

## ペルオキシダーゼ標識抗体, 5-アミノサリチル酸基質 を用いた日本住血吸虫症の ELISA 反応の研究

松田 肇\* 中尾 稔\* 田中 寛\*  
永田 博† Julian S. Noseñas‡, Bayani L. Blas‡,  
Gerundio P. Portillo‡, Alfredo T. Santos, Jr.‡

(昭和56年5月11日 受領)

**Key Words:** micro-ELISA, schistosomiasis japonica, serodiagnosis, peroxidase-labelled antibody, 5-aminosalicylic acid

### はじめに

住血吸虫症の免疫学的診断法に関する研究は、従来多数の報告が見られ、その鋭敏性、特異性について種々の角度から検討され、論じられている (Kagan and Pellegrino, 1961; Kagan, 1976).

最近、Van Weeman and Schurs(1971)及び Engvall and Perlmann (1971, 1972)により抗原抗体を測定するために考案された酵素抗体法 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が、ラジオイムノアッセイ (RIA)に匹敵する高感度を有し (Schinski *et al.*, 1976; Voller *et al.*, 1977), しかも RIA のもつ難点の多くを解消しうる可能性をもつ方法として注目されるようになってきた (WHO, 1976; Voller *et al.*, 1978). ELISA は、既に広い分野に応用され、Voller *et al.* (1976 a, 1978), WHO(1976), Hillyer and Kagan(1979) の総説に述べられている様に、寄生虫学領域への本法の導入は、1974年以後であり既に多くの寄生虫疾患に応用され、その診断的価値が認められつつある。すなわち、旋毛虫症 Ljungström *et al.*, 1974; Ruitenber *et al.*, 1974, 1975), マラリア (Voller *et al.*, 1974, 1975a), トリパノソーマ症 (Voller *et al.*, 1975b), シャーガス病 (Voller

*et al.*, 1975c), トキソプラズマ症 (Voller *et al.*, 1976b; Walls *et al.*, 1977), 包虫症 (Farag *et al.*, 1975), オンコセルカ症 (Bartlett *et al.*, 1975) などに広く用いられてきているが、住血吸虫症においては Huldts *et al.* (1975); Schinski *et al.* (1976); Deelder *et al.* (1977); Farag and Barakat (1978); McLaren *et al.* (1978); Hillyer and Gómez de Rios (1979); McLaren *et al.* (1979) が主として Manson 住血吸虫の診断に本法を応用している。日本住血吸虫に関しては、Tanaka *et al.* (1979); Yogore *et al.* (1980) の報告があるにすぎない。

本研究では、ペルオキシダーゼ標識抗体と5-アミノサリチル酸 (5AS) を基質とした系を用いて、Micro-ELISA 法により日本住血吸虫症の高度浸淫地であるフィリピン・レイテ島の本症患者血清での特異抗体の検出と、これに関する二、三の基礎的検討を行い、患者検出への簡易化について検討した。

### 材料及び方法

住血吸虫卵のマウス腸管からの消化分離法: Scorza (1961) 及び Matsuda *et al.* (1977) の方法に改良を加えた。マウスに70~80隻のセルカリアを感染させ、7~8週後に剖検し腸管を摘出後、切開し内容物を生理食塩水で充分洗浄し、4°Cに2~3日保ち自己融解を促進させた。濾紙で水分を除いた後、ハサミで細切し、組織の5倍量のハンクス BSS (Hanks's balanced salt solution, pH7.4) に0.01%の割合にプロナーゼ E (100万チロジン単位/g, 科研化学K.K) を溶き、4分間磨細後、37°C 孵卵器内でスターラーで攪拌しつつ翌朝まで消化した。その後2分間磨細し、60メッシュの金網で濾過後、2,000

This investigation received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

\* 東京大学医科学研究所寄生虫研究部

† 東京医科歯科大学医学部医動物学教室

‡ Schistosomiasis Control and Research Project,, Ministry of Health, Palo, Leyte 7118, Republic of the Philippines.

rpm 1分間遠心した。沈査に対し、10倍量の BSS に コラゲナーゼ (210U/mg, Sigma) を0.05%の割合に溶かし、更に1.5時間消化後、虫卵液を80, 115及び150メッシュの各サイズの金網に通し、最終的に325メッシュ (44 $\mu$ m) の網上に虫卵を回収した。冷1%食塩水で網上の虫卵を充分洗浄後、500rpm 1分間遠心、この操作を5~6回繰り返した。得られた虫卵を冷蒸留水で数回遠心後、沈査を凍結乾燥し、-70Cに保存し用に臨み抗原を作成した。

#### 抗原の作成：

日本住血吸虫 (山梨系) のマウス継代株から得た虫卵で抗原を作成した。凍結乾燥した虫卵を0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 加炭酸緩衝液 (0.05M, pH9.6) で1:100に希釈し、磨細後、凍結融解を繰り返して最終的に1:500になるように希釈して、4C, 2日間抽出した。1時間冷凍遠心 (20,000G) して得られた上清を径0.45 $\mu$ m のミリポアフィルターで濾過後、分注し-70Cに保存した。蛋白質濃度の測定は、Lowry *et al.* (1951) によった。

