

日本住血吸虫感染ウサギにおける虫卵および成虫抗原 に対する IgM, IgG 抗体出現の推移と praziquantel 駆虫前後の ELISA 反応の経過

松 田 肇¹⁾ 中 尾 稔^{1,2)}
森 田 真 奈 実¹⁾ 田 中 寛¹⁾

(昭和58年12月28日 受領)

Key words: *Schistosoma japonicum*, micro-ELISA, IgM, IgG, praziquantel

はじめに

住血吸虫の感染経過に伴って出現する流血中の抗体、とりわけ免疫グロブリンクラス別抗体の動態を観察することにより、感染の時期をある程度推定出来る可能性がある。ヒトにおいては、 Manson 住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 感染において、間接蛍光抗体法 (Indirect fluorescent antibody test; IFAT) を用いて Kanamura *et al.* (1979) が、また酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) を用いて Lunde and Ottesen (1980) が報告している。感染の時期、感染濃度が規定出来る動物モデルを用いた *S. mansoni* 感染実験では、Bout *et al.* (1980) がマウスで、Suzuki and Damian (1981) はヒヒ *Papio cynocephalus* で報告し、日本住血吸虫 *S. japonicum* では Little *et al.*, (1982) がマウスを用いて検討し、それぞれ IgA や IgM 抗体が感染初期には優位に認められることを報じている。

一方、駆虫後の抗体価の変動を測定することにより、ELISA が駆虫効果の判定に利用出来るかどうか判断出来、さらに野外での疫学調査の際に重要な意義をもつ。実験的には Ismail *et al.* (1981) がビルハルツ住血吸虫 *S. haematobium* 感染のヒヒで niridazole 等を用いて駆虫後の抗原と抗体の低下を ELISA で観察し、

駆虫後の効果判定が可能であることを示唆している。

本実験では、日本住血吸虫のセルカリアを種々の濃度で定量的に感染させたウサギを用いて、虫卵および成虫由来の抗原に対する IgM, IgG 抗体出現の経時的推移を ELISA により観察した。また一部のウサギを praziquantel で駆虫し、完全駆虫後の抗体価の変動を併せて追跡し、本法が駆虫効果の判定に有用であるか否かを検討した。

材料および方法

1. 実験動物と感染方法

日本白色種 (雌、体重2.5~3kg、生後約20週) のウサギを実験に供した。山梨系日本住血吸虫に感染したミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* を破砕して小シヤールに集め、少量の水溶液中に遊出したセルカリアを細片にしたカバーガラスで採取し、実体顕微鏡下で数を算定した。一方、ネンプタールで麻酔し、腹部を剃毛したウサギを準備し、それぞれ10, 20, 70, 250および800隻のセルカリアを経皮的に接触感染させた。感染後、耳静脈より経週的に採血し、分離した血清は-20°Cに保存した。

虫卵検査は、ウサギ1羽宛5糞塊を採取し、駆虫前後に AMS III法による検便を行った。

Praziquantel (EMBAY 8440, Biltricide®, Bayer) の原体を、2%の CREMOPHOR EL® (Sigma) に懸濁させ、感染9週後に100mg/kgを3時間間隔で4回、カテーテルを用い直接胃内に投与した。

2. 抗原の作成

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”の助成によった。

¹⁾ 東京大学医科学研究所寄生虫研究部

²⁾ 現所属：旭川医科大学寄生虫学教室

抗原は凍結乾燥した日本住血吸虫卵および成虫の炭酸緩衝液抽出抗原（ホモジナイザーによる磨砕，凍結融解，4°C で2日間抽出）である。蛋白量はLowry法(1951)で測定し，虫卵抗原では2.5 µg/ml，成虫抗原では10 µg/mlの濃度でプレートを作成した。

3. ELISA

方法および抗体価の測定は，松田ら(1982)に準じた。すなわち，被検血清は1% BSA-PBS-Tween で1:20から2倍段階に希釈した。正常ウサギ血清13羽のプール血清の2倍のOD値以上の反応を示した血清の最終希釈倍数を反応の終末点，抗体価とした。

