

ペルオキシダーゼ標識抗体, O-フェニレン ジアミン基質を用いた日本住血吸虫症の ELISA 反応の研究

松 田 肇* 田 中 寛* 中 尾 稔*
Bayani L. Blas† Julian S. Noseñas† Alfredo T. Santos, Jr.†

(昭和57年2月8日 受領)

Key words: micro-ELISA, schistosomiasis japonica, immunodiagnosis, peroxidase-labeled antibody, O-phenylenediamine

はじめに

住血吸虫症の免疫学的診断法として、古くから多くの手法がとり入れられてきた。わが国および東南アジアに分布する日本住血吸虫症に関しては、横川ら(1967)が卵周沈降反応(COPT)を本症の診断に導入して以来、多くの業績がみられ、鋭敏性、特異性共に優れた方法であることが認められ、診断的あるいは疫学的調査に応用されてきた(Tanaka *et al.*, 1975; Noseñas *et al.*, 1975; Matsuda *et al.*, 1977; Yogore *et al.*, 1979)。本法は簡便でしかも信頼性の高い免疫診断法の1つと評価されているが、判定に少くとも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り、反応の定量化に若干問題を残している。

そこで著者らは、Van Weeman and Schurs(1971), Engvall and Perlmann(1971)により考案された酵素抗体法 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に注目し、本症の診断に5-アミノサリチル酸(5AS)を基質としたELISA法を応用し、鋭敏で比較的特異性も高い方法であることを報告し(Tanaka *et al.*, 1979; 松田ら, 1981)、肉眼的判定も可能で疫学調査に応用出

来る可能性を示唆した。また中尾ら(1981)は、ペルオキシダーゼ標識抗体用の三種基質を比較し、鋭敏性と安定性において、O-phenylenediamine(OPD)基質が優れていることを報告した。

本研究では、日本住血吸虫症の診断に関し、OPD基質を用いたELISAの有用性を検討したので報告する。

材料と方法

抗原と反応手技:

実験に用いた抗原は、山梨系日本住血吸虫卵の炭酸緩衝液(0.05 M, pH 9.6)抽出粗抗原で、虫卵の消化分離法、抗原の作成および反応の手技は、Tanaka *et al.*(1979)、松田ら(1981)の方法に従った。標識抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 山羊血清(Miles-Yeda, L. T. D., Lot no. S 586)を用いた。基質は、OPD(Eastman Kodak Co.)を使用した。OPD 100 mgを10mlのメタノールに溶解し、褐色瓶で4℃に保存し、1週間以内に使用した。使用直前に保存液1 mlに対し、99mlの蒸留水と3% H₂O₂液0.1 mlを加えて遮光しながら基質液の調整を行った。

抗原感作は、37℃ 2時間湿潤箱中で行い、血清反応、標識抗体は37℃ 30分、基質(発色)は恒温(25~26℃)暗所で30分間反応させた。全過程の液量は、基質(0.3ml)を除き、プレート1穴当たり0.1mlで行った。酵素反応は、8 N H₂SO₄ 25 μ lで停止させ、吸光度はマイクロプレート光度計(コロナ MTP-12, 日製産業)により、500nmの波長で測定した。

血清と標識抗体は、BSA/T(1% Bovine serum albu-

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

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

min, 0.05% Tween 20加0.15M PBS pH 7.2; 56C 30分非働化後, -20C に保存) で希釈した. なお, BSA/T およびプレート洗浄液にアジ化ナトリウムの混入をさけた.

血清:

MIFC 法による虫卵検査で陽性と判定されたフィリピン・レイテ島由来の177例の日本住血吸虫症患者血清と, このうち約30例の血清を集めた陽性対照用のプール血清および陰性対照としてレイテ (10例), マニラ (20例), 東京 (36例) の各地で得られた健康者血清を用いた.

交叉反応の有無を調べるため, マンソン住血吸虫症7例, ビルハルツ住血吸虫症13例, 肝蛭症5例, ウェステルマン肺吸虫症5例, 宮崎肺吸虫症4例, 肝吸虫症4例, タイ肝吸虫症2例, 鳥類住血吸虫セルカリアを起因とする水田皮膚炎患者血清10例, 多包虫症2例, 有棘顎口虫症1例, 旋毛虫症4例, 糞線虫症1例, 三日熱および熱帯熱マラリア症各1例の血清を用いた.