#### 血清：

フィリピン・レイテ島の Schistosomiasis Control and Research Project (SCRП) の外来患者のうち、日本住血吸虫症の既往歴があり、Fuadin で治療を受けた1例を除き MIFC 法による糞便検査で虫卵陽性と判定された日本住血吸虫症患者の血清を用いた。対照の陰性血清は、SCRП の職員及び東大医科研附属病院で集められた住血吸虫非感染者血清である。

#### ELISA の手技：

抗原吸着体として、平底穴容量0.3ml のポリスチレン

製マイクロプレート (Dynatech, M29ART) を用いた。炭酸緩衝液で希釈調整された抗原0.3ml を、プレートに入れ、37C 2時間湿潤箱中で感作したのち4Cに保ち、通常、反応は翌日実施した。抗原をプレートから除き、Tween 20 (0.05%) 及び NaN<sub>3</sub> (0.05%) を含む0.15M リン酸緩衝液 pH7.2 (PBS/T) で5分毎に、液を3回交換して洗浄後、PBS で希釈された被検血清を入れ、37C 1時間反応させた。その後同様に洗浄し、1% BSA (Bovine serum albumin, Fraction V, Sigma) 加 PBS で1:400に希釈されたペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (Miles-Yeda) を加え、1時間反応させた。同様に洗浄後、すばやく基質を加え、室温に1時間保ち、25 $\mu$ l の1N NaOH を加え反応を停止させ、肉眼的判定と分光光度計 (日立124型) 449nm の波長で吸光度 (OD) を測定した。

基質は5-アミノサリチル酸 (5AS, 関東化学K.K.) を用い、その80mg を約70C の温蒸留水100ml 中で溶解し、NaOH で pH 6.0 に修正した。これに対し、1/10量の0.05%過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を加えて基質を調整した。

### 成 績

抗原のプレートへの感作条件の検討：

抗原の感作方法は、報告者により一定していない。抗原感作に影響を与えると考えられる温度と時間、更に感作プレートの保存法を検討した。Table 1 に示すように、37C で1時間と2時間で感作し、プレートを洗い風乾後4Cで乾燥保存を行った群、同様に感作後、抗原液を含むプレートを4Cに4日間保った群、他は4Cで1, 2

Table 1 Comparison of sensitizing methods and storing conditions of microtiter plates

Sensitization	Storage	Dilution of serum				
		1:15	1:30	1:60	1:120	1:240
37 C, 1 hr	dry, 4 C	.790	.635	.475	.325	.255
37 C, 2 hr	dry, 4 C	.890	.710	.520	.385	.295
37 C, 1 hr	wet, 4 C	.860	.710	.520	.425	.310
37 C, 2 hr	wet, 4 C	.955	.775	.605	.475	.350
4 C, 1 day	wet, 4 C	.710	.510	.415	.320	.265
4 C, 2 day	wet, 4 C	.625	.485	.390	.315	.255
4 C, 4 day	wet, 4 C	.710	.585	.445	.295	.260

\* Optical density at 449 nm

Antigen: *S. japonicum* egg extract (40  $\mu$ g/ml)

Conjugate: 1:400 dilution, Standard serum: 7,808

及び4日間感作を行つた各群のプレートと同時に反応させて比較した。この結果、4Cでは感作はされるが他に比べ弱く、日数を経ても感作は促進されなかつた。37C 1時間と2時間では、後者において高い吸光度が得られ、感作後そのまま4C保存が望ましいことが判明したので以下の実験では、この方法で抗原感作を行つた。

虫卵抗原とペルオキシダーゼ標識抗体濃度の決定：

この実験に先立ち、虫卵と成虫抗原の鋭敏度を比較した。陽性プール血清と抗原の間で力価測定を行つた結

果、いずれの希釈においても虫卵抗原の鋭敏度が優れていたため、本実験では虫卵抗原を用いて検討した。抗原の至適濃度を求めるために、蛋白量として320 $\mu$ g/mlから2倍希釈で2.5 $\mu$ g/mlまで希釈し、陽性血清との間で力価測定を行つた。対照として6例の非感染者血清を1:10に希釈した。標識抗体は1:400を用いた。Fig. 1に示すように、抗原濃度の増加に伴い吸光度も上昇したが、対照血清群と明らかな吸光度差を示す40~80 $\mu$ g/mlの抗原量が吸光度、肉眼判定共に適した濃度であると判

