimistry of larval and adult forms of *Schistosoma mansoni*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 113, 100-113.
- 9) Laurell, C-B. (1965) : Antigen-antibody cro-

- ssed electrophoresis. Anal. Biochem., 10, 358-361.
- 10) Tran Van Ky, P., Vaucelle, T., Capron, A. et Biguet, J. (1967) : Caractérisation des types d'activités enzymatiques dans les broyats de *Schistosoma mansoni* adultes après immunoélectrophorèse en agarose. Ann. Inst. Past., 112, 763-771.
  - 11) Tran Van Ky, P., Tsuji, M., Capron, A. and Vaucelle, T. (1968) : Characterization of the types of enzymic activities in freshly crushed *Paragonimus westermani* antigens after immunoelectrophoresis in agarose. Hiroshima J. Med. Sci., 17, 43-51.
  - 12) 辻 守康(1971) : 寄生虫感染における免疫学的診断, 共通抗原, 日本医学会総会誌, 18, 676-680.
  - 13) 辻 守康, 横川宗雄, Capron, A. and Biguet, J. (1968) : 3種肺吸虫(*Paragonimus westermani*, *P. miyazakii*, *P. ohirai*) の免疫電気泳動像の比較, 生物物理化学, 13, 271-272.
  - 14) Tsuji, M. and Yokogawa, M. (1972) : Studies on the immunodiffusion tests of *Schistosoma japonicum*. Research in Filariasis and Schistosomiasis, 2, University of Tokyo Press. 165-177.
  - 15) Uriel, J. (1961) : Caractérisation des cholinestérase et d'autres ésterases carboxyliques après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. I. Application à l'étude des estérases du sérum humain normal. Ann. Inst. Past., 101, 104-119.
  - 16) 横川宗雄, 大島智夫, 須川 豊, 平野多聞, 中川晃子(1955) : 肺吸虫症の皮内反応, スクリーニングテストの実用価値について, 日本医事新報, 1634, 19-23.

## Abstract

### ON THE IMMUNOELECTROPHORESIS FOR HELMINTHOLOGICAL RESEARCHES

MORIYASU TSUJI

(*Department of Parasitology, University of Hiroshima School of Medicine*)

Recent advances in immunological study are largely due to the development of immunoelectrophoretic techniques, and many promising results have been accumulating in the helminthological field. However, the electrophoretic movements of various substances mixed in agar gels may not be entirely the same when gels of various origins are used. To secure satisfactory results with this technique, certain properties of the gels and antigens would be required.

1) For the identification of specific bands and two-dimensional technique, agarose was proved to be better than agar. Although differences between various agarose samples in the electrophoretic pattern are found usually negligible, the use of the same brand is recommended for routine test. Such small concentration of agarose as 0.9% was found to be enough for obtaining good result.

2) As helminthic antigens, 0.1% saline extract and veronal buffered saline extract (VBS) antigens were compared in immunoelectrophoresis. VBS antigen failed to produce as many precipitating systems as 0.1% saline extract antigen did. The antigenicity of excretions-secretions as obtained by incubating adult worms in physiologic saline under 32°C 4 hours was proved to be weaker than 0.1% saline extract of adult worms. Thus, 0.1% saline extract antigen (20 mg of dried antigen in 0.1 ml distilled water) appears to be the best for immunoelectrophoresis and detection of precipitating antibodies, at this moment.

3) Sera concentrated to  $\frac{1}{8}$  of the original volume produced more bands than neat sera. Demonstration of precipitin bands in patient sera were achieved in about 90% of cases with neat sera while in 100% when such concentrated sera were applied.

4) The absorption procedure is useful technique for the identification of specific band. One ml of the hyper-immune rabbit serum of certain antigen was absorbed with 20 mg of another species antigen. After stirring, the antiserum-antigen mixture was incubated for 3 hours at 37°C and then stored in the refrigerator for 12 hours. The specific band in patient sera were demonstrated in about 80% of each groups with *Schistosoma japonicum* and *Paragonimus westermani* infection cases.