マイクロプレートの選択:

固相担体として, 用いるプレートの材質や型につき, 3種類の基質—OPD, O-tolidine(OT), 5-aminosalicylic acid(5-AS)—を用いて検討した. 平底 Immulon, micro-ELISA プレート (Dynatech, M 129 A), 組織培養用ポリスチレン・プレート (Dynatech, 29 ART), 2種類のディスプレイサブル丸底塩化ビニール・プレート (Dynatech, 220-24と三光純薬, 220-24K) で, 反応条件を同一にして比較した結果, 鋭敏な基質である OPD や OT では, 29 ART で陰性血清の非特異的反応が強くみられた. 塩化ビニール・プレートでは, 材質や型の影響で, プレート直統式光度計による吸光度のばらつきがみられたが, 肉眼判定では十分使用にたえるプレートであった. 著者らは, 血清や標識抗体の非特異的吸着による基質の発色が殆んどみられないプレート, M 129 A を使用した.

成 績

陽性限界および判定基準:

日本住血吸虫症患者血清40例と健康人血清36例を1:40に希釈し反応後, 吸光度 (OD) を測定し Fig. 1 に示した. 陰性群の OD 値の99%棄却限界の上限(0.110)は, 全体の平均 OD 値を2倍にした値 (0.124) 以下であり, この値は, 陰性プール血清の2倍の OD 値(0.128)に一致した. 血清の抗体価測定には, プレート毎に陰性プール血清 (1:40希釈) を数穴置き, この平均 OD

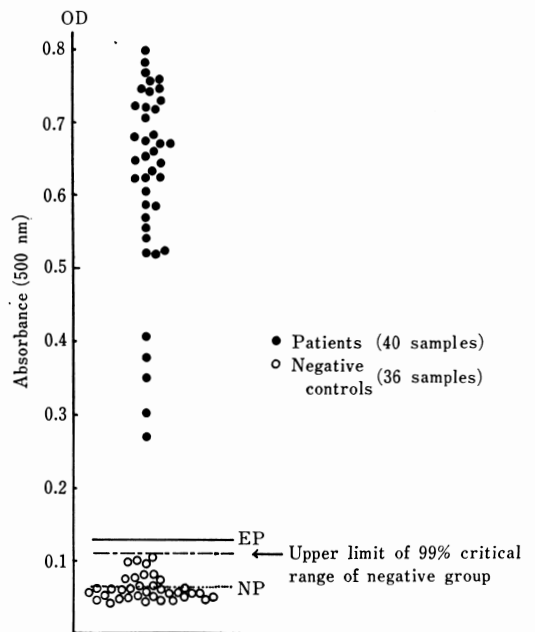


Fig. 1 Reaction of sera from *S. japonicum* patients and negative controls by ELISA at 1:40 serum dilution.

Antigen: *S. japonicum* egg extract (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Conjugate: 1:3,200

Substrate: O-phenylenediamine

NP: Pooled normal control serum diluted at 1:40

EP: Endpoint of reaction (2 \times of OD of pooled normal control serum)

値の2倍値以上の値が得られた血清希釈段階を反応の終末点あるいは陽性限界とし, 血清希釈1:40以下を陰性とした.

抗原と標識抗体の力価測定:

抗原濃度を蛋白量として160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から2倍希釈で, 0.15625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで希釈した. 陽性プール血清を1:40から1:5,120に, 陰性プール血清を1:40に希釈した. 陰性プール血清の非特異的反応は, 抗原濃度に依存し, Table 1 に示すように, 特異的に最高抗体価 (1:2,560) を与える抗原濃度は1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であり, 最少必要量の2倍の2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を反応に用いた. 同様に標識抗体を1:200~1:12,800に希釈した場合, 至適濃度は1:3,200であった.

