

肝蛭症の ELISA による血清診断におけるヘモグロビン 特異的蛋白分解酵素抗原の特性に関する検討

保 阪 幸 男 朝 日 博 子 加 藤 桂 子
林 滋 生

(昭和59年6月28日 受領)

Key words: haemoglobin specific proteinase, *Fasciola* sp., immunodiagnosis, ELISA, Ouchterlony

寄生虫体より抽出したヘモグロビン分解酵素の免疫学的診断法への応用については, Senft and Maddison (1975) が, マンソン住血吸虫体より抽出した同酵素を, 同虫症診断の皮内反応抗原として使用し, きわめてよい結果が得られたと報告した. 以来, 同酵素は皮内反応抗原として注目され, 多くの使用例もあるが, その他の免疫学的診断法への応用例は非常に少ない.

著者らは, 肝蛭成虫体より抽出したヘモグロビン特異的蛋白分解酵素(haemoglobin specific proteinase, HSP)を, 血清診断用抗原として, とくに ELISA 法に応用することを試みた. ELISA 法用の抗原としては, 保阪ら(1979) および保阪ら(1981) が宮崎肺吸虫症および日本住血吸虫症診断に, いずれも各々の成虫体より抽出した VBS 抗原を使用し, 非常によい結果を得ている. そこで著者らは, 肝蛭成虫体より抽出した VBS 抗原を, 同症診断のための ELISA 法に使用したところ, 満足すべき結果ではなかつた. ところが, 肝蛭成虫体より抽出した HSP を抗原として使用し, ELISA 法を実施すると, きわめてよい結果が得られることがわかつた.

ここではとくに, 実験的ウサギ肝蛭症の血清中の抗体を検出するために, HSP を抗原として使用し, ELISA 法でその特性を検討した結果と, ゲル内二重拡散法(Ouchterlony)に, HSP 抗原を試用した成績について報告する.

材料と方法

1. 使用抗原: (1) HSP 抗原は肝蛭成虫体 (湿重量

本研究の一部は文部省科学研究費補助金, 総合研究A (課題番号237017, 代表者: 浅見敬三) の補助を受けた. 記して謝意を表す.

国立予防衛生研究所寄生虫部

約1g)に0.04MNa-酢酸緩衝液(pH: 3.9)を約20ml 加え, テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし, さらに超音波破碎機で15分間4回破碎した. このホモジネイトを22,000g で30分間遠心沈澱し, 得られた上清を硫酸で塩析して20~50%飽和硫酸分画画分を得た. 塩析後12,000g で15分間遠心沈澱し, 沈渣を0.04M のNa-酢酸緩衝液で溶解してセファデックス G-200 によりゲル濾過した. さらに Agarose-L-phenylalanine カラムクロマトグラフィーにより精製したのち, アクリルアミドゲル使用のディスク電気泳動により, その蛋白分解パターンを検定した. また2次元電気泳動により分子量推定, ミリポアフィルターによる雑菌の除去を行ったのち, 蛋白量を測定して各試験に供した.

(2) ここで使用した VBS 抗原は, Chaffee *et al.* (1954) と同様の方法で作製し, 0.85% NaCl (Ouchterlony法) または coating buffer (ELISA 法) により総蛋白量を各試験ごとに調整して使用した.

2. 使用血清: (1) 肝蛭感染ウサギ血清は, 実験的に肝蛭(日本産 *Fasciola* sp.) のメタセルカリア10コを投与し, 経時的に採血した血清で, あらかじめ Ouchterlony 法により沈降線を証明したものを使用した.

(2) 正常ウサギ血清は, 採血時の週齢が肝蛭感染ウサギのそれと一致する時期に採血したものを使用した.

3. ELISA 法: 基本的には, Voller *et al.* (1976) とほとんど同様の方法によつた. すなわち, 抗原の吸着体としてポリスチレン製のサンプル容器を用い, coating buffer (pH: 9.6) に溶解した抗原液0.3ml を各々の容器に入れ, 4°C に24時間放置した. いずれの場合の洗浄にも PBS-Tween (pH: 7.4) を用い, 洗浄後風乾して-20°C に保存し, 必要に応じて使用した.