IgM と IgG の各免疫グロブリンクラス別抗体の検出は，夫々の標識抗体を用いて検討した。すなわち，ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 山羊血清 (H&L 鎖，Miles-Yeda, LTD) を1:1,600，同抗ウサギ IgM 緬羊血清 (μ -鎖特異性，United States Biochemical Corp, Cleveland, Ohio) を1:800に希釈して使用した。

O-phenylenediamine, H₂O₂ を基質に25°C 暗所で30分間反応させ，8 N H₂SO₄ 1滴を加えて反応停止後，プレート直読式光度計（コロナ MTP-12，日立）で，500 nm の波長を測定した。

成 績

1. 感染初期における日本住血吸虫 IgG 抗体の推移
セルカリアの感染数が異なる4羽（各10，20，250，800隻）のウサギにおいて，感染9週目までの感染初期における IgG 抗体の出現状況を，虫卵と成虫由来の抗原を用いて経過的に観察した (Fig. 1)。

虫卵と成虫抗原を用いた場合，特異抗体の出現時期と，抗体価のピークに到達する時期は，共にセルカリア250および800隻感染の高濃度感染のウサギでは，10および20隻感染の低濃度感染ウサギに比べ，IgG 抗体の出現は早く，4週目から出現し，低濃度感染ではそれより2~3週遅れた。抗虫卵抗体は感染後6週目に顕著な上昇を示し，7~8週で抗体価がピーク（1:1,280~1:2,560）に達した。抗成虫抗体は徐々に上昇し，6~7週でピークに達し，感染濃度に比例して抗体価のピークに達する時期は早まった。

概して，抗虫卵抗体価は成虫のそれに比べ高く，少数感染においても高い抗体価を示した。一方，抗成虫抗体価は，感染濃度に比例し，抗体価の高低（1:1,280~1:20の範囲）が認められた。

2. 感染経過に伴う日本住血吸虫 IgM 抗体の推移
虫卵および成虫抗原に対する IgM 抗体の経過変化を

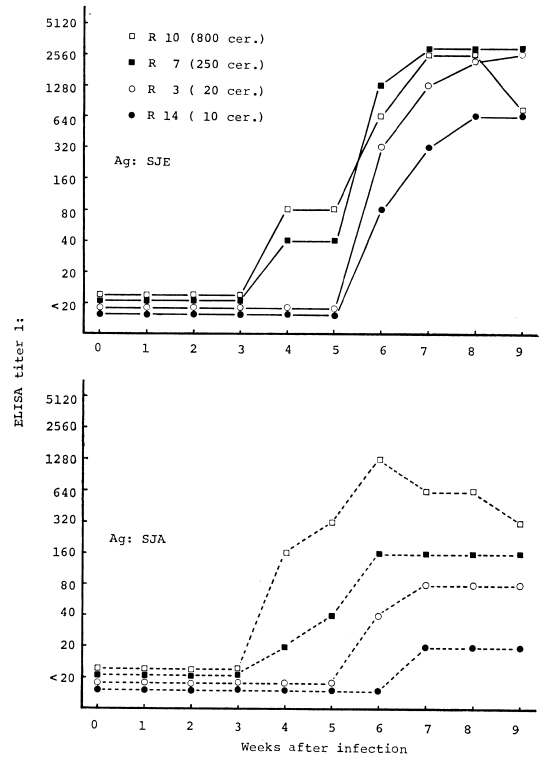


Fig. 1 Development of *S. japonicum*-specific IgG titers to egg (SJE) and adult worm (SJA) antigens in rabbits as measured by ELISA. cer.: cercariae.

3羽のウサギ（R 3，R 5およびR 7，それぞれ20，70および250セルカリア感染）において観察し，Fig. 2に示した。

虫卵抗原に対する特異抗体は，4週目から出現し，その後抗体価は急激な上昇を続け，5~7週の間で比較的高い抗体価のピークが認められた。感染8週目から抗体価の低下がみられ，R 5は9週で1:20以下の陰性，R 7は15週で陰性となったが，低感染のR 3では週を経るに従い徐々に低下はするものの，感染後47週まで低い（1:20）抗体価が認められた。

