

## 間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法による 日本住血吸虫症の免疫診断

神谷晴夫\* 鈴木俊夫\*  
松田肇† 田中寛†

(昭和56年9月14日 受領)

**Key words:** Indirect immunoperoxidase technique, formalin-fixed egg section, diagnosis, schistosomiasis japonica

日本住血吸虫症は東南アジアに広く分布し、概ねその流行地は亜熱帯、熱帯地域に多い。これらの流行地に於ける免疫診断は、主に卵周囲沈降反応 (Circumoval precipitin test; COPT) によつてなされている。一方、最近 COPT に関与する虫卵抗原が、強い耐熱性の特性を有することが明らかになつた (Kamiya, 1980)。その後、この耐熱性抗原は、ホルマリン固定されたパラフィン包埋の虫卵切片でも抗原性が良く保存され、それをを用いた間接蛍光抗体法 (Indirect fluorescent antibody test; IFAT)、あるいは卵内沈降反応 (Intraoval precipitin test; IOP) による日本住血吸虫症の免疫診断法が開発された (Kamiya and Kamiya, 1980; 神谷ら, 1981)。

このうち、IFAT は鋭敏で、特異性も比較的高く、しかも短時間で判定可能な特長があるが、反面、蛍光顕微鏡が必要なことなどこれらの流行地での実際面での応用には、尚問題点が残る。そこで、我々は日本住血吸虫症の新しい免疫診断法としての間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法 (Indirect immunoperoxidase test; IIP) に、ホルマリン固定虫卵切片の応用を試みた。

### 材料と方法

虫卵切片の作製：フィリピン・レイテ島由来の日本住血吸虫セルカリアを、ddY 系マウス1匹あたり約20隻を接種し、感染後8週目の多数の虫卵結節を有し、10%ホルマリン液中に約1年6カ月保存されていた肝臓を用いた。肝臓は、通常の病理組織切片作製法に準じてパラフィン包埋、薄切し (厚さ3 $\mu$ m)、キシロールを用いた

脱パラフィン、エタノールシリーズによる脱キシロールの操作を施し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 0.15M, pH 7.2)、ついで蒸留水でよく洗浄後自然乾燥して用いた。肝切片は、1枚のスライドガラスに上下各6枚計12枚を乗せ、切片間をマニキュア (nail varnish) で区切つた (Fig. 1)。

血清：日本住血吸虫症患者血清は、フィリピン・レイテ島由来の45例を用いた。すべての血清は、採血後、現地で COPT 陽性であることを確認し、窒化ソーダ (NaN<sub>3</sub>) を加えて、一定期間保存後、日本に輸送し、-20C に約1年半保存した。使用前凍結融解後、同一ロットの凍結乾燥虫卵を用いて再び COPT を実施し、横川ら (1967) に従つて、使用血清の COP 型別を調べた。対照群としては、20例の東京の健康人の血清を使用した。

間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法 (Indirect immunoperoxidase test; IIP)

1. 肝組織の非特異染色性—endogenous あるいは pseudoperoxidase 活性—の阻止：肝組織自体が有する非特異なペルオキシダーゼ活性を阻止するために室温で 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノール液 (山下・岩本, 1978)、70% エタノール加10%ホルマリン液 (Agner, 1941) で室温・2時間、また1, 2, 4, 8, 10%ヤギあるいはウサギ正常血清での 37C・30分間の反応などの前処置をほどこした。その結果0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノール液ではほとんど抑制されず、70%エタノール加10%ホルマリン液の処理では不十分ながら抑制された。しかし、8あるいは10%ヤギあるいはウサギ正常血清処理で肝組織の非特異的な反応はほぼ完全に阻止された。この結果から被検血清の稀釈を10%ヤギ正常血清加 PBS でおこない、一次

