

日本住血吸虫感染マウスの虫卵特異 IgM および IgG サブクラス抗体応答の ELISA と Immunoblotting による検討

横井 一^{1), 2)} 桐木雅史¹⁾ 千種雄一¹⁾ 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9月20日)

要 約

日本住血吸虫感染 BALB/c マウスプール血清中の IgM ならびに各 IgG サブクラス抗体の感染時期による応答性の違いを, 虫卵抽出抗原を用いた ELISA および Immunoblotting により検討した。

ELISA を用いて経時的推移を検討し, 観察期間を通じて各々のクラスがピークを示した感染8週目, および16週目の血清を感染初期, 慢性感染期血清とした。

Immunoblotting により IgM 抗体は, 感染8週目と16週目ともに分子量360 KDa, および58 KDa~265 KDa の拡散性の抗原群を強く認識し, 感染時期における認識部位に違いは認められなかった。IgG1 抗体は感染時期により異なり, 感染8週目では40 KDa 以上の領域のみを認識したが, 16週目ではさらに40 KDa 以下の低分子領域も強く認識した。この低分子領域の抗原に対して反応を示したのは IgG1 抗体のみであり, 40 KDa 以下の低分子抗原は感染慢性期に産生される IgG1 抗体によって特異的に認識されることが明らかとなった。IgG2a と IgG2b 抗体の反応は各感染週ともに極く弱かった。IgG3 抗体は感染後16週目で58 KDa~265 KDa の拡散性を示す領域を強く認識した。

ELISA の結果, IgM 抗体の反応は感染8週目, 16週目ともに過ヨウ素酸処理抗原に対して著しく低下したため, IgM 抗体は感染時期を問わず主として糖鎖部位を認識していると考えられた。IgG1 抗体の反応は感染後8週目では, プロナーゼおよび過ヨウ素酸処理抗原の両者に対して低下し, 16週目ではプロナーゼ処理抗原に対してのみ低下したことから, 感染が慢性化するに従い IgG1 抗体が認識するエピトープは, 糖鎖部位からペプチド部位へと変化することが示唆された。

Key words: *Schistosoma japonicum*; egg antigen; antibody isotype responses; epitope; ELISA; immunoblotting.

緒 論

日本住血吸虫感染において, 門脈系に寄生する成虫によって産出された虫卵は宿主組織内に捕捉され, 宿主に強い免疫応答を惹起させるため, 宿主の肉芽腫形成反応を促し, これが本症の主要な病害の原因の一つとなる (Warren *et al.*, 1975)。また, 虫卵は強い抗原性を有し, 本症の免疫診断法における抗体検出用の抗原として虫卵周囲沈降 (Circumoval Precipitin; COP) 反応 (横川ら, 1971; Noseñas *et al.*, 1975; Tanaka *et al.*, 1975; Matsuda *et al.*, 1977) や酵素抗体法 (Enzyme-

linked Immunosorbent Assay; ELISA) (松田ら, 1981; Yogore *et al.*, 1981; Matsuda *et al.*, 1984) に広く用いられてきた。

これまでに, 住血吸虫の感染経過に伴い出現する虫卵特異抗体, 特に免疫グロブリンクラスあるいはサブクラス抗体の出現状況は急性, および慢性期で異なることが報告されている (Lunde and Ottesen, 1980; Littel *et al.*, 1982; 松田ら, 1984)。しかし, これらクラスあるいはサブクラス別抗体が認識するエピトープの違いについて詳細な検討はなされていない。一方, 住血吸虫以外の寄生虫感染症においても感染の経過に伴う特異抗体の出現状況, および認識されるエピトープの違いについての検討がなされ, 旋毛虫症 (Ljungström *et al.*, 1988) では IgG4 特異抗体が感染慢性期に高くなること, バンクロフト糸状虫症 (Hussain *et al.*, 1987) および回