成虫抗原に対する IgM 抗体は，虫卵抗原の場合と比べその出現は1~2週遅れ，ピーク時の抗体価も1:20~1:40と低く，短期間で血中から消失する傾向を示した。一方，R 5のウサギでは，IgM 抗体は全期間を通じて全く検出されなかった。

以上のように，日本住血吸虫の感染経過に伴い，流血中に出現する IgM 抗体は虫卵抗原に対する抗体の産生が著明で，感染初期の5~7週に一峰性のピークが認め

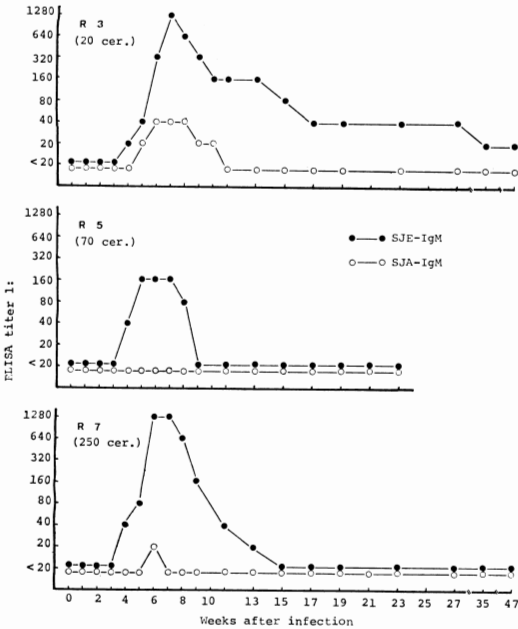


Fig. 2 Time course of *S. japonicum*-specific IgM titers to egg (SJE) and adult worm (SJA) antigens in rabbits as measured by ELISA. Number of cercariae infected were 20, 70 and 250 in rabbit no. 3, 5 and 7, respectively.

られ、その後徐々に消失する傾向を示した。従つて、以後の治療実験では、IgG 抗体の経過観察を行った。

3. Praziquantel 駆虫前後の日本住血吸虫 IgG 抗体の推移

セルカリア数20, 70および250隻で感染させた1群2羽のウサギのうち、各1羽を抗体価が十分高い感染後9週目に praziquantel を投与し駆虫した。各ウサギから5個の糞塊を採取し、AMS III法による検便を行った。R 4 (20隻感染) および R 8 (250隻感染) のウサギに

おいて、駆虫後3週目に虫卵は陰転した (Table 1)。

Praziquantel 駆虫前後の虫卵および成虫抗原に対するIgG 抗体価の経時的推移を、未駆虫のウサギを対照として、Figs. 3~5に示した。

20隻セルカリア感染ウサギにおいては (Fig. 3)、感染6週後から IgG 抗体が出現し、8週まで急激な上昇を続けた。R 4のウサギは、駆虫後4週目から虫卵と成虫抗原に対する抗体価が明らかに低下し、14週後には2倍希釈でピーク時より2~3管の低下を認めた。38週後には、虫卵抗原を用いた場合1:40 (4管の低下) に、成虫抗原では陰転した。未駆虫ウサギの抗体価は、全期間を通じ高い値を保った。

R 4のウサギを駆虫44週後に剖検したところ、肝臓には肉眼的に少数の虫卵結節が認められたが、腸管にはみられず、成虫の存在も確認できなかった。肝臓と腸管の組織を圧平し鏡検したところ、石灰化卵のみが確認された。さらに、組織の一部からミラシジウム孵化法を試みたが、陰性であった。

肝臓組織5gを、4% KOH で消化したところ、約1,000個の石灰化卵が認められたため、このウサギの抗体価の低下は、完全駆虫によるものと判断された。

70隻のセルカリアを感染させた R17 (駆虫) と R 5 (未駆虫) の抗体価の推移を Fig. 4に示した。R 17の抗虫卵抗体は、駆虫後漸次低下し、14週後に3管 (1:80) の低下、38週後に1:20に抗体価の低下をみた。一方、抗成虫抗体は、駆虫後急激な低下を示し、4週後には陰転した。このウサギは2年後に死亡したため、剖検したところ、肝臓は肉眼所見では正常であった。肝組織5gを消化した結果、約160個の石灰化した虫卵が認められた。

