

酵素標識抗体法による糞線虫症の血清 診断法に関する研究

佐藤良也¹⁾ 高井昭彦¹⁾ 真栄城純子¹⁾
城間祥行²⁾

(昭和58年10月28日 受領)

Key words: *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides ratti*, serodiagnosis, micro-ELISA

緒言

沖縄県における糞線虫症は近年著しく減少し、最近10年間の調査でも感染率は平均0.8~0.9%で、ほぼ横ばい状態で推移している。他方、糞便検査において糞線虫の寄生が確認されなかつた患者に何らかの目的で免疫抑制療法を実施した後などに、突如として糞線虫陽性となり、しかも重感染の状態をきたす例が近年しばしば経験され、臨床的立場からも看過できない問題となつていゝる。また、かかる軽感染例では従来の糞便培養法による検出率が必ずしも高くないことが最近の調査で明らかになつてきた。このため沖縄県における糞線虫感染率は従来言われているよりも実際にはかなり高いものと考えられるが、その実態は不明であり、軽感染者をも検出しようとする血清検査法の開発が望まれるところである。さらに本症では、その多彩な病態と宿主の免疫応答との間の密接な関連が従来より指摘されており、免疫学的観点からも興味深い問題を含んでいる。しかし、このような免疫学的研究の基礎となる血清検査法は本症に関するかぎりほとんど手つかずの状態にある。

以上の観点から、さきに著者らは糞線虫症の血清学的検査法の開発を目的として、患者糞便の大量培養法によつて得た幼虫からの抗原調製とこれを用いた micro-ELISA に関する予報を行つた(佐藤ら, 1983)。今回は、この micro-ELISA についてさらに検討を加え、その診断的価値を確認したので報告する。

本研究は文部省科学研究費補助金による研究、特別研究促進費：課題番号 57123117「熱帯寄生虫病の対策に関する基礎的研究」(研究代表者・大鶴正満)の助成による。

¹⁾ 琉球大学医学部寄生虫学教室

²⁾ 那覇市泉崎病院

材料および方法

1) 糞線虫の培養

糞線虫 *Strongyloides stercoralis* 幼虫は那覇市泉崎病院を受診した比較的重症の患者2名から4日間にわたつて採取した糞便を濾紙培養して得た。ネズミ糞線虫 *S. ratti* は熊本大学医学部寄生虫病学教室より提供をうけた感染ラット糞便を同様に濾紙培養し、幼虫を得た。幼虫の大量採取を目的とした糞便の大量培養法は、すでに報告したごとく(佐藤ら, 1983)、57×14cm の大型濾紙に型通り下端約3cm を残して全面に患者糞便を塗布し直径約9cm の円筒状に巻き上げたものを水を入れたガラス容器内に立て、28°C で7日間培養した。これと同じものを5~6個分用意することによつて、患者のほぼ全便を培養することが可能であつた。また、濾紙を巻き上げる際にフィルム現像用のプラスチックベルトを濾紙の間にはさみ、濾紙面が互いに接着しないように工夫し、培養水の汚れを防いだ。培養水は培養2日目以降、毎日交換し、遊出した幼虫をその都度集めた。

2) 抗原の調製

培養水中に遊出した虫体はそのほとんどがフィラリア型幼虫であり、ラブジチス型成虫の混入は認められなかつた。幼虫は冷リン酸緩衝液(0.05M PB, pH 7.2)で3,000rpm, 15分間の遠心洗浄を5回繰り返して、沈渣をテフロンホモジナイザーで磨砕した。これに少量のPBを加え、マグネチックスターラーで4°C, 48時間攪拌し、抗原抽出を行つた。抽出液は20,000rpm, 30分遠心し、その上清を抗原とした。抗原は凍結乾燥法により濃縮後、Lowry-Folin法(Lowry *et al.*, 1951)で蛋白質量を測定し、-20°C に凍結保存した。

3) 感染家兎血清

S. stercoralis および *S. ratti* による感染血清は各々 5×10^5 の生幼虫を皮下に注射された家兎血清を用いた。広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis* 感染血清は *Biomphalaria glabrata* から得た感染幼虫 1×10^2 を経口感染させ、その後 3×10^2 と 1×10^3 の生幼虫で 1 ~ 2 回の追加感染を行った家兎血清である。

4) 糞線虫症患者血清

糞線虫感染者血清は泉崎病院を受診した24名の患者より採取した合計27検体と座間味村の集団検診で糞線虫感染者と判明した一般住民9名の血清を用いた。比較のため、同じ集団検診で糞線虫の感染を認めることができなかつた住民33名の血清も検査した。対照として、最近の沖縄県ではほとんど本線虫の感染が認められず、感染の既往もないと考えられる10歳以下の小児血清64検体、および本線虫の分布しない新潟県の一般住民100名の血清を用いた。

5) 標識抗体および基質

標識抗体はいずれもペルオキシダーゼ標識ヤギ抗体 (Miles-Yeda) を用いた。感染家兎の血清抗体の測定は抗家兎 IgG (Lot No. S905)、患者血清抗体の測定には抗ヒト IgG (γ -chain specific: Lot No. S233)、抗ヒト IgM (μ -chain specific: Lot No. S161) および抗ヒト IgE (Lot No. S980) を使用した。

