

マウス系モデルにおける酸性緩衝液処理抗原 (*Plasmodium berghei* NK 65) を用いたマラ リア診断法としての間接蛍光抗体法

佐藤 功 栄 鈴木 守 脇 誠 治

東海大学医学部寄生虫学教室

(昭和53年9月9日 受領)

緒 言

世界的規模のマラリア撲滅対策が効を奏して、一旦下火となつたマラリアの流行は、対策推進の行詰りにより再び力を盛り返す傾向にある。マラリアの内在性流行のない本邦でも、海外交流の盛んな昨今こうした情勢に対処すべき具体的な方法が要求されるに至つた。

従来マラリア感染の指標として、脾腫の測定と原虫陽性率測定法 (Panpana, 1969) が、臨床的診断、疫学調査に用いられてきた。マラリア検査の対象となつている脾腫は、マラリア感染の繰り返しを反映する一つの指標として重要であるが、他の熱帯病、すなわち、カラ・アザール、住血吸虫症、回帰熱、天然痘の予防接種、その他の感染症、寄生虫病等によつても起り得る。この難点を補うため直接的な病原体の証明方法として血液塗抹標本中のマラリア原虫証明が、次に賞用されてきた。顕微鏡下のギムザ染色血液塗抹標本中のマラリア原虫の観察は、病原体の検出は言うに及ばず、原虫の種別まで鑑別できる最も直接的な証明法である。しかし、本法にもいくつかの難点があり、被検者の血液中に原虫が極めて少数存在する場合は、これを見落す可能性が大であるなどの問題を挙げなくてはならない。Panpana (1969) は、この点に関し1956年 Accra で Colbourne らの行なつた仕事をその著の中に紹介している。それによれば、一枚の標本について100視野を観察した際に陽性率が7%と算出された集団が、一人から10枚の標本作製し、そのすべてを検査することにより20%にまで上昇するという。従つて脾腫の測定や原虫陽性率算定だけでは、マラリアの診断、疫学的調査の目的を十分に達成させる事が

できない。特に近年マラリア対策が進み、マラリア発生率が著しく低下した地域のアセスメントには、上記の従来法に加え血清学的診断法の導入が必要とされるに至つている (Bruce-chwatt, 1970)。さらに本法のように内在性のマラリア流行がなく大多数の人々が、マラリアに対する抗体を保有していないと考えられる地域において、マラリアの確定診断を下す際、血清学的診断法は、しばしば決定的な意味をもつ。

マラリアの血清学的診断法として、現在間接蛍光抗体法 (Tobie and Coatney, 1961; Voller, 1962)、ゲル拡散法 (World Health Organization, 1974)、酵素結合抗体法 (Voller and Huldtt, 1975)、対向電気泳動法 (Seitz, 1975)、間接赤血球凝集反応法 (Kazan, 1972) 等が挙げられるが特に間接蛍光抗体法はその内でも特異性、再現性において他の方法よりも優れ、現在標準的血清反応として賞用されている。しかし、本法の欠点として反応の判定を蛍光顕微鏡観察に依存するため力価決定に主観の入りこむ難点が残されている事が挙げられる (World Health Organization 1974)。間接蛍光抗体法の成功の可否は、いうまでもなく、特異性、反応性の高い抗原を準備する事にある。現時点ではこの目的にかなつた抗原として、ヨザル (*Aotus trivigatus*) に、ヒトマラリア原虫を感染 (Geiman and Meagher, 1967) させて得た原虫を十分に洗浄し (Sulzer, 1969)、得られた原虫を高温下で培養した (Thomas and Ponnampalam, 1975) ものが使用されている。しかし、今なお各研究室間で得られた血清力価を比較するとその成績に相違をみる事が多い。

