

琉球大学学術リポジトリ

[原著] 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

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学医学部 公開日: 2010-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): Parasite, Strongyloides stercoralis, micro-ELISA, Immunodiagnosis 作成者: 佐藤, 良也, 高井, 昭彦, 真栄城, 純子, 大鶴, 正満, 城間, 祥行, Sato, Yoshiya, Takai, Akihiko, Maeshiro, Junko, Otsuru, Masamitsu, Shiroma, Yoshiyuki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015630

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

佐藤 良也 高井 昭彦 真栄城純子 大鶴 正満
城間 祥行*

琉球大学医学部寄生虫学教室

*那覇市泉崎病院

結 言

糞線虫症は、今日でも広く熱帯、亜熱帯地域に蔓延しており、わが国でも沖縄県を中心に奄美諸島、九州南部にわたって患者が多発している。特に沖縄県では、近年、著しい減少傾向をみせていたその感染率が、ここ数年ほぼ横ばい状態か、むしろ増加する傾向にある。

本症は、糞便の培養法によって確実に検査し得るとされているが、方法が繁雑であることや感染の危険があること、結果が出るまでに数日間かかることなどの問題点も指摘されていた。また、本症は無症状に近い状態で経過する場合が多く、このような軽感染例では糞便培養法でも検出率は必ずしも高くないことが最近の調査で明らかになってきた。他方、かかる軽感染例が例えば免疫抑制療法を受けた時などに突如として重感染の状態をきたし、死亡する例のあることが良く知られており、このような場合も予測し得る診断的価値の高い免疫検査法の導入が望まれていた。また、患者の病態は多彩であり、これを免疫状態との関連で検討することによって、本症の重症化のメカニズムを免疫学的観点から解析することも重要と思われる。しかし、このような免疫診断や免疫学的解析の基礎となる免疫検査法は、本症に関するかぎりまだほとんど手つかずの状態にあり、これまでに幼虫を抗原とした蛍光抗体法などが若干試みられているにすぎない。

以上の観点から、先ず著者らは糞線虫症患者糞便の大量培養と、これによって得られた幼虫

からの抗原調製法、さらにこれを用いた酵素抗体法による免疫診断の可能性を検討してみたので報告する。

材料および方法

1) 糞線虫の培養

糞線虫 *Strongyloides stercoralis* は、那覇市泉崎病院を受診した5名の糞線虫症患者の糞便を濾紙培養して得た幼虫を用いた。幼虫の大量採取を目的とした糞便の大量培養法はFig. 1に示したごとく、57 cm×14 cmの大型濾紙に型通り下側3 cmを残して全面に患者糞便を塗抹し、直径約9 cm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、25°Cで7~10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って、患者のほぼ全便を培養することができ、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することによって培養水の汚れを防ぎ、清浄な幼虫浮遊液を大量に得ることができた。培養水は培養4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

幼虫は冷リン酸緩衝液(0.005 M PB, pH 7.2)で3,000 rpm, 15分間の遠心洗浄を5回行ったのち、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、抗原抽出を行った。抽出液は20,000 rpm, 30分間遠心し、