基質は 5-aminosalicylic acid (5-AS: 関東化学) と o-phenylenediamine (OPD: Eastman Kodak) を用いた。5-AS はその80mg を 70°C の蒸留水100ml に溶解し、0.1N NaOH で pH 6.0 に調整したものに、使用直前、1/10量の0.05% H_2O_2 を加えて基質溶液とした。OPD は10mg を1.0ml のメタノールに溶解し、蒸留水で100ml としたものに、使用直前に 3% H_2O_2 を100 μl 加えた。

6) 酵素抗体法

酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) はマイクロプレートを用いた micro-ELISA を行った。方法は中尾ら (1981) に準拠し、1) プレート抗原感作、2) プレート BSA (ウシ血清アルブミン) 処理、3) 被検血清反応、4) 標識抗体反応、5) 基質反応の順に行った。マイクロプレートは micro-ELISA 用ポリスチレンプレート (Dynatech M129A) を使用し、抗原、被検血清、標識抗体、基質の液量はいずれも300 μl /well とした。抗原液は0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で蛋白濃度を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、これを各プレート穴に入れ、 37°C に2時間、続いて 4°C に一晩置いてプレートの抗原感作を行った。プレートの洗浄は0.05% Tween20 を含む0.15M PBS (pH 7.2) を洗浄液とし、その400 μl

を各プレート穴に入れ、5分間放置したのち、洗浄液を吸引除去する操作を3回繰り返した。プレートの洗浄操作は各実験手順ごとに行つた。プレートの BSA 処理は各穴に300 μl の2% BSA (Sigma) を含む PBS を入れ、 37°C で1時間行つた。被検血清は PBS で100倍に希釈し、 37°C で1時間反応させた。次いで、0.05% Tween 20と1.0% BSA を含む PBS で希釈した標識抗体を同様に30分反応させ、さらに基質を反応させた。基質の反応は速やかに基質溶液をプレート穴に入れ、5-AS は室温下で1時間、OPD は暗所で30分行つた。反応終了後、5-AS に対しては25 μl の 1N NaOH、OPD には 8N H_2SO_4 を25 μl 加えて酵素反応を停止させ、直ちに吸光度をマイクロプレート光度計 (コロナ MTP-12) を用いて、5-AS は波長449nm、OPD は500nm で測定した。ELISA 力価の測定は一穴法で行ない、その値を吸光度 (OD 値) で示した。

結 果

1) 基質の検討

使用した2種類の基質の反応特性を比較するために、糞線虫陽性者血清30例と糞線虫陰性の新潟県住民、小児血清のうちの18例、計48検体について、各基質の OD 値の相関をみたのが Fig. 1 である。両基質の反応性には強い相関がみられるが ($r=0.924$, $n=48$)、OPD では 5-AS に比較して陰性反応領域で OD 値が低く、

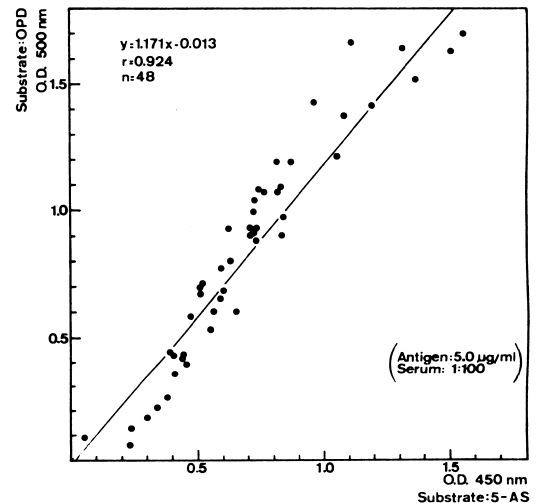


Fig. 1 Comparison of the ELISA values between two substrates (OPD and 5AS) in 48 sera of persons with or without strongyloidiasis.

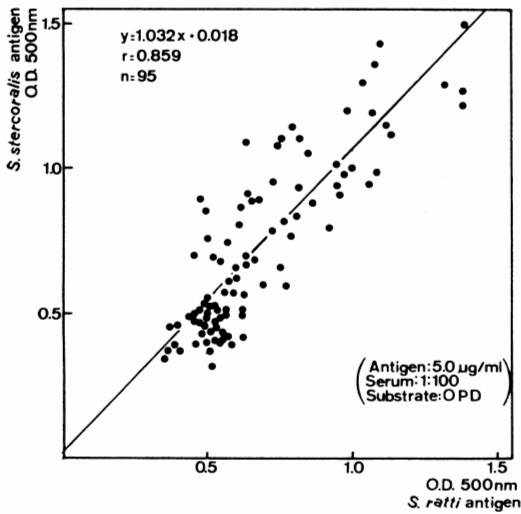


Fig. 2 Comparison of the ELISA values with *S. stercoralis* and *S. ratti* antigens in 95 sera of persons with or without strongyloidiasis.