我々は、上記の方法による抗原作製法を更に進めて抗

原に附着した抗体、血球由来の蛋白成分、抗体以外の附着血清成分等を取り除き、原虫表面の特異的抗原部位を、活性を保持したままの状態で十分に裸出させてより良い原虫抗原を得る事にここに試みた。このために抗原抗体結合物が、酸性条件下で解離すること (Kabat and Mayer, 1961)、同じく酸性液内で、赤血球の溶血がおこる事に注目し酸性緩衝液で感染血球を処理、洗浄し遊離虫体を得、これが間接蛍光抗体の抗原として使用に適するか否かを検討したので報告する。

材料及び方法

1) マラリア原虫：使用されたネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* NK 65) (Yoeli, 1965) は、New York 大学故 Dr. M. Yoeli により 1969 年に賦与されて以来、感染血液をマウス腹腔内に連続的に接種する事により、また一部を -70°C 凍結保存することにより維持されてきた。顕微鏡下でみる限り本原虫と *Eperyt-hroozoon coccoides* との混合感染は、認められていない。

2) マウス：DDY 系 5 週齢の雌 (日本クレア) を使用した。マウスは、プラスチックケージ内で固形飼料と通常の水とで飼育された。全実験を通じ動物は、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \sim 70\%$ の条件下で維持された。

3) マラリア原虫採取法：感染赤血球 0.2ml ($1 \times 10^8/\text{ml}$) をマウス腹腔内に接種し、4 日後感染赤血球数が約 20% になった時ヘパリンを用い、心臓穿刺により全採血を行なった。2 \sim 3 匹のマウス感染血液をプールし、本実験の抗原材料とした。

4) 抗マラリア血清：感染赤血球 0.2ml ($1 \times 10^7/\text{ml}$) をマウス腹腔内に接種し、接種後 3 日目よりピリメサミン 2% カルボキシメチルセルロースナトリウム浮遊液 $25\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ を 4 日間連続して、皮下注射する方法によりマウスを免疫した (Waki and Suzuki, 1974)。この免疫操作を 2 週間の間隔をおき、3 回繰り返した後全採血し、得られた高力価の免疫血清を標準抗血清 (間接蛍光抗体価 $1 : 1,024$) として使用した。

5) 蛍光標識ウサギ抗マウス IgG 血清：寒天を支持体とし、ウサギ抗マウス血清とマウス血清の免疫電気泳動により得られた抗原抗体結合沈降物支持寒天ゲルを切り出し、生食水に浮遊させ、1 日 1 回 10 日間連続して沈降物を洗浄した後、完全フロインド、アジュバンドに混合させ、繰り返しウサギに免疫してウサギ抗マウス IgG 血清を得た (Nariuch, et al. 1971)。その抗マウス IgG 抗体に蛍光色素 Fluorescin isothiocyanate を標識した (Kawamura, 1977)。本実験には F/P 比 1.24、染色

力価 8 倍の分画を用いた。

6) 酸性緩衝液：マラリア抗原処理に使用した緩衝液は、以下の通りである。

- 1) 0.15M リン酸緩衝液生理食塩水 pH 7.2 (PBS).
- 2) 0.15M Glycin-NaCl-HCl 緩衝液 pH 1.5, 2.0, 2.8, 3.0.
- 3) 0.15M ベロナールナトリウム酢酸ナトリウム塩酸緩衝液 pH 2.0.
- 4) 0.15M クエン酸 Na_2HPO_4 緩衝液 pH 2.0.