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) によった。

旋糸状虫症 (Cabrerera *et al.*, 1988) では虫体抗原に対する IgG サブクラス特異抗体の認識部位が感染病態により異なることが明らかにされている。さらに、赤尾ら (1983) は犬蛔虫を感染させた家兎において、幼虫の排泄、分泌物抗原に対する IgG 特異抗体が認識する抗原分画は感染初期と慢性期で異なることを報告している。以上のような寄生虫感染に伴う特異抗体の出現状況および認識されるエピトープの違いは、感染経過により宿主側の抗体応答が異なることを示唆するものである。

本研究では、日本住血吸虫感染初期と慢性期に出現するマウス血中の虫卵特異 IgM および IgG サブクラス抗体に着目し、感染時期によるこれら虫卵特異抗体の応答性の違いについて、虫卵抗原を用いた Immunoblotting および ELISA により検討した。

材料および方法

日本住血吸虫

日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*: Sj) は山梨県由来の系統で、実験室内においてマウスとミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* を用いて継代しているものである。

虫卵の採取

生後 4～6 週齢の雌 ICR マウスに 1 匹当たり約 60 隻の Sj セルカリアを経皮感染させ、感染 7～8 週後に虫卵を腸管より採取した。虫卵分離には松田ら (1981) の消化法を用い、分離した虫卵は凍結乾燥させた後、抗原調製時まで -70°C に保存した。

ELISA 用抗原および抗原吸着プレートの作成

1. 日本住血吸虫の虫卵抽出抗原

ELISA に用いた Sj 虫卵抽出抗原は松田ら (1981) に従い作成した。抗原の蛋白濃度は Lowry *et al.* (1951) の方法によって測定した。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の蛋白濃度に調製した Sj 虫卵抽出抗原をマイクロプレート (Immulon 200, Greiner 社, Germany) に吸着させ ELISA に供した。

2. プロナーゼ処理および過ヨウ素酸処理

Sj 虫卵抽出抗原のプロナーゼ処理は Owhashi and Ishii (1982) の方法に従って行い、これを 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の蛋白濃度に調製し、マイクロプレートに吸着させ、洗浄後、風乾させ、ELISA 実施時まで -70°C に保存した。一方、Woodward *et al.* (1985) の方法に従い、抗原吸着プレートを 0.02 M 過ヨウ素酸ナトリウムで 60 分間室温で処理した。処理後のプレートは洗浄、風乾した後、反応実験時まで -70°C に保存した。

SDS-PAGE 用抗原の作成

ELISA 用抗原を蒸留水に対して透析後、凍結乾燥させ 5 mg/ml (W/V) の割合でリン酸緩衝液 (PBS) に溶解させ抗原液とした。これらの抗原液は使用時まで -70°C に保存した。

感染マウス血清

生後 6 週齢の雌 BALB/c マウスを 5 匹用意し、1 匹あたり 40 隻の Sj セルカリアを尾部より経皮感染させた (Pellegrino and Katz, 1968)。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、2 週目ごとに各個体の血清を等量ずつプールし、使用時まで -20°C に保存した。

酵素抗体法 (ELISA)

虫卵特異 IgM と IgG サブクラス抗体の出現状況、ならびに認識エピトープを検討するための ELISA は Matsuda *et al.* (1984) に準じて行った。前述の方法により準備した抗原吸着プレートに 1% BSA-PBS-Tween 20 で 1:200 に希釈した被検血清を加え 45 分間反応させた。反応終了後、プレートを洗浄し、至適濃度のペルオキシダーゼ標識抗体を 60 分間反応させ、再びプレートの洗浄を行い、基質 (ABTS; 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), H₂O₂) を加え室温で 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 (コナ MTP-120; コナ社) を用いて OD 値を測定した。Sj 感染 BALB/c マウスの IgM 抗体および IgG サブクラス抗体の検出はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM ヤギ血清 (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) を 1:5,000 に希釈して使用した。陰性対照として感染前の BALB/c マウスのプール血清 (1:200 希釈) を使用した。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 用抗原液とサンプル緩衝液 (2% SDS, 12.5% 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8), 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0.0025% bromphenol blue) を等量ずつ混合した後、100°C で 1 分間煮沸し泳動用サンプルとした。抗原サンプルの泳動はアクリルアミド濃度 4-20% (W/V) の濃度勾配ゲル (TEFCO 社, Japan) 上で、Laemmli (1970) の方法に従って行なった。また、分子量推定の指標としてタンパク質分子量マーカー (Daiichi Pure Chemicals Co., Japan) を同時に泳動した。