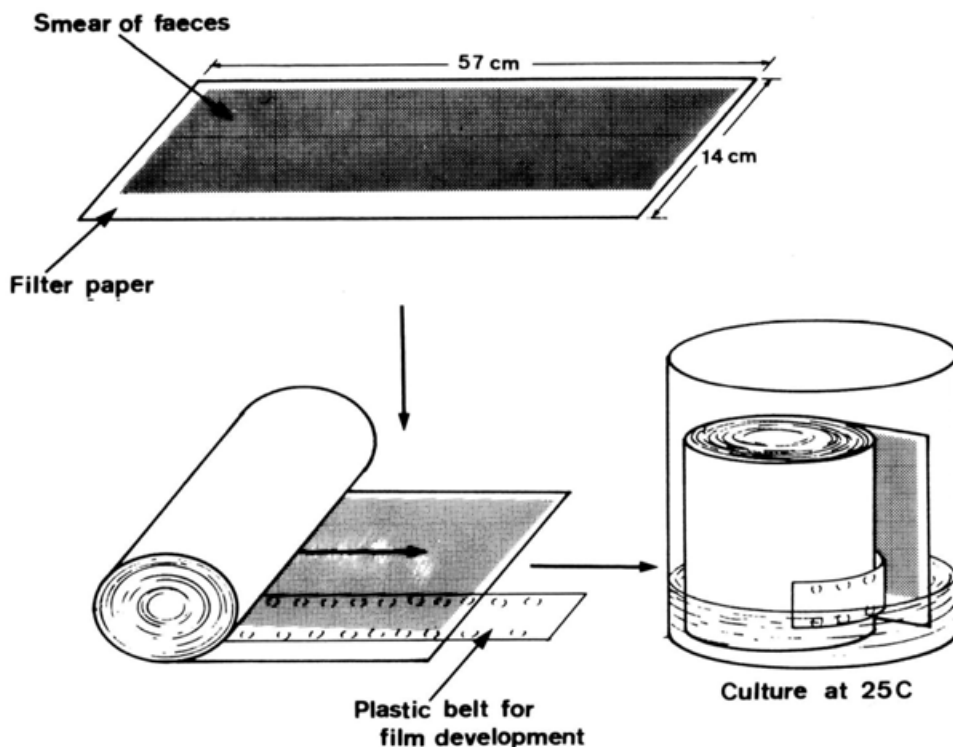


Fig. 1 The faecal culture method to collect a large quantity of larvae for antigen.

その上清液を抽出抗原とした。また、幼虫の一部をPB中で飼養し、幼虫からの分泌、排泄物質 (ES抗原)も採取した。ES抗原の採取法はFig. 2に示したが、幼虫浮遊液を直径18 mm、長さ45 mmのプラスチック製フィルターチャンバー (Milli-Fil: Millipore)に入れ、25 Cで48時間飼養した。この間、ペリスタリックポンプを用いて5 ml/時間のPBを連続的にチャンバー内に流し、幼虫からの分泌、排泄物質をミリポアフィルター (ポアサイズ0.8 μ m)を通して集めた。これらの抗原はいずれも凍結乾燥法により濃縮後、Lowry-Folin法¹⁾で蛋白量を測定し、-20 Cに凍結保存した。

3) 抗血清

糞線虫幼虫抽出抗原に対する抗血清 (anti-

Ss) は家兎を免疫して作製した。抽出抗原は蛋白量1.98 mg/mlであったが、その1.0 mlを等量のFreund's complete adjuvant (Difco)と混和し、家兎の大腿ならびに背側の筋肉内の十数カ所に注射して免疫した。同じ免疫処理を1週間間隔で2回行い、その4週後さらに1回の追加免疫を行った。家兎は免疫開始後、1週間毎に耳静脈より採血し、最終免疫の2週間後には全採血して抗血清を分離した。

広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis*, イヌ糸状虫 *Dirofilaria immitis*, イヌ鉤虫 *Ancylostoma caninum*, イヌ蛔虫 *Toxocara canis* に対する抗血清も、感染ラットおよび感染イヌから各々採取した虫体の抽出抗原を同様に家兎に免疫して作製した。