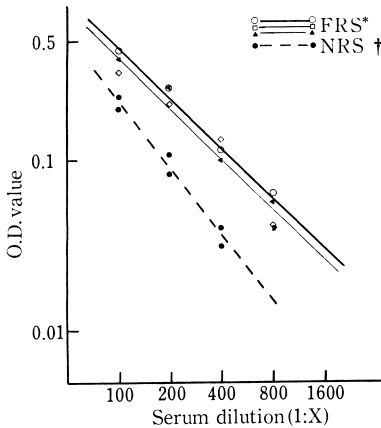


Fig. 1 Enzyme immunoassay values for sera from rabbit infected with *Fasciola* sp.* and from normal rabbit† to VBS antigen. 25 μ g (▲—▲), 50 μ g (□—□) and 100 μ g (○—○) of antigen were used.

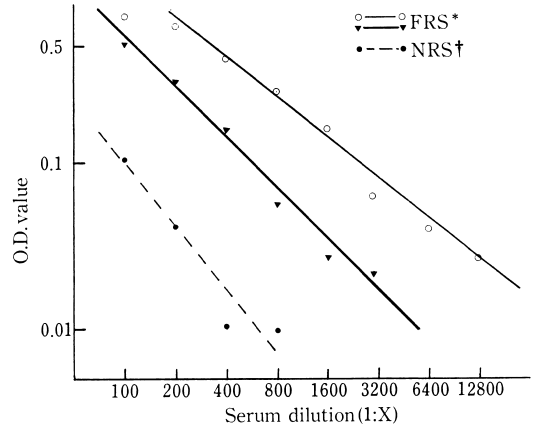


Fig. 2 Enzyme immunoassay values for sera from rabbit infected with *Fasciola* sp.* and from normal rabbit† to haemoglobin specific proteinase antigen. 100 μ g (○—○) and 25 μ g (▼—▼) of the antigen were used.

血清は各種濃度に稀釈し、抗原吸着容器にそれぞれ 0.3ml 入れ、25~26°C に 2 時間放置したのち洗浄した。

標識抗体としては、peroxidase 標識抗ウサギ IgG を用い、血清作用後の容器に各 0.3ml 入れ、25~26°C に 2 時間放置し、洗浄後 0.3ml の基質 (5-アミノサリチル酸液) を入れて、さらに約 1 時間放置し吸光度を分光光度計 449nm で測定した。

また、ELISA 法の一部は、松田ら(1982)の方法にしたがい、抗原をプレートに吸着させたのち、2% BSA で 37°C 30 分間処理し、血清および標識抗体の稀釈に BSA-Tween 20 (1% BSA 加 PBS-Tween 20) を使用した。なお、それぞれの反応時間および反応温度も同氏らの方法と同様に行ったが、基質は上記同様 5-アミノサリチル酸を使用した。

4. Ouchterlony 法: 0.9% アガロースをペロナール-HCl 液 (pH: 8.6, イオン強度: 0.1) に溶解させ、ガラス板に流して作ったゲルプレートを用い、試験抗原および血清は 4°C で 48 時間拡散させ、洗浄して風乾し、アミドブラック 10B で染色して観察した。

実験成績

1. ELISA 法による HSP 抗原および VBS 抗原の血清抗体検出について

まず一般的に使用例の多い粗抗原で、ELISA 法の標準的なデータを得るために、VBS 抗原の蛋白量を 25、50 および 100 μ g/ml の 3 段階にして用い、肝蛭感染ウサ

ギ血清 (感染後 10~13 週) と正常ウサギ血清とを使用して ELISA 法を実施した。その結果は Fig. 1 のように、感染ウサギ血清では 100~800 倍稀釈まで、直線性の吸光値回帰線が得られたが、それは抗原の濃度の違いと関係なく、それぞれの間にはほとんど差がない。しかし感染ウサギ血清と正常ウサギ血清で得られたそれぞれの吸光値回帰直線はやや異っており、その間わずかに差があることが示された。

ところが、HSP 抗原の蛋白量 25 および 100 μ g/ml を用い、感染ウサギ血清と正常ウサギ血清を使用して ELISA を実施すると、Fig. 2 のような結果が得られた。これによると、25 μ g/ml の抗原を使用した場合には、感染血清の 100~3,200 倍稀釈で、抗原 100 μ g/ml では同血清の 200~6,400 倍稀釈で直線性の吸光値回帰線が得られた。この場合、両回帰直線と正常ウサギ血清による回帰直線との間には、明らかに有意の差があることがわかった。

比較のために、各回帰線上で血清稀釈の 200、400 および 800 倍における吸光値を、抗原別に正常ウサギ血清と感染ウサギ血清との間の比で表すと、Table 1 のようになる。各々の比の値は、VBS 抗原使用の場合には、すべて 4 以下であるが、HSP 抗原では蛋白量 25 μ g/ml を用いると、その値はすべて 6 以上となり、100 μ g/ml を用いると 13 以上の値となった。

さらに一定の吸光度 (0.05 および 0.1) において各回帰直線上に現れる血清稀釈倍数の比を、上記同様正常ウ

Table 1 The ratio of OD value of FRS* to that of NRS† according to the serum dilution

Serum dilution	Haemoglobin specific proteinase		VBS antigen
	25 μ g	100 μ g	(25-100 μ g)
1 : 200	6.5	13.9	2.3
1 : 400	7.5	19.4	3.1
1 : 800	7.8	21.0	3.9

*FRS: Serum from rabbit infected with *Fasciola* sp.