以上の緩衝液 2), 3), 4) を生食水で希釈し、規定の pH に合わせた後使用した。

7) マラリア抗原材料の酸性緩衝液による処理法：感染マウスより得た感染血液を $2,000\text{r.p.m}$ 、5 分間の遠心操作により血漿をとり除き、原血液量の 2 \sim 3 倍容量の生食水を加え、沈渣血球を浮遊させ、同一条件の遠心操作で 1 回洗浄した。血球沈渣をその 200 倍量の各緩衝液に浮遊させ、5 分おきに振盪攪拌し、30 分間反応させた。緩衝液中に遊離した溶解物が再び抗原に附着するのを防ぐため同一の緩衝液で 3 回遠心操作 ($1,500\text{r.p.m}$ 、5 分) 洗浄を繰り返し、最後に上清の pH が 3.0 を示すことを確認した。処理後の抗原を更に PBS で 3 回遠心操作 ($1,500\text{r.p.m}$ 、5 分) による洗浄を繰り返した後、PBS に (倍率 $1,000$ 倍の顕微鏡 1 視野中に原虫数が 5 \sim 15 になるように適宜希釈) 浮遊させ Iron applicator (Voller and ÓNeil, 1971) を用い、無蛍光スライドグラスに乾燥固着させた。スライドグラス抗原は、ティッシュペーパーで包み、ビニール袋に入れ使用時まで -70°C 下に保存した。また対照として PBS 処理抗原を同時に作製した。

8) 血清の希釈：前項で記した方法で得た各マウス抗マラリア血清を、合成樹脂トレイ (Limbro U type) を使用し、2 倍法に従い、エクセルモノペット (光和機材) により希釈した。

9) 間接蛍光抗体法：抗原スライドを湿潤箱に入れ、 37°C のふらん器内で 30 分間各段階希釈の血清と反応させた。30 分後抗原スライドを大量の PBS により 3 回に分けて、11 分間振盪洗浄し、ティッシュペーパーで余分の PBS を取り去った後、蛍光標識血清を抗原上にのせ再び湿潤箱に入れ、30 分間、 37°C で反応させた。反応後抗原スライドを再び PBS により上記と同様の方法で洗浄し、緩衝グリセリン pH 9.1 (0.5M 炭酸重炭酸緩衝液 9 容、特級グリセリン 1 容) で封じ透過型蛍光顕微鏡 (Tiyoda, Model, FM 200) で判定した。

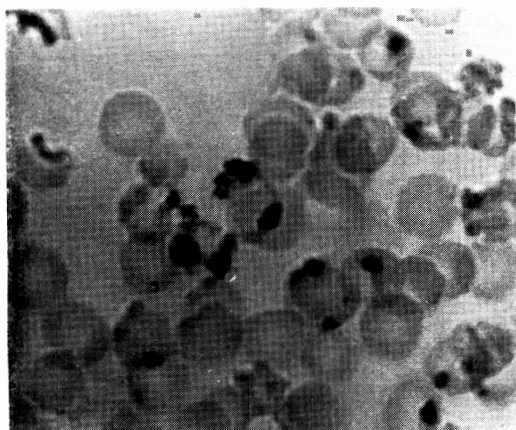


写真1 PBS 処理感染赤血球(溶血なし)
1000×

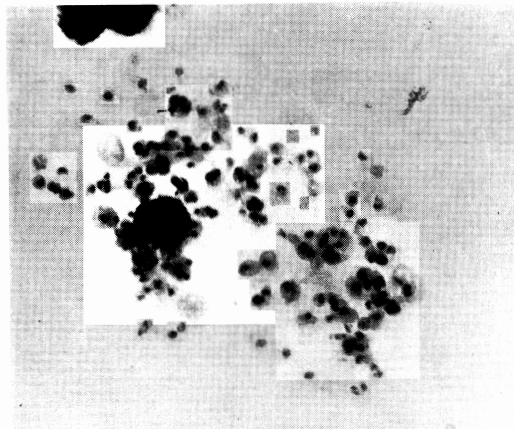


写真2 酸性緩衝液処理感染赤血球(溶血)
400×

成 績

酸性緩衝液作用時間の検討：各酸性緩衝液中に感染赤血球を入れ、時々振盪を加えながら10分、20分、30分、90分、180分間それぞれ反応させ溶血の程度と遊離マラリア原虫の存在をギムザ染色標本の観察によって追跡した。その結果、全ての緩衝液で、30分、37°Cの処理によりほぼ完全な溶血がおり、遊離原虫が得られる事が判明したので(写真1、2)以後感染赤血球処理時間はすべて30分とした。