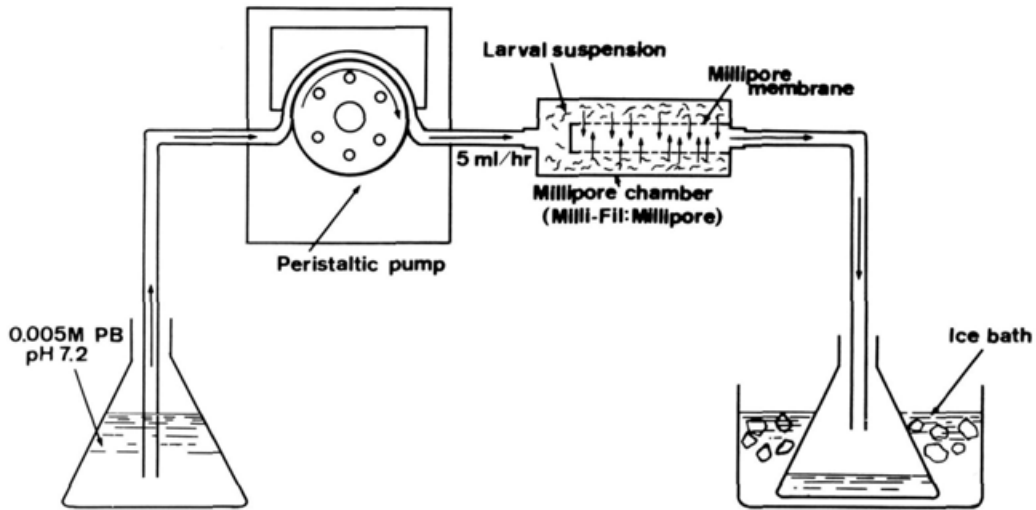


Fig. 2 The method for continuous collection of metabolic products(excretions and secretions:ES antigen) of larvae.

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。また、同じ集団検診において糞線虫の寄生が認められなかった住民32名の血清についても検査し、結果を比較した。

5) 標識抗体および基質

標識抗体はペルオキシダーゼ標識山羊抗体(Miles-Yeda)を用いた。免疫家兔の血清抗体の測定は抗家兔IgG(Lot NoS 905)、患者血清抗体の測定は抗ヒトIgG(γ -chain specific: Lot NoS 233)および抗ヒトIgM(μ -chain specific: Lot NoS 161)で行った。

基質は5-アミノサルチル酸(5-AS:関東化学)を用い、その80mgを70°Cの蒸留水100mlに溶解し、NaOHでpH 6.0に修正したものに、使用直前、1/10量の0.05% H_2O_2 を加えて基質溶液を調製した。

6) Ouchterlony法およびcounter immunoelectrophoresis

Ouchterlony法²⁾およびcounter im-

munoelectrophoresis(CIE)³⁾は、いずれもペロナール-塩酸緩衝液(pH8.6, $\mu=0.1$)で1.2%になるように加熱溶解したAgar-Noble(Difco)をガラス板上に流して固め、厚さ1.5mmの寒天平板を作製して用いた。Ouchterlony法は、これに直径5mmと8mmの穴を5mmの間隔で開け、各々に被検血清と抗原液を満たして24時間後に沈降線形成の有無を観察した。CIEは同様に直径3mmの穴を5mmの間隔で開け、陰極側の穴に抗原液、陽極側の穴に被検血清を入れ、4mA/cmの定電流で1時間電気泳動を行った。泳動終了後、直ちに沈降線形成の有無を判定した。

7) 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)⁴⁾に準拠し、1)プレート抗原感作、2)被検血清反応、3)標識抗体反応、4)基質反応(発色)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0.3ml/穴とした。抗原液

は 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で蛋白濃度を調整し、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% Tween 20 を含む 0.15 M PBS (pH 7.2) を洗浄液とし、その 0.4 ml 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。被検血清は 0.15 M PBS で希釈し、反応は 37 C で 1 時間行った。プレート洗浄後、0.05% Tween 20 と 1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で希釈した標識抗体を同様に 1 時間反応させ、再びプレートを洗浄したのち、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、室温下、1 時間行った。反応終了後、25 μ l の 1N NaOH を加えて酵素反応を停止させ、直ちに吸光度

(OD) をプレート直読式分光光度計 (コロナ MTP-12) を用いて波長 449 nm で測定した。

結 果

1) Ouchterlony 法による検討

調製した抗原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 Ouchterlony 法で検討した。Fig. 3 は幼虫の抽出抗原で免疫した家兎血清 (anti-Ss) と各種寄生虫抗原との間の反応性を調べたもので、糞線虫幼虫抽出抗原 (Ss) との間で著明な沈降線が形成されたが、ES 抗原との間で沈降線の形成はみられなかった。沈降線は糞線虫以外の寄生虫抗原との間でも認められ、特に広東住血線虫抗原 (Ac) との間の沈降線が著明であった。