日本住血吸虫症患者血清と健康人血清の ELISA 抗体価測定:

レイテ島の虫卵陽性者血清177例では, 2例 (1.1%)

Table 1 Determination of the optimal antigen concentration by block titration

| | Serum dilution 1 : | | | | | | | | Negative Control | | |
|-----------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|-------|------|
| | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 2560 | 5120 | 40* | BSA/T | |
| Antigen (μ g/ml) | 160 | .756 | .646 | .627 | .572 | .441 | .361 | .256 | .179 | .340† | .016 |
| | 80 | .847 | .700 | .644 | .562 | .460 | .353 | .258 | .209 | .261 | .012 |
| | 40 | .857 | .786 | .647 | .579 | .502 | .391 | .294 | .244 | .173 | .013 |
| | 20 | .840 | .772 | .661 | .571 | .494 | .400 | .271 | .208 | .129 | .014 |
| | 10 | .812 | .733 | .624 | .555 | .463 | .361 | .266 | .163 | .101 | .009 |
| | 5 | .811 | .725 | .601 | .518 | .424 | .328 | .255 | .181 | .111 | .008 |
| | 2.5 | .714 | .624 | .498 | .444 | .371 | .272 | .191 | .120 | .064 | .010 |
| | 1.25 | .631 | .482 | .378 | .329 | .273 | .178 | .133 | .104 | .065 | .011 |
| | .625 | .491 | .366 | .279 | .211 | .167 | .117 | .086 | .054 | .049 | .006 |
| | .3125 | .361 | .267 | .197 | .145 | .101 | .068 | .046 | .041 | .038 | .009 |
| | .15625 | .243 | .169 | .118 | .093 | .064 | .035 | .032 | .027 | .027 | .010 |
| CB | | .087 | .048 | .030 | .025 | .008 | .006 | .016 | .017 | .029 | .006 |

Antigen: *S. japonicum* egg extract

Conjugate: Peroxidase-conjugated anti-human IgG (Miles-Yeda) diluted at 1 : 3,200

CB: Carbonate buffer

BSA/T: 1% bovine serum albumin in PBS/Tween

*: Pooled normal control serum diluted at 1 : 40 †: Absorbance at 500 nm

Table 2 Distribution of ELISA titers in sera from *S. japonicum* infections and negative sera

| ELISA titer 1 : | <i>S. japonicum</i> patients* | Negative controls | | |
|-----------------|-------------------------------|-------------------|----------|----------|
| | Leyte, Philippines | Leyte | Manila | Tokyo |
| 40> | 2(1.1%) | 10(100%) | 20(100%) | 36(100%) |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 80 | 2(1.1) | 0 | 0 | 0 |
| 160 | 2(1.1) | 0 | 0 | 0 |
| 320 | 26(14.7) | 0 | 0 | 0 |
| 640 | 35(19.8) | 0 | 0 | 0 |
| 1280 | 30(17.0) | 0 | 0 | 0 |
| 2560 | 35(19.8) | 0 | 0 | 0 |
| 5120 \leq | 45(25.4) | 0 | 0 | 0 |
| Total | 177 | 10 | 20 | 36 |

*: Egg positive by MIFC

が抗体価 1 : 40 以下の陰性, 175 例 (98.9%) が 1 : 80 以上の陽性を示し, 反応陽性者のうち 171 例 (97.7%) が 1 : 320 以上の高い抗体価を示した (Table 2). 対照のレイテ島 (10 例), マニラ (20 例) および東京 (36 例) の健康人血清では, 全例が 1 : 40 以下の陰性と判定された。

交叉反応性の検討:

虫卵抽出粗抗原に対する他の寄生虫症患者血清での交

叉反応を Fig. 2 に示した. 同じ住血吸虫属のマンソン住血吸虫症とビルハルツ住血吸虫症との交叉反応は強く, 前者は 7 例中最高 1 : 5,120 以上の抗体価を示したが, このうち 3 例は 1 : 40 以下の陰性であった. 後者では 13 例中全例に交叉反応が認められ, 最高 1 : 320 の抗体価を示した. 旋毛虫症では, 4 例中 1 例に 1 : 160, 多包虫症 2 例と水田皮膚炎患者 10 例中 3 例に最高 1 : 80, 肝蛭症 5 例中 3 例に弱い交叉反応 (1 : 40) が認め

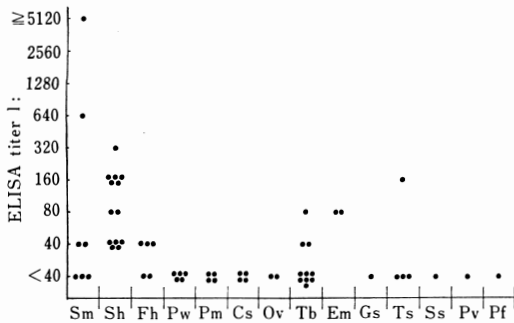


Fig. 2 Cross-reactivity of *S. japonicum* egg antigen among various helminth infections as determined by ELISA.