酸性緩衝液処理後の遊離原虫回収率：感染赤血球採取後、直ちに血液塗抹標本を作製してギムザ染色をほどこし、マラリア感染率を算定した。更に全赤血球を算定し総マラリア原虫数を算出した。得られた感染血液を酸性緩衝液、またはPBSに作用させた後、各々の材料を原容量と同量のPBSに浮遊させ原虫数を算定した。その結果を表1に示す様に原血液の64~72%の回収率を得

た。

酸性緩衝液の至適濃度とpHの検討：前項で記した3種類の等張酸性緩衝液のいずれを作用させた場合最良の蛍光抗体抗原が得られるか、さらにその至適pHを検討するため、各緩衝液を準備した(表2)。各々の希釈緩衝液によりマラリア原虫感染血液を処理し得た抗原を使い、標準抗血清を間接蛍光抗体法で力価を測定した。表2に示すように、酸性緩衝液(0.15M Glycin-NaCl-HCl 希釈緩衝液 pH 3.0)処理抗原の力価は、従来のPBS処理標準虫体抗原(溶血なし)と同値の血清力価(1:1,024)を示した。ペロナール緩衝液、クエン酸緩衝液では、いずれのpHにおいても抗原性が損われていることがみだされた。

さらに、抗原におよぼす0.15M Glycin-NaCl-HCl緩衝液の濃度の影響ををするために、pH 1.5、2.0、2.5、2.8、3.0の各0.15M Glycin-NaCl-HCl緩衝液を作製し、生食水で希釈し、pH 3.0の値にそろえた。それぞ

表1 酸性緩衝液によるマラリア原虫の処理・洗浄後の回収率

感染血液番号	原 虫 数		回収率
	PBS 処理	酸性緩衝液処理	
1	375 ⁺	260	69%
2	350	250	71
3	420	270	64
4	360	245	68
5	380	272	72

⁺ 原虫数/mm³：1 mm³中のPBS処理原虫数は、血球計算盤の1 mm³中の血球の数にマラリア感染率を掛けて求めた。酸性処理原虫数は、血球希釈ピペットで希釈後、ギムザ染色し、位相差顕微鏡で1 mm³中の原虫を数えて、求めた。

表 2 各等張緩衝液の生食水の希釈によって得た酸性液処理抗原を用いた蛍光抗体反応

等張緩衝液 希釈 倍数	pH	標準血清による 蛍光抗体反応 ⁺						力価
		×64	×128	×256	×512	×1024	×2048	
グリシン緩衝液								
原 液	2.0	+	±	-	-	-	-	64
1 : 10	2.6	+	±	-	-	-	-	64
1 : 30	2.9	+	±	-	-	-	-	64
1 : 50	3.0	+	+	+	+	+	-	1024
ペロナル緩衝液								
原 液	2.0	+	±	-	-	-	-	64
1 : 5	2.8	+	±	-	-	-	-	64
1 : 10	3.0	+	+	+	+	-	-	512
クエン酸緩衝液								
原 液	2.0	+	-	-	-	-	-	64
1 : 30	2.7	+	-	-	-	-	-	64
1 : 100	3.0	+	+	+	+	-	-	512
PBS	7.4	+	+	+	+	+	±	1024

⁺ 標準法で ×1024 を示すマウス標準血清

* 判定上で、PBS 処理抗原を対照とした場合、グリシン緩衝液 pH 3.0 の抗原は 1024 倍を示すが、ペロナル、クエン酸緩衝液 pH 3.0 の抗原は一段低い 512 倍を示す。