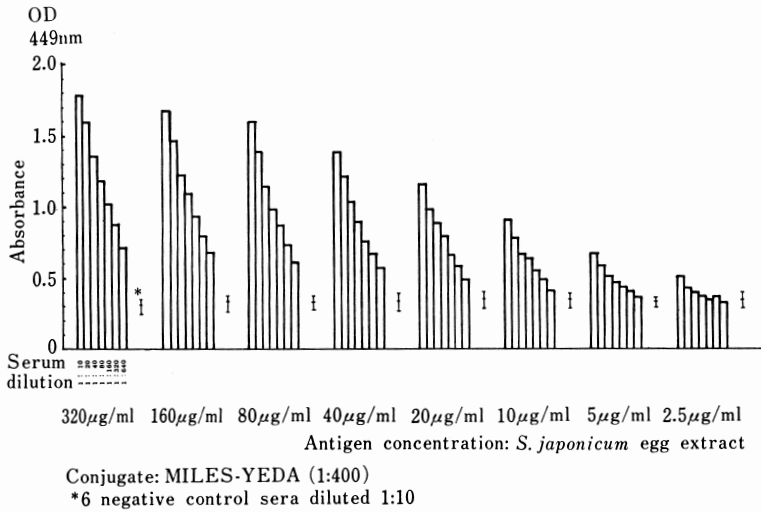


Fig. 1 Result of block-titration between antigen and antibody to determine the appropriate concentration of antigen.

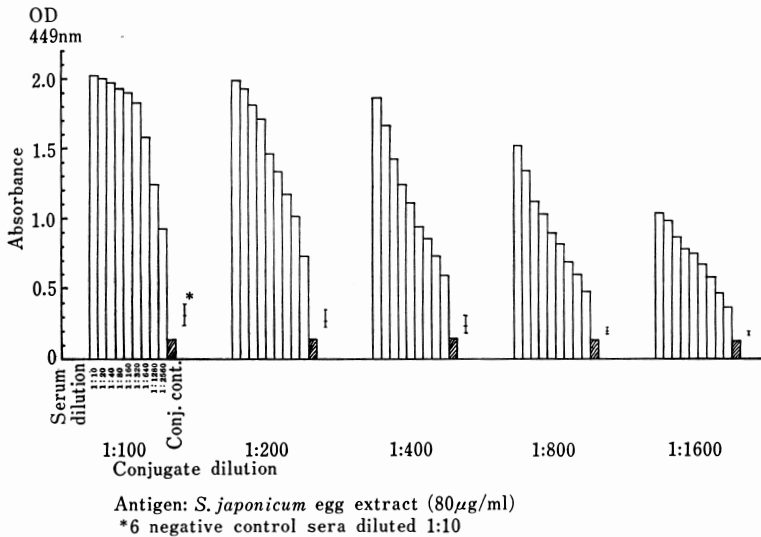


Fig. 2 Determination of appropriate dilution of conjugate for ELISA.

断された。

次いで標識抗体の至適濃度を求めるために、1:100から1:1,600まで2倍希釈し、虫卵抗原 80µg/mlで感作したプレートに、陽性血清との間で力価測定を行った (Fig. 2)。標識抗体のいずれの希釈においても対照血清との間に明らかな吸光度差を認めたが、肉眼的判定を基盤にすると、吸光度の高い1:400の標識抗体濃度が適当と判断された。

各希釈血清の1患者1穴法による判定：

反応の読みを簡易化し、判定を容易にするために、1患者血清あたり1穴で反応を試みた。32例の患者血清、14例の非感染者血清をそれぞれ1:50, 1:100, 1:500及び1:1,000に希釈し、各希釈血清との間で反応を行い、1穴法で判定する際の好適血清希釈段階を求めた (Fig. 3)。陽性限界は、陰性群の吸光度の99%棄却限界

の上限值と設定した。この結果、概して血清濃度の濃い程、吸光度も高く陽性・陰性間の差が顕著であったが、陰性群の非特異反応もやや高くなる傾向が認められた。また1:500及び1:1,000では順次吸光度も低下した。なお、各血清希釈の陰性群に含まれる患者1例は、本症の既応歴があり、Fuadinで治療され虫卵、COP反応共に陰転化した症例であり、今回のELISAにおいても陰性と判定された。従つてこの1例を除く虫卵陽性者全例 (31例) が各血清希釈段階で陽性と判定されたが、肉眼的にも陽性・陰性が明瞭に識別される血清希釈は1:100であった。

虫卵抗原と他種吸虫類患者血清間の交叉反応性の検討：

ELISA用の虫卵抗原が、他の吸虫類感染血清との間でどの程度交叉反応性があるかを検討した (Fig. 4)。日

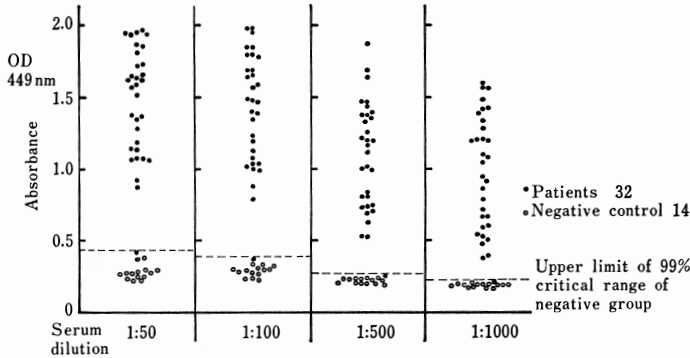


Fig. 3 Reaction of sera from *S. japonicum* infected patients and negative controls by ELISA at different serum dilutions.