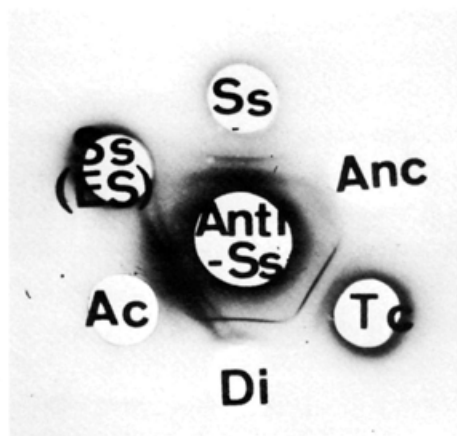


Fig. 3 Ouchterlony plate showing precipitin bands between antiserum to larval extract (anti-Ss) and various homologous and heterologous antigens.

Ss, Ac, Tc, Di and Anc: antigens of *S. stercoraris*, *A. cantonensis*, *T. canis*, *D. immitis* and *A. caninum*.

ES: ES antigen of *S. stercoraris* larvae.

Fig. 4は抽出抗原と10名の患者血清との間でOuchterlony法を行った結果であるが、10名中5名の患者血清との間で弱いながら明らかな沈降線の形成を認めた。

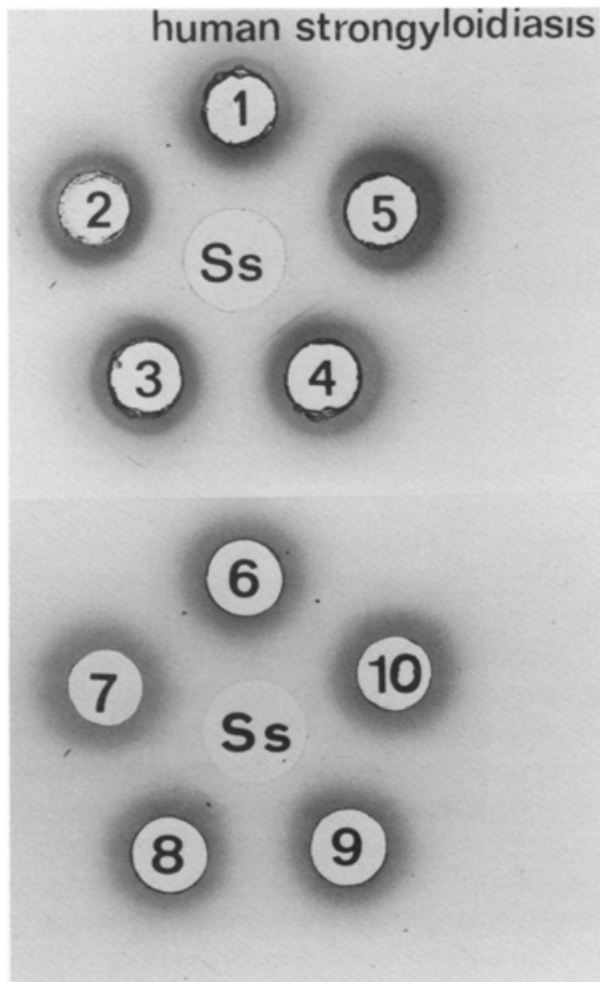


Fig. 4 Ouchterlony plate showing precipitin bands between larval extract(Ss) and sera from human strongyloidiasis.

1-10: sera from 10 different patients.

2) CIEによる検討

Ouchterlony法において、幼虫のES抗原が陽性の反応を示さなかったが、その原因としてES抗原の蛋白濃度の不足が考えられた。このため、

ES抗原と上記10名の患者血清の間でより鋭敏なCIEを実施した。結果をFig.5に示したが、ES抗原は6名の患者血清と沈降線を形成し、ES抗原にも患者血清との間の反応性を認めることが



Fig. 5 Counter immunoelectrophoresis between ES antigen and sera from human strongyloidiasis.

