

## 広節裂頭条虫症の免疫血清学的研究

### (2) ラテックス凝集反応と酵素抗体法による検討

近藤力王至\* 吉村裕之\* 大西義博\*  
赤尾信明\* 坪田宣之\* 鈴木俊夫†  
石郷岡清基†

(昭和54年7月25日 受領)

#### はじめに

寄生虫感染に対する宿主の免疫応答, 宿主の防御抗体, 各免疫グロブリンの誘導抗原, 免疫診断法など, 免疫血清学的研究が今日多くなされている. この中で条虫については包虫症に関するものが多いが, その他の条虫感染症については少なく, ことに広節裂頭条虫症については極めて少ない. さきに近藤ら(1977)は広節裂頭条虫感染者血清について IgE, IgG, IgM, IgA などの各免疫グロブリン量, Ouchterlony および免疫電気泳動像による検討を行なった結果を報告した. 今回は寄生虫症の免疫血清学的診断法として, ラテックス凝集反応(以下 LA)を試みた. 本法は今までに包虫症 (González, 1968; Fischman, 1960; Kagan, 1976), 旋毛虫症 (Innела and Redner, 1959), トキソプラズマ症 (Bozděce and Jira, 1961; Beverley *et al.*, 1973; 小林ら, 1977; 坪田・小沢, 1977), 赤痢アメーバ症 (Morris *et al.*, 1970; Stamm *et al.*, 1973), 日本住血吸虫症 (Deelder *et al.*, 1977) など数種の寄生虫感染症について広く応用されているものである. さらに今回 Engvall and Perlmann (1971) によつて開発された酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay 以下 ELISA) をも併用し, LA による抗体価および ELISA による本条虫抗原に対して特異的に反応する IgG 抗体値の検討を行った. ELISA は既に旋毛虫症 (Ljungström *et al.*, 1974; Ruitenber *et al.*, 1974), トリパノソーマ症 (Ruitenber *et al.*, 1977), 住血吸虫症 (Huldt *et al.*,

1975; Deelder *et al.*, 1977) などに広く用いられてきているが, 広節裂頭条虫症に関して応用された報告はみあたらない.

#### 材料および方法

##### 1) 被検血清:

ラテックス凝集反応 (LA) により抗体価の測定を行った血清は, 広節裂頭条虫感染者52名(北陸地方: 37名, 秋田地方: 15名)と, 対照群としては他寄生虫感染者75名(蛔虫, 鞭虫, 鉤虫の虫卵陽性者, アニサキス症患者), 一般健康者54名(金沢大学医療技術短期大学女子学生, その他)の計181名のものである.

##### 2) ラテックス凝集反応 (LA):

広節裂頭条虫抽出抗原をラテックス粒子に感作吸着させたものを用い, マイクロタイター法により血清中の LA 抗体価を測定した. この感作抗原は辻 (1974) の方法に準じ, 近藤ら (1974, 1977) の方法に従つて 0.1% 食塩水抽出後 14,500 G, 1時間遠沈, この上清を透析, 凍結乾燥し作製したものである. 本虫抗原は坪田・小沢 (1977) の方法に従い蛋白濃度が 3.7 mg/ml になるように調製し, 0.9  $\mu\phi$  のラテックス粒子に感作吸着させた. 感作および調製, 反応に用いた緩衝液は pH 8.0 の 0.2 M 塩化アンモニウム-アンモニウム緩衝液である. ラテックス粒子に抗原を感作するのは, この緩衝液で調製した抗原調製液と, 上記緩衝液にラテックス粒子が 2% (W/V) になるように懸濁させたラテックス懸濁液とを 1:1 の比に混じ, 37C 60分間行つた. 次いで余剰の抗原を除去した後, 感作ラテックス粒子を終濃度が 0.1% (W/V) になるように, 0.5% (W/V) 牛血清アルブミン加同緩衝液に懸濁したものを実験に供した. 抗体価は 1:2<sup>3</sup> を疑陽性,  $\leq 1:2$  を陰性域とし,  $\geq 1:2^3$  を陽性域とし判定した.

本研究は昭和51年文部省科学研究費 No. 148144 および昭和54年同 No. 337016 の補助を受けたことを付記する.