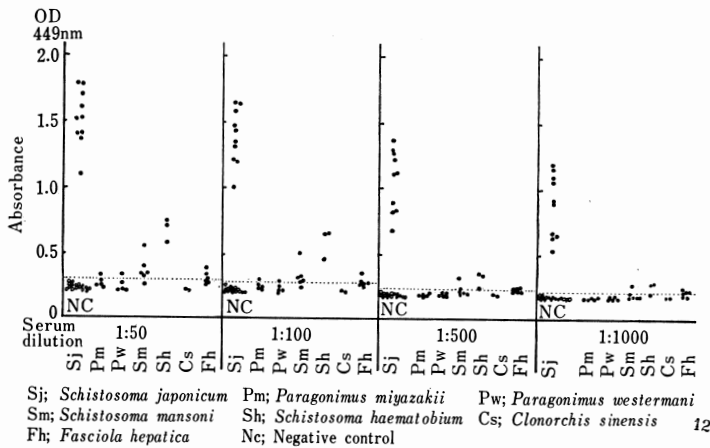


Fig. 4 Reactions of sera from various trematoda infections with *S. japonicum* egg antigen by ELISA.

Table 2 ELISA reactions of plasma from *S. japonicum* egg positives and their distribution by age and sex

Age	Male		Female		Total	
	No. exam.	No.+	No. exam.	No.+	No. exam.	No.+ (%)
<10	8	7	4	4	12	11 (91.7)
11-20	12	12	10	10	22	22(100.0)
21-30	5	5	5	5	10	10(100.0)
31-40	10	10	3	3	13	13(100.0)
41-50	7	7	4	4	11	11(100.0)
51<	5	5	3	3	8	8(100.0)
Total	47	46	29	29	76	75 (98.7)

Plasma isolated from blood taken by fingertip puncture was used at 1 : 100 dilution.

Table 3 Comparison of preservation methods of *S. japonicum* egg antigen for ELISA after exposure to field conditions

Condition of preservation	No. of sera examined	Geometric mean of reaction*	Log mean	t value against (1)	Result
Sensitized plate at -70C (1)	59	0.631	-0.1998		
Sensitized plate brought to field (2)	59	0.465	-0.3319	3.509	Significant difference
Lyophilized antigen brought to field (3)	59	0.633	-0.1984	0.0349	No difference

\* OD at 449 nm with serum dilution at 1 : 100

(1) : Control prepared and kept in laboratory in Tokyo

(2), (3) : Materials were kept dried in the container placed in an ice box or refrigerator for 3 weeks in the Philippines.

本住血吸虫症患者血清及び非感染者血清をそれぞれ陽性、陰性の対照とし、補体結合反応 (CFT) 及びゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法) で宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii* 感染と同定された 5 例、それぞれ虫卵検査で虫卵が証明された *P. westermani*, *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *Clonorchis sinensis* 及び *Fasciola hepatica* の各患者血清を 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500 及び 1 : 1,000 と希釈して 1 穴法で反応を試みた。全般に血清濃度が濃い程吸光度は高く、肝吸虫症を除く他の吸虫感染者血清との間で交叉反応が認められ、特にビルハルト、マンソン住血吸虫感染者血清が高い吸光度を示した。宮崎及びウエステルマン肺吸虫との交叉反応は、血清を 1 : 500 以下に希釈すると消失したが、ビルハルト、マンソン住血吸虫と肝蛭感染者血清の吸光度は、低下するものの、交叉反応は消失しなかった。

毛細管採血血漿での ELISA :

レイテ島の Sta. Fe と Dagami 地区より手指穿刺に

よる毛細管採血で得られた血漿を 1 : 100 に希釈して ELISA を行つた。全て虫卵陽性者を対象としたが、年齢別、性別にまとめて Table 2 に示した。虫卵陽性者 76 例中、75 例 (98.7%) が ELISA 陽性と判定され、そのうち男 46/47 (97.9%), 女 29/29 (100%) が陽性を示した。10 歳以下の男 1 例が陰性を示したのみで、虫卵排出者の年齢別陽性率の差はみられなかった。

ELISA 用卵抗原の熱帯地での安定性に関する検討 :

実際に熱帯地で ELISA を用いて患者の検出を行う際に、その抗原がどの程度安定しているかを知るために本実験を行つた。抗原を感作したプレートを用いて洗い、2 群に分け、1 群は -70C に保存した。他の抗原感作プレートと、凍結乾燥抗原は密閉容器にシリカゲルと共に乾燥を保ちつつ常温でレイテ島へ運んだ。当地で 3 週間の滞在中は、冷蔵庫或はアイスボックスに入れ低温を保つた。帰国後 -70C 保存のプレートを対照に、1 : 100 に希釈された 59 例の患者血清を用いて ELISA を行