\* 秋田大学医学部寄生虫学教室

† 東京大学医科学研究所寄生虫部

(被検)血清希釈と非特異なペルオキシダーゼ活性の阻止を同時におこなった。

2. 反応手技：スライドにはりつけた切片間をマニキュアで区切り，前述の方法で段階希釈した患者血清を切片1枚あたり0.01ml 乗せ，湿潤箱中で30分間・37Cで反応させた後，PBS でよく洗浄した。ついで希釈限界を調べて，PBS で1：320倍に希釈した二次血清であるペルキシダーゼ標識抗ヒト IgG ヤギ血清 (Peroxidase-anti-human IgG；富士臓器，ロット番号 01-02) を乗せ，同様に反応後 PBS で十分に洗浄した。洗浄後，0.003% の割合で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 3-3'diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB；和光純薬)ートリス塩酸緩衝液 (DAB 5 mg を10ml の pH 7.6 のトリス塩酸緩衝液に溶解) で5分間呈色させ，流水でよく洗浄し，アルコールシリーズで脱水後，キシロールで透徹し，バルサムで封入し，永久標本とした。呈色後，時にヘマトキシリン染色をほどこした。

間接蛍光抗体法：同様の切片を用いて Kamiya and Kamiya (1980)，神谷ら (1981) の方法に従って IFA 値を調べた。

交差反応：トリヒナ症8例，アニサキス症5例，ウエステルマン肺吸虫症8例，宮崎肺吸虫症3例，肝吸虫症4例，熱帯熱及び三日熱マラリア各1例，トキソプラズマ症5例，アメーバ症1例，熱帯リーシュマニア症1例の患者血清との間で，間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法により交差反応の有無を調べた。

### 成 績

間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法：特異的なペルオキシダーゼ活性は，卵膜 (vitelline membrane) とミラシジウムの中に最も強く認められ，褐色に染つたが，ミラシジウム自体にも抗原性が存在した (Figs. 2, 3)。患者血清全例が希釈倍数 1：200～51,200 (以下，IIP 値

Table 1 Distribution of IIP titers in cases of infected residents of Leyte, Philippines and non-infected residents of Tokyo with *Schistosoma japonicum*

| IIP titers | No. infected | No. non-infected |
|------------|--------------|------------------|
| 51200      | 8            | 0                |
| 25600      | 7            | 0                |
| 12800      | 6            | 0                |
| 6400       | 8            | 0                |
| 3200       | 8            | 0                |
| 1600       | 3            | 0                |
| 800        | 3            | 0                |
| 400        | 1            | 0                |
| 200        | 1            | 0                |
| 100        | 0            | 0                |
| 10         | 0            | 2                |
| <10        | 0            | 18               |
| Total      | 45           | 20               |

200～51,200) で陽性に認められた。対照群では，東京の健康人20例のうち2例が，IIP 値10で陽性に認められたが，他は陰性であつた (Fig. 4；Table 1)。

IIP 値と COP の型分類との関係：COP 型分類 I 型の患者血清では，IIP 値が200～6,400と変動したが概ね低い値を示した。しかし，COP II あるいは III 型では，IIP 値3,200以上の陽性で，特に III 型では大半 (18例中15例) が IIP 値25,600以上であつた (Table 2)。全般に COP 型分類と IIP 値との間には相関関係が認められた。

IIP 値と IFA 値との関係：IIP 値と IFA 値はよく相関した。特に IFA 値640以上の患者血清では，大半 (21例中20例) の IIP 値が12,800以上であつた (Table 3)。間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法は，間接蛍光抗

Table 2 Comparison between IIP titers and COP type criteria of sera from patients with schistosomiasis japonica of Leyte, Philippines

| COP type | No. cases with IIP titers of |   |   |    |    |    |     |     |     | Total |
|----------|------------------------------|---|---|----|----|----|-----|-----|-----|-------|
|          | ≥2*                          | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 |       |
| I        | 1                            | 1 | 3 | 2  | 5  | 2  | 0   | 0   | 0   | 14    |
| II       | 0                            | 0 | 0 | 1  | 3  | 5  | 4   | 0   | 0   | 13    |
| III      | 0                            | 0 | 0 | 0  | 0  | 1  | 2   | 7   | 8   | 18    |
| Total    | 1                            | 1 | 3 | 3  | 8  | 8  | 6   | 7   | 8   | 45    |