逆に陽性反応領域での値が高く出る傾向を示し、陽性反応と陰性反応の差は OPD においてより明瞭であった。このため、以後の実験には基質に OPD を使用した。

2) *S. stercoralis* と *S. ratti* 抗原の比較

Fig. 2 は糞線虫症患者血清27検体、座間味村の住民で糞線虫陽性であった者の血清9検体、および糞線虫陰性であった座間味村住民と小児血清のなかから任意に選出した59検体、計95検体について、各々5 µg/ml に調整した *S. stercoralis* および *S. ratti* 抽出液を抗原として用いた場合の反応相関をみたものである。全般に *S. stercoralis* 抗原を用いた場合の反応が *S. ratti* 抗原に比べてやや高いが、両抗原の間に強い相関がみられ ($r = 0.859$, $n = 95$), *S. stercoralis* 抗原の代わりに *S. ratti* 抗原を本症の診断用抗原として使用可能であることが示された。

3) 他種蠕虫抗原との比較

Fig. 3 に示したのは *Strongyloides* と他の6種蠕虫の粗抗原を用い、前記血清95検体について各々測定した ELISA 値とその平均値である。*E. multilocularis* のように全体として background がかなり高い傾向がみられたが、*Strongyloides* と *D. immitis* 抗原を除けば個々の OD 値はほとんどが0.3~0.5の低値を示し、平均 OD 値も0.4前後のものが多かった。他方、*D. immitis* 抗原に対する反応は OD 値0.4~1.35の広い範囲に分布し、平均 OD 値も0.68で、*S. stercoralis* や *S. ratti* 抗

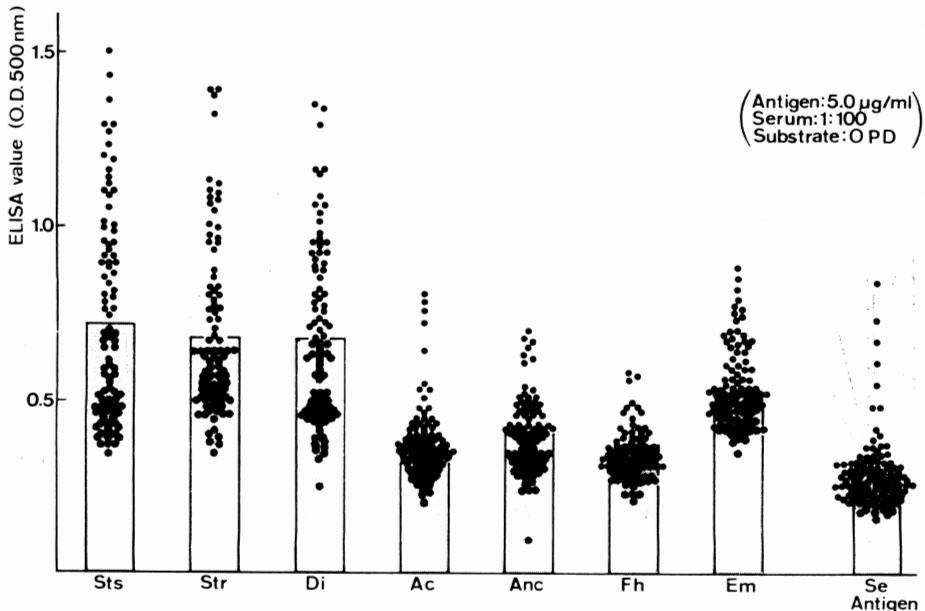


Fig. 3 Distribution of the ELISA values with various helminth antigens in 95 sera. Vertical bars represent the mean values. Sts: *S. stercoralis*, Str: *S. ratti*, Di: *D. immitis*, Ac: *A. cantonensis*, Anc: *Ancylostoma caninum*, Fh: *Fasciola hepatica*, Em: *Echinococcus multilocularis*, Se: *Sparganum mansoni*

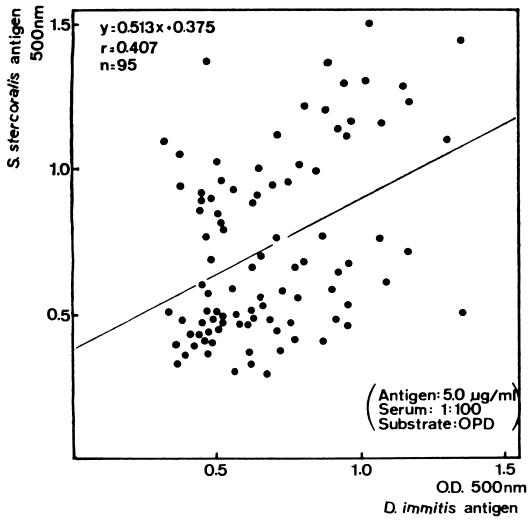
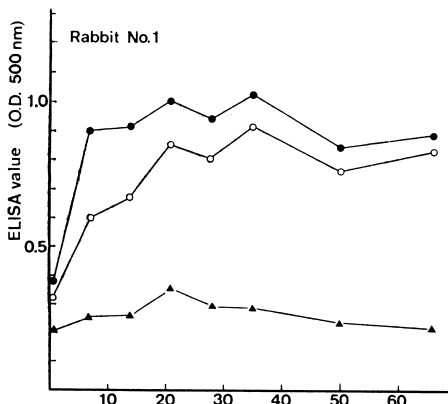


Fig. 4 Comparison of the ELISA values with *S. stercoralis* and *D. immitis* antigens in 95 sera.