つた。Table 3に示すように、凍結乾燥抗原の抗原性は全く失われず、統計的にも有意差は認められなかったが、野外へ運んだ感作プレートでは抗原性の失活が認められた。失活の程度を検定した結果、対照プレートに比べ、16.5%の反応の低下が認められ、抗原性の失活は約64%であった。従つて、熱帯の温度条件の悪い実験室で安定した ELISA 反応を行うためには、抗原の保存法を考慮し、特に凍結乾燥保存が望ましいことが明らかとなった。

### 考 察

著者らは日本住血吸虫症の免疫学的診断法に関する研究として、主としてフィリピン・レイテ島の本症流行地において、手技が簡単でしかも鋭敏かつ特異性の高い卵周囲沈降反応 (COPT) を検討し、野外調査の段階まで発展させ得た (Tanaka *et al.* 1975; Nosenas *et al.* 1975; Matsuda *et al.* 1977)。COP 反応は、器具機材の乏しい熱帯地の野外調査には最も望ましい診断法の1つと考えられるが、判定に少なくとも48時間を要し、1人が多数の検体を処理するには限度がある。そこで今回、著者らは RIA に匹敵する感度を有し、特殊な器材を必要とせず、手技が簡便で多数の検体を処理出来、しかも肉眼的判定が可能である ELISA に注目した。そして本法を日本住血吸虫症の診断に応用するための基礎となるいくつかの条件について検討を加えた。感染マウスの腸管から虫卵を純粹に消化分離する方法は、今回、Scorza (1961) の方法に若干の変更を加え、消化酵素も trypsin の代りに pronase を用いた。pronase は虫卵に対する影響もほとんどないため、37°C で1晩消化した。pronase と collagenase の両方で同時に消化を行うと、3時間で消化が可能であった。本実験では上記の方法で分離した虫卵抽出粗抗原を用いたが、これは成虫抗原に比べ鋭敏性が高いことなど、動物実験においても同様な結果を得た (松田ら 1980)。マンソン住血吸虫感染においても虫卵抗原の鋭敏性が高いことが報告されている (Huldt *et al.*, 1975; McLaren *et al.*, 1978, 1979)。標識抗体も、主としてアルカリフォスファターゼとペルオキシダーゼが各研究者により使われているが、ここでは比較的廉価で容易に得られる後者を選び、基質としては 5 AS を用いた。5 AS は、他の基質、O-phenylenediamine や O-tolidine に比べ感度がやや落ちるが (中尾ら, 1981)、プレートの選択により鋭敏に発色する。今回は組織培養用のプレートを用いた。また 5 AS は、基質そのものによる無反応発色値が高い欠点はある

が、陽性反応は褐色を呈するため、肉眼判定は容易であった。

本実験では、32例の日本住血吸虫症患者のうち、虫卵陽性の31例は全て ELISA 陽性であり、毛細管採血血漿での結果も、虫卵陽性者76例中98.7%が陽性と判定された。著者らは既に本実験と同一地域の患者を対象とし、凍結乾燥卵と非希釈血清を用いた COPT の成績で、虫卵陽性者の97.3%が陽性と判定され、COPT の鋭敏性が高いことを報告しており (Matsuda *et al.*, 1977)、また山梨県甲府市在住の慢性住血吸虫症患者で ELISA と COPT を比較し、鋭敏性において前者が優れていることを認めていること (松田ら, 未発表) から、ELISA は日本住血吸虫症の免疫診断法として、COPT と同程度か、或はそれ以上の鋭敏性をもち、診断的価値が高いことが認められた。最近 Yogore *et al.* (1980) は、フィリピン・サマル島の1部落住民338名を対象に、虫卵検査、COPT 及び ELISA を比較し MFC 法による虫卵陽性者の99.5%が ELISA 陽性となり、1:16希釈血清を用いれば MFC 法や COPT では検出し得ない感染者をも診断出来る可能性を示唆した。また ELISA は特異性も高く、交叉反応は人体囊虫症、腸カピラリア症、肺吸虫症などとの間には認められず、ビルハルツ住血吸虫症と旋毛虫症との間のみ認められたことを報告している。著者らの成績でも、血清を1:500に希釈すれば、肺吸虫症との交叉反応は認められず、ビルハルツ、マンソン住血吸虫、肝蛭症との間に認められたのみであった。従つて、フィリピンでは、住血吸虫症と肺吸虫症の混在流行地は、ルソン島のソルソゴンと、レイテ島ハロの2地域に限られるため、被検血清の希釈を変えればそれ程大きな問題はないと思われる。この特異性に関しては、Bout *et al.* (1976) は、肝蛭、包虫、フィラリア、アメーバなどの寄生虫疾患に対して ELISA は100%特異性があり、マンソン住血吸虫抗原に対する交叉反応は認められなかったと報じている。McLaren *et al.* (1978) は、IFA, CFT, ELISA の3者を比較し、感度の点では3者は同程度であるが、特異性の点で ELISA が優れているが、マンソン住血吸虫卵抗原は水田性皮膚炎を起こすような動物由来の住血吸虫との間で、交叉反応が24例中21%と多く認められ、また少数ではあるが、他種蠕虫性疾患との間でも陽性反応が認められたと述べている。しかし、マンソン住血吸虫非流行地である St. Vincent 島の学童の調査では、全例が陰性であったことも報告している (McLaren *et al.*, 1979)。一方、Hil-lyer and Gómez de Rios (1979) は、マンソン住血吸