Wells of anode side: sera from 10 different patients.

Wells of cathode side: ES antigen.

できた。

3) ELISAにおける至適抗原濃度、血清濃度の検討。

micro-ELISAを行うにあたり、抗原および被検血清の至適濃度を検討した。抗原液と被検血清 (anti-Ss) を倍数希釈し、それらを各々組

み合わせて行った反応を比較した結果、抽出抗原の場合、Fig.6に示したごとく、抗原希釈1:160、被検血清希釈1:320以下で高い抗体価を示した。ES抗原では、抗原と血清の希釈が各々1:80、1:160以下で良好な反応性を示した (Fig.7)。この結果をもとに、反応のend-pointを抗原

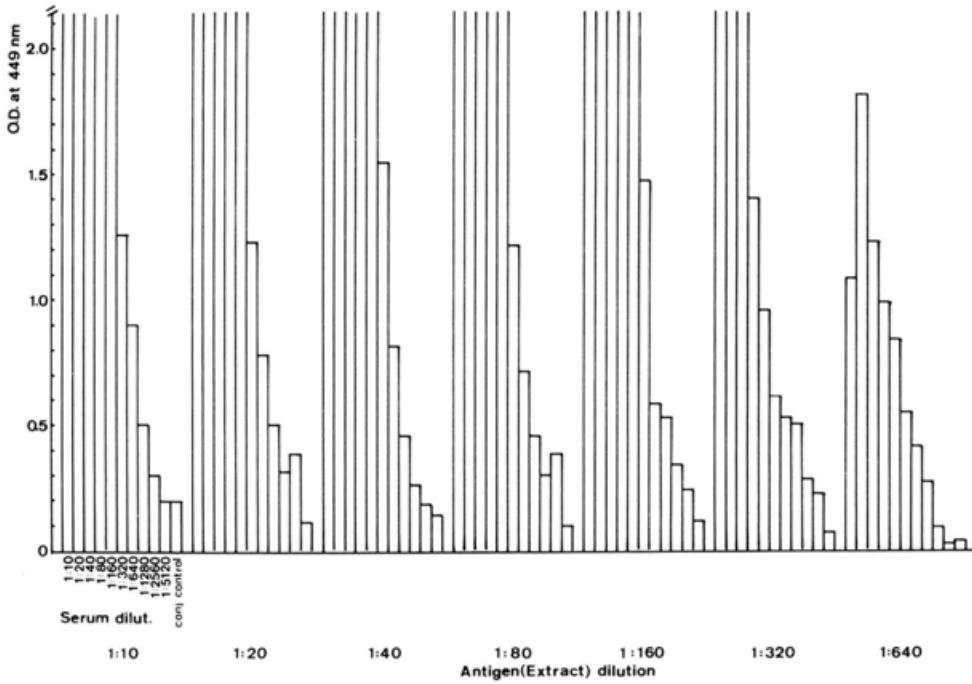


Fig. 6 ELISA reactions of antiserum(anti-Ss) to larval extract at various dilutions of serum and antigen.