\* 金沢大学医学部寄生虫学教室

† 秋田大学医学部寄生虫学教室

### 3) 酵素抗体法 (ELISA) :

ELISA は本条虫抽出抗原と反応した抗体と、この抗体と更に特異的に反応する酵素標識抗 IgG によって、反応した IgG 抗体値を測定する方法である。今回この ELISA によって反応した IgG 抗体値を測定し、検討した血清は本条虫感染者36名、一般健康者14名の計50名のものである。測定は Engvall and Perlmann (1971) の方法に準じ、鈴木・Damian (1978)、谷 (1979) の方法に従って行った。本条虫抗原を感作吸着させたキューベット (Ratiolad 製) に被検血清を入れ反応させた後、酵素標識抗 IgG を加え、先に本条虫抗原と反応した抗体にこの酵素標識抗 IgG を二次的に反応させた。次いで基質を加え発色させその吸光度を測定し、結合した抗 IgG の量から本条虫抗原に特異的に反応している IgG 抗体量を算定した。ELISA に用いた本条虫の抗原は鈴木ら (1969) の方法に従って作製し、感作吸着のための抗原液は0.1 M-sodium carbonate buffer に蛋白量40  $\mu\text{g/ml}$  になるように溶解したものである。酵素標識抗 IgG は、抗人 IgG 家兎 IgG に alkaline phosphatase Type IV (Sigma) を glutaraldehyde で標識したものである。基質としては p-nitrophenyl phosphatase を作用させ、分光光度計 (日立333型) を用い波長400nm で吸光度を測定し、抗 IgG 量に対する反応した IgG 量を百分率で表わし IgG 抗体値 (ELISA 値) とした。

### 成 績

#### 1) ラテックス凝集反応 (LA) の成績

LA によってその抗体価を測定したのは広節裂頭条虫感染者52名と、対照群として他の寄生虫 (蛔虫、鞭虫、鉤虫、アニサキス) 感染者75名、一般健康者54名の計181名の血清についてである。それぞれの群の LA 抗体価の分布は Fig. 1 に示した。本条虫感染者の LA 抗体価は  $<1:2 \sim 1:2^8$  の間にそれぞれ分布し、他寄生虫

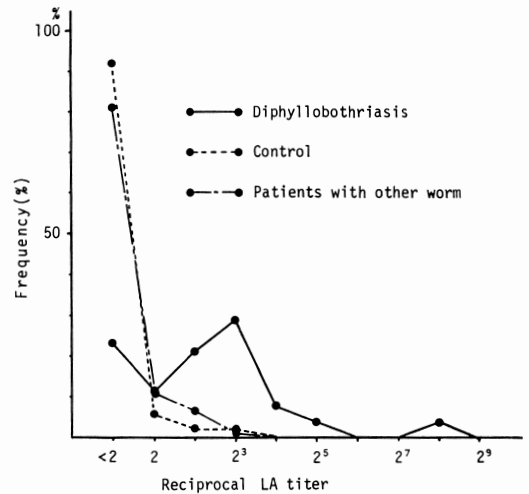


Fig. 1 Results of LA of 52 cases with *Diphylllobothrium latum* infection

感染者、一般健康者の LA 抗体価は  $<1:2 \sim 1:2^8$  の間にそれぞれ分布した。LA 抗体価についてそれぞれの群の平均値をみると、Table 1 に示した如く本条虫感染者群では  $1:2^{2.2 \pm 1.8}$  ( $1:2$  means  $\pm$  S.D.) であつたが、対照とした他寄生虫感染者群では  $1:2^{0.8 \pm 0.6}$ 、一般健康者群では  $1:2^{0.1 \pm 0.5}$  であつた。この結果から、本条虫感染者群と他寄生虫感染者群および一般健康者群との間にはそれぞれ  $t=4.33$ ,  $t=5.03$  で、この値は  $t > 2$  であることから、それぞれ危険率5%をもつて互い有意差があることを認めた。