虫の可溶性卵抗原 (SEA) を用い、その特異性に疑問を提示している。すなわち、肝蛭、旋毛虫、包虫や人体囊虫症などの広範な交叉反応を認め、SEA を用いた ELISA は、免疫学的特異性を欠いていると報じている。このように、特異性に関して種々の議論があるのは、研究室間の判定規準、方法の相違にも起因すると考えられる。その基準化、統一性は、抗原の精製の必要性とも関連し、今後残された課題であろう。

## ま と め

フィリピン・レイテ島の Schistosomiasis Control and Research Project (SCRIP) の外来患者で、MIFC 法により日本住血吸虫卵の証明された本症患者血清及び周辺部落の虫卵陽性者を対象に、ペルオキシダーゼ標識抗体と5-アミノサリチル酸を基質として用い、酵素抗体法 (Micro-ELISA 法) により、特異抗体の検出と、これに関する基礎的検討を行い、患者検出への簡易化について検討した。

1) 抗原吸着体としてポリスチレン製平底マイクロプレート (Dynatech, M29ART) を、抗原として山梨系日本住血吸虫卵の炭酸緩衝液 (0.05M, pH9.6) 抽出粗抗原 (蛋白量80 $\mu$ g/ml) を用いた。本反応を安定化するために、抗原感作法と保存法を検討したところ、37C 2時間の感作後 4C 保存が好成績を収めた。また凍結乾燥抗原は、低温に保った場合、熱帯地で3週間の保存後も抗原性の低下は全く起らなかった。

2) 反応の読みを簡易化するために、1患者血清を1穴で判定する試みとして、32例の患者血清と、東京 (6例) 及びレイテ島 (8例) で得た非感染者血清を 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500 及び 1 : 1,000 に希釈して用いた。Fuadin で治療した1例を除き、全ての希釈で虫卵陽性者31例は陽性と判定された。肉眼的判定を考慮すると、反応の強さから 1 : 100 希釈の血清が適当と思われた。レイテ島2部落の住民で虫卵陽性者76例から毛細管採血をし、血漿を 1 : 100 に希釈した成績では、75例 (98.7%) が陽性と判定された。

3) 虫卵抗原に対するビルハルツ、マンソン住血吸虫、ウェステルマン、宮崎肺吸虫、肝蛭及び肝吸虫患者血清の交叉反応性を検討した。1 : 50 及び 1 : 100 希釈血清では、日本住血吸虫症患者血清は著明に高い吸光度を示したが、ビルハルツ、マンソン住血吸虫、肝蛭、両肺吸虫患者血清の順に交叉反応が認められた。しかし、血清希釈 1 : 500 において、両肺吸虫症との交叉反応は消失した。

以上の結果から、ELISA は鋭敏性が高く、血清の希釈を考慮すれば特異性も優れ、毛細管採血等による少量の血清や血漿で陽性・陰性が肉眼的にも容易に判定出来るため、日本住血吸虫症の野外調査に応用し得る可能性が示された。

## 謝 辞

本研究に使用した血清類の一部は、広島大学医学部寄生虫学教室辻 守康教授ならびに、国立公衆衛生院寄生虫室荒木国興先生から分与いただきました。記して感謝致します。

なお、本研究の要旨は、第49回日本寄生虫学会大会ならびに The Philippine-Japan Joint Conference on Schistosomiasis Research and Control, 20th-23rd November, 1979 Manila, Philippines において一部発表した。

又本研究は国際協力事業団日比協同プロジェクトの一環として行われた。

## 文 献

- 1) Bartlett, A., Bidwell, D. E. and Voller, A. (1975) : Preliminary studies on the application of Enzyme immunoassay in the detection of antibodies in onchocerciasis. *Tropenmed. Parasit.*, 26, 370-374.
- 2) Bout, D., Dugimont, J. C., Farag, H. and Capron, A. (1976) : Immunodiagnosis of human parasitic diseases by ELISA. in *Immunoenzymatic techniques (INSERM)*, 2, 175-181. editor Feldmann, G. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 3) Deelder, A. M., Ruitenber, E. J., Kornelis, D. and Steerenberg, P. A. (1977) : *Schistosoma mansoni*: Comparison of the immunoperoxidase techniques, DASS and ELISA, for human diagnosis. *Exptl. Parasit.*, 41, 133-140.
- 4) Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) : ELISA. Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.*, 8, 871-874.
- 5) Engvall, E. and Perlmann, P. (1972) : ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129-135.
- 6) Farag, H., Bout, D. and Capron, A. (1975) : Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biomed.*, 23, 276-278.