- Sm : *Schistosoma mansoni*
- Sh : *Schistosoma haematobium*
- Fh : *Fasciola hepatica*
- Pw : *Paragonimus westermani*
- Pm : *Paragonimus miyazakii*
- Cs : *Clonorchis sinensis*
- Ov : *Opisthorchis viverrini*
- Tb : *Trichobilharzia brevis*
- Em : *Echinococcus multilocularis*
- Gs : *Gnathostoma spinigerum*
- Ts : *Trichinella spiralis*
- Ss : *Strongyloides stercoralis*
- Pv : *Plasmodium vivax*
- Pf : *Plasmodium falciparum*

られ、ウェステルマン、宮崎両肺吸虫症、肝吸虫症、タイ肝吸虫症、有棘顎口虫症、糞線虫症、三日熱および熱帯熱マラリアの各症例では 1 : 40 以下の陰性で交叉反応は認められなかった。

血清希釈による交叉反応消失法 :

本実験では、Fig. 2 で 1 : 40 以上の交叉反応が認められた各寄生虫疾患について、血清を 1 : 200 に希釈することにより交叉反応を除外しうるかを検討した。対照として、健康人 16 例を同時に比較し、その OD 値を示した (Fig. 3)。1 : 40 希釈の陰性プール血清の 2 倍の OD 値を陽性限界 (EP) とした場合、マンソン住血吸虫症 4 例中 2 例、ビルハルツ住血吸虫症 13 例中 2 例が陽性と判定され、他の寄生虫症全例が陰性と判定された。日本住血吸虫症 46 例中 45 例 (97.8%) が陽性と判定され、健康人 16 例全例は陰性であった。

交叉反応を除くため、1 : 200 以上を陽性と判定した場合、Table 1 の 177 例の虫卵陽性者中 171 例 (96.6%) が反応陽性と判定され、鋭敏性も保たれている。

この結果、日本住血吸虫症の高度の流行地で、1 : 200

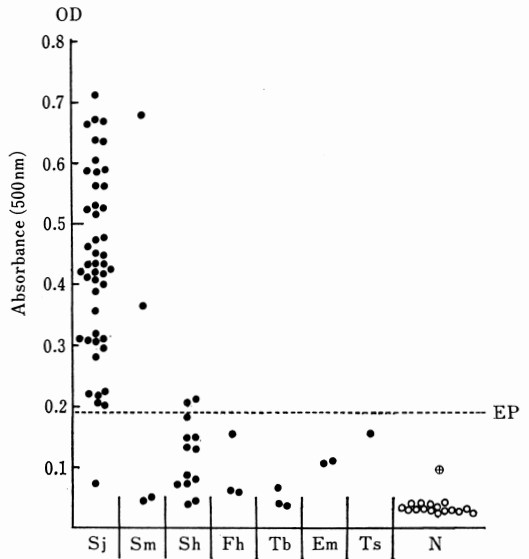


Fig. 3 The method to prevent cross-reactions by diluting sera at 1 : 200 of samples from Fig. 2 showing cross-reactivity.

- Sj : *S. japonicum*
 - Sm : *S. mansoni*
 - Sh : *S. haematobium*
 - Fh : *F. hepatica*
 - Tb : *T. brevis*
 - Em : *E. multilocularis*
 - Ts : *T. spiralis*
 - N : Negative control
- EP : Endpoint of reaction (2× of OD of pooled normal control serum (⊕) diluted at 1 : 40)
 Antigen : *S. japonicum* egg extract (2.5 μg/ml)
 Substrate : O-phenylenediamine

以上の抗体価を反応陽性とすれば特異的で鋭敏な反応として利用価値が高いと判定された。

もし、日本のように他の寄生虫感染が少なく、慢性症、低感染者の多い所で患者のスクリーニングとして利用する場合は、1 : 40 以上の反応を陽性に判定することで有効に利用出来るとみとめられた。

考 察

本研究は、鋭敏で安定性の高いペルオキシダーゼ標識抗体用基質の OPD を用いた ELISA により、ヒトの日本住血吸虫症の診断に関する信頼性を検討することを目的としたものである。