表 3 希釈グリシン緩衝液 (pH 3.0) 処理抗原を用いた場合の蛍光抗体反応

生食水による 希釈 倍数	希釈による pH の変化	標準血清による 蛍光抗体反応 ⁺							
		原液	希釈液	×64	×128	×256	×512	×1024	×2048
1 : 90	1.5 - 3.0			+	+	+	+	±	-
1 : 50	2.0 - 3.0			+	+	+	+	+	-
1 : 30	2.5 - 3.0			+	+	+	+	+	-
1 : 10	2.8 - 3.0			+	+	+	+	±	-
原 液	3.0			+	+	+	+	+	±
PBS	7.4			+	+	+	+	+	±

⁺ 標準法で ×1024 を示すマウス標準血清

れの緩衝液により感染赤血球を処理し、PBS 処理抗原を対照として標準血清により蛍光抗体反応をしらべたところいづれの処理抗原を用いても表 3 に示すように PBS 処理抗原が示す値とほとんど差がないことが判明した。

酸性緩衝液処理抗原による抗体価の測定：

1) 抗血清の準備：種々の力価をもつた抗マラリア原虫血清を得るために 5 匹 1 組のマウスを 3 組準備した。第 1 のグループ (A) に対しては、0.2ml (1×10⁶/ml) の感染赤血球を接種 (第 0 日) し 7 日後に採血し血清を得た。第 2 のグループ (B) に対しては、追加免疫をほどこすために 0.2ml (1×10⁶/ml) の感染赤血球を接種

後、化学療法によりマウスを治療し (材料及び方法 4 参照)、第 13 日目に第 2 回目の感染赤血球接種を行なったのち、さらに化学療法を行ない、7 日後に各マウスより血清を採取した。第 3 のグループ (C) に対しては、(B) と同様の操作を 3 回ほどこし最後の化学療法終了後 7 日目に血清を得た。

2) 血清力価の測定：(A)、(B)、(C)、各グループより得た各々の抗マラリア原虫血清力価を、酸性緩衝液処理抗原と通例の PBS 処理抗原とを対比させて定量した。表 4 に示すように、酸性緩衝液処理抗原と PBS 処理抗原との血清力価との間に差異は認められず、PBS

表 4 グリシン緩衝液処理抗原と標準抗原による蛍光抗体反応の差

マウス グループ	マウス番号	使用抗原	蛍光抗体反応							血清力価
			×32	×64	×128	×256	×512	×1024	×2048	
A	1	a ⁺	+	+	-	-	-	-	-	64
		b ⁺⁺	+	+	±	-	-	-	-	64
	2	a	+	+	+	-	-	-	-	128
		b	+	+	+	±	-	-	-	128
	3	a	+	+	-	-	-	-	-	64
		b	+	+	±	-	-	-	-	64
	4	a	+	-	-	-	-	-	-	32
		b	+	±	-	-	-	-	-	32
	5	a	+	+	-	-	-	-	-	64
		b	+	+	±	-	-	-	-	64
B	1	a	+	+	+	+	-	-	-	256
		b	+	+	+	+	±	-	-	256
	2	a	+	+	+	+	-	-	-	256
		b	+	+	+	+	±	-	-	256
	3	a	+	+	±	-	-	-	-	64
		b	+	+	+	±	-	-	-	128
	4	a	+	+	+	-	-	-	-	128
		b	+	+	+	±	-	-	-	128
	5	a	+	+	+	+	-	-	-	256
		b	+	+	+	+	±	-	-	256
C	1	a	+	+	+	+	+	-	-	512
		b	+	+	+	+	+	±	-	512
	2	a	+	+	+	+	+	-	-	512
		b	+	+	+	+	+	±	-	512
	3	a	+	+	+	+	+	+	-	1,024
		b	+	+	+	+	+	+	±	1,024
	4	a	+	+	-	-	-	-	-	64
		b	+	+	±	-	-	-	-	64
	5	a	+	+	+	+	-	-	-	256
		b	+	+	+	+	±	-	-	256
Control	a	+	+	+	+	+	+	-	1,024	
	b	+	+	+	+	+	+	±	1,024	

+ a 0.15 M Glycin HCl NaCl (pH 3.0)

++ b PBS 洗浄抗原 (pH 7.4)