\*：×100

Table 3 Comparison between IIP and IFA titers of sera from patients with schistosomiasis japonica of Leyte, Philippines

| IFA titers | No. cases with IIP titers of |   |   |    |    |    |     |     |     | Total |
|------------|------------------------------|---|---|----|----|----|-----|-----|-----|-------|
|            | $\geq 2^*$                   | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 |       |
| 1280       | 0                            | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 7   | 7     |
| 640        | 0                            | 0 | 0 | 0  | 0  | 1  | 6   | 6   | 1   | 14    |
| 320        | 0                            | 0 | 0 | 0  | 1  | 3  | 0   | 1   | 0   | 5     |
| 160        | 0                            | 0 | 0 | 2  | 5  | 4  | 0   | 0   | 0   | 11    |
| 80         | 0                            | 0 | 2 | 1  | 2  | 0  | 0   | 0   | 0   | 5     |
| 40         | 0                            | 1 | 1 | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 2     |
| 20         | 0                            | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0     |
| $\geq 10$  | 1                            | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 1     |
| Total      | 1                            | 1 | 3 | 3  | 8  | 8  | 6   | 7   | 8   | 45    |

\* :  $\times 100$ Table 4 Cross reactions among various parasite infections and formalin-fixed *S. japonicum* egg antigens

| Parasite species infected                  | No. cases examined | No. cases with IIP titers of |    |     |     |     |     |      |      |  |
|--|--------------------|------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|------|------|--|
|  |                    | negative                     | 10 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | 3200 |  |
| <i>Trichinella spiralis</i>                | 8                  | 0                            | 0  | 0   | 0   | 1   | 1   | 4    | 2    |  |
| <i>Anisakis</i> sp. larva (Type I)         | 5                  | 4                            | 1  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>Paragonimus westermani</i>              | 8                  | 0                            | 0  | 3   | 0   | 1   | 2   | 1    | 1    |  |
| <i>P. miyazakii</i>                        | 3                  | 0                            | 0  | 0   | 0   | 0   | 1   | 2    | 0    |  |
| <i>Clonorchis sinensis</i>                 | 4                  | 0                            | 4  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>Echinococcus multilocularis</i> (larva) | 14                 | 10                           | 0  | 0   | 2   | 1   | 0   | 1    | 0    |  |
| <i>Diphyllbothrium latum</i>               | 5                  | 1                            | 2  | 2   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>D. mansoni</i> (larva)                  | 1                  | 0                            | 0  | 1   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>Plasmodium falciparum</i>               | 1                  | 1                            | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>P. vivax</i>                            | 1                  | 1                            | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>Toxoplasma gondii</i>                   | 5                  | 2                            | 2  | 1   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>Entamoeba histolytica</i>               | 1                  | 1                            | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |
| <i>Leishmania tropica</i>                  | 1                  | 1                            | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |  |

体法に比し、血清稀釈倍数で10~20倍鋭敏な反応であった。

交差反応：トリヒナ症：CLP (Circular larval precipitin test) で陽性であった患者血清8例全例との間に交差反応が認められ、IIP値は最高3,200を示した。

肺吸虫症：ウエステルマン・宮崎両肺吸虫症全例がIIP値100以上で交差反応が認められ、最高3,200の値を示した。

多包虫症：14例中4例で交差反応が認められ、1例でIIP値1,600を示した。

その他の寄生虫症ではマンソン孤虫症、広節裂頭条虫症、トキソプラズマ症で、若干例がIIP値100で陽性を示したが、他のものでは10あるいはそれ以下であった (Table 4)。

#### 考 察

住血吸虫症は主に亜熱帯、熱帯地に流行し、そのような現場に即した免疫診断法としては、COPTが手技が簡便で安定した反応であるところからもつとも多用されている (Tanaka, *et al.*, 1975; Noseñas *et al.*, 1975;

Matsuda *et al.*, 1977; Yogore *et al.*, 1978, 1979; Hillyer *et al.*, 1979). しかしながら, COPT に使用する凍結乾燥虫卵の作製がやや煩雑で, 多数の実験用動物が必要なこと (Kamiya *et al.*, 1980), 軽度な感染の検出あるいは感染の程度を数値的に把握しにくいこと (Tanaka, 1976) などに問題が残る.

一方, 最近日本住血吸虫症診断 COPT 用凍結乾燥虫卵が極めて強い耐熱性特性を有し (Kamiya, 1980), さらにこの特性に着目し, ホルマリン固定虫卵切片を用いた間接蛍光抗体法あるいは卵内沈降反応が開発され, 診断に用いられるようになった (Kamiya and Kamiya, 1980; Kamiya, 1981; 神谷ら, 1981). たしかにホルマリン固定虫卵切片を用いた間接蛍光抗体法は, 従来の凍結切片を用いた方法に比べれば, その手技はさらに簡便になったといえるが, やはり蛍光顕微鏡あるいは蛍光色素標識抗血清が必要で, しかも資料を永久標本として残すことの出来ない難点があり, 流行地の現場での実用という点に関しては今一步の感が残っている.