まず、固相担体としてのプレートの選択を行い、micro-ELISA プレート (Dynatech, M 129 A) が血清や標識抗体の非特異的吸着が少なく、鋭敏な基質を用いた場合にも無反応発色値が低いため、本プレートを採用した。前報 (松田ら, 1981) では、基質に 5-AS を用いたため、反応が強くと発現する組織培養用プレートで目的を

達したが、OPD, OT では強い非特異的反応がみとめられた。

また反応系で安定した成績をうるために、抗原は所定の陽性プール血清との間で block titration を行ない、最高抗体価を与える抗原濃度を定めることが出来た。このプレートでは、日本住血吸虫卵抗原で蛋白量として $2.5 \mu\text{g/ml}$ のものを1穴に 0.1 ml を用いるという極めて微量が至適濃度であり、安定した抗体価が得られた。本法での陽性限界は、統計上陰性血清の99%棄却限界上限 OD 値より常に高い値になり、住血吸虫非感染者を100%陰性とみなすことができるため、偽陽性の反応が起らない利点がある。

従来 ELISA は、鋭敏な反応だけに毎回異なる OD 値が得られ (Schinski *et al.* 1976; Yogore *et al.* 1981)、安定した成績が得にくい傾向にあつたが、本法の判定基準、陰性プール血清 $1:40$ 希釈の2倍の OD 値以上を陽性と判定すれば、例え毎回 OD 値が異なる場合でも、陰性プール血清の OD 値も変わるため、ほぼ一定した抗体価が得られ、再現性も高いことがみとめられた。

用いた抗原は乾燥虫卵 100 mg を炭酸緩衝液で $1:500$ に希釈抽出した場合、蛋白量は $650 \mu\text{g/ml}$ であつた。この微量法では、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ の抗原 0.1 ml で感作を行うので、96穴のプレートが $1,300$ 枚感作可能で、 $14,000$ 検体の力価測定が出来、1患者1穴法を用いれば、約11万検体が検査可能となる。また抗原を凍結乾燥すれば、熱帯の温度条件でも失活は起らなかつたので (松田ら, 1981)、熱帯の野外研究室でも反応が行える。

一般に、対照の陰性血清を熱帯地から求めると、偽陽性反応が多く出現するといわれるが (Huldt *et al.* 1975; Schinski *et al.* 1976, Voller *et al.* 1977; McLaren *et al.* 1978)、本判定基準によると熱帯の健康人は全て陰性と判定された。

他属の寄生虫疾患との交叉反応に関しては、旋毛虫症との反応が最も強く、4例中1例に $1:160$ 、水田皮膚炎と多包虫症の患者血清に最高 $1:80$ 、肝蛭症に弱い ($1:40$) 交叉反応が認められた。交叉反応はマンスン、ビルハルツ両住血吸虫症において比較的強く出現したが、前者では43%が陰性反応を示した。両種と日本住血吸虫症との地理的分布は明らかに異なり、野外調査では問題は起らない。

マンスン住血吸虫症で強い交叉反応を示した2例は、林ら (1980) が報告した比較的急性期で多数虫卵排泄者を含む症例であり、日本住血吸虫卵を抗原として用いた ELISA においても交叉反応は強く出現した。またビル

ハルツ住血吸虫症においては、最高 $1:320$ で全体に弱い交叉反応を示したが、100%が陽性であつた。

著者らが山梨県甲府市在住の慢性日本住血吸虫症69例を対象に ELISA で検討した結果では (松田・田中 1981)、 $1:40$ 以上の陽性者は68%に認められ、そのうち94%が $1:160$ 以下であつたことから、虫卵陽性者と慢性症例では明らかに抗体価の差がみとめられた。しかし、陽性反応を $1:40$ 以上と設定することにより、慢性症例、低濃度感染者、初期感染者などを含めたより多くの症例が検出され得ることが推測される。

一方、マンスン住血吸虫症の診断に ELISA を用いた報告は多く、とりわけ虫卵抽出抗原で成果を収めてはいるが (Huldt *et al.* 1975; Schinski *et al.* 1976; Voller *et al.* 1977; McLaren *et al.* 1978)、殆どどの報告である程度の偽陰性の出現をみとめ、また交叉反応もみられている。そのため特異抗原の精製が望まれ、Pelley *et al.* (1977) による major serological antigen (MSA)、Kelsoe & Weller (1978) や Deelder *et al.* (1980) による多糖類抗原である circulating anodic antigen (CAA) および McLaren *et al.* (1981) による (CEF 6) などの精製抗原が提唱され、ある程度の成果を収めてはいるが、収量が少ない難点がある。

