

マンソン住血吸虫, 日本住血吸虫および日本産 肝蛭における特異的ヘモグロビン分解酵素の RAST 抗原としての性質

青 木 孝

順天堂大学医学部寄生虫学教室

(昭和54年7月13日 受領)

緒 言

マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* (Sm) の特異的ヘモグロビン分解酵素 (hemoglobin-specific protease, HSP) は, *in vitro* においてはヘモグロビン (Hb) のみを特異的に水解する至適 pH 約4のプロテアーゼであり, 消化管局在性の消化酵素であると考えられている (Timms and Bueding, 1959). Sauer and Senft (1972) は本酵素を精製し, その物理化学的・酵素学的性質を詳細に検討した. また青木・大家 (1976, 1977, 1978), 佐藤ら (1976a, 1976b), Sato *et al.* (1978), 大屋・野口 (1976, 1977) の研究にみられるように HSP は多種の寄生蠕虫に見出されており, その生理的意味が興味をもたれている.

他方, Sm-HSP は虫体から宿主血流中へ放出され, その体内を循環するため, これらの抗原としての意義が注目されている (Senft and Maddison, 1975; Senft, 1978; Hayashi, 1978; Oya *et al.* 1978). Senft and Maddison (1975) は Sm-HSP の皮内反応抗原としての可能性を追求し, 日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* (Sj) およびビルハルツ住血吸虫 *Schistosoma haematobium* 感染動物に対する皮内反応は陰性であることを報告した. このことは Sm-HSP 抗原の種特異性が高いことを示すものと考えられる.

上記のように生体にとって必須であり, 基質特異性が高くしかも種特異性が高い HSP は寄生適応におけるモデル酵素として興味深い対象であるばかりでなく, これ

の抗原としての諸性質を解析することによって, 特異的免疫診断抗原として利用することも可能となることが期待される.

本論文では Sm, Sj および日本産肝蛭 *Fasciola sp.* (Fh) における HSP の抗原性を検討し, Sm- および Sj-HSP は radioallergosorbent test (RAST) の抗原として種特異性が高いことを明らかにした. また Hb ゲルにより HSP の純度を分析した.

材料および方法

1. 試薬

Sephadex G-200は Pharmacia Fine Chemicals の製品を, Agarose-L-phenylalanine (27 μ moles/ml) は Miles-Yeda LTD の製品を使用した, ¹²⁵I 標識抗ヒト IgEは Pharmacia Diagnostica の製品 (Lot No. 2609) を使用した. 本製品は immunosorbent により精製されたものであり, 部分精製抗ヒト IgE より特異性が高いことが報告されている (根本, 1974). CNBr は和光純薬工業 K.K. の製品を用いた. Hb ゲルの基質として用いたウシ Hb (enzyme substrate powder) は Miles Laboratories 製のものである. アクリルアミドは半井化学薬品 K. K. の製品を, ニグロジンは東京化成工業 K.K. の製品を使用した. その他の試薬は特級の市販品を用いた.

2. 抗原

Sj, Sm, Fh の成虫は0.85% NaCl 溶液で3回洗浄した後-20C で保存した. 保存虫体からの HSP の抽出精製は Sauer and Senft (1972) の変法によった. すなわち0.04M Na-酢酸緩衝液 (pH 3.9) で抽出した後,

本研究の一部には文部省科学研究費, 昭和50年度海外学術調査の補助を受けた.

Sephadex G-200 カラムを用いてゲル濾過をおこない、さらに Agarose-L-phenylalanine カラムクロマトグラフィにより部分精製 HSP を得た。Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-, Sj-, Fh-HSP は蒸留水で透析し RAST の抗原として使用した。

Sm, Sj 虫体からの Veronal-buffered saline による抽出液 (Sm-, Sj-VBS 抗原) は横川ら (1955) の方法により調製し、RAST の抗原として用いた。各 HSP 画分および VBS 抗原の蛋白量測定は Lowry *et al.* (1951) の方法および Layne (1957) が記した Warburg and Christian の方法によった。

3. 被検血清

Sm 症流行地のヒト血清 (Sm 血清) として、1976年11月に中央アフリカ共和国ブール地区で採取したものを使用した。これらは国立予防衛生研究所寄生虫部林滋生博士および広島大学医学部 辻 守康博士から分与された。Sj 症既往患者血清 (Sj 血清) は1977年11月に山梨県韮崎市で採取したものである。

