

虫卵周囲沈降 (COP) 反応および酵素抗体法 (ELISA) における日本住血吸虫とマンソン住血吸虫の虫卵抗原に対するマウス抗体反応性の検討

横井 一^{1), 2)} 桐木雅史¹⁾ 千種雄一¹⁾ 山本 久¹⁾
石井俊雄²⁾ 今井壮一²⁾ 松田 肇¹⁾

¹⁾獨協医科大学医動物学教室, 〒321-02 栃木県下都賀郡壬生町北小林880番地,
²⁾日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室, 〒180 東京都武蔵野市境南町1-7-1)

(掲載決定: 平成8年7月23日)

要 約

日本住血吸虫とマンソン住血吸虫の虫卵抗原に対するマウス抗体の反応性を虫卵周囲沈降 (COP) 反応および酵素抗体法 (ELISA) により検討した。

BALB/c マウスに日本住血吸虫あるいはマンソン住血吸虫セルカリアをそれぞれ40隻, 150隻宛経皮感染 (各1群5頭) させ, その後16週まで2週ごとに採血し血清を得た。この感染血清と両種の凍結乾燥虫卵との COP 反応を行い反応陽性虫卵率, I・II・III型反応 (横川ら, 1967) の各陽性率, および分節状沈降物の出現状況について観察した。また, ELISA により両種の虫卵抽出抗原に対する同種および異種感染群の IgM と IgG サブクラス抗体の反応を観察した。

両種いずれの虫卵に対しても各感染群の COP 反応陽性率の推移に大きな差は認められなかった。しかし, III型沈降物形成虫卵率に着目すると, 日本住血吸虫卵に対しては6週以降, マンソン住血吸虫卵では14週以降における同種感染群の陽性率は異種感染群よりも有意に高く推移した。また, 分節状沈降物は同種の感染血清と虫卵を用いた時にのみ認められた。

一方, ELISA において日本住血吸虫とマンソン住血吸虫感染群の IgM 抗体は両種の虫卵抗原に対して強い交叉反応を示した。IgG サブクラス抗体については日本住血吸虫の虫卵抗原に対する同種感染群の IgG1 と IgG3 抗体が感染6週目から16週目まで異種感染群よりも有意に高い反応を示し, マンソン住血吸虫の虫卵抗原では同種感染群の IgG1 抗体が感染12週目から16週目まで異種感染群に比べ高い反応を示した。

以上の結果から, COP 反応ではIII型沈降物形成虫卵率と分節状沈降物の観察が本反応の特異性を反映し, 免疫診断上有用な指標になることが示唆された。また, 虫卵抗原を用いた ELISA の特異性は IgG サブクラス抗体, とりわけ IgG1 抗体を検出することによって向上すると考えられた。

Key words: *Schistosoma japonicum*; *Schistosoma mansoni*; egg antigen; antibody response; circumoval precipitin (COP) reaction; ELISA.

緒 論

現在, 虫卵周囲沈降 (Circumoval Precipitin: COP) 反応と酵素抗体法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA) は住血吸虫症の免疫学的診断として広く用いられており, 中でも COP 反応は操作の簡便性から本症の重要な診断法の一つとなっている。

Correspondence: Hajime Matsuda

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (課題番号 07670289) による。

COP 反応がマンソン住血吸虫症の免疫診断法として初めて Oliver-González (1954) によって報告されて以来, 新鮮虫卵を用いた COP 反応の種特異性が検討されてきた (Oliver-González *et al.*, 1955; Newsome, 1958; Hillyer and Bruce, 1980)。その後, 凍結乾燥虫卵を用いた COP 反応が Rivera de Sala *et al.* (1960) によって報告され, 虫卵の保存性, 安定性などの点から野外調査にまで応用されるに至っている (Lewert and Yogore, 1969; Noseñas *et al.*, 1975; Tanaka *et al.*, 1975; Matsuda *et al.*, 1977; Yogore *et al.*, 1979)。しかし, 凍結乾燥虫卵を用いた COP 反応の特異性に関

しては, Yogore *et al.* (1968) の報告があるのみで詳細な検討はなされていない。

虫卵抗原を用いた ELISA の特異性については Hillyer *et al.* (1980) と Barral-Netto *et al.* (1983a) が, マンソン住血吸虫の虫卵抗原に対する IgG 抗体の応答に交叉性が認められることを報告している。しかし, ELISA の特異性の向上をはかる目的で, 各種虫卵抗原に対するクラスあるいはサブクラス別の抗体反応について検討した報告は極めて少ない。一方, 他の寄生虫感染では ELISA の特異性について種々の検討がなされ, 回旋糸状虫症 (Weil *et al.*, 1990; Ogunrinade *et al.*, 1992), バンクロフト糸状虫症 (Hitch *et al.*, 1991) では感染者血清より IgG サブクラス特異抗体の検出を行うことによって, さらに特異性の高い診断が可能であると報告し, 特に IgG4 特異抗体検出の有用性を報じている。

そこで本研究では, COP 反応と ELISA の特異性を明らかにするために, 最も交叉反応を発現すると思われる日本住血吸虫およびマンソン住血吸虫の虫卵抗原に対する両種の感染マウスの抗体応答について検討を加えた。

材料および方法

日本住血吸虫とマンソン住血吸虫

山梨系の日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*: Sj) は, 実験室内において ICR マウスとミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* を用いて継代し, PR-1 マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*: Sm) は, ICR マウスと M-line *Biomphalaria glabrata* を用いて継代したものをそれぞれ実験に使用した。