Immunoblotting

SDS-PAGE によって展開された *Sj* 虫卵抽出抗原成分を PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜 (日本ミリポア社) に転写後, Towbin *et al.* (1979) および Tsang *et al.* (1983) の方法に準じ, PVDF 膜上で Immunoblotting を行った。すなわち, 5% Skim milk-PBS に浸し 4°C で一晩ブロッキング後, 0.5% Skim milk-PBS で 1:100 に希釈した被検血清と室温で 2 時間反応させた。0.05% Tween 20-PBS で洗浄後, 1:1,000 に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM ヤギ血清 (μ 鎖; Cappel 社, USA) および, 同抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ウサギ血清 (γ 鎖; Zymed 社, USA) と室温で 1 時間反応させた。反応後 3, 3'-Diaminobenzidine, H₂O₂ で発色させ, それぞれの二次血清と反応した抗原バンドを観察した。また, 陰性対照として正常 BALB/c マウスのプル血清 (1:100 希釈) を用いた。

結 果

感染経過に伴う虫卵特異 IgM および IgG サブクラス抗体の推移

Immunoblotting により虫卵特異抗体の応答性を検討するに当たり, あらかじめ虫卵抽出抗原に対する日本住

血吸虫感染マウスプル血清中の IgM, および IgG サブクラス抗体 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) の経時的推移を ELISA により検討した。その結果を Fig. 1 に示す。

IgM 抗体の出現は感染 4 週目から認められ, その後急激な上昇を示し, 8 週目でその OD 値はピーク (1.251) に達した。感染 8 週目以降, IgM 抗体値の推移は若干の減少傾向を示したものの, 常に 1.100 以上の値を維持した。IgG1 抗体は感染 6 週目に出現し, その後上昇を続け, 16 週目の OD 値は 1.171 に達した。一方, IgG2a および IgG2b 抗体の OD 値は全感染期間を通じ, 常に 0.100 以下で推移した。IgG3 抗体は感染 6 週目に出現し, その後常に上昇を続け, 感染後 16 週目の OD 値は 0.985 となった。

以上の結果から, 感染マウスプル経時血清のうち, 観察期間を通じて IgM および IgG サブクラス抗体レベルがそれぞれ最高値を示した感染 8 週目, および 16 週目の血清を感染初期と慢性感染期血清として選び, 以後の Immunoblotting と ELISA に使用した。