しかしながら, 最近免疫組織化学の分野で, 形態と機能を対応させ, 組織内抗原物質の検出に用いられている非標識抗体酵素法 (Immunoglobulin-enzyme bridge method; PAP 法) は, ホルマリン固定組織が使用可能で, しかも鋭敏な反応であることが知られている. 本法は, Mason *et al.* (1969) により考案されたもので, 3層に抗体を重ね, 最後に酵素 (ペルオキシダーゼなど) を抗原抗体反応で結合させ, 呈色させて観察する方法である. この方法を生検あるいは剖検等で得られたホルマリン固定の組織中の寄生虫種—日本住血吸虫を含む—の同定に応用し, 良い成績が得られている (鈴木ら, 1981). しかし, この方法は, 手技が煩雑であり, 診断を目的とした血中の特異抗体の検出には適してはいない. したがって, より簡便な間接ペルオキシダーゼが酵素抗体法 (Indirect immunoperoxidase test) に, ホルマリン固定虫卵切片の応用を試みた.

ところが, 感染マウスの肝の虫卵結節中の虫卵切片を用いた場合, 一番の問題点は, 肝組織自体が通常の間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法では非特異に強く染まり, 特異染色部位との区別が困難になることで, 肝組織の endogenous あるいは pseudoperoxidase 活性を阻止することが必須であった. そのため, メタノールに 0.3% の比率で  $H_2O_2$  を加えた液 (山下・岩本, 1978), 70% エタノールに 10% のわりにホルマリン液を加えたもの (Agner, 1941) でその反応性の阻止を試みたが, 満足出来る結果が得られなかった. しかしながら, ヤギ正常

血清あるいはウサギ正常血清単独での処理により, ほぼこの非特異な染色性を阻止出来ることが明らかになった. しかも, これら正常血清の濃度により抑制の程度に差があり, 今回の実験では, 8あるいは10%ヤギ正常血清との 37°C・30分間の反応で十分に阻止出来ることが明らかになった.

しかしながら, スライドグラスにはりつけた切片を, 3回にわたって血清と反応させることは, 切片がスライドグラスから剝離する可能性があります. そのため, 一次血清である被検血清を 10% ヤギ正常血清加 PBS で稀釈し, 肝切片の非特異反応の阻止と被検血清との反応を同時におこなっても, ヤギ正常血清のみであらかじめ阻止した場合と同様に, 充分にその非特異反応を阻止出来るので, その手技は間接蛍光抗体法と同様の簡便なものになった.

この方法を, フィリピン・レイテ島の日本住血吸虫症患者血清 45例に応用したところ, 全例が血清稀釈倍数 1:200 (IIP 値 200) 以上で陽性で, 過半数は IIP 値 3,200以上, 最高 51,200の値を示し, 極めて鋭敏な反応であることが明らかになった. しかも, 対照群の正常血清では非特異反応はほとんど認められなかった (Table 1).

COP の型分類と IIP 値との関係は, I型と判定されたものでは IIP 値は概して変動が認められたが, II・III型と判定されたものは大半が IIP 値 6,400以上を示した (Table 2). さらに, 同一の感染血清を用いた IFA 値との関係はより密接な相関があり, IFA 値が高いものほど IIP 値は高くあらわれ, 10~20倍の高い値を示した (Table 3). ところが, 鋭敏性 (sensitivity) が増すと同時に, 神谷ら (1981) の IFAT の場合と同様にトリヒナ症, ウェステルマン・宮崎両肺吸虫症との間に明らかな交差反応が認められた. 同様の交差反応は, Matsuda *et al.* (1980) が ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) で, また Araki *et al.* (1980) がゲル内沈降反応で報告している. しかしながら, 今回の場合概ね IIP 値は低く, COP の型分類で考えれば, II・III型を示すほどの交差反応はなさそうである. したがって, 今回の場合, 交差反応での血清稀釈倍数が, 日本住血吸虫感染血清と比べ, 概ね低いことを考慮すれば, 陽性血清稀釈限界を 1:3,200以上と規定することに加えて, 他種寄生性疾患の侵淫状況を把握することにより, 本法による診断の信頼性はより確実なものになるといえる. また, 多包虫症患者血清との間にも, 若干例で弱い交差反応が認められた. したがって, 住血吸虫症