未駆虫のウサギ(R 5)は、感染後23週で死亡したが、

Table 1 Fecal egg counts in rabbits infected with *S. japonicum* before and after treatment with praziquantel

Rabbit number	Number of cercariae exposed	Treatment*	Egg count in 5 fecal pellets†					
			Weeks after cercarial exposure					
			8	9	10	11	13	15
3	20	No	1	4	8	2	5	2
4	20	Yes	1	1	2	1	0	0
7	250	No	3	2	11	23	21	19
8	250	Yes	7	13	115	1	0	0

* Rabbits treated with praziquantel in one day by oral administration at a dose of 100 mg/kg×4 at 3 hr intervals, 9 weeks after infection.

† Egg count was observed by the AMS III fecal concentration technique.

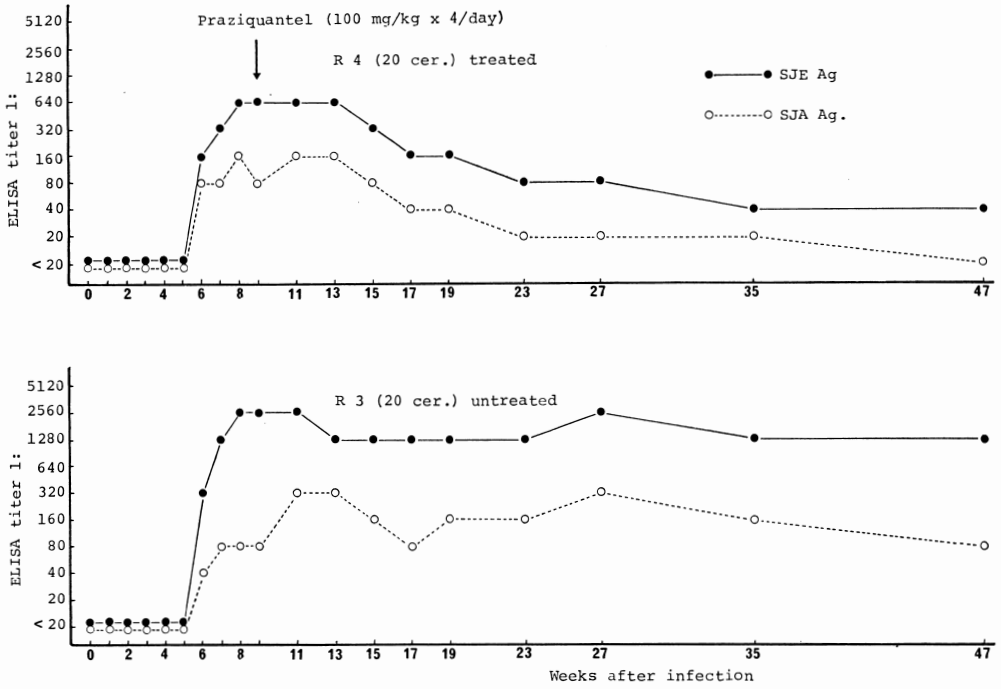


Fig. 3 Progressive change of *S. japonicum*-specific IgG titers to egg (SJE) and adult worm (SJA) antigens in rabbits before and after treatment with praziquantel. Rabbits were infected with 20 cercariae of *S. japonicum* each.