- 7) Farag, H. F. and Barakat, R. M. R. (1978) : The enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of human bilharziasis. *Tropenmed. Parasit.*, 29, 12-14.
- 8) Hillyer, G. V. and Gómez de Rios, I. (1979) : The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28, 237-241.
- 9) Hillyer, G. V. and Kagan, I. G. (1979) : New advances in the immunodiagnosis of parasitic infections. I. The enzyme-linked immunosorbent assay. *Biol. Assoc. Med. P. Rico.*, 71, 366-377.
- 10) Hommel, M. (1976) : Enzymoimmunoassay in leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70, 15-16.
- 11) Huldt, G., Lagerquist, B., Phillips, T., Draper, C. C. and Voller, A. (1975) : Detection of antibodies in schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 69, 483-488.
- 12) Kagan, I. G. and Pelligrino, J. (1961) : A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 25, 611-674.
- 13) Kagan, I. G. (1976) : Recent advances in the diagnosis of schistosomiasis. *Egypt. J. Bilh.*, 3, 121-128.
- 14) Ljungström, I., Engvall, E. and Ruitenber, E. J. (1974) : ELISA, enzyme linked immunosorbent assay-a new technique for sero-diagnosis of trichinosis. *Parasit.*, 69, XXIV. In Proceedings of the British Society for Parasitology.
- 15) 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.
- 16) McLaren, M., Draper, C. C., Roberts, J. M., Minter-Goedbloed, E., Lighthart, G. H., Teesdale, G. H., Amin, M. A., Omer, A. H. S., Bartlett, A. and Voller, A. (1978) : Studies on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for *Schistosoma mansoni* infections. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 72, 243-253.
- 17) McLaren, M. L., Long, E. G., Goodgame, R. W. and Lillywhite, J. (1979) : Application of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in St. Lucia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73, 636-639.
- 18) Matsuda, H., Noseñas, J. S., Tanaka, H., Santos, A. T. Jr. and Trinidad-Perez, D. (1977) : Comparative studies on reading criteria of circumoval precipitin reaction of *Schistosoma japonicum* for field survey in highly endemic area. *Japan. J. Exp. Med.*, 47, 369-375.
- 19) 松田 肇・中尾 稔・田中 寛・安羅岡一男 (1980) : 日本住血吸虫感染ウサギにおける酵素抗体法 (ELISA). *寄生虫誌*, 29, (1・補), 15.
- 20) 中尾 稔・松田 肇・田中 寛・永田 傳 (1981) : 日本住血吸虫症の ELISA プレート法におけるペルオキシダーゼ標識抗体用の三種基質の比較. *寄生虫誌*, 30, 197-204.
- 21) Noseñas, J. S., Matsuda, H., Blas, B. L., Tanaka, H. and Santos, A. T. Jr. (1975) : Evaluation of the circumoval precipitin test using dried blood on filter paper as a diagnostic tool in epidemiological survey for schistosomiasis. *Japan. J. Exp. Med.*, 45, 367-375.
- 22) Ruitenber, E. J., Steerenberg, P. A., Bro-si, B. J. M. and Buys, J. (1974) : Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 51, 108-109.
- 23) Ruitenber, E. J., Steerenberg, P. A. and Brosi, B. J. M. (1975) : Microsystem for the application of ELISA in the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection. *Medikon Nederland.*, 4, 30-33.
- 24) Schinski, V. D., Clutter, W. C. and Murrell, K. D. (1976) : Enzyme and <sup>125</sup>I-labeled anti-immunoglobulin assays in the immunodiagnosis of schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 824-831.
- 25) Scorza, V. J. (1961) : Eine neue Methode zur Isolierung von *Schistosoma japonicum*-Eiern durch Enzyme. *Ztschr. Tropenmed. Parasit.*, 12, 196-207.
- 26) Tanaka, H., Matsuda, H., Blas, B. L. and Noseñas, J. S. (1975) : Evaluation of a technique of circumoval precipitin test using blood taken on filter paper and a microtiter technique of complement fixation test of *Schistosoma japonicum*. *Japan. J. Exp. Med.*, 45, 105-111.
- 27) Tanaka, H., Matsuda, H. and Noseñas, J. S. (1979) : Detection of antibodies in *Schistosoma japonicum* infections by a micro-technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japan. J. Exp. Med.*, 49, 289-292.
- 28) Van Weeman, B. K. and Schurs, A. H. W.