* 酸性処理抗原では、蛍光抗体法の判定が明瞭かつ客観的な判定が見られる。

処理抗原を用いた際には、血清の倍数希釈に従い陽性から陰性へ反応が反転する際、結果が必ずしも明瞭に得られないため力価決定上主観的判断が入りやすいのに対し、酸性緩衝液処理抗原を使用した方法においては、その反転が常に明瞭なため判定にさいし（写真3、4）主

観的判断の入りこむ余地が少ないことが認められた。その理由は、マラリア原虫の抗原性が保たれたままの状態では赤血球の溶血が起こるため、遊離マラリア原虫が、高い特異性において抗体および蛍光標識血清を吸着し、いわゆるバックグラウンド非特異反応が生じにくくなった

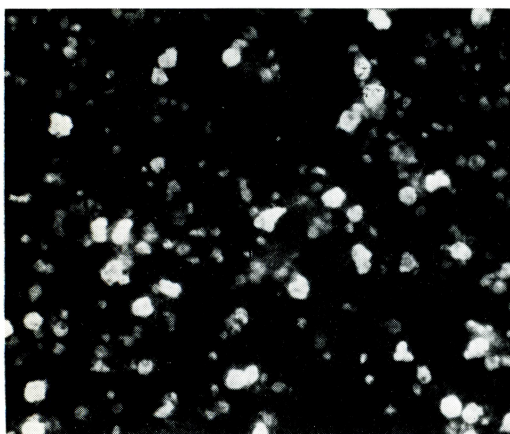


写真3 PBS 処理感染赤血球抗原を用いた蛍光抗体 200×

* 抗原の蛍光外にバックグラウンドの蛍光が見られる

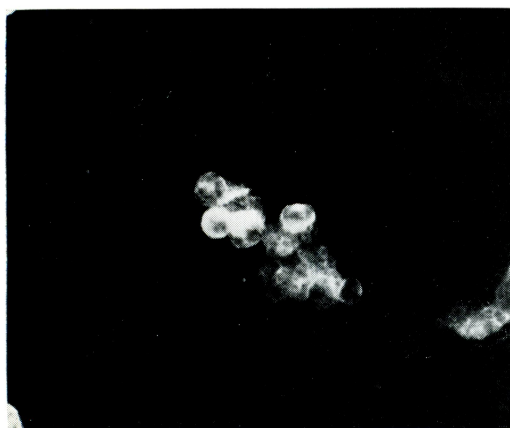


写真4 0.15M Glycin-NaCl-HCl 緩衝液処理感染溶血赤血球抗原を用いた蛍光抗体 400×

* 蛍光は抗原だけに見られる

ためと考えられた。

考 察

マラリアの血清学的診断法とし蛍光抗体法が取り入れられて以来、抗原として感染赤血球がもつぱら使用され、赤血球を取り除いた遊離マラリア原虫を使用する試みは、これまでなされていなかった。Sulzer (1971) らは、0.1% HCl 水溶液を用いて、マラリア抗原スライドを処理したところ溶血はおこるが抗原性が64分の1に低下する事を報告した。ゆえに抗原酸性処理法は、マラリア蛍光抗体法の改良法として賞用されるには至らな