本研究の micro-ELISA 法は、血清希釈を $1:200$ にした場合、虫卵抽出粗抗原を用いても、McLaren *et al.* (1981) が報告した (CEF 6) 精製抗原と鋭敏性、特異性、交叉反応性等に関し、ほぼ同じ成績が得られ、疫学調査にも十分使用出来るため、優れた免疫診断法であると思われる。

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 法による検便で日本住血吸虫卵の証明された患者血清ならびにレイテ島、マニラ、東京の各地より得た一般健康人血清を対象に、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 血清と OPD 基質を用いた micro-ELISA 法により、本法の診断に関する鋭敏性、特異性を検討した。

1) 固相担体として micro-ELISA プレート (Dynatech, M129A) を用い、山梨系日本住血吸虫卵の炭酸緩衝液 (0.05 M , $\text{pH } 9.6$) 抽出粗抗原 (蛋白量 $2.5 \mu\text{g/ml}$) 0.1 ml で感作後、血清と標識抗体 0.1 ml で反応させ、最終的に 0.3 ml の基質で発色させた。反応の陽性限界は、健康人の血清から統計的に決定し、陰性プール血清の繰り返した反応の OD 値の2倍値以上の値が得られ

た血清希釈段階を反応の終末点とした。

2) 177例の虫卵陽性者中、175例(98.9%)が1:80以上の抗体価を示し、そのうち171例が1:320以上の高い抗体価を示した。一方、レイテ島(10例)、マニラ(20例)、東京(36例)の各地より得た健康人血清では、全例が1:40以下の陰性であった。

3) 本抗原に対する交叉反応は、マンソン、ビルハルト両住血吸虫症において最も強く出現し、旋毛虫症、水田皮膚炎患者血清、多包虫症、肝蛭症の各寄生虫疾患において1:160以下でみとめられた。ウエステルマン、宮崎両肺吸虫症、肝吸虫症、タイ肝吸虫症、有棘顎口虫症、糞線虫症、三日熱および熱帯熱マラリア症では交叉反応はみとめられなかった。

4) 交叉反応がみとめられた各寄生虫症患者血清を1:200に希釈した結果、両種住血吸虫症を除き、全ての寄生虫症は陽性限界以下のOD値を示し陰性と判定され、日本住血吸虫症46例中45例(97.8%)が陽性を示した。

以上の結果から、本法は鋭敏性、特異性および定量性の点で優れたものであると判定された。

本研究に使用した血清類の一部は、広島大学医学部・辻守康教授、市立甲府病院・林正高博士、Dr. Regionald K. Anteson・Noguchi Memorial Institute for Medical Research Univ. of Ghana、秋田大学医学部・神谷晴夫博士、東京都立衛生研究所・村田以和夫氏、国立公衆衛生院・荒木国興博士、在マニラ JICA 専門家・越後貫博博士および Dr. Prapit Vivatanasesth・Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University の諸先生から分与提供を受けた。記して深く感謝の意を表する。

なお、本研究の要旨は、10th Int. Cong. Trop. Med. & Malaria (Manila, Philippines. Nov. 9-15, 1980)において一部発表した。また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) Deelder, A. M., Kornelis, D., Makbin, M., Noordpool, H. N., Codfried, R. M., Rotmans, J. P. and Oostburg, B. F. J. (1980): Applicability of different antigen preparations in the enzyme-linked immunosorbent assay for schistosomiasis mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 401-411.
- 2) Engvall, E. and Perlmann, P. (1971): ELISA. Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem., 8, 871-874.
- 3) 林 正高・平沢秀人・構木睦男(1980): マンソン住血吸虫症—輸入寄生虫疾患の問題点—日本医事新報, 2945, 26-30.
- 4) Huldtt, 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.
- 5) Kelsoe, G. H. and Weller, T. H. (1978): Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to circulating antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75 (11), 5715-5717.
- 6) 松田 肇・中尾 稔・田中 寛・永田 傳・Julian S. Nosenas, Bayani L. Blas, Gerundio P. Portillo, Alfredo T. Santos, Jr. (1981): 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。寄生虫誌, 30, 363-372.
- 7) Matsuda, H., Nosenas, 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.
- 8) 松田 肇・田中 寛 (1981): 日本住血吸虫症の血清診断。臨床と細菌, 8(3), 46-50.
- 9) 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.
- 10) McLaren, M. L., Lillywhite, J. E., Dunne, D. W. and Doenhoff, M. J. (1981): Serodiagnosis of human *Schistosoma mansoni* infections: enhanced sensitivity and specificity in ELISA using a fraction containing *S. mansoni* egg antigens ω_1 and α_1 . Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 72-79.
- 11) 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.
- 12) Nosenas, 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.