住血吸虫卵の採取

感染は生後 4~6 週齢の雌の ICR マウスに, Sj および Sm セルカリアを 1 匹あたり 60 隻あるいは 150 隻宛試験管内に浮遊させ, マウスの尾部を 30 分間浸して経皮感染させた (Pellegrino and Katz, 1968)。感染 7~8 週後に Sj 虫卵を腸管より, また Sm 虫卵を肝臓より採取した。各臓器からの虫卵分離には 0.01% プロナーゼ, 0.05% コラゲナーゼによる消化法 (松田ら, 1981) を用い, 分離後の虫卵は凍結乾燥させ, -70°C に保存した。

抗原の作成

ELISA に用いた Sj および Sm の虫卵抗原は松田ら (1981) に従い作成した。また, 蛋白濃度の測定には Lowry *et al.* (1951) の方法を用いた。

感染マウス血清

Sj の産卵数は Sm に比べ多い理由から, 感染は生後 6 週齢の雌性 BALB/c マウスを 1 群 5 頭とし, Sj お

よび Sm セルカリアをそれぞれ 1 匹あたり 40 隻, ならびに 150 隻宛試験管内に浮遊させ, マウスの尾部を 30 分間浸すことにより行った。その後各個体から 2 週間隔で 16 週目まで眼底静脈叢より採血し, 血清分離後, 使用時まで -20°C で保存した。なお, Sj および Sm 感染マウスにおける剖検時の成虫回収数 (平均値 \pm SE) はそれぞれ 6.2 ± 0.7 および 22.8 ± 1.6 対であった。

虫卵周囲沈降 (COP) 反応

凍結乾燥虫卵と 0.15M リン酸緩衝液 (PBS) で 5 倍に希釈した血清 0.1 ml をスライドガラス上で混和し, 18×18 mm のカバーガラスで覆いワセリンで封じた。 37°C 下で 48 時間反応させた後, 観察した成熟虫卵数 (100 個以上) に対する沈降物形成虫卵 (陽性虫卵) 数の比率 (%) を求め, Sj および Sm 感染群 (各 1 群 5 匹) それぞれの平均値を求めた。卵殻周囲の沈降物の形状については横川ら (1967) に従い I 型, II 型, III 型に分類した。同様に観察成熟虫卵数 (100 個以上) に対する I 型, II 型, III 型それぞれの沈降物形成虫卵数の比率 (%) も求め, 各群ごとにその平均値で表わした。また, Yogore *et al.* (1968) による分節状沈降物 (septate precipitin) の出現の有無についても観察した。

酵素抗体法 (ELISA)

反応手技は Matsuda *et al.* (1984) に準じた。Sj および Sm の虫卵抽出抗原をそれぞれ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の蛋白濃度でマイクロプレート (Immulon200; Greiner 社, Germany) に 4°C で一晩吸着させた。被検血清は 1% BSA-PBS-Tween20 で 1:200 に希釈し, 37°C で 45 分間反応させた後, 至適濃度のペルオキシダーゼ標識抗体を 37°C で 60 分間反応させた。次いで ABTS; 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), H_2O_2 を基質として加え, 室温で 30 分間反応させた後, 414 nm の波長でマイクロプレートリーダー (コロナ M TP-120; コロナ社) を用いて測定し, OD 値を求めた。各感染群の IgM 抗体および IgG サブクラス抗体の検出は, ブロックタイトレーションにより決定し, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 山羊血清 (μ 鎖; Cappel 社, USA) を 1:10,000, 同抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, および IgG3 ウサギ血清 (γ 鎖; Zymed 社, USA) のそれぞれを 1:5,000 に希釈して使用した。

統計解析

Sj および Sm 感染に伴う COP 反応陽性率, ならびに ELISA 値の平均値の差の検定には Mann-Whitney's U test を用い, 危険率を 1% とした。

結 果

日本住血吸虫およびマンスン住血吸虫の凍結乾燥虫卵による COP 反応

Sj および Sm 凍結乾燥虫卵に対し、同種あるいは異種の住血吸虫感染マウス血清（各群 5 匹）による COP 反応の発現状況を経過的に観察した。

1. COP 反応陽性率の推移

Sj 虫卵を COP 反応の抗原に用いた場合、Sj 感染群の陽性率は感染 6 週目でピーク（65.4%）に達し、その後 16 週まで高い陽性率を保った。Sm 感染群の陽性率は 10 週目をピーク（53.2%）に減少する傾向を示したが、常に 30.0% 以上の高値を示した（Fig. 1A）。

一方、Sm 虫卵を抗原に用いた場合、感染 6 週から 12 週目では Sj 感染群の陽性率は Sm 感染群に比べて高く、14 週目以降は逆転した（Fig. 1E）。このように、両種

の虫卵に対して各感染群血清はそれぞれ交叉反応を示した。

2. I 型および II 型沈降物形成虫卵率の推移

COP 反応陽性虫卵につき沈降物の形状を型別に観察した。Sj 虫卵について I 型および II 型陽性虫卵率の推移を観察したところ、各感染群血清はそれぞれ交叉反応を示した（Fig. 1B, C）。Sm 虫卵についても同様の成績であった（Fig. 1F, G）。

3. III 型沈降物形成虫卵率の推移

Sj 虫卵に対する III 型沈降物の陽性率は感染 10 週目でピーク（28.4%）となり、16 週までその値を保持した。Sm 感染群の陽性率は常に < 5.2% を示した。統計的に 6 週目から実験終了の 16 週まで Sj 感染群の陽性率は Sm 感染群に比べ有意に高い値を示した（Fig. 1D）。