かつた。本研究は、ネズミマラリア (*Plasmodium berghei* NK 65) —マウスの系をモデルとしマラリア感染赤血球を等張酸性緩衝液で得た遊離虫体を抗原として用いた蛍光抗体法の反応結果に客観性を与える事を目的として試みた。その結果、マラリアの抗原性は、緩衝液の濃度に作用されず、pH に影響されることから0.15M Glycin-NaCl-HCl 緩衝液 (pH 2.0) を生食水で50倍に希釈し pH 3.0に調整した反応液中で感染血球を30分処理する事で、抗原性を損なわない遊離原虫を得る事が可能でありまた判定上でも客観性を与えることが判明した。特に興味深いのは、同一緩衝液を生食水により30倍に希釈して得た pH 2.9の緩衝液で抗原材料を処理すると、抗原性が極端に損なわれる事である。マラリア原虫の抗原性をきめている分子が pH のわずかな変化によって損われることは、今後マラリア抗原の解析を進める上に必要な情報と思われる。本研究に用いた方法で抗原を準備すれば、蛍光抗体法において従来法より明瞭な陽性、陰性の反応の差が得られるので、ヒトマラリアの系においても、各研究室間での被検血清抗体価判定上の差異が少なくなるであろうと考えられる。マラリア原虫を赤血球から分離する方法として Martin (1971) らは、0.17M Tris buffer で pH 7.4に調整した0.83% NH₄Cl 溶液を作用させる方法を報告している。著者らは、この方法を追試し、賞用すべき点を確認しているが、マラリア原虫に附着している、感染に伴って生じた抗体をできるだけ原虫より取り除き、非特異反応を無くす目的の為には、本論文に記した方法が理論的により勝つていると考えられる。この視点より考えると本研究の酸性処理法は、マラリア原虫抗原を精製する際 Immuno absorbent に吸着した抗原物質を解離溶出させる時などに有益な情報ともなりうるものと思われる。

総 括

従来の蛍光抗体法は、反応の判定を蛍光顕微鏡観察に依存するために主観の入りこむ難点が残されている。蛍光抗体法の成功の可否は、いうまでもなく、特異性、反応性の高い抗原を準備する事から、活性を保持されたままの状態で原虫抗原を得る方法(酸性緩衝液処理法)を検討した。

その結果を要約すると次の如くである。

- 1) 感染赤血球は、30分、37C の酸性緩衝液処理で完全溶血を起こす。
- 2) 完全溶血により64~72%の割合で遊離原虫が得られる。

3) 遊離原虫の抗原性は、pH の値に大きく影響されることが考えられる。

4) 以上の点において、0.15M Glycin-NaCl-HCl 緩衝液 (pH 2.0) を生食水で50倍希釈し pH 3.0に調整した反応液中で処理する事で抗原性を損われない遊離原虫を得る事が判明した。

5) 4) により得た抗原使用で、従来のような主観的観察でなく、客観的観察が認められた。

文 献

- 1) Bruce-Chwatt, L. J. (1970) : Seroepidemiology of malaria. J. Parasit., 56, 552-555.
- 2) Geiman, Q. M. and Mearger, M. M. (1967) : Susceptibility of a new world monkey to *Plasmodium falciparum* from man. Nature. 215, 437-439.
- 3) Kabat, E. A. and Mayer, M. M. (1961) : Experimental Immunochemistry. Second Edition. Charles C. Thomas, Publisher Springfield, Illinois.
- 4) Kagan, I. G., (1972) : Evaluation of the indirect hemagglutination test as an epidemiologic technique for malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21, 683-689.
- 5) Kawamura, A. (1977) : Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press. 292p.
- 6) Martin, W. J., Finerty, J. and Rosenthal, A. (1971) : Isolation of *Plasmodium berghei* (Malaria) parasites by ammonium chloride lysis of infected erythrocytes. Nature, (New Biology) 233, 260-261.
- 7) Naeiuchi, H., Jusui, M., Hirokaya, K. and Mapsuhashi, T. (1971) : Studies on the anti-plasma cell serum. I Selective suppression of gamma-2 hemolysis in mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 40, 590-602.
- 8) Pampana, E. J. (1969) : A textbook of malaria eradication. Second Edition, Oxford University Press. London. 593p.
- 9) Sulzer, A. J., Wilson, M. and Hall, E. C. (1969) : Indirect fluorescent antibody tests for parasitic diseases V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA Test for malaria antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18, 199-205.
- 10) Sulzer, A. J. and Wilson, M. (1917) : The fluorescent antibody test for malaria. CRC Crit. Rev. Clin. Lab., 2, 601-619.
- 11) Seitz, H. M. (1975) : Counter-current immunoelectrophoresis for the demonstration of malaria antigens and antibodies in the sera of rats and mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 69, 88-90.
- 12) Tobie, J. E. and Coatney, G. R. (1961) : Fluorescent antibody staining of human malaria parasites. Exp. Parasit. 11, 128-132.
- 13) Thomas, V. and Ponanmpalam, J. T. (1975) : Thick Smer *Plasmodium falciparum* antigen from *in vitro* cultures for indirect fluorescent antibody test. WHO/MAL 75, 853 (WHO unpublished working document).
- 14) Voller, A. and Bray, R. S. (1962) : Fluorescent antibody staining as a measure of malaria antibody. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110, 907-910.
- 15) Voller, A. and O'Neil, P. (1971) : Immunofluorescence method suitable for large scale application to malaria. Bull. Wld. Hlth. Org., 45, 524-529.
- 16) Voller, A. and Huldtt, G. (1975) : New serological test for malaria antibodies. Brit. Med. J. 22, 659-661.
- 17) Waki, S. and Suzuki, M. (1974) : Development and decline of antiparasitodal indirect fluorescent antibodies in mice infected with *Plasmodium berghei* (NK 65) and treated with drugs. Bull. Wld. Hlth. Org. 50, 521-526.
- 18) World Health Organization (1974) : Serological test in malaria. Bull. Wld. Hlth. Org., 50, 527-535.
- 19) Yoeli, M. (1965) : Studies on *Plasmodium berghei* in nature and under experimental conditions. Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg., 59, 255-271.