虫卵抗原に対する IgM および IgG サブクラス抗体の反応部位

日本住血吸虫感染後 8 週目と 16 週目のマウス血清を用

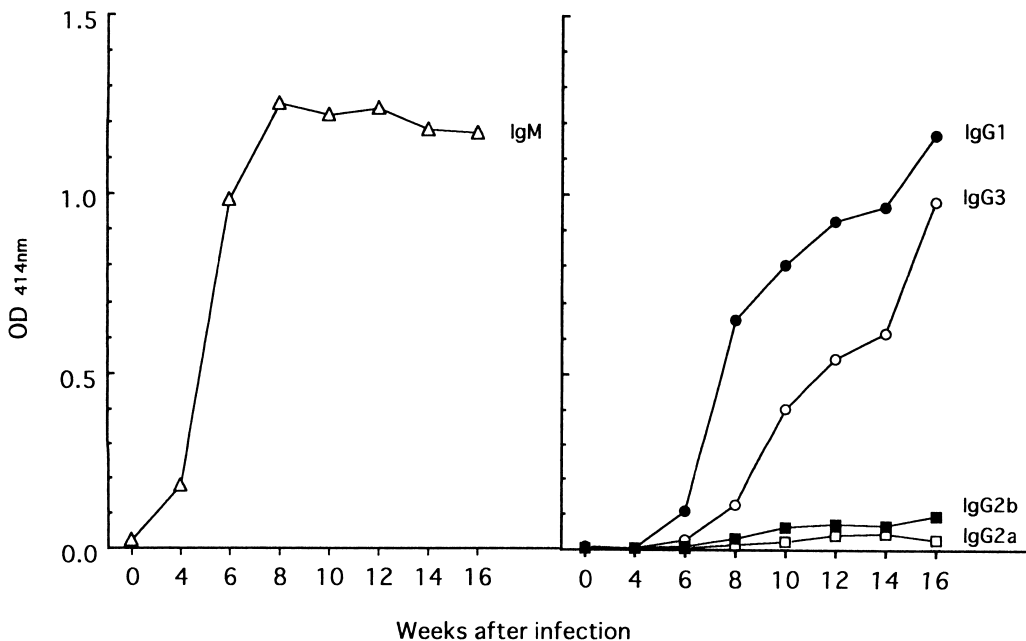


Fig. 1 Evaluation of *Schistosoma japonicum*-specific IgM (left) and IgG subclass (right) antibody responses to egg antigens during the course of murine infection.

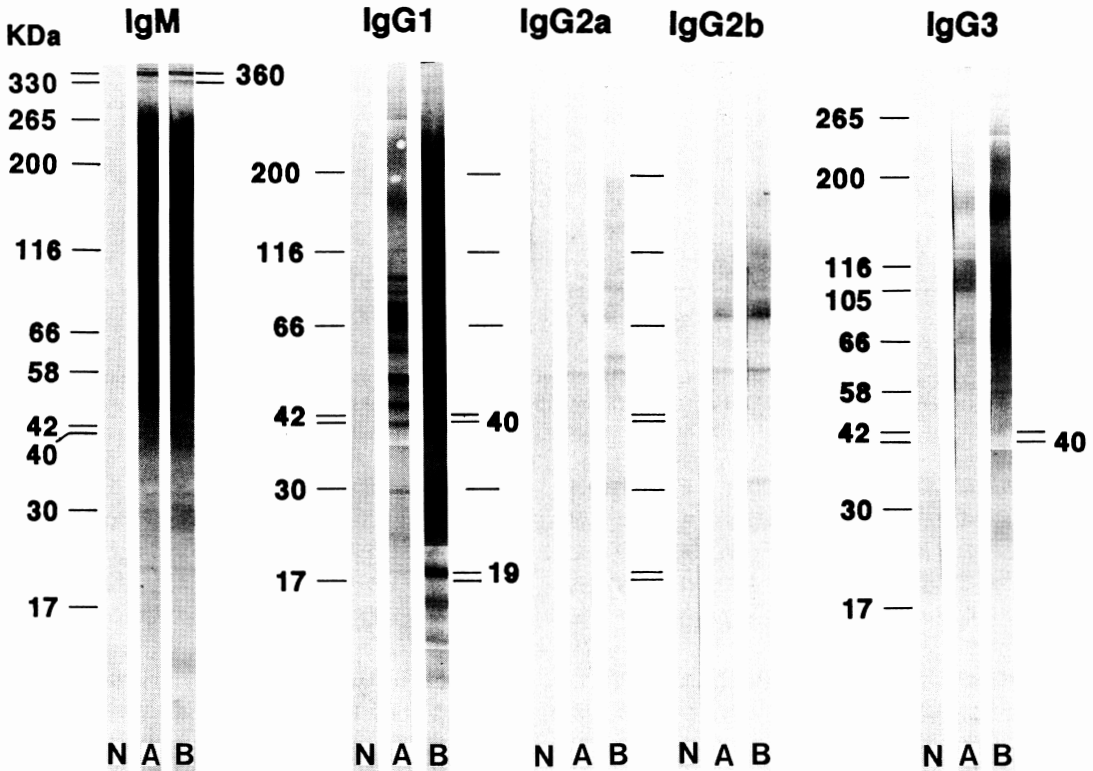


Fig. 2 Immunoblot analysis of *S. japonicum*-specific IgM and IgG subclass antibodies to egg antigens in serum pools from 5 BALB/c mice each at 8 and 16 weeks after infection.

Lane A, 8 weeks after infection; lane B, 16 weeks after infection, lane N, normal mouse serum. The gel contained a 4–20% acrylamide gradient.