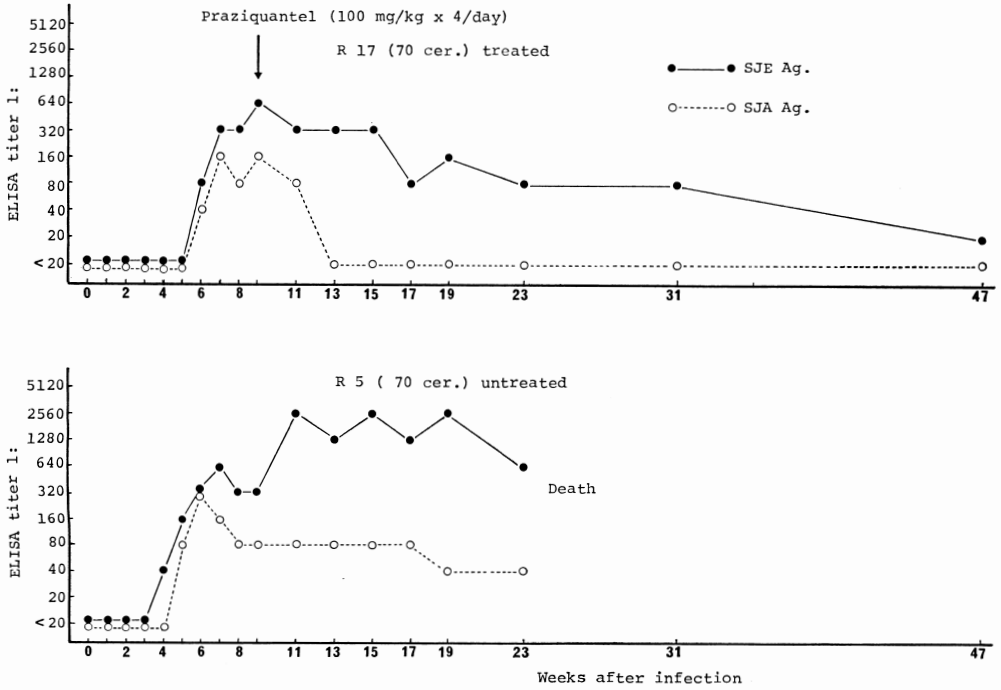


Fig. 4 Progressive change of *S. japonicum*-specific IgG titers to egg (SJE) and adult worm (SJA) antigens in rabbits before and after treatment with praziquantel. Rabbits were infected with 70 cercariae of *S. japonicum* each.

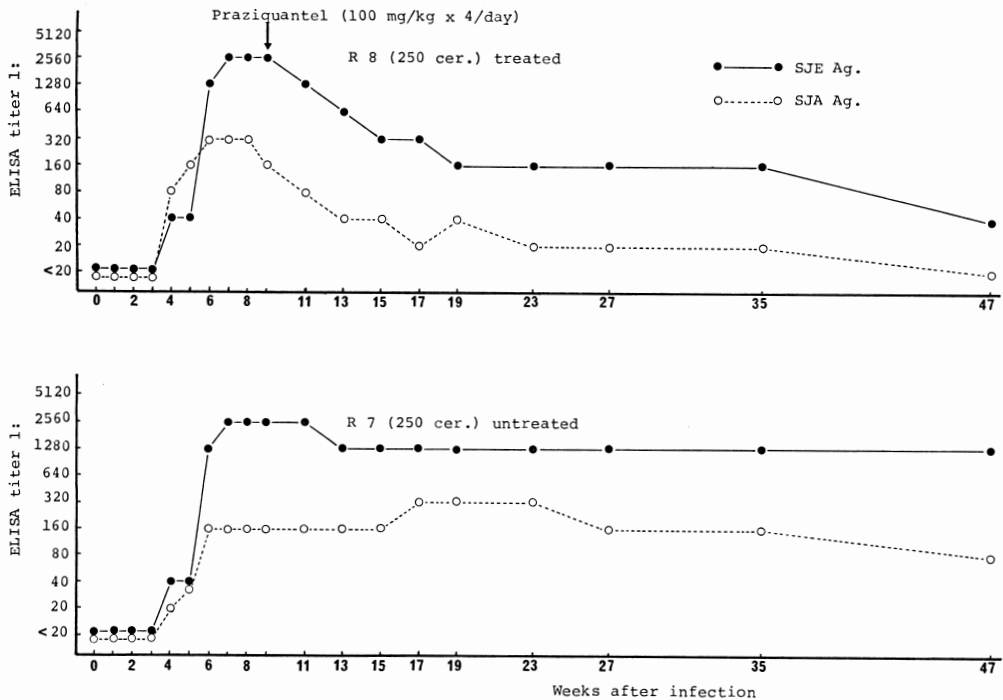


Fig. 5 Progressive change of *S. japonicum*-specific IgG titers to egg (SJE) and adult worm (SJA) antigens in rabbits before and after treatment with praziquantel. Rabbits were infected with 250 cercariae of *S. japonicum* each.