Abstract

INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST FOR MALARIA SERODIAGNOSIS
IN RODENT MODEL USING *PLASMODIUM BERGHEI* NK 65
ANTIGEN TREATED BY LOW pH BUFFER SOLUTION

KOEI SATO, MAMORU SUZUKI AND SEIJI WAKI
(*Department of Parasitology, School of Medicine, Tokai
University Isehara, 259-11 Japan*)

Indirect fluorescent antibody technique for malaria serodiagnosis has been tried using parasitized blood treated by low pH buffered solution. *Plasmodium berghei*-white mouse(DDY strain) system was employed as an experimental model.

In acid buffer, erythrocytes underwent lysis and freed parasites are released in the solution. Antibodies or any other protein coating the surface of the parasites are considered to be removed under low pH conditions. Parasitized blood withdrawn from infected mice was divided into three aliquots and respectively treated by 0.15 M Glycin-NaCl-HCl buffer, Sodium barbitratesodium acetate HCl buffer, isotonic citric acid-Na₂HPO₄ buffer adjusted to ranging pH by adding physiological saline. The prepared specimens were comparatively studied for the applicability as the antigen source of the test. The best results was observed with the use of parasite antigen treated by 0.15 M Glycin-HCl buffer, pH 2.0 diluted by 50 times as much physiological saline to get final pH at 3.0 (GHS, pH 3.0). The same buffer adjusted to pH 2.9 by adding 30 times volume of saline caused reduction of antigenicity of parasite. Sera from groups of mice subjected to one time infection without drug treatment, 2 times infections each combined by chemotherapy (pyrimethamine 25 mg/kg/day), 3 times infections each of which were followed by the same drug treatment, were studied using thus prepared antigen under comparison with conventional antigen slides. Indirect fluorescent antibody test using antigen treated by GHS, pH 3.0 gave the same titer as that obtained by the classical antigen slides. The parasite did not reduce in antigenicity even after treatment by GHS, pH 3.0 and was considered to serve as better antigen source with least non specific fluorescence reaction, permits more objective determination of examined serum titers, leading coincidece of results from various laboratories.

This study was supported by a Scientific Reseach Grant from Ministry of Education (057315) and also partly by a fund from Toyota Foundation.

Authors' present adress: 1, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science 3-18, Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113. 2, Department of Parasitology, School of Medicine, Gunma University Maebashi 371.