一方、Sm 虫卵に対する反応において、Sj 感染群の陽性率は 10 週目をピーク（11.0%）に次第に減少し、16

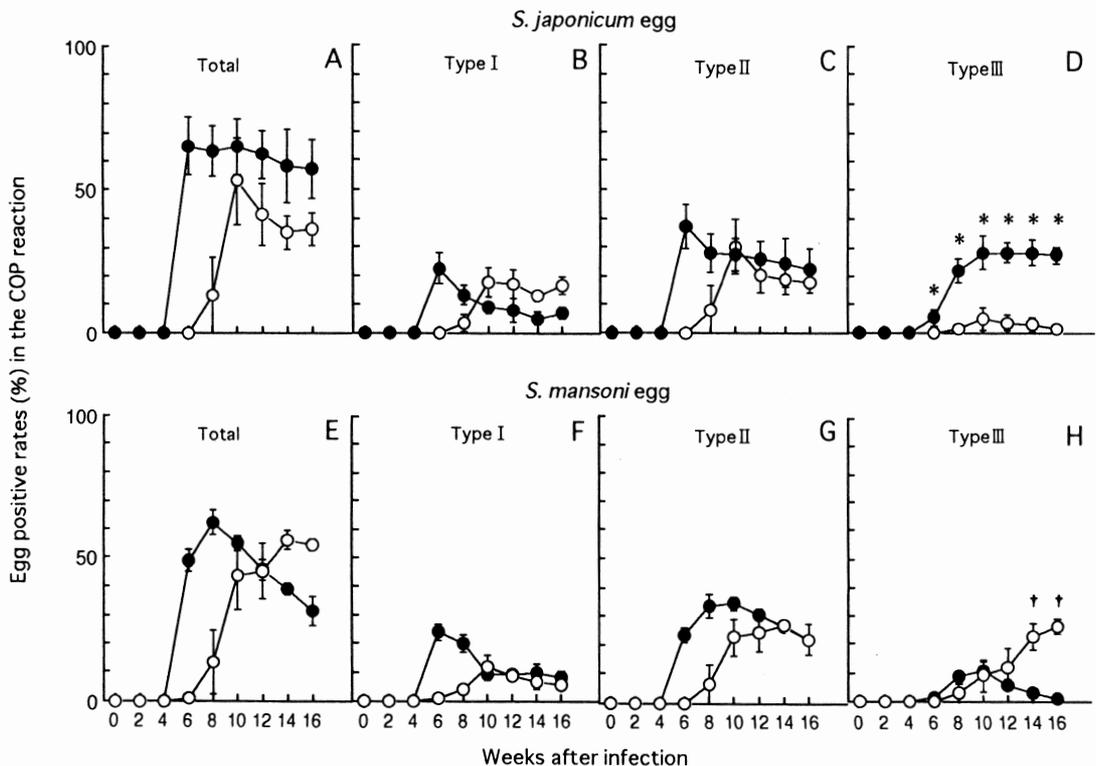


Fig. 1 Circumoval precipitin (COP) reaction using lyophilized eggs of *S. japonicum* (A-D) or *S. mansoni* (E-H) reacted with the sera from mice infected with *S. japonicum* (closed circles) or *S. mansoni* (open circles) for 16 weeks. Mean (\pm standard error) of individual percentage of egg positive of all mice in each group.

Reactions were classified into three types defined by Yokogawa *et al.* (1967)

*Significantly higher than *S. mansoni* infected group ($p < 0.01$).

†Significantly higher than *S. japonicum* infected group ($p < 0.01$).