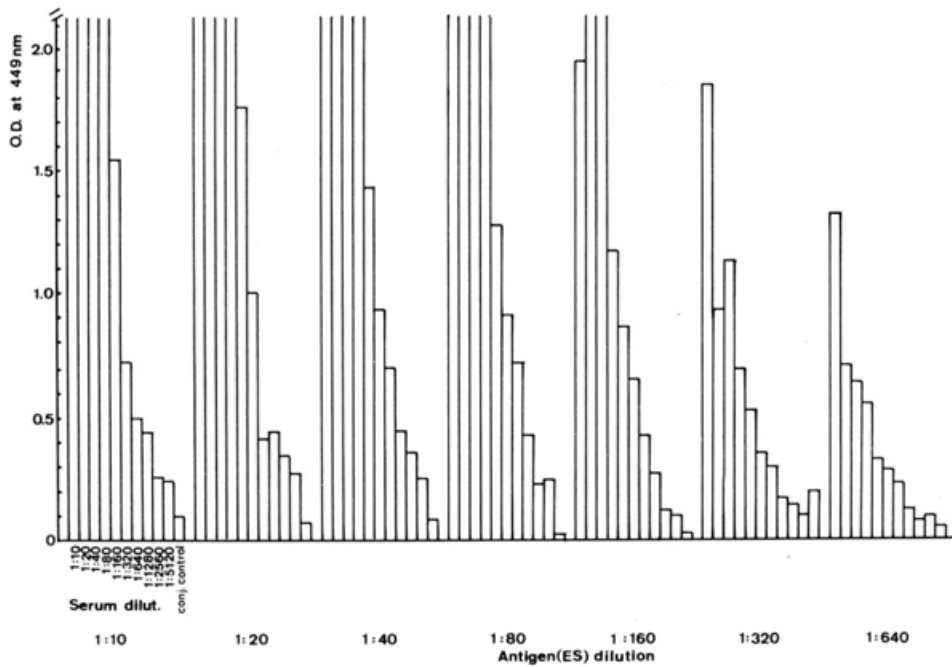


Fig. 7 ELISA reactions of antiserum(anti-Ss) to ES antigen at various dilutions of serum and antigen.

希釈と被検血清希釈の関係で示したのがFig. 8である。通常、micro-ELISAで陰性の反応とみなされるOD 0.5以下の値は、抽出抗原の場合、血清希釈が1:10~1:160の間で抗原希釈が1:1280以上、血清希釈が1:320~1:640では抗原希釈が1:160~1:320以上の組み合わせで得られ、血清希釈1:1,280以上ではいずれの抗原濃度でも反応は陰性であった。ES抗原では、血清希釈が1:10~1:160の間で抗原希釈が1:160~1:640を越えると反応は陰性とな

り、この場合にも血清希釈が1:1,280以上になるといずれの抗原濃度を用いても陽性の反応は得られなかった。非特異反応を可及的に除外した至適希釈度を求めるために、抗原と抗血清を比較的高い希釈度で組み合わせた場合の陽性反応をみると、抽出抗原では抗原希釈1:320と血清希釈1:160、ES抗原は抗原、抗血清ともに1:160の希釈度の組み合わせで良好な陽性反応を示した。この抗原希釈度における蛋白濃度は抽出抗原が6.2 µg/ml、ES抗原が4.7 µg/ml

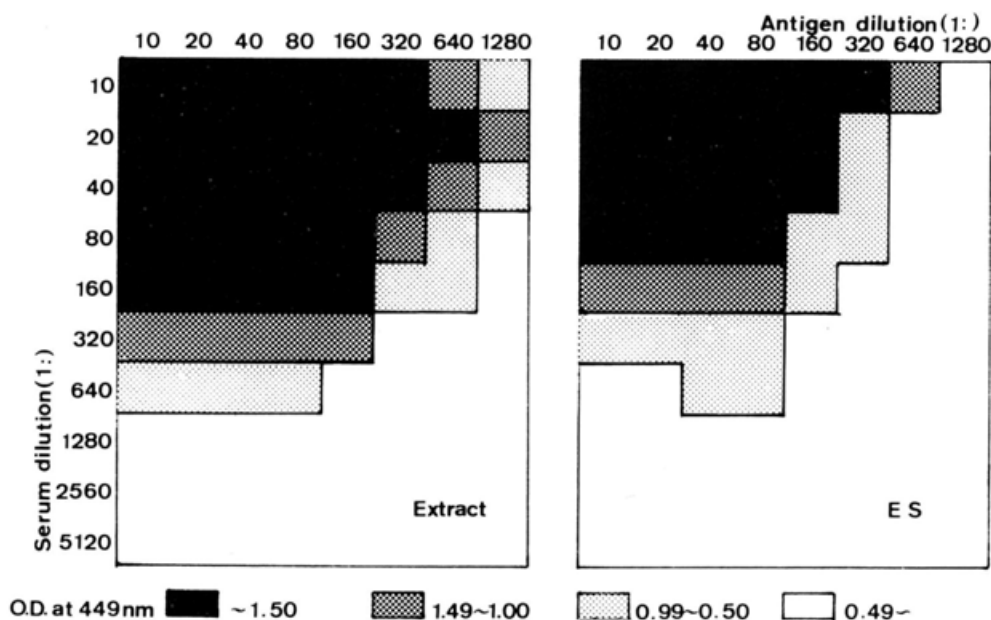


Fig. 8 Results of block-titration between antibody (anti-Ss) and antigens (larval extract and ES antigen) to determine the appropriate concentrations of antigen and antibody.