その抗虫卵抗体は死亡直前まで高い値を示した。しかし、抗成虫抗体は感染6週後に抗体価のピーク(1:320)を示し、8週では1:80、死亡直前の23週では1:40と漸次低下する傾向を示した。

250隻のセルカリアを感染させた R 8 (駆虫) と R 7 (未駆虫) のウサギの抗体価の推移を Fig. 5 に示した。R 8 のウサギの両抗原に対する抗体価は、駆虫後徐々に低下がみられ、14週後には3~4管の低下を認めた。38週後の抗体価は、虫卵抗原で6管(1:40)の低下をきたし、成虫抗原では陰転した。未駆虫ウサギでは、全期間を通じ著明な抗体価の変動はみられず、高い抗体価を持続した。R 7 のウサギは、感染64週目に死亡したため剖検した。門脈および腸管膜静脈内に生存虫体を確認し、肝臓内の虫卵を用いたミラシジウム孵化法により、多数のミラシジウムが認められた。従つて組織中には多数の生卵が存在するものと思われた。また肝組織5gをKOHで消化した結果、約23,000個の虫卵が確認された。

以上の実験から、praziquantel による完全駆虫により、虫卵および成虫抗原に対する IgG 抗体は、漸次低下を続けるため、ELISA による駆虫効果の判定が可能

と考えられ、特に成虫抗原を用いた場合、比較的早期に陰転するので、本抗原による判定がより有効であることが示唆された。

考 察

本研究では、実験的に日本住血吸虫セルカリアをウサギに感染させ、その後の免疫グロブリンクラス別抗体(IgM, IgG)の経過を虫卵と成虫抽出抗原を用いて検討し、それぞれの診断上の評価を試みた。また、近年新しく住血吸虫症の治療剤として開発された praziquantel を用いて一部のウサギを駆虫し、完全駆虫に伴う抗体価の推移を観察して、ELISA が駆虫効果の判定に有用であるか否かを検討したものである。

S. mansoni 感染において、Suzuki and Damian (1981) は、一定濃度のセルカリア(1,000隻)で感染させた1群6匹のヒヒを用いて、糞便内虫卵数と ELISA による抗成虫 IgM, IgG および IgA 抗体の検出レベルとを比較した結果、相互に相関はみられないと報告している。これに反し、本実験ではセルカリア数による感染濃度と抗成虫 IgG 抗体価に相違がみられたことは、興味のもたれるところである。

住血吸虫の各発育期の虫卵、セルカリアおよび成虫を抗原とした ELISA で、Lunde *et al.* (1979) は、マンソン住血吸虫患者血清とサルにおいて、IgG 抗体を比較し急性期の血清ではセルカリア抗原に、慢性期では成虫抗原による検出率が高く、さらに虫卵抗原を用いた各クラスの免疫グロブリンの比較によつて、IgM と IgE 抗体の検出に差が認められるため、急性・慢性の区別が可能であるが、虫卵抗原に対する IgG 抗体は両期で差が認められないことを報じている (Lunde and Ottesen, 1980).

また、Suzuki and Damian (1981) は、同様に3種類の抗原を用い、クラス別抗体の検出を比較し、上記の報告とほぼ同じ成績を得ている。

一方、日本住血吸虫感染マウスを用いた Little *et al.* (1982) は、虫卵抗原を用いて急性期に特異的に IgM 抗体が上昇すること、また感染6週以後に流血中出现し持続する IgG 抗体をさらに詳しく検討し、なかでも IgG₁ が主体を占めたと報告している。

このように、住血吸虫症の感染経過に伴い多様の抗原刺激による種々の免疫応答がみられるが、本実験の結果からも抗原の種類とクラス別抗体の組み合わせにより、感染の時期をある程度推測できる可能性があることが認められた。感染初期では、抗虫卵 IgM と IgG 抗体が共に高く、慢性期には前者が極めて低い。また抗虫卵 IgM が抗成虫 IgG 抗体に比べ感染初期では高く、慢性期ではこのレベルが逆転することなどで急性期・慢性期の区別が免疫学的に可能であることが示唆された。