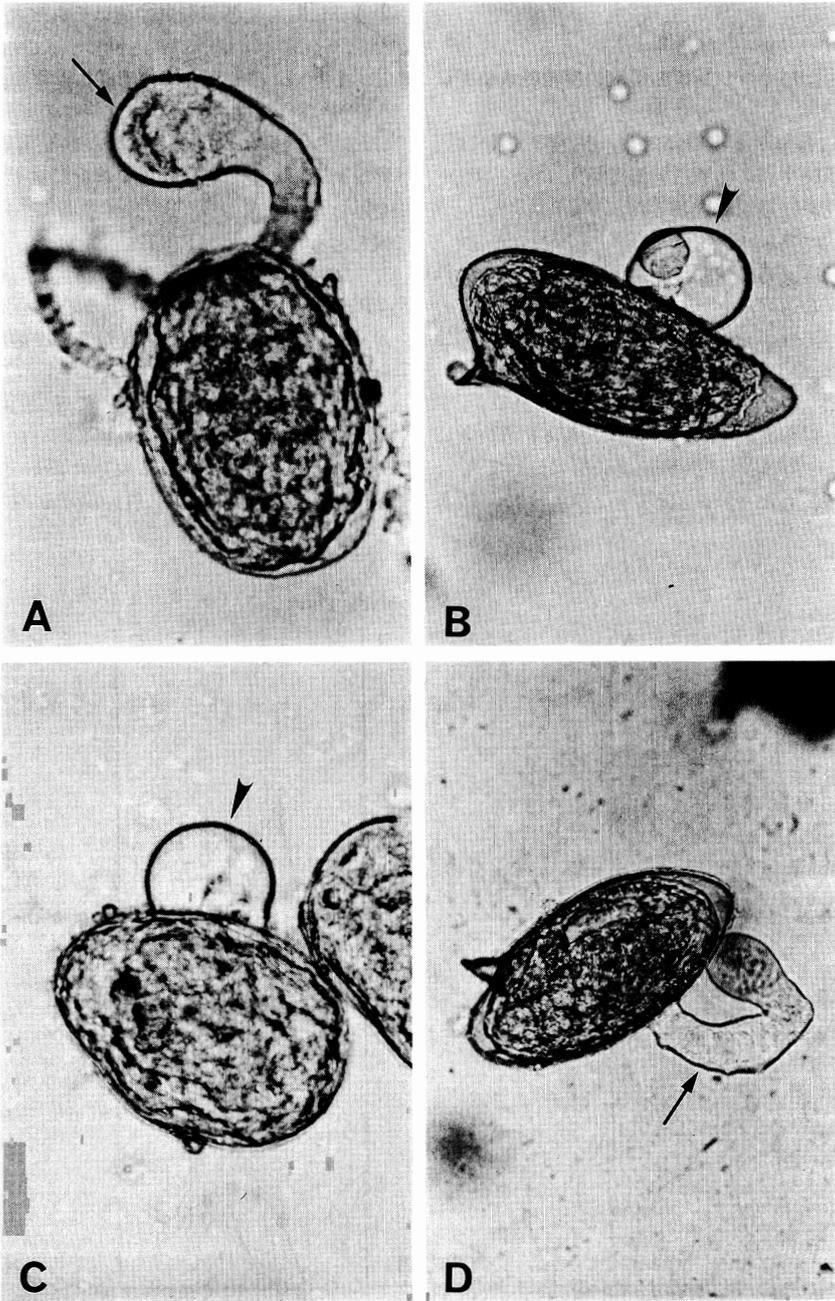


Photo. 1 Lyophilized eggs of *S. japonicum* or *S. mansoni* in the COP reaction. Septate precipitates were observed when the serum of mouse with *S. japonicum* or *S. mansoni* was reacted with homologous eggs (A, D), but when the serum was reacted with heterologous eggs, only bleb precipitates were observed (B, C).

週目には1.1%を示した。Sm 感染群の陽性率は常に増加傾向を示し、最終的に26.4%に達した。統計処理の結果、14週目以降のSm 感染群の陽性率はSj 感染群よりも有意に高い値であった (Fig. 1H)。

4. 分節状沈降物の出現状況

Sj あるいは Sm 虫卵に対して、同種の感染血清を反応させた時のみ分節状沈降物 (Photo. 1) が各感染群とも感染8週目から認められ、異種の血清では全く出現しなかった。本沈降物はSj 感染群では10週目、Sm 感染群では14週目に全例の血清について認められた (Table 1)。

Sj および Sm 虫卵抗原を用いた ELISA による虫卵特異抗体の反応

Sj および Sm 虫卵抽出抗原に対する同種あるいは異種の住血吸虫感染マウス IgM 抗体、ならびに IgG サブクラス抗体の反応性を観察した。

1. IgM 抗体の反応

Sj 虫卵抗原に対して Sj 感染群の IgM 抗体は強い反応を示し、感染12週目でその抗体値はピーク (1.339) に達した。その後16週目までは減少傾向を示したが、OD 値は常に1.2以上の高値を維持した。Sm 感染群の IgM 抗体値は Sj 感染群よりも低く推移したものの感染に伴いその値は上昇し、16週目では0.935に達した (Fig. 2A)。一方、Sm 虫卵抗原に対しても Sj 感染群の IgM 抗体は強く反応し、抗体値は感染8週目をピー

Table 1 Number of sera from mice infected with *S. japonicum* (Sj) or *S. mansoni* (Sm) producing septate precipitates in circumoval precipitin reaction using lyophilized eggs of *S. japonicum* and *S. mansoni*

No. of mice	Egg species	Infection category	Weeks after infection								
			0	2	4	6	8	10	12	14	16
5	Sj	Sj	0	0	0	0	2	5	5	5	5
		Sm	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Sm	Sj	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Sm	0	0	0	0	1	3	4	5	5

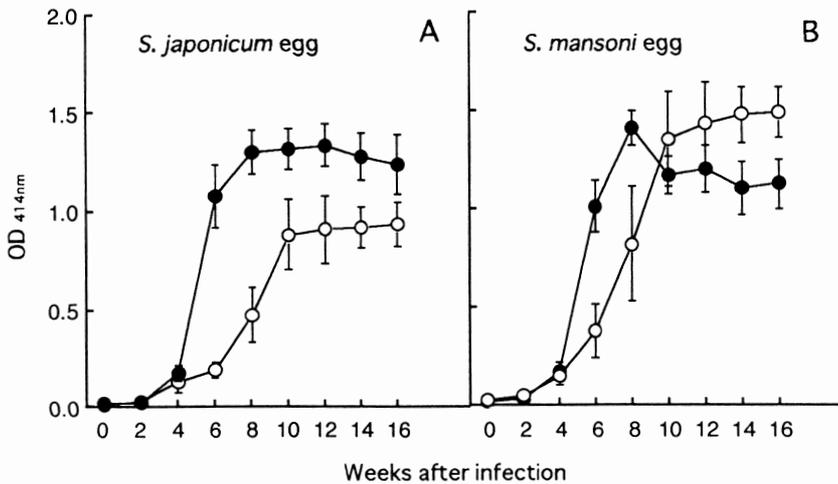


Fig. 2 Comparison of *S. japonicum* (A) and *S. mansoni* (B) soluble egg antigens in reactivity of IgM antibodies of mice infected with *S. japonicum* (closed circles) or *S. mansoni* (open circles) by ELISA.