であった。

4) 家兎血清抗体価の測定

上記の結果をもとに、抽出抗原の希釈度を 1 : 320, ES 抗原を 1 : 160 とし、血清希釈 1:80, 1:160, 1:320 で測定した免疫家兎血清

(anti-Ss) の抗体価を経時的に示したのが Fig. 9 である。いずれの抗原を用いた場合にも、免疫開始 10 日目以降、急激な抗体価の上昇を捉えることができた。抽出抗原と ES 抗原の間で反応性を比較すると、免疫後いずれの時期でも抽出

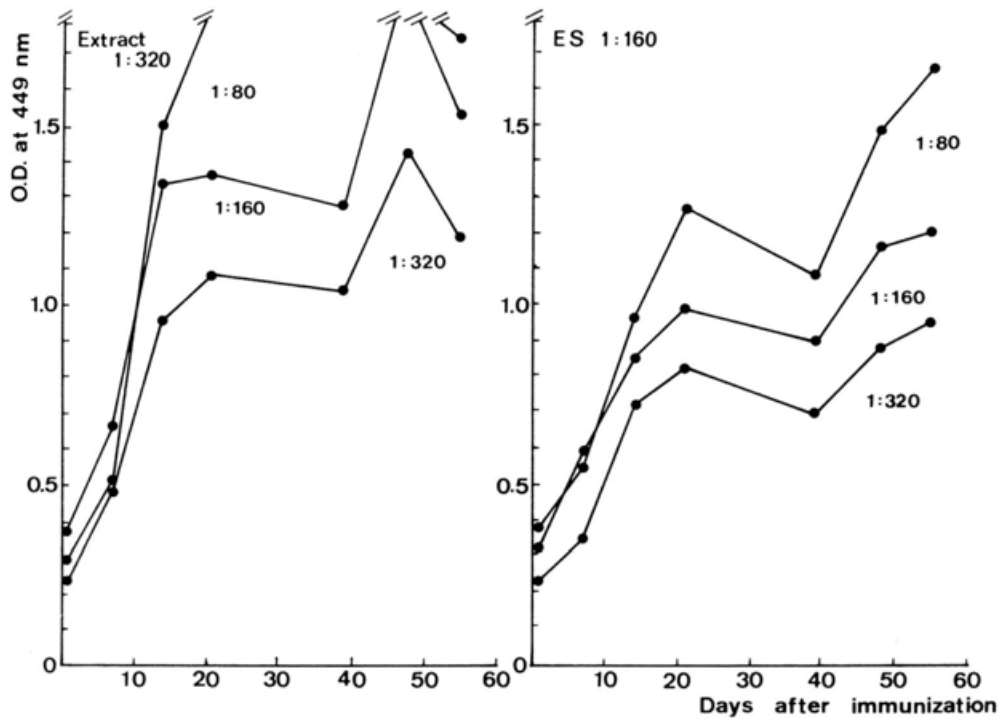


Fig. 9 Antibody responses in sera of a rabbit immunized with larval extract by the micro-ELISA using the larval extract and ES antigen.