と主に北半球の寒冷あるいは温暖な地域に流行する多包虫症とは、概ねその分布は異なるが、広く世界的に分布する単包虫症との交差反応は未検討であるため、充分考慮しておく必要がある。このように、住血吸虫症の地理的分布、侵淫度の違い、感染様式・臨床症状の違い、他種寄生性疾患の侵淫状況などを考慮すれば、流行地での本法の診断的価値はさして減ずるとは考えられない。

一方、Jones and Lewert (1975) は、間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法で日本住血吸虫感染動物中の虫体抗原あるいは免疫複合体の検出をおこなっている。しかしながら、彼等の方法では凍結切片を用い、しかも感染血清の反応後に切片を固定し、それ以前の固定では肝組織の非特異染色性が増すことを指摘している。また、感染(免疫)血清が濃かつたり、DAB液(0.01%  $H_2O_2$  に0.05% DABを加えて使用)に長く浸けておくと非特異的染色性がやはり増加するとしている。さらに、ペルオキシダーゼを標識する抗体の精製度が大切で、製品化された標識抗血清や、硫酸塩析により精製された抗体の使用は良い結果をもたらさないとしている。ところが、今回の我々の方法では、10%ホルマリン液による反応前固定で、しかもパラフィン包埋切片であっても、充分に間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法の使用に耐え、しかもヤギ正常血清単独処理で、Jones and Lewert (1975) が指摘した肝組織の非特異的な染色を充分阻止することが可能となり、手技はより簡便化された。また、DAB液、ペルオキシダーゼ標識抗血清は、彼等の方法に比べ、さらに低濃度で使用したほうが良い結果が得られることが明らかとなった。

また、凍結切片を用いた間接蛍光抗体法では、単性寄生例の検出(Kanamura *et al.*, 1979)、初期感染や急性・慢性感染の区別(Helden *et al.*, 1975; Okot-Kotber 1978; Kanamura *et al.*, 1979)、免疫複合体(immune-complex)あるいはそれによる糸球体腎炎の検出(Hillyer and Lewert, 1974; Hoshino-Shimizu *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1977) が可能とされている。したがって、今回の間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法は、IFATに比しさらに鋭敏な反応であり、充分にこのような目的で利用出来るようである。さらに、有効な治療薬が開発された現在、治療効果判定への応用は期待出来るよう。

しかしながら、今回の方法の最大の利点は、ホルマリン固定、パラフィン包埋の抗原性の安定した、しかも安価に作製出来る虫卵切片抗原を用い(Kamiya and Ka-

miya, 1980)、しかも蛍光顕微鏡等特別な機器が不要で、加えて反応後の切片が永久標本として残り、将来再検討可能な点である。このような本法の特長は、住血吸虫症が主に亜熱帯・熱帯地の開発途上国に多いことを考えれば、そのような環境下での疫学調査目的に耐え得る有効な診断方法であることが示唆された。

## 要 約

フィリピン・レイテ島由来の日本住血吸虫感染後8週目のホルマリン固定マウス肝組織中の虫卵切片を用いた間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法(Indirect immunoperoxidase test; IIP)を、同島の日本住血吸虫症患者の免疫診断に応用した。

患者血清45例全例、血清稀釈倍数1:200以上で陽性、最高陽性稀釈倍数は1:51,200で、37例(82.2%)は1:3,200以上で陽性であった。対照群の非感染者20例のうち2例は、1:10の血清稀釈で陽性を示したが、他は全て陰性であり、高い特異性が認められた。また、COPの型分類との関係では、I型については概ね低いIIP値であったが、II・III型を示すものではIIP値3,200以上で、特にIII型では大半が25,600以上であった。また、IIP値はIFA値とよく相関し、後者に比しより鋭敏な反応であることが明らかとなった。

交差反応は、トリヒナ症、ウエステルマン・宮崎両肺吸虫症、多包虫症患者血清との間で認められたが、血清稀釈1:3,200以上で消失した。

今回の間接ペルオキシダーゼ酵素抗体法は、安価に作製出来る抗原性の安定したホルマリン固定パラフィン包埋の虫卵切片を抗原として利用出来ること、蛍光抗体法と異なり蛍光顕微鏡が不要で、尚かつ反応後の切片が永久標本として残る利点があり、亜熱帯・熱帯の流行地における住血吸虫症の免疫診断に応用出来ることが示唆された。