Mean (\pm SE) of individual OD (optical density) values of all mice in each group.

ク (1.407) にその後は減少傾向を示した。Sm 感染群の IgM 抗体値は感染 4 週目から 8 週目まで Sj 感染群に比べて低く推移したが、10 週目以降で逆転し、16 週目の抗体値は 1.493 に達した (Fig. 2B)。概して、各感染群の IgM 抗体はいずれの虫卵抗原に対しても強い反応を示した。

2. IgG サブクラス抗体の反応

Sj 虫卵抽出抗原を用いた場合、Sj 感染群の IgG1 および IgG3 抗体の反応は Sm 感染群に比べて強く、最終的に各々の抗体値は 0.816 および 0.598 を示した。これに対して Sm 感染群の IgG1 と IgG3 抗体値は感染期間を通じて、それぞれ <0.2 および <0.1 であった。統計的には感染 6 週目から 16 週目まで各々の抗体値に有意差が認められた (Fig. 3A, D)。Sj 感染群の IgG2a および IgG2b 抗体値はともに感染期間を通じて <0.1 であり、Sm 感染群においても殆ど認められなかった (Fig. 3B,

C)。

一方、Sm 虫卵抽出抗原を用いた場合、感染 10 週目以降における Sm 感染群の IgG1 抗体の反応は Sj 感染群に比べて強く、感染 16 週目の抗体値は 0.892 に達した。Sj 感染群における IgG1 抗体の反応も認められたが、感染 12 週目の 0.288 が抗体値のピークであった。統計的には感染 12 週目から 16 週目までの抗体値に有意差が認められた (Fig. 3E)。また、Sm 感染群の IgG3 抗体の反応も Sj 感染群に比べて強かったが、その抗体値に有意差は認められなかった (Fig. 3H)。Sj 感染群の IgG2a および IgG2b 抗体の反応は認められず、Sm 感染群の IgG2a 抗体も殆ど認められなかった (Fig. 3F, G)。しかし、Sm 感染群の IgG2b 抗体は感染 8 週目以降徐々に上昇し、感染 12 週目から 16 週目までの抗体値は Sj 感染群よりも有意に高いものであった (Fig. 3G)。

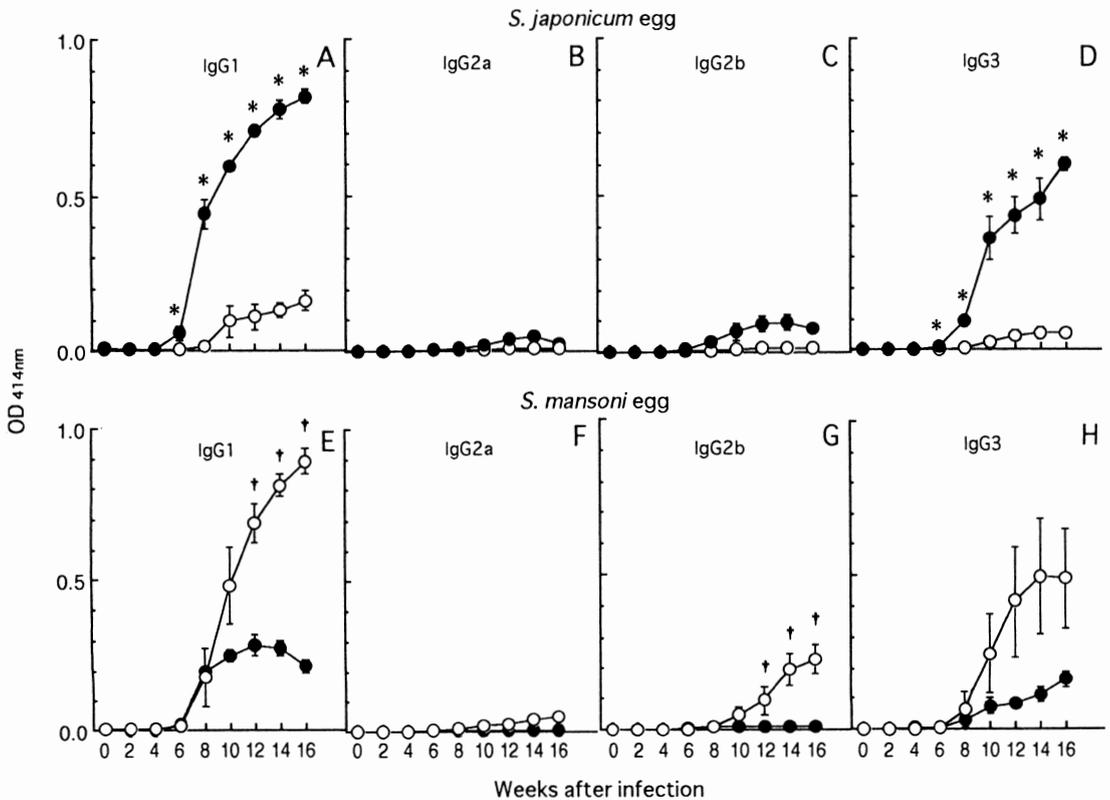


Fig. 3 Comparison of *S. japonicum* (A–D) and *S. mansoni* (E–H) soluble egg antigens in reactivity of IgG subclass antibodies of mice infected with *S. japonicum* (closed circles) or *S. mansoni* (open circles) by ELISA.

Mean (\pm SE) of individual OD values of all mice in each group.

*Significantly higher than *S. mansoni* infected group ($p < 0.01$).