4. RAST

Ceska *et al.* (1972) の方法にもとづき paper disc を用いる RAST をおこない、Sm-, Sj-, Fh-HSP に対する IgE 抗体を測定した。すなわち、Agarose-L-phenylalanine 処理後の HSP (1.0 mg protein/蒸留水 10 ml) に、CNBr で活性化した paper disc 200枚を入れ、4C、約20時間インキュベートしてアレルゲンを disc に結合させた。これらのアレルゲン disc は Ceska *et al.* (1972) の方法により洗浄した後、各1枚の disc に対して0.05 ml の被検血清を添加し、4C で約20時間インキュベートした。さらにこれらの disc を0.85% NaCl 溶液で洗浄し、¹²⁵I 標識抗ヒト IgE (2-4×10⁴ cpm, 0.05 ml) とともに4C、約20時間インキュベートし、再び0.85% NaCl 溶液で洗浄した後、paper disc に結合した放射能をガンマカウンター (アロカ K.K. 製 JDC-752) で測定した。

Sm-, Sj-VBS 抗原を用いた RAST では、5.5 mg protein/VBS 10 ml の抗原を paper disc 200枚に結合させた後、上記と同様に処理した。

5. Hb ゲルによる HSP の純度検定

Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-, Fh-HSP (100-400 μg protein/ゲル) につき、pH 4.4、10% ポリアクリルアミドゲルを分離ゲルとするディスク電気泳動をおこない、蛋白の分離パターンを検討した。すなわち、電極槽用緩衝液として70 mM β-アラニン-28 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.35) を用い、3 mA/ゲル、4C、2-3

時間電気泳動をおこない、前線指示薬メチレンブルーが分離ゲル中を40 mm 移動した時点で電気泳動を終了した。泳動後のゲルはアミドブラック 10B で染色し、脱染色した後蛋白分離パターンを調べた。

また、上記のシステムによる泳動終了後のゲルを別に5%ウシ Hb を含む0.4 M Na-酢酸緩衝液 (2 ml/ゲル) 中で37C、60分間インキュベートし、ゲルに Hb を浸透・付着させ (Andary and Dabich, 1974 の変法)。同 Hb 溶液は Sm-, Fh-HSP に対してそれぞれ pH 3.9、4.5 に調製したものを用いた。得られた Hb ゲルは0.01%ニグロジンを含む0.4 M Na-酢酸緩衝液 (pH 3.9 あるいは4.5、10 ml/ゲル) 中で37C、2-20時間インキュベートした後、5%メタノール-7.5%酢酸混液中で固定・保存した。以上の操作によつて Hb ゲル上の HSP 活性局在部は透明な活性バンドとして観察され、他の部分は Hb に対するニグロジンの呈色反応により濃紫色に染色された。活性バンドの分離パターンおよび蛋白分離パターンを比較することにより、活性バンドに対応する蛋白バンドを推定し、さらに HSP の純度を推定した。

成 績

1. RAST

a) 抗原濃度の影響：Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-HSP を4倍希釈し、それぞれ希釈抗原を結合させた paper disc と Sm 虫卵陽性ヒト血清 (原液) につき RAST をおこない、RAST カウントに対する抗原濃度の影響を検討した。Fig. 1 に、数回くり返した実験のうち典型的な2例の結果を示した。曲線AおよびBはそれぞれ100 μg protein/ml および850 μg protein/ml の抗原原液を用いた場合の結果であるが、両者は50-100 μg protein/ml において RAST カウントの最高値を示した。したがつて以下の実験では100 μg protein/ml の HSP 抗原により調製したアレルゲン disc を使用した。

b) 血清希釈の影響：Sm 虫卵陽性ヒト血清を、0.3% ウシ血清アルブミン、0.9% NaCl、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2)、0.05% NaN₃ および0.1% Tween 20 かなる incubation buffer で1:128まで倍数希釈し、それぞれの希釈血清につき Sm-HSP を抗原とする RAST を実施した。Fig. 2 の典型的な2例の実験結果にみられるように、曲線Aでは1:2希釈血清がやや高い RAST カウントを示したが、いずれの希釈血清においても大差のない RAST カウントが得られた。曲線Bにおいては血清希釈に伴ない RAST カウントは低下し