次に、LA 抗体価の陽性域 ( $\geq 1:2^3$ ) を示したものは、本条虫感染者群では52名中23名 (44.2%) で、他寄生虫感染者群では75名中1名 (1.3%) で、一般健康者群では54名中1名 (1.9%) で、本条虫感染者群と対照とした2群との間に大きな差を認めた。逆に陰性域 ( $\leq 1:2$ ) を示したものは、本条虫感染者群では52名中18

Table 1 Results of ELISA and LA on diphylllobothriasis

Methods of test		Number of cases (%)				Means $\pm$ S.D.
		+	$\pm$	-	Total	
LA	Diphylllobothriasis	23 (44.2)	11 (21.2)	18 (34.6)	52	$1:2^{2.2 \pm 1.8*}$
	Other parasite-carriers	1 (1.3)	5 (6.7)	69 (92.0)	75	$1:2^{0.8 \pm 0.6*}$
	Controls	1 (1.9)	1 (1.9)	52 (96.2)	54	$1:2^{0.1 \pm 0.5*}$
ELISA	Diphylllobothriasis	17 (47.2)	8 (22.2)	11 (30.6)	36	$1.51 \pm 0.76 \dagger$
	Controls	2 (14.3)	3 (21.4)	9 (64.3)	14	$0.95 \pm 0.51 \dagger$

\* LA titer     $\dagger$  IgG (%) values obtained by ELISA

名(34.6%)であつたが、他寄生虫感染者群では75名中69名(92.0%)、一般健康者群では54名中52名(96.2%)で、本条虫感染者群と対照とした2群との間には著明な差を認めた。

2) 酵素抗体法(ELISA)による広節裂頭条虫感染者血清についての成績

ELISAによりIgG抗体値を測定したものは本条虫感染者36名と、対照群として一般健康者14名の計50名の血清についてである。結果はTable 1とFig. 2に示

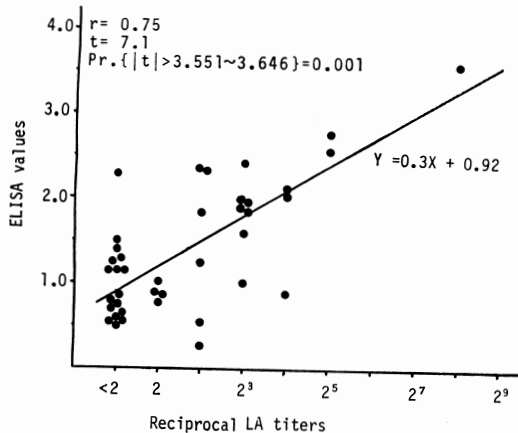


Fig. 2 Correlation between ELISA values and LA titers on 41 sera.

した如くであつた。本条虫感染者群ではIgG抗体値が0.49~3.61%の間にそれぞれ分布し、平均が $1.51 \pm 0.76\%$ であるのに対し、一般健康者群では0.49~0.76%の間に分布し、平均 $0.95 \pm 0.51\%$ であつて、両者の間には $t = 5.01$ で $t > 2$ であることから、危険率5%をもつて有意差が認められた。一般健康者群の平均IgG抗体値( $0.95 \pm 0.51\%$ )から、仮にELISA値の $1.46 \leq$ を陽性域とすると、陽性域を示したものは本条虫感染者群では36名中17名(47.2%)であるのに対し、一般健康者群では14名中2名(14.3%)と低い。逆に陰性域を示したものは本条虫感染者群では36名中11名(30.6%)であるのに対し、一般健康者群では14名中9名(64.3%)で、この2群の間にもそれぞれ明らかな差が認められた。

3) LAとELISAによる抗体価の相関について

LAによつて得られた抗体価と、ELISAにより得られたIgG抗体値との関係についての検討を行ったものは、本条虫感染者27名と一般健康者14名の計41名の血清についてである。その結果はTable 2に示したように、LA抗体価とELISA値(IgG抗体値)とが共に陽性

Table 2 Qualitative agreement between ELISA and LA on sera from 27 diphyllorhynchiasis patients and 14 controls

	ELISA		
	+	-	
LA	+	11(26.8)	2(4.9)
	-	5(12.2)	23(56.1)