†NRS: Serum from normal rabbit.

Table 2 The ratio of serum dilution of FRS* to that of NRS† which gave the specified OD value

OD value	Haemoglobin specific proteinase		VBS antigen
	25 μ g	100 μ g	(25-100 μ g)
0.05	6.3	29.4	3.4
0.1	5.6	21.8	2.4

* FRS: Serum from rabbit infected with *Fasciola* sp.

† NRS: Serum from normal rabbit.

サギ血清と感染ウサギ血清との間で表すと、Table 2 のようになる。この場合も比の値は、VBS 抗原使用では3.4以下であるが、HSP 抗原では25 μ g を使用した場合に5以上、同100 μ g 使用のそれは21以上と、いずれもVBS 抗原よりその値が大であることが示された。

別に VBS 抗原について再検討するために抗原吸着後BSA 処理を行い、さらに血清および標識抗体の稀釈に1% BSA 加 PBS-Tween 20を用いる方法で、感染ウサギ血清と正常ウサギ血清との比較において ELISA 法を実施すると、正常ウサギ血清と感染ウサギ血清との間の吸光値の比が、いずれの例でも4以上となり、ある血清では6~7となるものがあつた。このような BSA を使用しての方法により、VBS 抗原でも両血清の間には有意の差が示されることがわかつた。

2. Ouchterlony 法による HSP 抗原の抗体検出について

HSP 抗原の濃度を蛋白量3,200 μ g/ml より34,000 μ g/ml までの5段階と、通常著者らが使用している VBS 抗原の濃度3,200 μ g/ml とを用い、肝蛭感染ウサギ血清(感染後10週)を使用して Ouchterlony 法を実施した。その結果は Fig. 3 のようであり、HSP 抗原では、使用濃度のすべてに沈降線は現れるが、低濃度においてはその数がやや少くなる傾向がみられた。VBS 抗原と同血

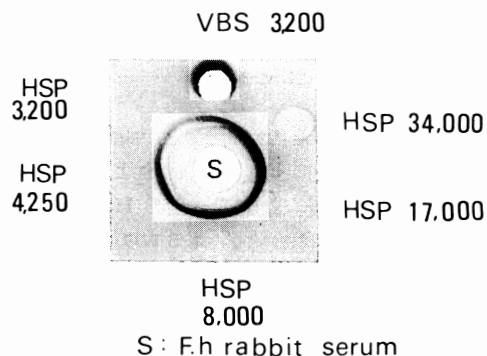


Fig. 3 Double gel diffusion test using haemoglobin specific proteinase antigen (HSP 3200-34000 : 3200 μ g/ml - 34000 μ g/ml protein) and VBS antigen (VBS 3200 : 3200 μ g/ml protein) against serum from rabbit infected with *Fasciola* sp.

清で現れる沈降線の数は、HSP 抗原でのそれよりやや多い傾向が示された。

感染ウサギ血清の濃度を変え、HSP 抗原と VBS 抗原との間に現れる沈降線を見ると、Fig. 4 のようである。HSP 抗原使用の場合には、血清の低濃度において、VBS 抗原の場合より沈降線の検出が困難であることが示された。

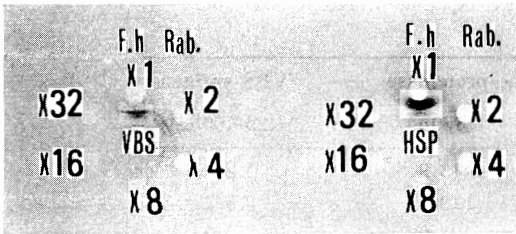


Fig. 4 Double gel diffusion test using haemoglobin specific proteinase antigen (HSP) and VBS antigen (VBS) against diluted sera from rabbit infected with *Fasciola* sp.