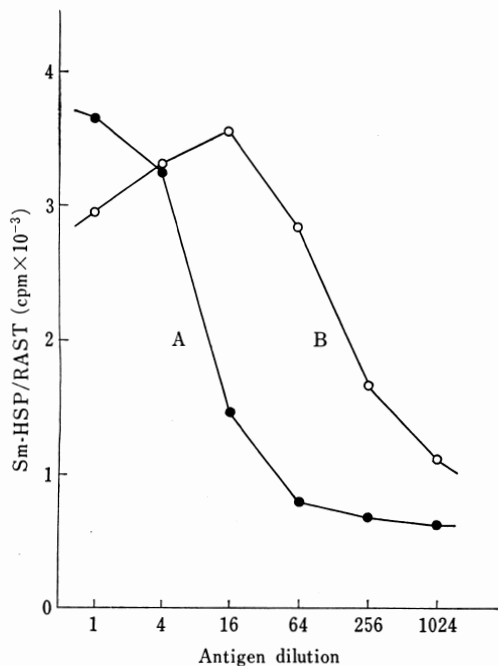


Fig. 1 Effect of antigen dilution on RAST counts. Protein concentrations of the original antigen solutions were 100 μg per ml (A) and 850 μg per ml (B). Sm-HSP/RAST is designated as RAST counts for Sm-HSP used as antigen.

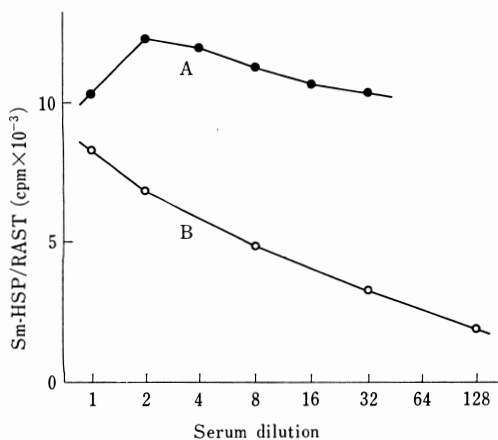


Fig. 2 Effect of serum dilution on RAST counts.

た. したがって以下の実験では血清原液あるいは2倍希釈液を使用した.

c) Sm 血清の RAST: Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-HSP を抗原として RAST をおこない、

多数の Sm 血清中に特異的 IgE 抗体を検出することができた. すなわち, Sm 血清161検体の RAST カウントの平均値は 4,148 cpm (最高値 10,780 cpm, 最低値 788 cpm) であり, 67検体が 4,000 cpm 以上のカウントを示したのに対して, 対照群10検体の平均 RAST カウントは 1,321 cpm (最高値 1,504 cpm, 最低値 1,113 cpm) であった.

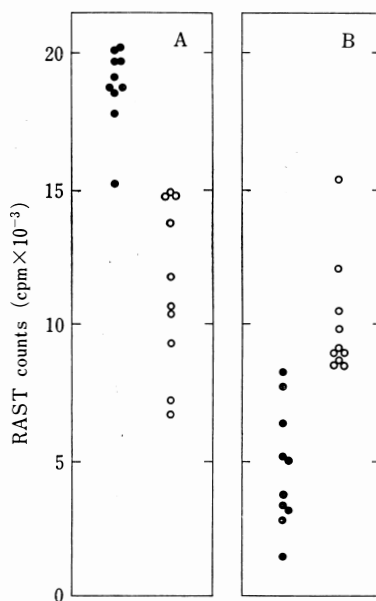


Fig. 3 Comparison of RAST counts of Sm- and Sj-sera for Sm- and Sj-HSP used as antigens. Group A is the Sm-sera examined with Sm-HSP (●) and Sj-HSP (○), while group B is the Sj-sera.

d) Sm- および Sj-HSP の RAST 抗原としての種特異性: Sm 血清10検体 (Fig. 3A) および Sj 血清10検体 (Fig. 3B) につき, Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-HSP および Sj-HSP を抗原とする RAST をおこなつたところ, Sm 血清に関しては homologous な組合せ (Sm血清対 Sm-HSP) の方が heterologous な組合せ (Sm血清対 Sj-HSP) より高い RAST カウントを示し, Sj 血清でも homologous な組合せの方が高 RAST カウントを示した. さらにA群の homologous な組合せにみられる RAST カウントはB群の homologous な組合せの RAST カウントより高く, A, B 両群の heterologous な組合せの間にも同様の特徴が認められた.