いて虫卵抽出抗原に対する IgM および各 IgG サブクラス抗体が認識する抗原の違いを Immunoblotting により検討した (Fig. 2)。

感染 8 週目と 16 週目の IgM 抗体はともに、分子量 360 KDa の抗原および 58 KDa ~ 265 KDa の拡散性を示す抗原群を強く認識し、感染時期による出現バンドのパターンに違いは認められなかった。IgG1 抗体は感染 8 週目では 40 KDa 以上の領域の抗原を認識したが、感染 16 週目では出現バンドはさらに増加し、40 KDa 以上の領域に加えてそれ以下の低分子領域、特に 19、30 および 40 KDa の各抗原分子に強い反応を示した。また、40 KDa 以下の低分子領域の抗原に対して出現するバンドは感染 16 週目の IgG1 抗体に特異的であった。IgG2a および IgG2b 抗体の反応は ELISA での結果と同様に極めて弱いものであったが、感染 16 週目に IgG2b 抗体と弱い反応を示すバンドが数本認められた。IgG3 抗体は感染 8 週目に 105 KDa 付近の抗原に弱い反応を示し

たが、16 週目では 58 KDa ~ 265 KDa の領域に数本の拡散性のバンドが出現し、IgM 抗体と類似した反応パターンを示した。

IgM, IgG1 および IgG3 抗体が認識する虫卵抗原エpiteope の感染時期による差異

感染 8 週目と 16 週目の虫卵特異 IgM, IgG1 および IgG3 抗体が認識するエpiteope が感染時期により異なるか否かを調べるため、プロナーゼならびに過ヨウ素酸処理を施した虫卵抗原を用いて ELISA を行った (Fig. 3)。

IgM 抗体の反応は感染 8 週目、16 週目ともに無処理抗原と比べ、過ヨウ素酸処理抗原に対して著しい低下 (8、16 週目ともに 70.0% 以上の OD 値の減少) を示した。従って、本抗体は感染時期を問わず主として糖鎖部位を認識しているものと考えられた。IgG1 抗体の反応は無処理抗原と比べ、感染 8 週目ではプロナーゼおよび

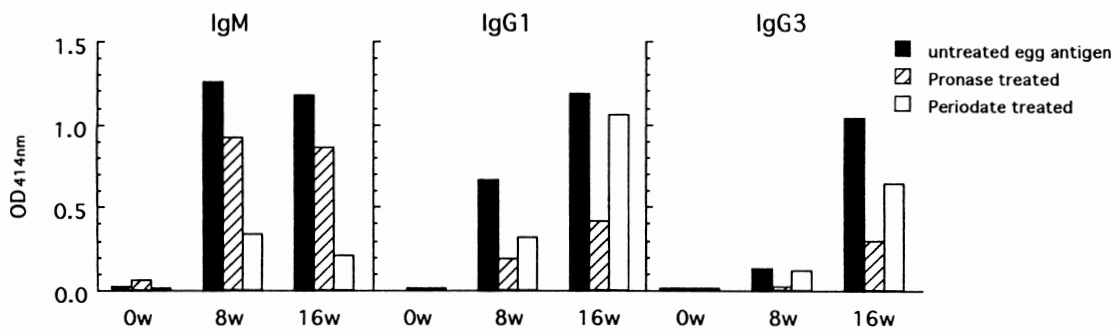


Fig. 3 Response of *S. japonicum* – specific IgM, IgG1 and IgG3 antibodies to pronase-, periodate-treated and untreated egg antigens in serum pools from 5 BALB/c mice each at pre-infection and 8, 16 weeks after infection, as determined by ELISA.