住血吸虫症を治療し、その後の抗体の変動を ELISA で測定し、駆虫効果の判定法としての有用性を検討したものに、マンソン住血吸虫症のヒトを hycanthone で (Salih *et al.* 1978)、或はビルハルツ住血吸虫感染ヒトを niridazole 等の薬剤で駆虫した Ismail *et al.* (1981) の報告があり、いずれも成虫抗原を用い、駆虫後の抗体の低下を認めている。

近年、praziquantel が開発され、その高い駆虫効果が動物実験やヒトの3種住血吸虫感染において認められている (Webbe and James, 1977, Gönnert and Andrews, 1977, James *et al.* 1977, Santos *et al.* 1979)。

そこで今回、ウサギに対し十分な薬量と考えられる総量400mg/kg を投与し、流血中の ELISA 抗体価を、虫卵および成虫抗原に対する IgG 抗体としてその経過を観察した。免疫反応で駆虫の効果を判定する場合、陽性・陰性を指標にするか、あるいは抗体価の定量的変化を指標にして判定されるが、本症では完全駆虫後抗体

価は低下を続けながらも長期間持続するので、反応の陰転化による判定には長期間を要し適当でない。従つて、定量的に抗体価を測定することにより、明瞭な抗体価の低下が認められる駆虫4カ月以後に治癒の傾向を知りうる事が分つた。さらに、測定系に用いる抗原の種類は重要な要因となり、成虫抗原では駆虫されたウサギ全例が1年後に陰転することが示された。

従つて、以上の結果から ELISA は、駆虫後の効果判定にも用いるものと考えられる。

まとめ

ウサギに日本住血吸虫のセルカリアを定量的に10, 20, 70, 250および800隻経皮感染させ、虫卵と成虫抽出抗原を用いた ELISA により、IgM と IgG 抗体出現の経時的推移を観察した。また、一部のウサギを感染9週目に praziquantel (100mg/kg×4/日) で駆虫し、駆虫前後の IgG 抗体の変化を測定し、本法の診断的価値並びに駆虫効果の判定法として利用出来るか否かを検討し、以下の成績を得た。

1) 感染初期における虫卵および成虫抗原に対する IgG 抗体は、感染4週目から出現し、虫卵抗原では5～6週で急激な抗体価の上昇がみられ、低濃度感染(セルカリア10～20隻)においても高い抗体価を示した。成虫抗原では、抗体出現時期とピーク時の抗体価は、感染濃度に比例した。

2) IgM 抗体は、虫卵抗原を用いた場合に顕著で、4週目から出現し、5～7週の間抗体価の一峰性のピークがみられ、以後急激な低下が認められた。成虫抗原では虫卵抗原に比べ、その出現は1～2週遅れ、抗体価も極めて低く短期間で血中から消失した。従つて、用いる抗原の種類と IgM, IgG 抗体の検出により、感染の時期をある程度推測出来ることが示唆された。

3) Praziquantel による駆虫前後の IgG 抗体の変化を観察した。駆虫後抗体価は漸次低下を続け、14週後には3～4管、38週後には成虫抗原で全例が陰転したが、虫卵抗原では低い抗体価を保っていた。他方、未駆虫群では全期間を通じ高い抗体価を持続していた。従つて、本法は駆虫効果の判定にも利用可能で、特に成虫抗原が目的に沿っていることが明らかとなつた。