Sm 血清20検体および Sj 血清40検体につき Fig. 3,

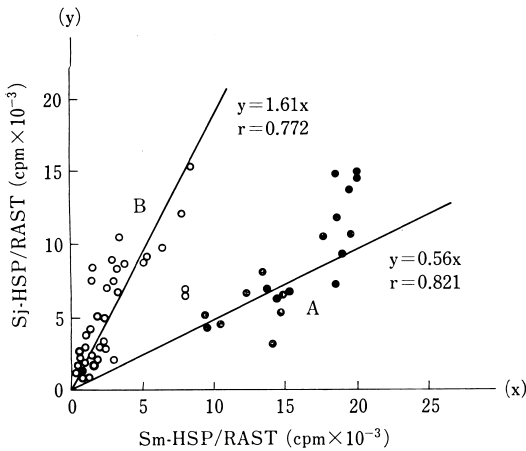


Fig. 4 Estimation of species-specific antigenicity of Sm- and Sj-HSP. A, Sm-sera (●); B, Sj-sera (○). Sj-HSP/RAST, RAST counts for Sj-HSP used as antigen.

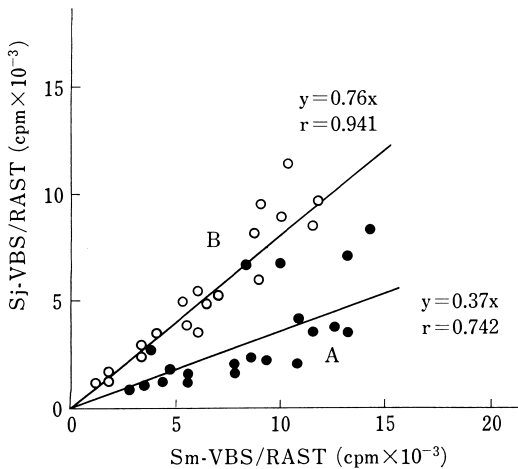


Fig. 5 Estimation of species-specific antigenicity of Sm- and Sj-VBS. A, Sm-sera (●); B, Sj-sera (○). Sm-VBS (or Sj-VBS)/RAST, RAST counts for Sm-VBS (or Sj-VBS) used as antigen.

と同様な実験をおこなつて得た結果を Fig. 4 に記した。Fig. 3 と同様に Sm 血清は Sm-HSP 抗原により強く、Sj 血清は Sj-HSP 抗原により強く反応したが、図にみられるように、血清に対し抗原 Sm-HSP を用いた場合の RAST カウントを x とし、Sj-HSP を用いた場合のカウントを y とすれば、Sm 血清に対する方程式は $y=0.56x$ (相関係数 $r=0.821$)、Sj 血清に対するそれは $y=1.61x$ ($r=0.772$) となり、これらの方程式の傾

き 0.56, 1.61 はそれぞれ Sm-HSP, Sj-HSP の抗原としての種特異性を定量的に表現する示標として利用できると思われる。また両方程式の傾きの比 $1.61/0.56=2.88$ は両 HSP 抗原間の種特異性の高さをあらわす一種の係数とみなすことができ、この比が 1 のとき両抗原間には種特異性は存在しないといえよう。また、この比が無大の場合交叉反応は存在しないといえる。

これと同様な実験を Sm- および Sj-VBS 抗原を用いておこなつて得た結果を Fig. 5 に示したが、Sm 血清に対しては $y=0.37x$ ($r=0.742$)、Sj 血清に対しては $y=0.76x$ ($r=0.941$) の方程式が得られた。この場合傾きの比 $0.76/0.37=2.08$ は HSP 抗原を用いた場合よりかなり低く、両 VBS 抗原間にもある程度の種特異性は認められるはするものの、HSP 抗原の場合に比し種特異性は低いものと考えられる。

さらに Agarose-L-phenylalanine 処理後の Fh-HSP についても RAST によつて検討した。Fig. 6 にみら

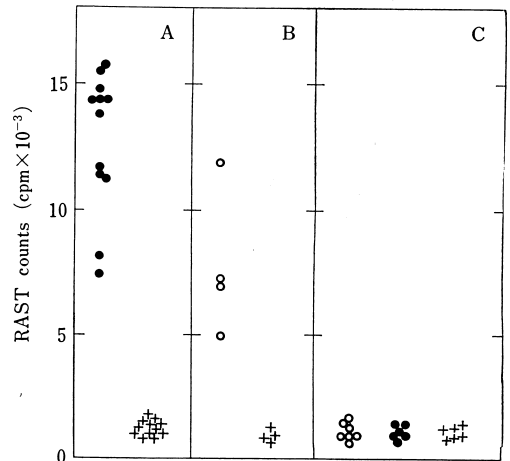


Fig. 6 Comparison of RAST counts of Sm- and Sj-sera and normal human sera for Sm-, Sj- and Fh-HSP. A, Sm-sera; B, Sj-sera; C, normal human sera. Sm-HSP (●), Sj-HSP (○), and Fh-HSP (+) were used as antigens.