原による平均 OD 値 (0.72 および 0.69) とほぼ同じ高値を示した。しかし、*D. immitis* と *S. stercoralis* 抗原による OD 値の相関をみると (Fig. 4), 前述した *S. stercoralis* と *S. ratti* との間の場合と異なり、相関はみられなかった ($r=0.407$, $n=95$)。すなわち、*D. immitis* に対して高い OD 値が示されたのは検査した沖縄住民の血清中に *S. stercoralis* に対して陰性でありながら *D. immitis* に陽性のものが相当数含まれていた



結果であることが示された。

4) 感染家兎血清による反応

S. stercoralis あるいは *S. ratti* を感染させた家兎血清中の IgG 抗体の推移を Fig. 5 に示した。いずれの家兎でも感染 1 週目にはすでに高い ELISA 値を示し、*S. stercoralis* 感染家兎で 66 日以上、*S. ratti* 感染家兎では 125 日以上にわたって高値が維持された。また、*S. stercoralis* と *S. ratti* 抗原の間で ELISA 値に大きな差はみられなかった。これに対し、非対応の *A. cantonensis* 抗原による反応はきわめて低い値を示したにすぎない。

逆に *A. cantonensis* 感染家兎では Fig. 6 に示したごとく、対応する *A. cantonensis* 抗原に対する抗体レベルの上昇にともなう *Strongyloides* 抗原に対する反応も上昇するが、この場合にも非対応の *Strongyloides* に対する反応はいずれも明らかな低値を示した。

5) 糞線虫感染者血清による反応

Fig. 7 は糞線虫感染者および比較のための各種血清群について IgG, IgM, IgE 抗体ごとに測定した ELISA 値を示したものである。IgG 抗体についてみると、泉崎病院を受診した患者 (A 群) のほとんどが OD 値で 0.7~1.9 にわたる高値を示し、平均 OD 値も 1.12 であつた。また、座間味村の集団検診において本線虫の感染が確認された一般住民 (B 群) の血清 OD 値はすべて 0.8 を越え、平均値も 1.4 と高値であつた。これに対し、同じ集団検診で糞線虫の寄生が認められなかった一般住民 (C 群) では 0.7 以上の高い OD 値を示すものが少数

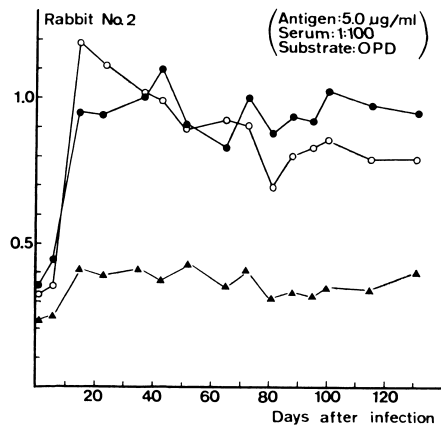


Fig. 5 Antibody responses assessed by the micro-ELISA with three antigens of *S. stercoralis* (●), *S. ratti* (○) and *A. cantonensis* (▲) in rabbits infected with *S. stercoralis* (Rabbit No. 1) and *S. ratti* (Rabbit No. 2). Rabbits were infected by subcutaneous injection of 5×10^5 filariform larvae of either species respectively.

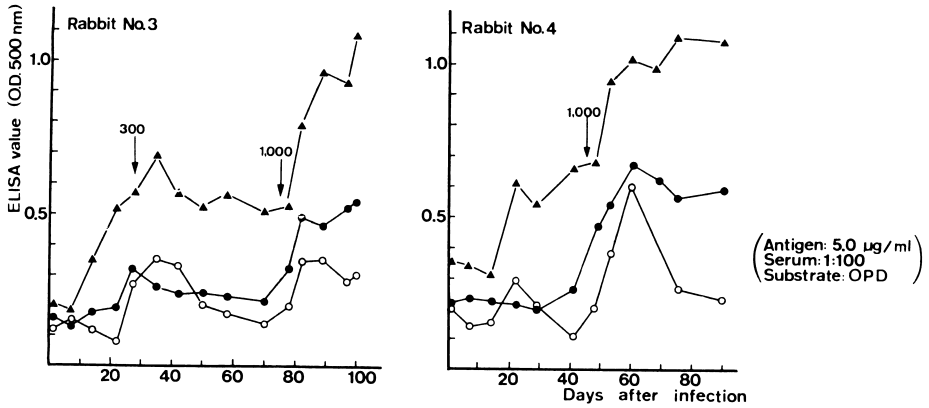


Fig. 6 Antibody responses assessed by the micro-ELISA with three antigens of *S. stercoralis* (●), *S. ratti* (○) and *A. cantonensis* (▲) in rabbits infected with *A. cantonensis*. Rabbits were infected orally with 100-infective larvae and then re-infected with 300 or 1,000 larvae as indicated.