過ヨウ素酸処理抗原の両者に対して低下（それぞれ69.4%、47.0%の減少）したが、16週目ではプロナーゼ処理抗原に対してのみ著しい反応の低下（65.3%の減少）を示した。これは感染慢性期に移行するにつれ、IgG1抗体が認識する抗原エピートは糖鎖部位からペプチド部位へと変化することを示唆している。一方、IgG3抗体は感染8週目では反応が弱く、感染時期による比較はできなかったが、16週目ではプロナーゼおよび過ヨウ素酸処理抗原の両者に対して低下が見られた（それぞれ71.3%、38.0%の減少）ことから、糖鎖およびペプチドの両部位をエピートとして認識しているものと考えられた。

考 察

住血吸虫感染に伴い出現する血中抗体、特にクラスまたはサブクラス別抗体が感染経過中に認識する抗原の違いについて、Immunoblottingを用いた詳細な検討はなされていないが、他の寄生虫感染症ではいくつかの報告がある。赤尾ら（1983）は犬蛔虫を感染させたウサギにおいて、IgG特異抗体が認識する幼虫の排泄・分泌物の抗原分画について検討した結果、感染初期の血清は分子量80 KDa以上の抗原、慢性期では主に分子量30 KDa～40 KDaの抗原と反応することを明らかにし、IgG特異抗体は感染経過によって異なる抗原分画を認識することを示唆している。Muro *et al.*（1992）は犬糸状虫感染ヒト血清について虫体抗原を用いて検討し、IgM抗体は分子量43 KDa以上の抗原、IgG抗体は分子量74 KDa以下の抗原を認識し、抗体クラス間でその認識抗原分画が異なることを報告している。一方、Hussain *et al.*（1987）はマレー糸状虫成虫抗原に対する、バンクロフト糸状虫感染ヒト血清中の各IgGサブクラス抗体（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）の反応部位について比較検討し、ミクロフィラリア血症を示す患者ではIgG4抗体が特異的に認められ、主として68 KDa

以下の抗原を認識すること、また、象皮病を示す患者ではIgG1とIgG3抗体が68 KDa以上の抗原を特異的に認識することを明らかにしている。このように犬蛔虫症あるいはフィラリア症において出現する特異抗体のが認識する抗原分画は感染経過によって異なることが示されている。

一方、Carter and Colley（1981）は日本住血吸虫卵の抗原性を二重免疫拡散法とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて検討し、本虫卵抗原には感染初期から抗原性を有する成分と、感染慢性期に抗原性を示す成分が存在することを示している。Kobayashi *et al.*（1985）も日本住血吸虫卵の抗原性を二重免疫拡散法とポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて検討し、感染初期のマウス特異抗体は虫卵抗原に対して糖蛋白を含む泳動度の小さい抗原分画と反応し、慢性期の特異抗体はこれに加え、さらに泳動度の大きい分画にも反応することを明らかにし、Carter and Colley（1981）とほぼ同様の成績を得ている。

本実験の結果、IgMとIgG3抗体が認識する抗原分画は感染時期による差が認められず、ともに40 KDa以上の領域の抗原を強く認識した。しかし、IgG1サブクラス抗体が認識する分画は感染時期により異なり、感染初期では40 KDa以上の領域の抗原を認識し、慢性期では40 KDa以上の領域に加え、40 KDa以下の領域の抗原も認識することを明らかにした。このことは、日本住血吸虫卵には感染初期から特異抗体によって認識される抗原分画（40 KDa以上）と、感染慢性期になり認識される抗原分画（40 KDa以下）が存在することを示唆する。また、40 KDa以上の抗原分画には主としてIgM, IgG1およびIgG3抗体が反応したが、とりわけIgM抗体に対して強い抗原性を示していた。

以上のように、日本住血吸虫感染BALB/cマウスにおける虫卵特異IgMおよび各IgGサブクラス抗体

の応答は感染時期により異なることが示唆されたが、今回さらにこれらの特異抗体が認識する虫卵抗原のエピトープについても検討した結果、IgM 抗体は主に糖鎖部位を認識し、感染時期による違いは認められなかったものの、IgG1 抗体は感染8週目では糖鎖およびペプチド部位、16週目では主としてペプチド部位を認識すると考えられたことから、IgG1 抗体が認識するエピトープは感染が慢性化するにつれて糖鎖部位からペプチド部位へ変化することが示唆された。

Owhashi *et al.* (1987) は、日本住血吸虫卵中のアレルゲン(糖蛋白質)として J1 (135 KDa) と J2 (45 KDa) を報告している。しかし、本研究において感染慢性期に出現する IgG1 抗体が認識する 40 KDa 以下の抗原分画は、性状および機能の両面からみてもこれら 2 種のアレルゲンとは異なることが考えられ、今後、この抗原分画の検討を行うにあたり興味深い知見である。