れるように、高 RAST カウントを示す Sm 血清 (12 検体) および Sj 血清 (4 検体) はいずれも Fh-HSP に対してきわめて低いカウントを示し、正常対照血清の RAST カウントのレベルと異ならなかつた。

2. HSP の純度検定

Agarose-L-phenylalanine 処理後の Fh-HSP につきディスク電気泳動をおこない、ウシ Hb を浸透・付着

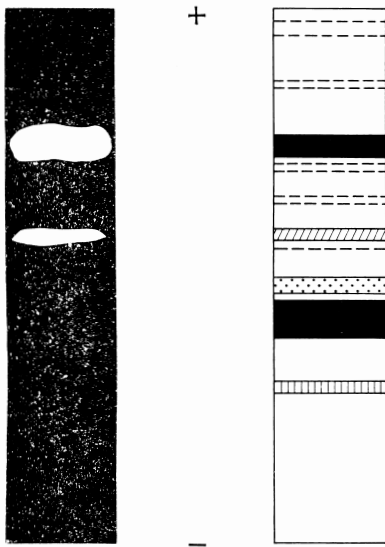


Fig. 7 Disc-electrophoretic separation of Fh-HSP. Left, Hb-gel; Right, protein profile.

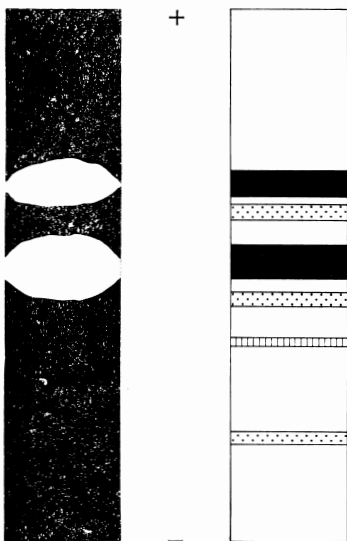


Fig. 8 Disc-electrophoretic separation of Sm-HSP. Left, Hb-gel; Right, protein profile.

させた後、同ゲル上で HSP 活性の検出を試みた。Fh-HSP 活性は2本の透明バンドとして認められ、これらを陽極側から Fh-HSP₁ および Fh-HSP₂ とすると、Fh-HSP₂ の方が高い活性を示した (Fig. 7)。蛋白の分離パターンはアミドブラック 10B による濃染バンド2本と微染バンド4本からなり、2本の濃染バンドはそれぞ

れ Fh-HSP₁ および₂ と電気泳動度が一致した。

これと同様な方法で Sm-HSP 画分を分析した結果、Fh-HSP と同様に2本のバンド (陽極側から Sm-HSP₁ および Sm-HSP₂) として検出されたが、Sm-HSP₂ の活性はきわめて微弱であった (Fig. 8)。これらの活性バンドに対応する蛋白バンド2本が蛋白分離パターンの中に認められ、Sm-HSP₂ に相当する蛋白バンドは活性バンドと同様に微小であった。また Sm-HSP の場合は Fh-HSP と異なりかなり多量の混在蛋白が存在することが蛋白分離パターンから明らかとなった (Fig. 8)。

考 察

本論文では Sm-, Sj- および Fh-HSP 画分の抗原としての性質を検討した。Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-HSP を抗原とする RAST では、多数の Sm 血清中に特異的 IgE 抗原の存在が認められた。したがって、Sm-HSP 画分はアレルゲンとして作用するものと考えられる。

IHA に関しては、浅見ら (1979) は Sm-HSP 画分とともに Freund's complete adjuvant を用いてウサギを免疫し (10日毎に計3回)、IHA 抗体の産生を認めている。著者ら (青木ら, 1979) は比較的生理条件に近いと考えられる免疫方法として、粗抽出 Sm-HSP を隔日に8回 (計 15 mg protein) ウサギに静注する方法により IHA の標準陽性血清を調製し、IHA に供した。その結果、粗抽出 Sm-HSP を抗原とした場合多少の陽性反応が認められたが、Sephadex G-200 処理後の Sm-HSP 抗原では IHA は陰性であった。したがって HSP の純化は IHA 反応性の低下をもたらすと考えることもできよう。しかしながら Sm-HSP が IgE 以外の抗体を産生し得るか否かについては免疫動物の種類、免疫方法、HSP の純度、抗原量等につき充分考慮を払い、今後さらに検討をかさねる必要がある。