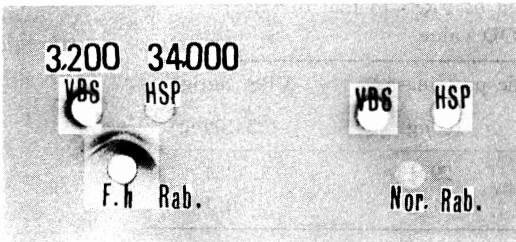


Fig. 5 Double gel diffusion test using haemoglobin specific proteinase antigen (HSP 34000 $\mu\text{g/ml}$ protein) and VBS antigen (VBS 3200 $\mu\text{g/ml}$ protein) against sera from rabbit infected with *Fasciola* sp. (F. h. Rab.) and from normal rabbit (Nor. Rab.)

さらに両抗原と感染ウサギ血清との間に現れる沈降線と比較観察するために Fig. 5 に示すような試験をおこなった。これによると、感染血清と HSP 抗原および VBS 抗原との間には、少なくとも 3 本以上の共通沈降線が存在することが示唆された。

考 察

寄生虫体より抽出した VBS 抗原は、多くの免疫学的診断法に広く応用されている。ELISA 法の抗原としては、保阪ら (1979, 1981) が、宮崎肺吸虫および日本住血吸虫の ELISA による診断に、各々の成虫体 VBS 抗原を使用し、非常によい結果を得たとしている。ところが、本研究の肝蛭成虫体 VBS 抗原を用いた ELISA では、Fig. 1 のように、感染ウサギ血清における吸光値はやや高いが、対照の正常ウサギ血清のそれも高い値となり、その間に顕著な差がない。また、非特異的吸着を防止する手段とされている BSA 処理を行っても、或程度改善され、両血清の吸光値の差はやや大となるが、HSP 抗原使用のそのように顕著な差ではなく、満足すべき結果とはいえない。

この VBS 抗原使用の場合の、正常ウサギ血清においても高い吸光値 (血清稀釈100倍において約0.2) となる現象は、抗原を作用させない対照のウエルにおいて、いずれの血清も非常に低い吸光値 (<0.02) しか示さないことを考慮すると、抗原中の或成分に非特異的に血清成分が吸着し、それに標識抗体が吸着しておこるものと思われる。またそれは、宮崎肺吸虫および日本住血吸虫の VBS 抗原ではおこらないが、肝蛭成虫体 VBS 抗原でとくに現れるものとしてよいであろう。しかし、肝蛭成虫体より抽出した HSP 抗原の場合、高度に精製されたものであり、いわゆる非特異的吸着をおこすような成分は含まれていないと考えてよい。このことは、肝蛭 HSP 抗原使用の ELISA 法において、きわめてよい結果が得られる原因の1つとなつているものと思われる。

ポリスチレン容器を吸着体とし、寄生蠕虫体抗原を用い、peroxidase 標識抗体による ELISA 法の例は、最近多くの報告がある (Saunders *et al.*, 1977; Ruitenbergh and van Knapen, 1977; Deelder *et al.*, 1977; Arambulo III *et al.*, 1978; 保阪ら, 1979; 保阪ら, 1981; Hillyer and Santiago de Weil, 1979; 松田ら, 1982など)。これらのうち Hillyer and Santiago de Weil (1979) の報告を除き、他は *Trichinella spiralis*, *Toxocara canis*, *Taenia solium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* または *Paragonimus miyazakii* の成虫粗抗原または虫卵粗抗原あるいは、一部その精製抗原を使用した例である。いずれも、各々の寄生虫抗原との特異抗体を、ELISA 法により、非常に効果的に検出することができたと報告している。

ELISA 法を肝蛭症診断に使用した例は Hillyer and Santiago de Weil (1979) であり、ELISA 法はその診断のみではなく、同症の駆虫効果判定にも効果的に応用しようとしている。また使用抗原については、Sephar-cryl S-200 を用いて一部精製した抗原が、より有効であると報告している。この精製抗原がより有効であるとの報告は、前述した本研究の、ELISA 法による VBS 抗原と HSP 抗原における結果の相違の事実と、あるいは一致する現象ではないかとも考えられる。

いずれにしても、肝蛭症の診断のため、ELISA 法により血中の抗体を検出する場合に、肝蛭成虫体 VBS 抗原は、必ずしも有効であるとはいえない。ところが、同成虫体より抽出した HSP は、ELISA 用抗原として非常にすぐれているといえる。

当研究室では、Ouchterlony 法による寄生虫症診断

に、従来 VBS 抗原を使用しているが、本研究では、HSP を本法に試用したところ、VBS 抗原を凌駕するような結果は得られなかった。HSP の製法の複雑さと、粗抗原と比較して収量が少ない点などを考慮すると、Ouchterlony 法に HSP 抗原を使用するのは実用的でないといえる。