謝 辞

Praziquantel の恵与を受けた筑波大学基礎医学系安羅岡一男教授に深謝致します。

文 献

- 1) Bout, D., Rousseaux-Prevost, R., Carlier, Y. and Capron, A. (1980) : Kinetics of classes and subclasses of total immunoglobulins and antibodies to *Schistosoma mansoni* during murine infection. Parasitol., 80, 247-256.
- 2) Gönnert, R. and Andrews, P. (1977) : Praziquantel, a new broad spectrum antischistosomal agent. Z. Parasitenkd., 52, 129-150.
- 3) Ismail, M. M., James, C. and Webbe, G. (1981) : The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of circulating antigen and antibody in *Schistosoma haematobium*-infected baboons. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 542-548.
- 4) James, C., Webbe, G. and Nelson, G. S. (1977) : The susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium* in the baboon (*Papio anubis*) and of *S. japonicum* in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*). Z. Parasitenkd., 52, 179-195.
- 5) Kanamura, H. Y., Hoshino-Shimizu, S., Camargo, M. E. and da Silva, L. C. (1979) : Class-specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 242-248.
- 6) Little, J. V. III., Carter, C. E. and Colley, D. G. (1982) : Serologic responses to *Schistosoma japonicum* : Evaluation of total and parasite-specific immunoglobulins during the course of murine infection. J. Parasitol. 68, 519-528.
- 7) 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.
- 8) Lunde, M. N., Ottesen, E. A. and Cheever, A. W. (1979) : Serologic differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 87-91.
- 9) Lunde, M. N. and Ottesen, E. A. (1980) : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting IgM and IgE antibodies in human schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 82-85.
- 10) 松田 肇・田中 寛・中尾 稔・Blas, B. L., Noseñas, J. S., Santos, A. T. Jr. (1982) : 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の ELISA 反応の研究. 寄生虫誌, 31, 147-154.
- 11) Salih, S. Y., Bartlett, A. and Voller, A. (1978) : Detection of antibodies by enzyme-immunoassay in human *Schistosoma mansoni* infections: A clinical and chemotherapeutic study. Tropenmed. Parasit., 29, 409-412.
- 12) Santos, A. T., Blas, B. L., Noseñas, J. S., Portillo, G. P., Ortega, O. M., Hayashi, M. and Boehme, K. (1979) : Preliminary clinical trials with praziquantel in *Schistosoma japonicum* infections in the Philippines. Bull. W. H. O., 57, 793-799.
- 13) Suzuki, T. and Damian, R. (1981) : *Schistosoma mansoni* in baboons. IV. The development of antibodies to *Schistosoma mansoni* adult worm, egg and cercarial antigens during acute and chronic infections. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30, 825-835.
- 14) Webbe, G. and James, C. (1977) : A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. intercalatum* and *S. mattheei* in hamsters. Z. Parasitenkd., 52, 169-177.

Abstract

SEQUENTIAL OCCURRENCE OF IgM AND IgG ANTIBODIES AGAINST
EGG AND ADULT WORM ANTIGENS IN RABBITS INFECTED
WITH *SCHISTOSOMA JAPONICUM* OBSERVED BY
ELISA AND CHANGES AFTER TREATMENT
WITH PRAZIQUANTEL

HAJIME MATSUDA, MINORU NAKAO, MANAMI MORITA
AND HIROSHI TANAKA

(Department of Parasitology, Institute of Medical Science,
The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108)

Rabbits were infected percutaneously with 10, 20, 70, 250 and 800 cercariae of *Schistosoma japonicum* in order to examine class-specific antibodies (IgM, IgG) by micro-ELISA using antigens derived from eggs and adult worms. Some of those rabbits were treated at week 9 with praziquantel at a dose of 100 mg/kg \times 4 in one day. Changes of IgG antibody after treatment was studied with both antigens.

1) IgG antibody against egg antigen appeared between 4th and 6th weeks after infection, reached high titers between 7 to 8 weeks regardless of the intensity of infection. In contrast, the period to the first detection of antibody and the maximal titer against worm antigen was closely dependent on the number of cercariae infected.

2) IgM against egg antigen was higher at titers than that of worm antigen. It appeared from 4th week after infection, showed only one pronounced peak at 5 to 7 weeks and declined thereafter. Anti-adult IgM antibody appeared in the sera 1 to 2 weeks later to the anti-egg antibody and disappeared in a short period.

From these observations, it was indicated that by the detection of IgM and IgG antibodies using both antigens, the ELISA could distinguish the state of infection serologically.

3) The change of IgG antibodies to egg and adult worm antigens was studied using ELISA after treatment with praziquantel. Antibody titers after treatment declined gradually and disappeared 38 weeks post-treatment when the worm antigen was used, whereas those against egg antigen were still persisting at low levels. The untreated rabbits showed high level of antibody throughout the observation periods.

The crude worm antigen seems to be better suited for the evaluation of therapeutic effect.