Sm 血清に対して Sm- および Sj-HSP を、Sj 血清に対しても Sm- および Sj-HSP を用い、RAST における両 HSP 抗原の種特異性を検討した結果、種特異性を定量化し得ると考えられる方程式が得られた (Fig. 4)。

この方程式を用いて実験結果を検討し、Sm- および Sj-HSP 抗原の種特異性は相当高いことが明らかとなったが、一方まだ交叉反応がみられることも明らかである (Fig. 4)。Hb ゲルによる分析結果からも明らかのように、Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-HSP 画分にはまだ相当量の混在蛋白が存在する。したがって上述の交叉反応はこれら混在蛋白に由来する可能性も考えら

れる。

しかしながら他方では、Sm- および Sj-HSP 分子間に共通抗原が存在することも考えられる。このような場合には純粋に分離された HSP を RAST 抗原として用いても交叉反応がみられることとなろう。また、既述のような、本実験に用いた ^{125}I 標識抗 IgE の特異性は相当高いことが報告されている (根本, 1974) が、これら HSP が IgE 以外の抗体を産生しうるか否かという問題と関連して、抗 IgE の特異性も検討を要すると思われる。これらの問題は今後精製 HSP を用いて検討すべき興味深い課題であろう。

Hb ゲルによる分析結果にみられるように、Agarose-L-phenylalanine 処理後の Fh-HSP はきわめて高純度にまで精製された。Sm と Fh の粗抗原間で共通抗原の認められること (Capron *et al.*, 1968) はよく知られたところであるが、高 RAST カウントを示す Sm および Sj 血清に対する本 Fh-HSP による RAST は完全に陰性であったことから、この画分の種特異性の高さが推察できる。したがって本酵素は RAST において種特異性を検討するためのモデル抗原として利用価値の高いものと考えられるが、今後 Fh 感染ヒト血清を用いての実験によりこのことをさらに確認したい。これと関連して、著者らは Fh 感染ラットの血清を用いた PCA をおこない、高純度 Fh-HSP は陽性反応を示すことを確認している (青木・大家・内田・板垣, 未発表)。また従来既知粗抗原を用いては困難とされていた Sm および Fh による感染の選別も、精製酵素を抗原として用いることにより可能となることが期待される。

Sm 血清, Sj 血清および Sm-HSP, Sj-HSP 間での各種組合せにより RAST を実施したが、homologous な組合せあるいは heterologous な組合せにおいて、Sm 血清の方が Sj 血清より高 RAST カウントを示したことはまことに興味深い。このことは、中央アフリカ共和国ブール地区には現在虫卵を排出している Sm 症患者が多数存在し、山梨県韮崎市には Sj 症既往患者のみがみられることと関連しているとも考えられるが、今後 homologous なグループ (Sj 虫卵陽性患者血清および Sj 症既往患者血清) 間での比較検討によりこの点を明らかにしてゆきたい。

要 約

Agarose-L-phenylalanine 処理後の Sm-HSP を抗原とする RAST をおこない、多数の Sm 血清中に特異的 IgE 抗体が検出されたことから、Sm-HSP はアレ

ルゲンとして作用するものと考えられる。Sm-, Sj-HSP および Sm, Sj 血清の間の各種組合せにより RAST をおこない、Sm- および Sj-HSP 抗原間にきわめて高い種特異性が認められた。Sm- および Sj-VBS 抗原を用いてこれと同様な実験をおこない、両 VBS 抗原間にも種特異性を認めたが、RAST 抗原としては両 HSP 抗原の方がより高い種特異性を示すことが明らかとなった。また、高純度 Fh-HSP を抗原とする RAST においては、Sm および Sj 血清の RAST カウントはいずれも正常ヒト血清の RAST カウントと異ならなかつた。Agarose-L-phenylalanine 処理後の Fh- および Sm-HSP を Hb ゲルにより分析し、前者はきわめて純度が高く、後者は相当量の混在蛋白を含むことが明らかとなった。