†Significantly higher than *S. japonicum* infected group ($p < 0.01$).

考 察

COP 反応における沈降物は、虫卵内のミラシジウムと卵殻の間に存在する抗原が卵殻の小孔を通過し (Sakumoto *et al.*, 1972; Ford *et al.*, 1980; Demaree and Hillyer, 1981), 感染血清中の抗体と反応することによって形成されると考えられている。また、これまでにマノン住血吸虫より分離精製された Major Serologic Antigen 1 (Hillyer and Pelley, 1980) や日本住血吸虫卵中の糖蛋白質である 145 K 抗原 (小林, 1986) などが本反応に関与する抗原として報告されているが、その特異性について検討した報告は極めて少ない。

Oliver-González *et al.* (1955) は日本住血吸虫 (Sj) とビルハルツ住血吸虫 (*S. haematobium*: Sh) の新鮮虫卵に対して COP 反応を行うと、同種の感染血清のみが陽性反応を示すが、マノン住血吸虫 (Sm) の新鮮虫卵に対しては、同種だけでなく異種の感染血清も陽性を示すと報告している。一方、Newsome (1958) は Sh 虫卵と Sm 感染ヒヒ血清との COP 反応で非分節状の沈降物を認めている。Hillyer *et al.* (1980) および Hillyer *et al.* (1981) は Sm あるいは Sh 虫卵と異種の感染血清との反応において、水胞状および分節状を呈する沈降物を観察している。さらに、Tawfik and Galil (1977) と Koech *et al.* (1984) は感染者の尿中より得た Sh 虫卵を用いた COP 反応は偽陽性を示す傾向があると報じている。これらのことから Sj 新鮮虫卵を用いた場合に本反応の特異性は最も高くなり、交叉反応もないとまで言及されている。今回、凍結乾燥虫卵を用いた COP 反応の特異性について検討を行ったところ、Sj および Sm 感染群血清はそれぞれ両種の虫卵に対して高い交叉反応を示した。この結果は、本反応に新鮮虫卵を用いた場合と凍結乾燥虫卵を用いた場合とでは反応の発現に差があることを示唆し、Oliver-González *et al.* (1955) の報告と異なっていた。

本反応の陽性判定には顕微鏡下で沈降物の形態を観察し、I, II, III型に分類する横川ら (1967) の方法、全陽性虫卵を観察し最強の反応型を記載する方法 (Matsuda *et al.*, 1977), Index を用いる方法 (Tanaka, 1976) などがある。本研究では、同種の虫卵と感染血清との COP 反応によって形成される沈降物は、異種の虫卵と感染血清との反応により形成されるものに比べ、感染経過に伴い大きくなる (Hillyer and Bruce, 1980) と考え、横川ら (1967) の方法に従い I, II および III 型沈降物形成虫卵率の推移を観察した。その結果、I 型と II 型沈降物形成虫卵は同種あるいは異種の虫卵と感染血清との反応において認められたが、III 型沈降物形成虫卵は同種の虫卵と感染血清との反応において顕著に認められた。すなわち、Sj 虫卵に対しては感染

6 週目以降、Sm 虫卵では 14 週目以降の同種感染群の III 型沈降物形成虫卵率は、異種感染群に比べて有意に高いことが明らかとなった。これは、凍結乾燥虫卵を用いた COP 反応の陽性判定は III 型沈降物を基準にして行った方が特異性も高く、診断上有効であることを示唆している。なお、感染 6 週目から 10 週目の間、Sm 虫卵に対する Sj 感染群の III 型陽性率は Sm 感染群を上回っていたことから、この期間において Sm 虫卵を用いた COP 反応の特異性は低いものと考えられ、COP 反応の特異性は使用する虫卵の種類や感染経過によって異なることが示唆された。

Yogore *et al.* (1968) は、Sj 凍結乾燥虫卵を COP 反応に用いる場合、同種の感染血清との反応によって出現する分節状沈降物を陽性判定の指標にすることで、本反応は高い種特異性と感度を備えると報じているが、マノン住血吸虫の虫卵を用いた検討は行っていない。しかし、今回の実験では Sj のみならず Sm 虫卵に対しても、同種の感染血清を用いた時にも分節状沈降物が出現し、異種の感染血清との反応では本沈降物は全く認められないことが明らかとなった。従って、分節状沈降物も本反応の陽性判定に有用であると考えられた。また、分節状沈降物は形状が特徴的で判定が容易であるため、野外調査などに際し簡便且つ特異性の高い判定指標として利用できるものと思われる。

ELISA における特異抗体の反応性についてはいくつかの報告がある。Hillyer and Bruce (1980) は Sj あるいはメコン住血吸虫 (*S. mekongi*) の虫卵抗原に対する同種感染マウスの IgG 抗体は、異種の感染マウスに比べ高く推移することを認めている。Barral-Netto *et al.* (1983b) は Sj, Sm およびメコン住血吸虫の虫卵抗原に対する、Sm とメコン住血吸虫感染者の IgG 抗体の反応性を比較し、同種感染者の IgG 抗体値は異種感染者に比べて高いという成績を得ている。一方、住血吸虫以外の寄生虫感染症では IgG サブクラス抗体検出の有用性について検討がなされ、回旋糸状虫症 (Weil *et al.*, 1990; Ogunrinade *et al.*, 1991) やバンクロフト糸状虫症 (Hitch *et al.*, 1991) では感染者血清より IgG サブクラス特異抗体、特に IgG4 特異抗体を検出することにより、さらに特異性の高い診断が可能であると報告している。今回、著者らは Sj および Sm 虫卵抽出抗原に対する同種あるいは異種感染マウスの IgM 抗体、および IgG サブクラス抗体の反応を ELISA により検討した。両種いずれの虫卵抗原に対しても Sj と Sm 感染群の IgM 抗体は強い反応を示し、本抗体の高い交叉反応性が窺われた。しかし、Sj と Sm の虫卵抗原に対する同種感染群の IgG サブクラス抗体の反応は、Hillyer and Bruce (1980) や Barral-Netto *et al.* (1983b) の報告と同様、異種の感染群よりも高いこと