## おわりに

貴重な多包虫症患者血清を分与いただきました北海道立衛生研究所副所長熊谷 満博士に深謝致します。また、種々御協力いただきました当教室石郷岡清基、山下恵子氏に感謝致します。

なお、本研究の要旨は第50回日本寄生虫学会総会ならびに第92回日本獣医学会において発表された。

## 文 献

- 1) Agner, K. (1941): Verdoperoxidase, fer-

- ment isolated from leucocytes. Acta Physiol. Scandinav., 2 (Suppl.), 1-62.
- 2) Araki, K., Shimomura, H., Yokogawa, M., Noseñas, J. S., Trinidad-Perz, D., Lazal, R. and Blas, B. L. (1980): Evaluation of immunodiffusion test for the diagnosis of schistosomiasis in Leyte, Philippines. Proceedings of the Philippines-Japan joint conference on schistosomiasis research and control, 37-39.
  - 3) Helden, H. P. T. van, Terpstra, W. J., Okot-Kotber, B. M. and Eyakuze, V. M. (1975): Are these stage-characteristic immunofluorescence patterns in schistosomiasis? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 69, 309-311.
  - 4) Hillyer, G. V. and Lewert, R. M. (1974): Studies on renal pathology in hamsters infected with *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 404-411.
  - 5) Hillyer, G. V., Ruiz-Tiben, E. R., Knight, W. B., Gomez de Rios, I. and Pelley, R. P. (1979): Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: Comparison of ELISA, radioimmunoassay, and precipitation tests performed with antigen from eggs. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 661-669.
  - 6) Hoshino-Shimizu, S., Brito, T. de, Kanamura, H. Y., Canto, A. L., Silva, A. D., Campos, A. R., Penna, D. O. and Silva, L. C. da (1976): Human schistosomiasis: *Schistosoma mansoni* antigen detection in renal glomeruli. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 70, 492-496.
  - 7) Jones, C. E. and Lewert, R. M. (1975): Peroxidase-labeled antibody, a tool for demonstrating parasite antigen or host immunoglobulin in tissue. J. Parasitol., 61, 140-142.
  - 8) Jones, C. E., Richford, F. W., Ozcel, M. A. and Lewert, R. M. (1977): *Schistosoma mansoni*: Semiquantitative assessment of circulating immune complexes, serum Clq and C3 and their relationship to renal pathology and hepatic fibrosis in rabbits. Exp. Parasitol., 42, 221-234.
  - 9) Kamiya, H. (1980): Influence of temperature on the antigenicity of *Schistosoma japonicum* lyophilized egg for circumoval precipitin test (COPT) Jap. J. Vet. Res., 28, 149-154.
  - 10) Kamiya, H. and Kamiya, M. (1980): Preliminary application of a formalin fixed tissue section to the indirect fluorescent antibody technique and intraoval precipitin test for the diagnosis of schistosomiasis japonica. Jap. J. Vet. Res., 28, 155-160.
  - 11) Kamiya, H., Tada, Y., Lazal, R., and Blas, B. L. (1980): Production of COPT antigens for schistosomiasis japonica with regards on the establishment of laboratory mouse colony in the tropics. Proceedings of the Philippine-Japan joint conference on schistosomiasis research and control, 43-46.
  - 12) Kamiya, H. (1981): Technique of the intraoval precipitin (IOP) reaction by using formalin fixed tissue section for the diagnosis of schistosomiasis. Jap. J. Parasit., 30, 161-165.
  - 13) 神谷晴夫・石郷岡清基・鈴木俊夫・松田肇・田中寛・神谷正男・大林正士 (1981): ホルマリン固定組織切片を用いた日本住血吸虫症の免疫診断一特に間接蛍光抗体法の検討. 寄生虫誌, 30 (増), 72.
  - 14) Kanamura, H. Y., Hoshino-Shimizu, S., Camargo, M. E. and Silva, L. C. da (1979): Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 242-248.
  - 15) Mason, T. E., Phifer, R. F., Spicer, S. S., Swallow, R. A. and Dreskin, R. B. (1969): An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. J. Histochem. Cytochem., 17, 563-569.
  - 16) 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. Jap. J. Exp. Med., 47, 369-375.
  - 17) Matsuda, H., Tanaka, H., Blas, B. L., Noseñas, J. S. and Santos, A. T. Jr. (1980): Detection of antibodies in schistosomiasis japonica by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proceedings of the Philippine-Japan joint conference on schistosomiasis research and control, 34-36.
  - 18) Noseñas, J. S., Matsuda, H., Blas, S., Tanaka, H. and Santos, A. T. Jr. (1975): Evaluation of circumoval precipitin test using dried blood taken on filter paper as a diagnostic tool in epidemiological survey for schistosomiasis. Jap. J. Exp. Med., 45, 367-375.
  - 19) Okot-Kotber, B. N. (1978): The develop-