謝 辞

終始ご指導とご校閲を賜った本教室大家 裕教授に心から感謝いたします。有益な助言を与えられた本教室吉村堅太郎助教授、データの統計処理につきご教示を与えられた国立予防衛生研究所寄生虫部林 滋生部長に深謝いたします。本研究に用いた日本住血吸虫成虫は予研寄生虫部保坂幸男、北里大学医学部伊藤洋一、山梨県公害衛生研究所地方病科薬袋 勝、長崎大学熱帯医学研究所寄生虫部青木克己・嶋田雅暁の諸先生から分与された。記して感謝の意を表します。ブラジル・レシフェ市のマンソン住血吸虫流行地ヒト血清および山梨県韮崎市の日本住血吸虫症既往患者血清の入手に際し多大の便宜を与えられた慶応大学医学部浅見敬三、千葉大学医学部横川宗雄、予研寄生虫部林 滋生、甲府市立病院井内正彦、山梨衛研地方病科堀見利昌の諸先生とその共同研究者の方々に感謝いたします。RAST の手技につきご教示を与えられた宮崎大学医学部石井 明先生および東京大学医学部伊藤幸治先生に深謝いたします。本研究に用いた ^{125}I 標識抗ヒト IgE は第一ラジオアイソトープ K.K. より分与された。

文 献

- 1) Andary, T. J. and Dabich, D. (1974): A sensitive polyacrylamide disc gel method for detection of proteinases. *Anal. Biochem.*, 57, 457-466.
- 2) 青木 孝・大家 裕 (1976): 日本住血吸虫の hemoglobin specific proteolytic enzyme. *寄生虫誌*, 25 (増), 63.

- 3) 青木 孝・大家 裕 (1977) : 肝蛭, 広東住血線虫およびマンソン住血吸虫の特異的ヘモグロビン分解酵素-ヘモグロビン・ゲルによる電気泳動および酵素学的解析一. 寄生虫誌, 26(増), 26.
- 4) 青木 孝・大家 裕 (1978) : マンソン住血吸虫, 広東住血線虫, 肝蛭の hemoglobin-specific acid protease—ヘモグロビン・ゲルによる multiple forms の分離検出—. 寄生虫誌, 27(増), 101.
- 5) 青木 孝・吉村堅太郎・大家 裕 (1979) : RAST 抗原としての寄生蠕虫 hemoglobin-specific protease の種特異性. 寄生虫誌, 28(増), 36.
- 6) 浅見敬三・田辺将信・小林正規・三浦左千夫 (1979) : マンソン住血吸虫のグロビン特異的蛋白分解酵素の精製及び性質について. 寄生虫誌, 28(増), 79.
- 7) Capron, A., Biguet, J., Vernes, A. and Afchain, D. (1968) : Structure antigenique des helminths. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Pathologie-Biologie, 16, 121-138.
- 8) Ceska, M., Eriksson, R. and Varga, J. M. (1972) : Radioimmunosorbent assay of allergens. J. Allergy Clin. Immunol., 49, 1-9.
- 9) Hayashi, S. (1978) : Studies on the intradermal test for schistosomiasis. The relation between the quantity of the inoculum and its potency. The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Abstracts of 13th Joint Conference on Parasitic Diseases, pp. 12-14.
- 10) Layne, E. (1957) : Protein estimation by ultraviolet absorption. Methods in Enzymology, 3, 451-454.
- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 12) 根本俊彦 (1974) : 特異的 IgE 抗体の RAST による測定. 第1編 RAST の2-3の基礎的検討. アレルギー, 23, 594-603.
- 13) Oya, H., Aoki, T. and Yoshimura, K. (1978) : Species specificity of protease fractions from *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* as antigens for radioallergosorbent test. The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Abstracts of 13th Joint Conference on Parasitic Diseases, pp. 49-51.
- 14) 大屋幸子・野口市夫 (1976) : *Ancylostoma caninum* の hemoglobin 分解酵素について. 寄生虫誌, 25 (増), 63.
- 15) 大屋幸子・野口市夫 (1977) : 犬鉤虫 (*Ancylostoma caninum*) におけるヘモグロビン分解酵素の性状. 寄生虫誌, 26, 307-313.
- 16) 佐藤久美子・高橋順治・沢田利貞 (1976a) : *Dirofilaria immitis*, *Schistosoma japonicum*, *Chlonorchis sinensis* の globinolytic enzyme についての研究. 寄生虫誌, 25, 8-9.
- 17) 佐藤久美子・高橋順治・沢田利貞 (1976b) : *D. immitis*, *C. sinensis*, *S. japonicum* の globinolytic enzyme についての研究 II. 寄生虫誌, 25 (増), 38.
- 18) Sato, K., Sawada, T. and Suzuki, M. (1978) : Studies on hemoglobin specific protease of *Dirofilaria immitis*. The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Abstracts of 13th Joint Conference on Parasitic Diseases, pp. 58-59.
- 19) Sauer, M. C. V. and Senft, A. W. (1972) : Properties of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. Comp. Biochem. Physiol., 42B, 205-220.
- 20) Senft, A. W. (1978) : Schistosomal proteolytic enzyme: Use as a antigen. The U.S.-Japan Medical Science Program, Abstracts of 13th Joint Conference on Parasitic Disease, pp. 60.
- 21) Senft, A. W. and Maddison, S. E. (1975) : Hypersensitivity to parasite proteolytic enzyme in schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24, 83-89.
- 22) Timms, A. R. and Bueding, E. (1959) : Studies of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. Brit. J. Pharmacol., 14, 68-73.
- 23) 横川宗雄・大島智夫・勝呂 毅 (1955) : 肺吸虫症の皮内反応に関する研究 (II). 寄生虫誌, 282-289.