ELISA:  $\geq 1.456 = +$

LA:  $\geq 1: 8 = +$

Agreement: 82.9%

域を示したものは41名中11名(26.8%)、疑陽性域と陰性域とを示したものは41名中23名(56.1%)で、合わせて41名中34名(82.9%)となつた。即ち、両反応で得られた測定値の定性的一致率は82.9%であつた。次にLA抗体価とELISA値(IgG抗体値)との相関をみるとFig. 2に示した如くである。X軸にLA抗体価、Y軸にELISA値(IgG抗体値)をとると、相関係数は $r = 0.75$ で、検定の結果 $t = 7.1$ 、0.1%以下の危険率で有意性を認め、回帰方程式 $Y = 0.3X + 0.92$ が成立し、両者の間に相関があることがわかつた。

## 考 察

広節裂頭条虫症に関する免疫血清学的研究は少い。最近、石田ら(1976)は本条虫感染者の中には高IgE値を示したものと述べ、近藤ら(1977)も本条虫感染者の血清について各免疫グロブリン値、寒天ゲル内沈降反応による検討を行った。その結果は総IgG量は21名中13名が正常値を越す高値を、総IgE量は21名中7名が対照群IgE値よりも高い値を示したが、Ouchterlony法では21名中7名、免疫電気泳動法では21名中1名と、沈降線を確認できたものは少く、寄生虫体数とこれら反応との間に一定の関係は認められなかつた。著者らは今回、本条虫感染者について本条虫抗原に対するLA抗体価の測定とELISAにより特異的に反応したIgG値の測定を行い、それら測定値および両反応の相関について検討を行った。はじめに述べたようにLAはSinger and Plotz(1956)によつて開発されて以来、寄生虫学領域では包虫症、旋毛虫症などに適用されたが、最近トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症などにも応用されている。当初はラテックス粒子の性状、抗原の特異性、測定法に問題がみられた。しかし、その後改善が試みられ、反応の再現性、技術的な簡便さなどの点からトキソプラ

ズマ症やアメーバ症では既に臨床診断の適用にまで進められてきた。著者らの今回行つた広節裂頭条虫症の患者血清についての検討の結果は次の如くであつた。LA 抗体価は本条虫感染者群では $\leq 1:2 \sim 1:2^8$ の間に広く分布したのに対し、対照群とした他寄生虫感染者群、一般健康者群では共に $\leq 1:2 \sim 1:2^3$ と分布が狭く、平均抗体価でも本条虫感染者群と他寄生虫感染者群、本条虫感染者群と一般健康者群との間に、それぞれ明らかに有意差がみられた。このことは少くとも本条虫の感染により、凝集反応にあずかる抗体が LA により測定しえたことを示している。

von Bonsdorff (1977) はその著書の中で過去の本条虫に関する免疫学的研究にふれ、現在の問題点として交差反応が避けられないこと、およびより鋭敏な微量抗体の測定に radioimmunologic な方法、ELISA による方法の必要性を提示すると共に、恐らくは本条虫に対する自然免疫 (natural immunity) は存在しないように思われると述べている。

近藤ら (1977) は本条虫感染者の免疫グロブリン値の中で IgG 総量が増加していることを知つたが、今回さらに ELISA による IgG 抗体値と LA 抗体価とがどのような関連性があるかを検討したところ、両者に相関が認められ、また 82.9% の定性的一致率がえられた。小林ら (1977) は、トキソプラズマ LA が間接赤血球凝集反応および色素試験と極めて高い定性的一致率をみた述べている。著者らも本条虫において LA と ELISA によつて、両者間に少数検出例とはいえ、かなりの定性的な一致率をえた。しかし、既報で近藤ら (1977) が述べたように、Ouchterlony や免疫電気泳動法による沈降抗体の出現はよわく、感染者の一部にのみ証明しえにすぎないことは、体内移行を行わない腸管内寄生虫での抗体産生に共通してみられる現象のように思われる。谷 (1979) は棘口吸虫 (*Echinostoma hortense*) 感染者についての IgG 値の測定から、対照群との間に有意差を認めながらも、抗体の産生は軽微であつたと報告しているが、今回著者らの報告もこれと一致している。即ち、虫体からの抗原性物質が腸管壁を通過して、抗体産生系を刺激していることは疑いないものの、組織内寄生に比べて微弱であると考えられる。なお、LA については抗原の保存と反応性など技術的検討を含め、今後研究を進めたい。