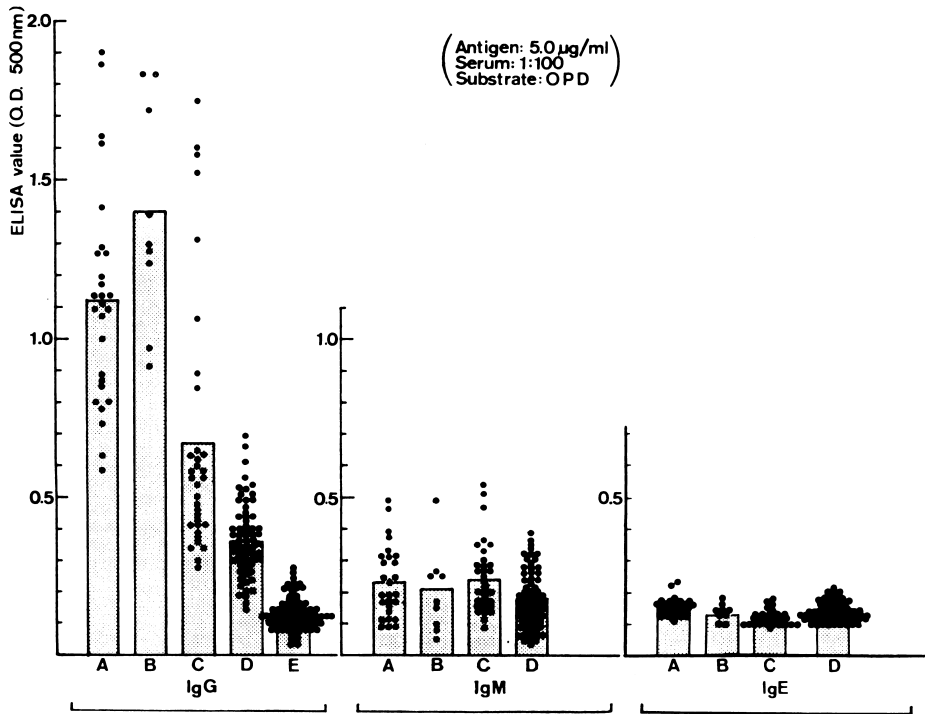


Fig. 7 The distribution of the ELISA values in the sera of persons with or without strongyloidiasis, in relation to three immunoglobulin classes. Vertical bars represent the mean values. A) Sera of patients with strongyloidiasis admitted to the Izumizaki Hospital. B) Sera of inhabitants in Zamami Village who were found harboring *S. stercoralis*. C) Sera of inhabitants in Zamami Village without patent infection with *S. stercoralis*. D) Sera of children without a previous history of the infection with *S. stercoralis* admitted to Chubu Hospital due to other disease. E) Sera of inhabitants in Niigata Prefecture, as the control.

みられたが、多くは0.7以下であり、平均値は0.67であった。また、糞線虫陰性であった小児血清（D群）ではすべてが0.7以下のOD値で、平均はわずかに0.37であった。さらに新潟県の一般住民（E群）でも0.3を越えるOD値を示すものは1例もなかった。陰性群（D、E群）について、その99%棄却限界上限値を求めると各々0.696、0.266となり、仮にD群の上限値を反応の陽性限界とすると、A群で92.6%（25/27）、B群で全例が陽性となり、逆にD、E群は全例が陰性であった。また、C群では24.2%（8/33）に陽性の反応がみられた。

E群を除く他の血清群では、IgM、IgEクラスの抗体についても同様の測定を行った。しかし、いずれの抗体クラスでも高値を示す例はほとんどなく、糞線虫陽性者と陰性者の間でも差はみられなかった。

考 察

ヒト糞線虫症に関する研究は、その多彩な病態を反映して症例報告や治療経験に関するものが多く、我が国では田中らが主に寄生虫学的立場から系統的な研究を行ってきたほか（Tanaka, 1958）、臨床的立場からは城間らが一連の報告を行っている（城間, 1959）。しかし、免疫学的立場からの研究は内外を問わずまだほとんど手つかずの状態にあり、我が国では佐藤（佐）が1933年に行つた古い報告があるだけである。国外でも Brannon and Faust (1949), Dafalla *et al.* (1977), Rifaat *et al.* (1979) が抽出抗原による皮内反応を試み、Coudert *et al.* (1968), Dafalla (1972), Ambroise-Thomas *et al.* (1974), Grove and Blair (1981) が幼虫を抗原として用いた蛍光抗体法の結果を報告したものなどが少数みられるにすぎない。その理由として、*S. stercoralis* は実験動物による継代維持が困難であることや虫体が微小であり、充分量の抗原を得ることが難しいことがあげられる。また、本症は一般に無症状のまま長期間経過する場合が多いことや糞便の培養検査によつてほぼ確実に検査できると考えられていたことも本症の血清診断に対して比較的関心が低かつた原因と考えられる。しかしながら、本症は前述したごとく、何らかの原因で免疫低下をきたした患者においてしばしば全身散布型の糞線虫症をひきおこし、重篤な状態におちいることが古くから知られている（Liepman 1975; Bradley *et al.*, 1978; Scowden *et al.*, 1978）。また、著者らが最近沖縄県下で行つた調査では、無症状のまま長期間を経過しているような軽感染者は糞便培養検査法による検出率が必ずしも高くなく、従来の方法で感染が確認できる例は実際の半

分にも満たないことが明らかになつてきた（高井ら, 1983）。近年、免疫抑制療法の普及とともにステロイド剤や免疫抑制剤の使用が増加していることを考え合わせると、かかる軽感染例をも効果的に検査し得るような敏感で感度の高い血清学的検査法の必要性が強調される。