要 約

肝蛭 (*Fasciola* sp.) 成虫体より抽出したヘモグロビン特異的蛋白分解酵素 (HSP) を、肝蛭症の血清診断における酵素標識抗体法 (ELISA) に使用することを試み、実験的肝蛭感染ウサギ血清を用いて、その特性を検討した。また、ゲル内二重拡散法 (Ouchterlony) に HSP を試用し、次のような結果を得た。

1. HSP は、ELISA 法による肝蛭抗体検出用抗原として、きわめてすぐれているといえる。
2. HSP を Ouchterlony 法用の抗原として使用するのには実用的ではないといえる。

謝 辞

稿を終わるにあたり、本研究で使用した HSP 抗原は、順天堂大学医学部寄生虫学教室の青木孝博士および大家裕博士より提供していただいたことを記し、深く感謝の意を表します。また、文部省科学研究費、総合研究 A の研究班代表者浅見敬三博士および班員諸先生の御援助に感謝いたします。

文 献

- 1) Arambulo III, P. V., Walls, K. W., Bullock, S. and Kagan, I. G. (1978): Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzymelinked immunospecific assay (ELISA). *Acta Tropica*, 35, 63-67.
- 2) Chaffee, E. F., Bauman, P. M., and Shapilo, J. J. (1954): Diagnosis of schistosomiasis by complement-fixation. *Amer. J. Trop. Med.*, 3, 905-913.
- 3) Deelder, A. M., Ruitenber, E. J., Kornelis, D. and Steerenberg, P. A. (1977): *Sshistosoma mansoni*: Comparison of the immunoperoxidase techniques, DASS and ELISA, for human diagnosis. *Exp. Parasitol.*, 41, 133-140.
- 4) Hillyer, G. V. and Santiago de Weil, N. (1979): Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infections with *Fasciola hepatica* II. The enzyme linked immunosorbent assay in infected rats and rabbits. *J. Parasitol.*, 65, 680-684.
- 5) 保阪幸男・朝日博子・林 滋生 (1979): ELISA の寄生虫症診断への応用 (1) 宮崎肺吸虫感染動物における抗体の検出. *寄生虫誌*, 28, (増), 70.
- 6) 保阪幸男・林 滋生・朝日博子・堀見利昌・薬袋 勝・梶原徳昭 (1981): ELISA の寄生虫症診断への応用 (3) 慢性日本住血吸虫症患者血清中の抗体の検出. *寄生虫誌*, 30, (増), 73.
- 7) 松田 肇・田中 寛・中尾 稔 (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症の ELISA 反応の研究. *寄生虫誌*, 31, 147-154.
- 8) Ruitenber, E. J. and van Knapen, F. (1977): The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections. *J. Infect. Dis.*, 136, S 267-S 273.
- 9) Saunders, G. C., Clinard, E. H., Bartlett, M. L. and Sanders, W. M. (1977): Application of the indirect enzyme-labeled antibody microtest to the detection and surveillance of animal diseases. *J. Infect. Dist.*, 136, S 258-S 266.
- 10) Senft, A. W. and Maddison, S. E. (1975): Hypersensitivity to parasite proteolytic enzyme in schistosomiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 83-89.
- 11) Voller, A., Bilwell, D. E. and Bartlett, A. (1976): Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Theory and Practice. Bull. W. H. O.*, 53, 55-65.

Abstract

CHARACTERISTICS OF HAEMOGLOBIN SPECIFIC PROTEINASE AS AN
ANTIGEN FOR ELISA IN SERODIAGNOSIS OF FASCIOLIASIS

YUKIO HOSAKA, HIROKO ASAHI, KEIKO KATO AND SHIGEO HAYASHI

*(Department of Parasitology, National Institute of
Health, Tokyo 141, Japan)*

The characteristics of haemoglobin specific proteinase (HSP) collected from adult worms of *Fasciola* sp. as an antigen for enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in serodiagnosis of fascioliasis were evaluated using sera from rabbits infected with the *Fasciola* worms. The HSP antigen was also analyzed by Ouchterlony double diffusion test.

The results indicate that HSP can be adopted as the antigen for ELISA technique in immunodiagnosis of fascioliasis. The HSP antigen appears to be more effective than the crude antigen extracted from the worms with veronal buffered saline (VBS antigen) in detecting the antibodies in the serum by ELISA. On the contrary, the application of HSP antigen for Ouchterlony test seems to be unsuitable for practical use.