が明らかとなった。すなわち、Sj 虫卵抗原に対し感染6週目以降における同種感染群の IgG1 および IgG3 抗体値が Sm 感染群よりも有意に高く、また Sm 虫卵抗原に対しては感染12週目以降の同種感染群の IgG1 抗体値が Sj 感染群に比べ有意に高い値を示した。この成績は前述の COP 反応における分節状沈降物の出現状況と相関し、Long *et al.* (1980) が示唆したように、COP 反応で出現する分節状沈降物の形成に IgG 抗体が関与していることを支持するものである。従って、IgG サブクラス抗体は分節状沈降物と同様に、ELISA による本症の診断上特異性の高い検出対象になると考えられる。また、ELISA によって IgG サブクラス抗体を検出することで、Sm 虫卵抗原に対する異種感染血清中の IgG 抗体の強い交叉反応性 (Hillyer *et al.*, 1980; Barral-Netto *et al.*, 1983a) をある程度低下させることができるものと思われる。なお、Littel *et al.* (1982) は Sj 感染マウスの虫卵特異 IgG サブクラスのうち、IgG1 抗体のみが反応を示すと報告しているが、本実験では Sj 虫卵抗原に対する同種感染群の IgG3 抗体にも反応が認められたことは、新たな知見である。一方、Sm 虫卵抗原に対する同種感染群の IgG2b 抗体の反応は低値ではあったが、Sj 感染群を有意に上回った。しかし、Sj 虫卵抗原に対する同種感染群の IgG2b 抗体も若干の反応を示しており、これが Sm 感染群に特異的な現象であるか否かについては今後さらに検討する必要性がある。

以上の一連の結果より、COP 反応ではⅢ型沈降物形成虫卵率と分節状沈降物の観察、虫卵を抗原とした ELISA では IgG1 サブクラス抗体の検出を行うことにより、虫卵抗原の高い特異性を活かした免疫診断が可能になると考えられた。

謝 辞

PR-1 *S. mansoni* および M-line *B. glabrata* を分与して戴いた鹿児島大学医学部医動物学教室、佐藤淳夫名誉教授ならびに野田伸一助教授に深謝致します。また、種々ご協力戴いた獨協医科大学医動物学教室員の皆様に感謝致します。

文 献

- Barral-Netto, M., Cheever, A. W., Lawley, T. J. and Ottesen, E. A. (1983a): Cell-mediated and humoral immune responses in capuchin monkeys infected with *Schistosoma japonicum* or *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32, 1335-1343.
- Barral-Netto, M., Hofstetter, M., Cheever, A. W. and Ottesen, E. A. (1983b): Specificity of antibody and cellular immune responses in human schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32, 106-113.
- Demaree, R. and Hillyer, G. V. (1981): *Schistosoma* species: Transmission electron microscopy of the circumoval precipitin reaction on egg. *Exp. Parasitol.*, 52, 77-85.
- Ford, J. W., Hillyer, G. V. and Connelly, T. G. (1980): The circumoval precipitin reaction on *Schistosoma mansoni* eggs as seen by scanning electron microscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 1246-1248.
- Hillyer, G. V. and Bruce, J. I. (1980): Serologic response in murine schistosomiasis mekongi and japonica. In the Mekong schistosome, *Malacological Review*, (Suppl.), 2, 161-167.
- Hillyer, G. V. and Pelley, R. P. (1980): The major serological antigen (MSA₁) from *Schistosoma mansoni* eggs is a "Circumoval" precipitinogen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 582-585.
- Hillyer, G. V., Ramzy, R. M., El Alamy, M. A. and Cline, B. L. (1980): Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 1254-1257.
- Hillyer, G. V., Ramzy, R. M., El Alamy, M. A. and Cline, B. L. (1981): The circumoval precipitin test for the serodiagnosis of human schistosomiasis mansoni and haematobia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 121-126.
- Hitch, W. L., Hightower, A. W., Eberhard, M. L. and Lammie, P. J. (1991): Analysis of isotype-specific antifilarial antibody levels in a haitian peiatric population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44, 161-167.
- 小林富美恵 (1986): モノクローナル抗体による日本住血吸虫の虫卵周囲沈降反応に関する研究. *寄生虫誌.*, 35, 445-456.
- Koech, D. K., Hirata, M., Shimada, M. and Wambayi, E. (1984): Precipitates found around *Schistosoma haematobium* eggs from human urine prior to circumoval precipitin test. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 78, 627-632.
- Lewert, R. M. and Yogore, M. G. (1969): A field circumoval precipitin (FCOP) test for schistosomiasis japonica. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63, 343-348.
- Littel, J. V., 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.
- Long, G. W., Pelley, R. P., Blas, B. L., Yogore, M. G. Jr. and Lewert, R. M. (1980): Analysis of the immunoglobulins responsible for the circumoval precipitation reaction.

- Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 1241-1245.
- 15) 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.
 - 16) 松田 肇・中尾 稔・田中 寛・永田 傳・Noseñas, J. S., Blas, B. L., Portillo, G. P., Santos, A. T. 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.
 - 17) 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. *Jpn. J. Exp. Med.*, 47, 369-375.
 - 18) Matsuda, H., Tanaka, H., Blas, B. L., Noseñas, J. S., Tokawa, T. and Ohsawa, S. (1984): Evaluation of ELISA with ABTS, 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid), as the substrate of peroxidase and its application to the diagnosis of schistosomiasis. *Jpn. J. Exp. Med.*, 54, 131-138.
 - 19) Newsome, J. (1958): Species-specific serological tests for bilharzia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 52, 82-86.
 - 20) Noseñas, J. S., Matsuda, H., Blas, B. L., Tanaka, H. and Santos, A. T. Jr. (1975): Evaluation of the circumoval precipitin test using dried blood filter paper as a diagnostic tool in epidemiological survey for schistosomiasis. *Jpn. J. Exp. Med.*, 45, 367-375.
 - 21) Ogunrinade A. F., Kale, O. O., Chandrashekar, R., Weil, G. J. (1992): Field evaluation of IgG4 serology for the diagnosis of onchocerciasis in children. *Trop. Med. Parasitol.*, 43, 59-61.
 - 22) Oliver-González, J., (1954): Anti-egg precipitins in serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.*, 95, 86-91.
 - 23) Oliver-González, J., Bauman, P. M. and Benenson, A. S. (1955): Species specificity of the anti-egg precipitin in schistosome serums. *J. Infect. Dis.*, 96, 95-100.
 - 24) Pellegrino, J. and Katz, N. (1968): Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. In "Advances in parasitology", Vol. 6, ed. by Dawes, B., Academic Press, New York., 233-290.
 - 25) Rivera de Sala, A., Canico, M. and Rodriguez-Molina, R. (1960): Preservation of eggs of *Schistosoma mansoni* for the circumoval precipitin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 11, 199-200.
 - 26) Sakumoto, D., Tongu, Y., Suguri, S., Itano, D., Inatomi, S., Tanaka, H. and Matsuda, H. (1972): Ultrastructural observation of the circumoval precipitation of *Schistosoma japonicum*. In "Research in Filariasis and Schistosomiasis", Vol. 1, ed. by Yokogawa, M., University Park Press, Baltimore., 199-209.
 - 27) Tanaka, H. (1976): Complement fixation and circumoval precipitin reactions for diagnosis and as tests of cure in schistosomiasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 7, 176-179.
 - 28) 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*. *Jpn. J. Exp. Med.*, 45, 105-111.
 - 29) Tawfik, J. and Galil, N. (1977): The isolation and preservation of viable *Schistosoma haematobium* eggs for the circumoval precipitin (COP) test in schistosomiasis. *J. Egypt. Med. Assoc.*, 60, 793-802.
 - 30) Weil, G. J., Ogunrinade, A. F., Chandrashekar, R. and Kale, O. O. (1990): IgG4 subclass antibody serology for onchocerciasis. *J. Infect. Dis.*, 161, 549-554.
 - 31) 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 epidemiological studies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 10, 23-31.
 - 32) Yogore, M. G. Jr., Lewert, R. M. and Silan, R. B. (1968): The circumoval precipitin (COP) test in schistosomiasis japonica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 17, 65-71.
 - 33) 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

STUDIES ON ANTIBODY RESPONSES IN MICE TO EGG ANTIGENS OF
SCHISTOSOMA JAPONICUM AND *S. MANSONI* DETECTED BY CIRCUMOVAL
PRECIPITIN (COP) REACTION AND ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

HAJIME YOKOI^{1,2)}, MASASHI KIRINOKI¹⁾, YUICHI CHIGUSA¹⁾, HISASHI YAMAMOTO¹⁾,
TOSHIO ISHII²⁾, SOICHI IMAI²⁾ AND HAJIME MATSUDA¹⁾

¹⁾Department of Medical Zoology, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi 321-02, Japan.

²⁾Department of Veterinary Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University,
1-7-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180, Japan.

We examined antibody responses to *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* egg antigens in COP reaction and ELISA using sera from mice infected with both *Schistosoma* species. Individual mice were infected percutaneously either with 40 cercariae of *S. japonicum* or with 150 cercariae of *S. mansoni*. They were then bled from the eyeground venous plexus at 2 week intervals up to 16 week after infection for serum samples. COP tests using the serum samples revealed that the total positive rates with homologous eggs were similar to those with heterologous eggs. However, the appearance rate of the "type 3" reactions (Yokogawa *et al.*, 1967) with sera of *S. japonicum* infected mice collected 6–16 weeks after infection was significantly higher to homologous eggs than to heterologous eggs. Similar results were obtained with sera of *S. mansoni* infected mice collected 14–16 weeks after infection. Septate precipitates were observed only to homologous eggs. The results of ELISA indicated that IgM of mice infected either with *S. japonicum* or *S. mansoni* cross-reacted against both schistosome species egg antigens. IgG1 and IgG3 antibody levels of sera from *S. japonicum* infected mice collected 6–16 weeks after infection were significantly higher to homologous eggs than to heterologous eggs. Similar results were found in sera from *S. mansoni* infected mice obtained 12–16 weeks after infection. These findings suggest that in COP tests species specificity of *S. japonicum* and *S. mansoni* eggs may be recognized by the rate of "type 3" reactions and by the appearance of septate segments, and that in ELISA the species specificity may be manifested by the change of IgG1 antibody production.