このような観点から、著者らは前報において清浄な幼虫浮遊液を大量に得るための患者糞便の大量濾紙培養法を工夫し、得られた幼虫からの抗原調製とその抗原性および患者血清中の本線虫に対する特異抗体の存在を検討した（佐藤ら, 1983）。その結果、得られた抗原と患者血清との間でゲル内沈降反応によつて弱いながら明らかな沈降線の形成を認めることができた。さらにこれを micro-ELISA に応用し、その至適抗原濃度や血清濃度、特異性などの予備的検討も行つた。今回は、この micro-ELISA で多数の糞線虫陽性者、各種対照者血清を検討し、糞線虫陽性者血清では著明に高い ELISA 抗体価を検出することができた。糞線虫陰性であった一般住民の血清の一部に高値を示すものがみられたが、これはさらに徹底した糞便検査を行えば本線虫の感染が確認される可能性があり、あるいは感染既往者であった可能性が考えられる。さらに、他種寄生虫抗原との交差反応の検討結果も考え合わせ、本法が5 $\mu\text{g/ml}$ 程度の微量の抗原で実施でき、かつ感度が高く、比較的特異性に優れた血清学的検査法として本症の診断に応用し得ることを確認した。本症の micro-ELISA はすでに Tribouley-Duret *et al.* (1978), Carroll *et al.* (1981), Neva *et al.* (1981) も *S. stercoralis* や *S. ratti* 抗原を用いた検討を行い、やはり5～10 $\mu\text{g/ml}$ 程度の抗原濃度で良好な反応性の得られることを報告している。micro-ELISA にかぎらず、本症の血清学的検査にあつてまず問題となるのがいかにして充分な抗原材料と得るかという点である。沖縄県では最近でも比較的重感染の患者が散見され、著者らはこれまでに7名の患者から駆虫前数日間にわたつて糞便材料を集め、多量の抗原を得ることができた。また、Grove and Blair (1981) は *S. stercoralis* を実験的に感染させたイヌから幼虫を得ている。沖縄県では糞便材料から直接大量の幼虫を集め、抗原を調製することがまだ比較的容易であると思われるが、今後さらに安定した抗原の供給を図るために各種実験動物からの虫体採取の可能性も検討する必要がある。他方、*S. stercoralis* 以外の *Strongyloides* を抗原として用いることも試みられ、Brannon and Faust (1949) は自然感染のチンパンジーから得た *S. fülleborni* と思われるフィラリア型幼虫を使用している。また、従来より *S. stercoralis*

ralis の代りに *S. ratti* 抗原を用いた検討も多くなされておき、これは *S. stercoralis* に比べて実験室内での継代維持が容易であることや感染の危険がないなどの利点によるものと思われる。しかしながら、他種 *Strongyloides* 抗原の使用にあたってはその反応性や特異性について充分な解析を行っておく必要がある。Grove and Blair (1981) は間接蛍光抗体法で、また、Neva *et al.* (1981) は micro-ELISA で *S. stercoralis* と *S. ratti* 抗原の反応性を比較し、*S. stercoralis* 抗原で全体的に高い反応性が得られたが、両抗原の反応性の間には密接な相関のあることを報告した。今回、著者らも micro-ELISA ではほぼ同様の結果を得、*S. ratti* 抗原が本症の血清診断用抗原として充分利用できることを示した。

本症の多発地域の多くは蛔虫、鉤虫、鞭虫などの消化器寄生線虫類やフィラリアの高浸淫地域である。従って血清診断を試みたこれまでの報告ではその特異性に関する評価は必ずしも一定していない。Kanani and Rees (1970) は本線虫とフィラリアとの間で強い交差反応がみられることから、フィラリア抗原を用いた補体結合反応が糞線虫症の診断に応用できると述べている。また、Tribouley-Duret *et al.* (1976; 1978) も *S. ratti* を抗原として用いた皮内反応や micro-ELISA で蛔虫や鉤虫などとの間で比較的強い交差反応を認めている。これに対し、Grove and Blair (1981) は間接蛍光抗体法によって蛔虫やイヌ糸状虫と *S. ratti* との間に交差反応の存在を認めなかつたと報告した。著者らも前報において、広東住血線虫、イヌ蛔虫、イヌ糸状虫、イヌ鉤虫の抽出抗原で各々免疫した家兎血清を用い、*S. stercoralis* 抗原との交差反応性を検討した。その結果、広東住血線虫抗原で免疫した家兎血清との間で比較的強い交差反応を認めたが、他の3種寄生虫との交差反応は微弱なものであつた。さらに今回は、広東住血線虫感染家兎と同様の検討を行つたが、交差反応はかなり低いという結果を得た。また、今回検査した糞線虫陽性者はいずれも他種寄生虫との混合感染の認められなかつた者であり、その血清中に著明に検出された IgG 抗体は糞線虫の感染によって特異的に産生されたものであることを示唆している。

今回は、抗体レベルの測定を一穴法で行い、その値を OD 値で示した。これは限られた抗原量で可能なかぎり多くの検討を行うことを目的としたものであり、今後、疫学調査のためのスクリーニングテストとして有効な方法と思われる。他方、個々の症例の免疫診断にあたって血清希釈倍数による正確な抗体価の測定を行うための判

定基準の検討も行う必要がある。

ま と め

糞線虫症の血清診断を目的として、患者糞便の大量培養によつて得た *Strongyloides stercoralis* 第3期幼虫から調製した抗原を用いて micro-ELISA を行つた。