Abstract

ANTIGENIC PROPERTY OF HEMOGLOBIN-SPECIFIC PROTEASE FROM
SCHISTOSOMA MANSONI, *S. JAPONICUM* AND *FASCIOLA* SP.
 FOR RADIOALLERGOSORBENT TEST

TAKASHI AOKI

(*Department of Parasitology, Juntendo University School
 of Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*)

Hemoglobin-specific protease (HSP) was purified from 22,000 g supernatant of *Schistosoma mansoni* (Sm) homogenate by Sephadex G-200 gel filtration and agarose-L-phenylalanine column chromatography. *Schistosoma japonicum* (Sj) HSP and *Fasciola* sp. (Fh) HSP were also purified by the same methodology. The antigenicity of these HSP fractions for the paper-disc method of RAST assay was examined.

The presence of IgE antibodies to Sm-HSP (agarose-L-phenylalanine fraction) in Sm-patient sera could be demonstrated by RAST, suggesting that the Sm-HSP serves as an allergen. Using various combinations between Sm- and Sj-HSP (agarose-L-phenylalanine fraction), and Sm- and Sj-sera, RAST studies were carried out for the elucidation of species-specific antigenicity of HSP fractions; the Sm-sera were obtained from local populations in the Central Africa Republic where schistosomiasis mansoni is still endemic, while the Sj-sera were collected in Yamanashi, Japan, where no active schistosomiasis japonica has been found for recent several years. The RAST counts were higher in the homologous combinations than in the heterologous combinations, i. e., the Sm-sera responded more strongly to Sm-HSP than to Sj-HSP, and this is also true in the Sj-sera. When the RAST counts for Sm-HSP were plotted against x-axis and those for Sj-HSP were plotted against y-axis, equations: $y=0.56x$ ($r=0.821$) and $y=1.61x$ ($r=0.772$) were obtained for the Sm-sera (20 samples) and for the Sj-sera (40 samples), respectively. The ratio of the coefficient of each equation ($1.61/0.56=2.88$) seems to be used as an index of species specificity between Sm- and Sj-HSP. Thus, larger ratio suggests the higher species specificity. Therefore, the greatest ratio would be expected if pure Sm- and Sj-HSP could be employed as RAST antigens. By using Sm- and Sj-VBS antigens, similar equations were obtained, and the ratio obtained ($0.76/0.37=2.05$) is significantly smaller than that for HSP antigens. These results indicate that the species specificity of Sm- and Sj-HSP antigens is higher than that of VBS antigens. Additionally, both Sm- and Sj-sera showing high RAST counts to Sm- and Sj-HSP did not show any positive reaction to Fh-HSP (agarose-L-phenylalanine fraction), highly purified enzyme fraction, by RAST assay.

Disc-electrophoretic analysis of Fh-HSP used as the RAST antigen revealed that the enzyme activity was separated to multiple from (Fh-HSP₁ and Fh-HSP₂) on the polyacrylamide gel coated with hemoglobin. On the Amino Black stained gel, two protein bands corresponding to the activities were observed and besides small amounts of impurities were seen. Sm-HSP was also separated to Sm-HSP₁ and Sm-HSP₂, but the sample employed was still contaminated with large amounts of other various impurities.