最近、Langley *et al.* (1994) は Manson 住血吸虫感染者の虫卵抗原に対する各 IgG サブクラス抗体の認識エピトープについて検討を行い、IgG2 抗体は糖鎖部位、IgG1 と IgG3 抗体は糖鎖およびペプチド部位、さらに IgG4 抗体はペプチド部位を認識すると報告している。しかし、彼らは感染の経過に伴う認識エピトープの差異などについては検討していない。また、今回の成績は日本住血吸虫感染マウスモデルを用いた実験系で得られたものであり、住血吸虫感染に対する特異抗体応答を、今後ヒトの系で検討する必要がある。

以上のことから、日本住血吸虫卵中の分子量 40 KDa 以上の抗原は糖蛋白質が主体を占め、感染初期から強力な IgM 抗体の産生を促し、40 KDa 以下の抗原は慢性期になってから IgG1 抗体に対して抗原性を示す蛋白質が主体であることが推測された。また、40 KDa 以下の低分子領域には IgG1 抗体のみが反応するのに対し、40 KDa 以上の抗原分画には IgM、IgG1 および IgG3 抗体が反応したことから、この分画には本虫卵の主要抗原が多く含まれると推測された。さらに、40 KDa 以下の抗原分画は感染慢性期に産生される IgG1 抗体によって特異的に認識されるため、この抗原分画と IgG1 特異抗体の反応によって出現するバンドの有無を観察することにより、本症の感染時期の把握が可能であると考えられた。

謝 辞

実験動物飼育に関して種々御協力いただいた、獨協医科大学医動物学教室、大下真由美、田谷潤子両技術員に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

1) 赤尾信明・近藤力王至・岡本 敬・吉村裕之 (1983):

犬蛔虫第 2 期幼虫 ES 抗原の抗原分析と感染経過中に見られる宿主の抗原認識の変化. 寄生虫誌., 32, 541-548.

- 2) Cabrera, Z., Buttner, D. W. and Parkhouse, R. M. E. (1988): Unique recognition of a low molecular weight *Onchocerca volvulus* antigen by IgG3 antibodies in chronic hyper-reactive oncho-dermatitis (Sowda). Clin. Exp. Immunol., 74, 223-229.
- 3) Carter, C. E. and Colley, D. G. (1981): *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens: separation by Con A chromatography and immunoaffinity purification. Mol. Immunol., 18, 219-226.
- 4) Hussain, R., Grogl, M. and Ottesen, E. A. (1987): IgG antibody subclasses in human filariasis. Differential subclass recognition of parasite antigens correlates with different clinical manifestations of infection. J. Immunol., 139, 2794-2798.
- 5) Kobayashi, F., En, T., Morii, T., Matsui, T. and Iijima, T. (1985): Characterization of *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens by double immunodiffusion assay. J. Kyorin Med. Soc., 16, 389-396.
- 6) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, London., 227, 680-685.
- 7) Langley, J. G., Kariuki, H. C., Hammersley, A. P., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. and Dunne, D. W. (1994): Human IgG subclass responses and subclass restriction to *Schistosoma mansoni* egg antigens. Immunology., 83, 651-658.
- 8) 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.
- 9) Ljungström, I., Hammarström, L., Kociecka, W. and Smith, C. I. E. (1988): The sequential appearance of IgG subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. Clin. Exp. Immunol., 74, 230-235.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 松田 肇・中尾 稔・森田真奈美・田中 寛 (1984): 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. 寄生虫誌., 33, 163-170.
- 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Muro, A., Cordero, M. and Simon, F. (1992): Differential recognition of *Dirofilaria immitis* antigens by human IgG and IgM positive sera. Preliminary data based on EITB analysis. Trop. Med. Parasitol., 43, 130-131.
 - 17) 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.
 - 18) Owhashi, M. and Ishii, A. (1982): Purification and characterization of a high molecular weight eosinophil chemotactic factor from *Schistosoma japonicum* eggs. J. Immunol., 129, 2226-2231.
 - 19) Owhashi, M., Horii, Y., Ishii, A. and Nawa, Y. (1987): Isolation of two immunogenically different allergens from *Schistosoma japonicum* eggs. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 83, 149-154.
 - 20) Pellegrino, J. and Katz, N. (1968): Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. In Advances in Parasitology, Vol. 6, Dawes, B., ed., Academic Press, New York, 233-290.
 - 21) 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.
 - 22) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4350-4354.
 - 23) Tsang, V. C. W., Peralta, J. M. and Simons, A. R. (1983): The enzyme-linked immunoelectro-transfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods Enzymol., 92, 377-391.
 - 24) Warren, K. S., Boros, D. L., Hang, L. M. and Mahmoud, A. A. F. (1975): The *Schistosoma japonicum* egg granuloma. Am. J. Pathol., 80, 279-294.
 - 25) Woodward, M. P., Young, W. W. J. and Bloodgood, R. A. (1985): Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. Immunol. Methods, 78, 143-153.
 - 26) Yogore, M. G. Jr., 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.
 - 27) 横川宗雄・佐野基人・小島荘明・荒木国興・小川京子・山田 完・下徳辺昭郎・飯島太郎・樋口勝治・早坂成郎 (1971): 千葉県利根川流域の乳牛における日本住血吸虫症の発生について 1. 寄生虫誌., 20, 507-511.