抗原は 5 μ g/ml に調整し、100倍希釈した血清で測定した糞線虫症患者および感染が認められた一般住民血清の ELISA 値は、そのほとんどが OD 値で 0.7 以上を示し、平均 OD 値も 1.1 と 1.4 に達する高値であつた。これに対し、本線虫の感染が認められなかつた小児血清や本症の非浸淫地域である新潟県住民の血清では OD 値が 0.7 を越える例はなく、糞線虫陽性者と陰性者の間で明らかな抗体レベルの差が認められた。

これらの結果から、本法の陽性限界は 100 倍希釈血清で OD 値が 0.7 程度と判断され、これをもとに測定した感染者の陽性率は 94.4% (34/36)、非感染者は全例が陰性であつた。

これらの感染者血清中に検出された抗体はそのほとんどが IgG クラスの抗体であつた。

糞線虫感染者血清は *S. ratti* 抗原に対しても高値を示し、*S. stercoralis* と *S. ratti* 抗原の反応には強い相関がみられたことから、*S. ratti* 抗原も本症の診断用抗原として利用できることが示された。

今回検討した糞線虫感染者はいずれも他の蠕虫類との混合感染がみられなかつた者であり、*Strongyloides* 以外の蠕虫抗原との反応も一般に低かつた。

以上の結果から、本法が微量の抗原で実施でき、しかも鋭敏性に優れ、比較的特異性の高い方法として、広汎な疫学調査や個々の免疫診断に利用できることを確認した。

文 献

- 1) Ambroise-Thomas, P., Yoeli, M. et Scheinsson, G. P. (1974): Etude serologique de la strongyloides humaine par immunofluorescence indirecte-applications pratiques au diagnostic et au controle post-therapeutique. Third Intern. Cong. Parasitol., Munich, 25-31 August.
- 2) Bradley, S. L., Dines, D. E. and Brewer, N. S. (1978): Disseminated *Strongyloides stercoralis* in an immunosuppressed host. Mayo Clin. Proc., 53, 332-335.
- 3) Brannon, M. J. C. and Faust, E. C. (1949): Preparation and testing of a specific anti-

- gen for diagnosis of human strongyloidiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 229-239.
- 4) Carroll, S. M., Karthigasu, K. T. and Grove, D. I. (1981) : Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 706-709.
 - 5) Coudert, J., Ambroise-Thomas, P., Kien, T. T. et Pothier, M. A. (1968) : Diagnostic serologique de l'anguilllose humaine par immunofluorescence (resultats preliminaires). Bull. Soc. Pathol. Exot., 61, 74-80.
 - 6) Dafalla, A. A. (1972) : The indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of strongyloidiasis. J. Trop. Med. Hyg., 75, 109-111.
 - 7) Dafalla, A. A., Satti, M. H. and Nur, A. O. M. (1977) : Cutaneous larva migrans in Northern Kordofan, Sudan : a preliminary report. J. Trop. Med. Hyg., 80, 63-67.
 - 8) Grove, D. I. and Blair, A. J. (1981) : Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30, 344-349.
 - 9) Kanani, S. R. and Rees, P. H. (1970) : The diagnosis of strongyloidiasis with special reference to the value of the filarial complement fixation test as a screening test. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 64, 246-251.
 - 10) Liepman, M. (1975) : Disseminated *Strongyloides stercoralis*. A complication of immunosuppression. J. Am. Med. Assoc., 231, 387-388.
 - 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
 - 12) 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.
 - 13) Neva, F. A., Gam, A. A. and Burke, J. (1981) : Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. J. Inf. Dis., 144, 427-432.
 - 14) Rifaat, M. A., Salem, S. A., Abdel-Aar, T. M. and Attia, M. M. (1979) : Effect on temperature on the serological activity of the antigen of *Strongyloides stercoralis*. J. Egypt. Soc. Parasitol., 9, 81-87.
 - 15) 佐藤佐一 (1933) : 糞線虫 *Strongyloides stercoralis* の免疫及び治療に関する実験的研究. 第1編. 糞線虫の免疫について. 福岡医大誌, 26, 1526-1586.
 - 16) 佐藤良也・高井昭彦・真栄城純子・大鶴正満・城間祥行 (1983) : 糞線虫症診断用抗原の調製と酵素抗体法による免疫診断の試み. 琉大医学会誌, 6, 35-49.
 - 17) Scowden, E. B., Schaffner, W. and Stone, W. J. (1978) : Overwhelming strongyloidiasis; an unappreciated opportunistic infection. Medicine (Baltimore), 57, 527-544.
 - 18) 城間祥行 (1959) : 沖繩に於ける糞線虫症の研究. I. 糞線虫症の疫学並びに糞線虫の病原性について. II. 糞線虫症重症例の観察. III. Gentiana violet の糞線虫寄生雌成虫駆虫効果について. お茶の水医誌, 7, 1501-1524.
 - 19) 高井昭彦・佐藤良也・真栄城純子・大鶴正満・安里龍二 (1983) : 糞線虫症 micro-ELISA のスクリーニングテストへの応用. 寄生虫誌, 33 (1・補), 34.
 - 20) Tanaka, H. (1958) : Experimental and epidemiological studies on strongyloidiasis of Amami Island. Jap. J. Exp. Med., 28, 159-182.
 - 21) Tribouley-Duret, J., Tribouley, J. et Pautrizel, R. (1976) : Interet des tests d'allergie cutanee pour le diagnostic de la strongyloidose. Bull. Soc. Pathol. Exot., 69, 360-367.
 - 22) Tribouley-Duret, J., Tribouley, J., Appriou, M. et Megraud, R. -N. (1978) : Application de test E. L. I. S. A. au diagnostic de la strongyloidose. Ann. Parasitol., (Paris), 53, 641-648.