- 13) Pelley, R. P., Warren, K. S. and Jordan, P. (1977) : Purified antigen radioimmunoassay in serological diagnosis of schistosomiasis mansoni. *The Lancet.*, 2, 781-785.
- 14) Schinski, V. D., Clutter, W. C. and Murrell, K. D. (1976) : Enzyme and ¹²⁵I-labeled anti-immunoglobulin assay in the immunodiagnosis of schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 824-831.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Van Weeman, B. K. and Schurs, A. H. W. M. (1971) : Immunoassay using antigen-enzyme conjugate. *FEBS Letters.*, 15, 232.
- 18) 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.
- 19) Yogore, M. G., 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 epidemiological studies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Helth.*, 10, 23-31.
- 20) Yogore, M. G., Lewert, R. M. and Blas, B. L. (1981) : Schistosomiasis japonica in Barrio San Antonio, Basey, Samar in the Philippines: V. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared with quantitative stool examination and the circumoval precipitin (COP) test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 1252-1262.
- 21) 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

A STUDY OF ELISA FOR SCHISTOSOMIASIS JAPONICA USING
O-PHENYLENEDIAMINE, A SUBSTRATE OF
PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY

HAJIME MATSUDA, HIROSHI TANAKA, MINORU NAKAO

(Department of Parasitology, Institute of Medical Science,

The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108)

BAYANI L. BLAS, JULIAN S. NOSEÑAS

AND

ALFREDO T. SANTOS, Jr.

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

In the present study, the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (micro-ELISA) for the detection of schistosomiasis japonica using sera collected from proven patients in Leyte, Philippines was examined for its reliability.

1) The reactions of ELISA were performed in flat bottom wells of micro-ELISA plate (Dynatech, M 129 A) with crude *S. japonicum* egg antigen, peroxidase-labeled anti-human IgG serum (Miles-Yeda) and O-phenylenediamine as a substrate, respectively. For the titration of antibody in sera from patients, the endpoint of reaction was derived from the optical densities of 36 negative control sera diluted at 1 : 40. Sera showing an optical density of less than twice the mean value of triplicated reactions of pooled negative control serum diluted at 1 : 40 were considered to be negative based on statistical considerations.

2) According to this criterion, of 177 *S. japonicum* egg positives, 175 sera (98.9%) were found positive by ELISA. Of 175 reaction positives, 171 sera (97.7% in sensitivity) had the ELISA titers higher than 1 : 320, while 10 in Leyte, 20 in Manila, Philippines and 36 negative controls in Tokyo were all lower than 1 : 40.

3) Relatively strong cross-reactivity (higher than 1 : 160) with crude *S. japonicum* egg antigen was observed with sera from *S. mansoni* and *S. haematobium*, while sera from *Trichinella spiralis*, *Trichobilharzia brevis*, *Echinococcus multilocularis*, *Fasciola hepatica* showed weakly positive (reactions less than 1 : 160). No cross-reactivity was observed with sera from *Paragonimus westermani*, *P. miyazakii*, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Gnathostoma spinigerum*, *Strongyloides stercoralis*, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*.

4) Further study of cross-reaction of the egg antigen was made by diluting the sera at 1 : 200 to prevent cross-reactions among samples showing cross-reactivity. At this dilution of sera, all the infections other than those with *S. mansoni* and *S. haematobium* became negative. By this method, sensitivity of detecting patients with *S. japonicum* was 97.8%.

The results indicate that micro-ELISA technique developed in this study with crude *S. japonicum* egg antigen can be used for immunodiagnosis of schistosomiasis japonica because of its high sensitivity, specificity and quantification.