## ま と め

広節裂頭条虫感染者血清のラテックス凝集反応 (LA) 抗体価、酵素抗体法 (ELISA) による反応 IgG 値を測定し、その値の相関について検討した。得られた結果を要約すると以下の如くである。

1) 本条虫感染者 52 名、対照とした他寄生虫感染者 75 名、一般健康者 54 名について LA を行つた結果、平均抗体価は本条虫感染者群では  $1:2^{2.2 \pm 1.8}$ 、対照とした上記の 2 群ではそれぞれ  $1:2^{0.8 \pm 0.6}$ 、 $1:2^{0.1 \pm 0.5}$  で、本条虫感染者群とこれら 2 群との間に有意差を認めた。また陽性域 ( $1:2^3$  以上) の抗体価を示したものは本条虫感染者群では 44.2% であつたが、対照とした 2 群ではそれぞれ 1.3%、1.9% と低く、明らかに差を認めた。

2) ELISA による反応 IgG 値を本条虫感染者 36 名と一般健康者 14 名について検討した結果、平均 IgG 抗体値は本条虫感染者群では  $1.51 \pm 0.76\%$ 、一般健康者群では  $0.95 \pm 0.51\%$  で、両群の間には有意差が認められた。また IgG 抗体値の陽性域を ELISA 値の  $\geq 1.46$  とすると、本条虫感染者群では 47.2% が陽性域の値を示し、一般健康者群では 14.3% と低く、有意な差を認めた。

3) LA 抗体価と ELISA による ELISA 値 (IgG 抗体値) との相関は、本条虫感染者 27 名と一般健康者 14 名と計 41 名についてみると、相関係数  $r=0.75$ 、回帰式  $Y=0.3X+0.92$  で、よく相関していることが認められ、定性的一致率は 82.9% であつた。

## 文 献

- 1) Beverley, J. K. A., Freeman, A. P. and Watson, W. A. (1973): Comparison of commercial toxoplasmosis latex slide agglutination test with the dye test. *Vet. Rec.*, 93, 216-218.
- 2) von Bonsdorff, B. (1977): *Diphyllobothriasis in man*. Academic Press, 124-128, New York.
- 3) Bozděče, V. and Jira, J. (1961): Latex-agglutination test mit dem *Toxoplasma* antigen. *Deut. Gesundheitsw.*, 16, 2398-2400.
- 4) Deelder, A. M., Ruitenbergh, E. J., Kornelis, D. and Steerenberg, P. A. (1977): *Schistosoma mansoni*: Comparison of the immunoperoxidase techniques, PASS and ELISA, for human diagnosis. *Exp. Parasit.*, 41, 133-140.
- 5) Engvall, E. and Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),

- Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8, 871-874.
- 6) Fischman, A. (1960): Flocculation tests in hydatid disease. *J. Clin. Path.*, 13, 72-75.
  - 7) González, C. J. (1968): Kagan (1976) より引用.
  - 8) Hultdt, G., Lagerquist, B., Phillips, T., Draper, C. C. and Valler, A. (1975): Detection of antibodies in schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 69, 483-488.
  - 9) Innella, F. and Redner, W. J. (1959): Latex agglutination serologic test for trichinosis. *J. A. M. A.*, 171, 885-887.
  - 10) 石田和人・谷重和・鈴木俊夫 (1976): 各種寄生虫感染者における IgE の測定. *寄生虫誌*, 25 (増), 94.
  - 11) Kagan, I. G. (1976): Serodiagnosis of hydatid disease. *Immunol. Parasitic Inf.*, 131-142, Blackwell Scientific Pub., Oxford.
  - 12) 小林昭夫・平井徳幸・鈴木康弘・西川洋昭, 渡辺直熙 (1977): トキソプラズマラテックス凝集反応 (トキソテスト-MT) の検討. *寄生虫誌*, 26, 175-180.
  - 13) 近藤力王至・織田清・栗木浩・嶋田義治 (1974): 犬蛔虫と猫蛔虫との DISC 電気泳動像. *寄生虫誌*, 23 (増), 51.
  - 14) 近藤力王至・吉村裕之・西田和美・大西義博 (1977): 広節裂頭条虫症の免疫血清学的研究. (1) 感染者の血清グロブリン, 特に IgE 値および沈降反応について. *寄生虫誌*, 26, 265-270
  - 15) Ljungström, I., Engvall, E. and Ruitenberg, F. J. (1974): ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay): A new technique for the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections. *Parasitol. B. S. P. Proc.*, 69, XXIV.
  - 16) Morris, M. N., Powell, S. J. and Elsdon-Dew, R. (1970): Invasive amoebiasis: Circulating antibody levels by latex agglutination test. *Lancet*, 1, 1362-1363.
  - 17) Ruitenberg, E. J., Steerenberg, P. A., Brosi, B. J. M. and Buys, J. (1974): Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. *Bull. W. H. O.*, 51, 108-109.
  - 18) Ruitenberg, E. J. and Buys, J. (1977): Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of human african trypanosomiasis (sleeping sickness). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26, 31-36.
  - 19) Singer, J. M. and Plotz, C. M. (1956): The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.*, 21, 888-892.
  - 20) Stamm, W. P., Asthley, M. T. and Par-elkar, S. N. (1973): Evaluation of latex agglutination test for amoebiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67, 211-213.
  - 21) 鈴木俊夫, Damian, R. T. (1978): マンソン住血吸虫感染ヒヒにおける抗体の推移. *寄生虫誌*, 27 (増), 37.
  - 22) 鈴木俊夫・白木公・大鶴正満 (1969): アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究. 2. 抗原の分離, 精製. *寄生虫誌*, 18, 232-240.
  - 23) 谷重和 (1979): *Echinostoma hortense* Asada, 1926 に関する研究. (4) 感染経過に伴う排卵数, 末梢血液好酸球, 抗体の変動. *寄生虫誌*, 28, 57-62.
  - 24) 坪田宣之・小沢光 (1977): トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究 (第1報) マイクロタイター用試薬の調製条件と安定性. *寄生虫誌*, 26, 276-285.
  - 25) 辻守康 (1974): 寄生蠕虫類の免疫電気泳動法について. *寄生虫誌*, 23, 335-345.

**Abstract**

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON DIPHYLLOBOTHRIASIS, WITH  
SPECIAL REFERENCE TO LATEX-AGGLUTINATION AND  
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

KAORU KONDO, HIROYUKI YOSHIMURA, YOSHIHIRO OHNISHI,

NOBUAKI AKAO, NOBUYUKI TSUBOTA

*(Department of Parasitology, School of Medicine,  
Kanazawa University, Kanazawa City, Japan)*

TOSHIO SUZUKI AND SEIKI ISHIGOOKA

*(Department of Parasitology, Akita University,  
School of Medicine, Akita City, Japan)*

Immunological investigations, using both microtiter latex-agglutination (LA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were carried out on sera from patients with *Diphyllobothrium latum*, other parasite-carriers such as *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, hookworm, *Anisakis* and non-parasitic controls.

Results obtained in the present study were as follows:

(1) Average antibody titers of LA were  $1 : 22.2 \pm 1.8$  on 52 sera from diphyllbothriasis patients,  $1 : 20.3 \pm 0.6$  on 75 from other parasite-carriers and  $1 : 20.1 \pm 0.5$  on 54 from controls, respectively. When the titers of  $1 : 2^8$  or over were determined as positive reaction, 44.2% in diphyllbothriasis patients, 1.3% in other parasite-carriers and 1.9% in controls were to be positive. There were statistically significant differences in antibody titers between the patients and other parasite-carriers or controls.

(2) IgG antibody values measured by ELISA were shown to be  $1.51 \pm 0.76$  in 27 diphyllbothriasis patients and  $0.95 \pm 0.51$  in 14 controls, respectively. The positive rates ( $\geq 1.46$ ) were given as 47.2% in the infections and 14.3% in controls; accordingly the difference was significant between two groups.

(3) There was an evident correlation among antibody levels in both LA and ELISA on sera from 27 infections and 14 controls; namely, qualitative agreement between LA and ELISA was shown to be 82.9%.