Abstract

STUDIES ON THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)
FOR IMMUNODIAGNOSIS OF STRONGYLOIDIASIS

YOSHIYA SATO¹⁾, AKIHIKO TAKAI¹⁾, JUNKO MAESHIRO¹⁾ AND YOSHIYUKI SHIROMA²⁾

(¹⁾Department of Parasitology, School of Medicine, University of the Ryukyus,
Nishihara, Okinawa 903-01; ²⁾Izumizaki Hospital, Naha, Okinawa 902)

The technique of enzyme-linked immunosorbent assay on a microtiter plate (micro-ELISA) for serodiagnosis of human strongyloidiasis was tried using the antigen from the larvae of *Strongyloides stercoralis* obtained by the faecal mass-culture.

The antigen could be used at the protein concentration of 5 µg/ml, showing the sensitive reaction in the micro-ELISA. Most of the sera from 24 patients with proved strongyloidiasis and from 9 inhabitants positive for *S. stercoralis* by faecal examination in Okinawa prefecture showed the ELISA values above 0.7 (OD at 500 nm) at 1 : 100 serum dilution and their mean values were as high as 1.1 and 1.4, respectively. On the other hand, the sera from 100 inhabitants in Niigata prefecture, an area nonendemic for strongyloidiasis, showed low values below 0.3 and a significant difference in the ELISA values was observed between the persons with and without strongyloidiasis.

From the results, sera with optical density values greater than 0.7 were considered to be positive. Using the criterion, 94.4 % of 36 positive persons and none of 164 negative controls had antibodies to *S. stercoralis*.

The IgG class of antibody was considered specific for *S. stercoralis* infection and those of IgM and IgE classes were not significant.

When the responsiveness of *S. stercoralis* extract was compared with that of *S. ratti*, a close correlation between these two extracts were observed. It was suggested that *S. ratti* antigen could be utilized for serodiagnosis of strongyloidiasis instead of *S. stercoralis* antigen.

In addition to the fact that no concurrent infection with other gastrointestinal helminths was observed among the examined persons, the considerable weak cross-reactions of their sera with other helminth antigens suggested that the responses in the micro-ELISA were specific for *Strongyloides*.

The micro-ELISA technique developed in the present study could be put into practice with a very small amount of antigen and the results obtained indicated that its sensitivity, as well as specificity, was satisfactory. The technique was considered to be reliable for serodiagnosis of each patient as well as for epidemiological survey of strongyloidiasis.

Abstract

STUDIES ON THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR IMMUNODIAGNOSIS OF STRONGYLOIDIASIS

YOSHIO SATO, AKIHIRO TAKAI, JUNKO MAESHIRO, AND YOSHITERU SHIRAMA
Department of Parasitology, School of Medicine, University of the Kyushus
Nishiku, Okazaki 903-01, Kumamoto Hospital, Naha, Okinawa 905

The technique of enzyme-linked immunosorbent assay on a microtiter plate (micro-ELISA) for serodiagnosis of human strongyloidiasis was tried using the antigen from the larvae of *Strongyloides stercoralis* obtained by the faecal mass culture.

The antigen could be used at the protein concentration of 5 µg/ml, showing the sensitive reaction in the micro-ELISA. Most of the sera from 24 patients with proved strongyloidiasis and from 9 inhabitants positive for *S. stercoralis* by faecal examination in Okinawa prefecture showed the ELISA values above 0.7 (OD at 500 nm) at 1:100 serum dilution and their mean values were as high as 1.1 and 1.4, respectively. On the other hand, the sera from 100 inhabitants in Niigata prefecture, an area nonendemic for strongyloidiasis, showed low values below 0.3 and a significant difference in the ELISA values was observed between the persons with and without strongyloidiasis. From the results sera with optical density values greater than 0.7 were considered to be positive. Using the criterion, 94.4% of 36 positive persons and none of 164 negative controls had antibodies to *S. stercoralis*.

The IgG class of antibody was considered specific for *S. stercoralis* infection and those of IgM and IgA classes were not significant.

When the responsiveness of *S. stercoralis* extract was compared with that of *S. vivax*, a close correlation between these two extracts was observed. It was suggested that *S. vivax* antigen could be utilized for serodiagnosis of strongyloidiasis instead of *S. stercoralis* antigen.

In addition to the fact that no concurrent infection with other gastrointestinal helminths was observed among the examined persons, the considerable weak cross-reactions of their sera with other helminth antigens suggested that the responses in the micro-ELISA were specific for strongyloidiasis. The micro-ELISA technique developed in the present study could be put into practice with a very small amount of antigen and the results obtained indicated that its sensitivity, as well as specificity, was satisfactory. The technique was considered to be reliable for serodiagnosis of each patient as well as for epidemiological survey of strongyloidiasis.