- ment of stage-characteristic immunofluorescence patterns in experimental schistosomiasis in mice. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 72, 255-262.
- 20) 鈴木俊夫・赤尾信明・山下隆夫 (1981) : 非標識抗体酵素法によるホルマリン固定組織内蠕虫の染色・寄生虫誌, 30 (増), 46.
- 21) 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*. *Jap. J. Exp. Med.*, 45, 105-111.
- 22) Tanaka, H. (1976) : Complement fixation and circumoval precipitin reaction for diagnosis and as tests of cure in schistosomiasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 7, 176-179.
- 23) 山下清章・岩本俊之 (1978) : Immunoglobulin-enzyme bridge method —ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片における抗原の証明法. 免疫実験操作法, 2111-2119.
- 24) Yogore, M. G. Jr., Lewert, R. M. and Blas, B. L. (1978) : Schistosomiasis japonica in Barrio San Antonio, Basey, Samar in the Philippines : II. Quantitative fecal examination and circumoval precipitin tests. *Southeast Asian J. Trop. Med., Public Health*, 9, 433-355.
- 25) Yogore, M. G. Jr., Lewert, R. M. and Blas, B. L. (1979) : Schistosomiasis japonica in Barrio San Antonio, Basey, Samar in the Philippines : III. The plasma circumoval precipitin test. Procedure and use in epidemiologic studies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 10, 23-31.
- 26) 横川宗雄・佐野基人・荒木国興 (1967) : 日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究 (3) Circumoval precipitation test (COPT) に関する研究. 寄生虫誌, 16, 77-84.

Abstract

DIAGNOSIS OF SCHISTOSOMIASIS JAPONICA BY INDIRECT  
IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE USING *SCHISTOSOMA*  
*JAPONICUM* EGGS IN FORMALIN-FIXED  
LIVER SECTIONS

HARUO KAMIYA, TOSHIO SUZUKI,

(Department of Parasitology, Akita University School of  
Medicine, Akita 010, Japan)