- M. (1971) : Immunoassay using antigen-enzyme conjugate. FEBS Letters., 15, 232.
- 29) Voller, A., Bidwell, D. E., Huldt, G. and Engvall, E. (1974) : A microplate method of ELISA and its application to malaria. Bull. Wld. Hlth. Org., 51, 209-211.
- 30) Voller, A., Huldt, G., Thors, C. and Engvall, E. (1975a) : A new serological test for detection and measurement of malarial antibodies. Brit. Med. J., 1, 659-661.
- 31) Voller, A., Bidwell, D. E. and Bartlett, A. (1975b) : A serological study on human *Trypanosoma rhodesiense* infections using a microscale ELISA. Tropenmed. Parasit., 26, 247-251.
- 32) Voller, A., Draper, C. C., Bidwell, D. E. and Bartlett, A. (1975c) : Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas diseases. Lancet, 1, 426-427.
- 33) Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. E. (1976a) : Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans, Roy. Soc. Trop. Med., 70, 98-106.
- 34) Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., Fleck, D. G., Perkins, M. and Oladehin, B. (1976b) : A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. J. Clin. Path., 29, 150-153.
- 35) Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. and Edwards, R. (1977) : A comparison of isotopic and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 71, 431-437.
- 36) Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. E. (1978) : Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J. Clin. Path., 31, 507-520.
- 37) Walls, K. W., Bullock, S. L. and English, D. K. (1977) : Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol., 5, 273-277.
- 38) World Health Organization (1976) : The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bull. Wld. Hlth. Org., 54, 129-139.
- 39) Yogore, M. G., Lewert, R. M. and Blas, B. L. (1980) : Schistosomiasis japonica in Barrio San Antonio, Basey, Samar in the Philippines vs ELISA compared with quantitative stool examination and the COP Test. Abstract, 10th Int. Cong. Trop. Med. & Malaria (Manila, Philippines. Nov. 9-15), 312-313.
- 40) 横川宗雄・佐野基人 (1966) : 日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究, (2) Circumoval Precipitin Test (COPT) に使用する感染マウス臓器内虫卵の分離集卵法について. 寄生虫誌, 15, 394-397.

**Abstract**

A STUDY OF ELISA FOR SCHISTOSOMIASIS JAPONICA USING  
5-AMINOSALICYLIC ACID, A SUBSTRATE OF  
PEROXIDASE-LABELLED ANTIBODY

HAJIME MATSUDA, MINORU NAKAO, HIROSHI TANAKA  
(Department of Parasitology, Institute of Medical Science, University  
of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108)

TSUTAE NAGATA  
(Department of Medical Zoology, Tokyo Medical and Dental  
University, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

JULAN S. NOSEÑAS, BAYANI L. BLAS, GERUNDIO P. PORTILLO,

AND

ALFREDO T. SANTOS, Jr.

(Schistosomiasis Control and Research Project, Ministry of Health,  
Palo, Leyte 7118, Republic of the Philippines)

The present study deals with the establishment of a simple technique of micro-ELISA for the field study of schistosomiasis japonica. In this assay, peroxidase-conjugated anti-human IgG (MILES-YEDA) and 5-aminosalicylic acid were used as the conjugate and substrate, respectively.

1) The polystyrene microtiter plate with 0.3 ml flat bottom wells (Dynatech, M29ART) was used in antigen sensitization. The antigen was extracted from lyophilized eggs of the Yamanashi strain of *Schistosoma japonicum* in carbonate buffer (0.05 M, pH 9.6). Sensitization of this antigen was performed at 37°C for 2 hours. The antigen was brought to the field in the Philippines and its antigenicity was undiminished even after 3 weeks.

2) To simplify the assessment with ELISA, a single dilution of each serum sample was established. Sera collected from 32 patients in the Philippines and 6 and 8 non-infected individuals from Tokyo and Leyte, respectively, were diluted at 1:50, 1:100, 1:500 and 1:1,000. With one exception (a patient who had been treated with Fuadin), all the diluted sera from *S. japonicum* patients showed values above the upper limit of the 99% critical range of reaction of the negative group. By visual reading, positives and negatives were clearly distinguished at serum concentrations higher than 1:100. Plasma samples of blood in a capillary tube taken by fingertip puncture from 76 schistosomiasis patients were examined at the 1:100 dilution. Of the 76 samples, 75 (98.7%) showed positive reactions.

3) Cross reactions with the crude *S. japonicum* egg antigen were examined using the sera from human infections with *S. haematobium*, *S. mansoni*, *Paragonimus westermani*, *P. miyazakii*, *Fasciola hepatica* and *Clonorchis sinensis*. Cross reaction was prominent with *S. haematobium*, followed by *S. mansoni*, *F. hepatica* and two *Paragonimus* sera. These cross reactions, however, were minimal at the 1:500 serum dilution. Positive reactions with infections other than *S. japonicum* occurred in *S. haematobium*, *S. mansoni* and *F. hepatica*.

The results indicated that ELISA can be used to distinguish between schistosomiasis patients and non-infected persons in the sero-epidemiological survey in schistosomiasis endemic areas.