Abstract

SEQUENTIAL CHANGES IN IgM AND IgG SUBCLASS ANTIBODY RESPONSES IN MICE TO EGG ANTIGENS OF *SCHISTOSOMA JAPONICUM* REVEALED BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) AND IMMUNOBLOTTING

HAJIME YOKOI^{1,2}), MASASHI KIRINOKI¹), YUICHI CHIGUSA¹),
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

Antigenic profiles of *Schistosoma japonicum* egg antigens specifically recognized by specific IgM and IgG subclasses in serum pools from BALB/c mice at 8 and 16 wk post-infection (PI) were investigated by immunoblotting. IgM antibody in sera at 8 and 16 weeks strongly bound with egg antigens having a molecular weight (m.w.) range of 58–265 kDa and those of 360 kDa. The IgM binding patterns were similar at 8 and 16 weeks. IgG1 in the sera of 8 wk PI reacted with antigens with a m.w. of more than 40 kDa, whereas that in the sera of 16 wk PI reacted with antigens of m.w. less than 40 kDa. Furthermore, antigens of less than 40 kDa were recognized specifically by IgG1 antibody of 16 wk PI. Both IgG2a and IgG2b in the sera of mice at 8 and 16 wk PI showed very weak binding. IgG3 in the serum of mice at 16 wk PI showed strong binding to antigens of m.w. more than 40 kDa, with a range of 58–265 kDa.

To examine the nature of epitopes of *S. japonicum* egg antigens recognized by specific antibodies various time after infection, the antibody responses to egg antigens treated with pronase or sodium periodate were examined by ELISA. The reactivity of IgM antibodies in serum between 8 and 16 wk PI was decreased against periodate-treated antigen, but not against untreated antigen, suggesting that IgM usually recognized carbohydrate epitopes. The reactivity of IgG1 in serum of mice at 8 wk PI was decreased against both pronase- and periodate-treated antigens, whereas that of IgG1 in serum of mice at 16 wk PI was decreased only against periodate-treated antigens. Therefore, it is suggested that the epitopes of antigens recognized by IgG1 antibodies shift from peptide to carbohydrate with the course of infection.

From these results, it is considered that *S. japonicum* egg antigens exceeding 40 kDa in m.w. are mainly glycoproteins which strongly induce the production of IgM antibodies. In contrast, antigens less than 40 kDa in m.w. may be proteins which show strong antigenicity against only IgG1 antibodies during chronic infection. As IgM, IgG1 and IgG3 antibodies showed reactivity with antigen fraction exceeding 40 kDa in m.w., it is considered that this fraction contains major antigenic components. Furthermore, the antigen fraction of m.w. less than 40 kDa may be a useful indicator for detecting the time of infection with *S. japonicum* because IgG1 antibodies produced at the chronic stage recognize these fractions.