HAJIME MATSUDA AND HIROSHI TANAKA

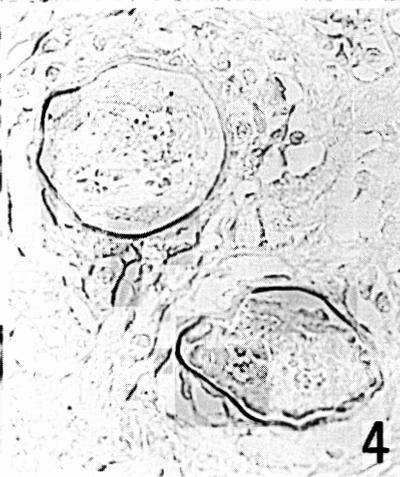
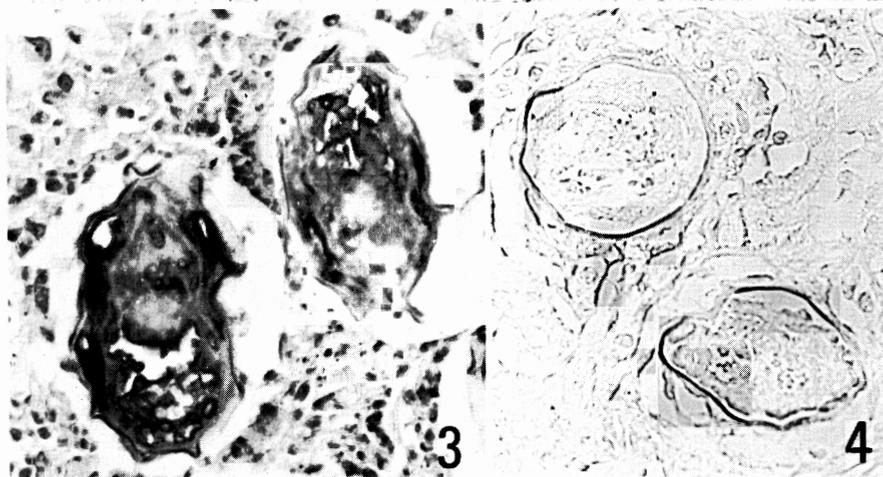
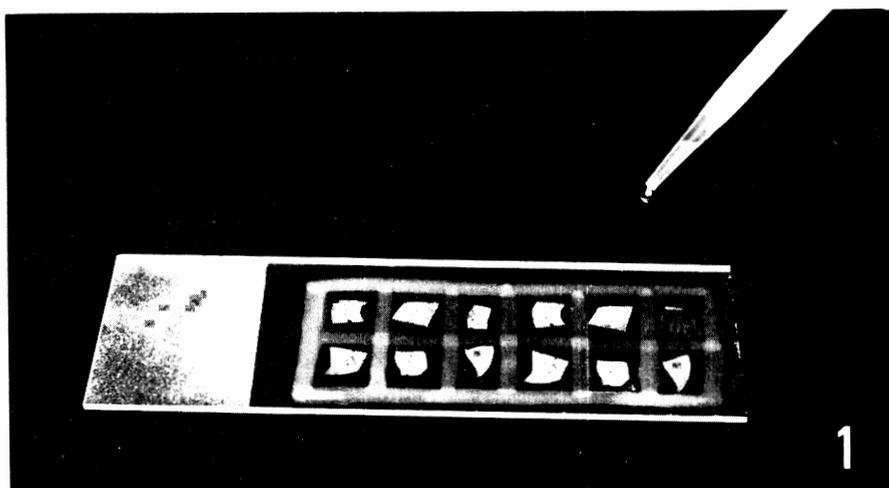
(Department of Parasitology, Institute of Medical Science,  
The University of Tokyo, Tokyo 108 Japan)

Application of the heat stable antigen in *Schistosoma japonicum* eggs to the indirect immunoperoxidase technique (IIP) was investigated for the diagnosis of schistosomiasis japonica. Sera of 45 schistosomiasis patients were collected in Leyte, Philippines and those of 20 healthy controls were sampled in Tokyo, Japan.

Eggs in the histology section of liver of the mouse 8 weeks after infection with *S. japonicum* from Leyte, Philippines were used as antigen. Test sera were diluted with 10% normal goat serum for eliminating endogenous and pseudoperoxidase reactions of the liver. The sections were incubated with each serum in a moist chamber at 37°C for 30 min. Anti-human IgG conjugated with horseradish peroxidase was used at 1:320 dilution with PBS as an appropriate concentration. The freshly prepared 0.05% 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride in tris buffer (0.05 M; pH 7.6) containing 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as the substrate for visualization. The space between the vitelline membrane and miracidium in the egg showed most strong peroxidase activity. All of the 45 serum samples from patients showed positive reactions at 1:200 or more dilutions. On the other hand, among control sera, only 2 cases resulted in a low positive reaction at 1:10 dilution (Table 1). Cross reactions were observed in the cases with *Trichinella spiralis*, *Paragonimus westermani*, *P. miyazakii* and *Echinococcus multilocularis* infections.

Immunofluorescent antibody technique (IFAT) using eggs in the same liver section and circumoval precipitin test (COPT) were performed on the same serum samples as reference tests. The results among IIP, IFAT and COAT correlated well each other (Tables 2, 3).

From the results, it may be suggested that the present procedure of the indirect immunoperoxidase technique is useful for the diagnosis of schistosomiasis japonica in the endemic areas where other parasites giving cross reactions are not existing.



**Explanation of Figures**

- Fig. 1 The mouse liver sections with many egg granulomas of *S. japonicum*; divided by nail varnish.
- Fig. 2 Eggs showed positive peroxidase staining; incubated in the infected serum; without any counter-staining.  $\times 230$
- Fig. 3 Eggs showing strong peroxidase activity between vitelline membrane and miracidia; incubated in the serum of infected patient. Sections are counter-stained with hematoxylin.  $\times 660$
- Fig. 4 Absence of peroxidase staining in the eggs incubated in the normal control serum; no counter-staining.  $\times 660$