抗原を用いた場合の反応性が著明に高かった。

Fig. 10は抽出抗原、ES抗原の希釈を各々 1:200, 1:100 とし、対応する anti-Ss と非対応の 4 種寄生線虫に対する抗血清の抗体価を測定した結果である。両抗原とも対応する anti-Ss の反応性が非対応の抗血清のそれよりも明らかに高かった。非対応抗血清のうち、広東住血線虫に

対する抗血清の抗体価が比較的高く、他の 3 種の非対応抗血清の抗体価はほぼ同程度の低いものであった。ES 抗原では、対応する anti-Ss の反応が抽出抗原を用いた場合に比較して低く、逆に非対応抗血清における反応が高かったため、結果として、対応、非対応の抗血清間の抗体価の差は抽出抗原に比べて少なかった。

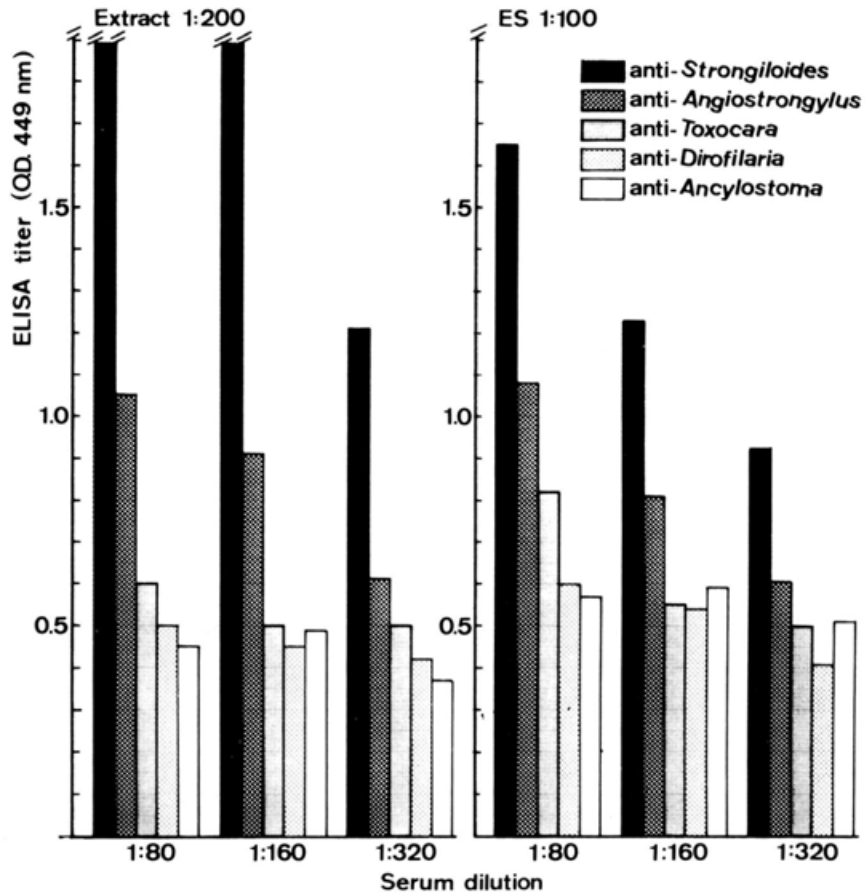


Fig. 10 ELISA reactions of sera from rabbits immunized with extracts of *S. stercoraris*, *A. cantonensis*, *T. canis*, *D. immitis* and *A. caninum* to the larval extract of *S. stercoraris*.

5) 患者血清抗体価の測定

Fig. 11は抽出抗原を各々 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ に調整し、糞線虫症患者および集団検診において糞線虫の感染が確認された一般住民の血清を1:100に希釈して実施したmicro-ELISAの抗体価を示したものである。糞線虫陽性者の血清はほとんどがOD 0.7を越える高い抗体価を示し、その平均力価もOD 1.0前後の高い値であったが、対照とした糞線虫陰性者血清は1例

のみが高い値を示しただけで他はいずれも低く、平均抗体価もOD 0.4以下であった。抗原濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ の間で、これらの抗体価には大きな差はみられず、平均抗体価もほとんど変らなかった。しかし、抗体価を免疫グロブリンクラス別に測定してみると、糞線虫陽性者における抗体のほとんどがIgGクラスのものであり、IgM抗体が陽性の反応を示した例は1例もなかった。

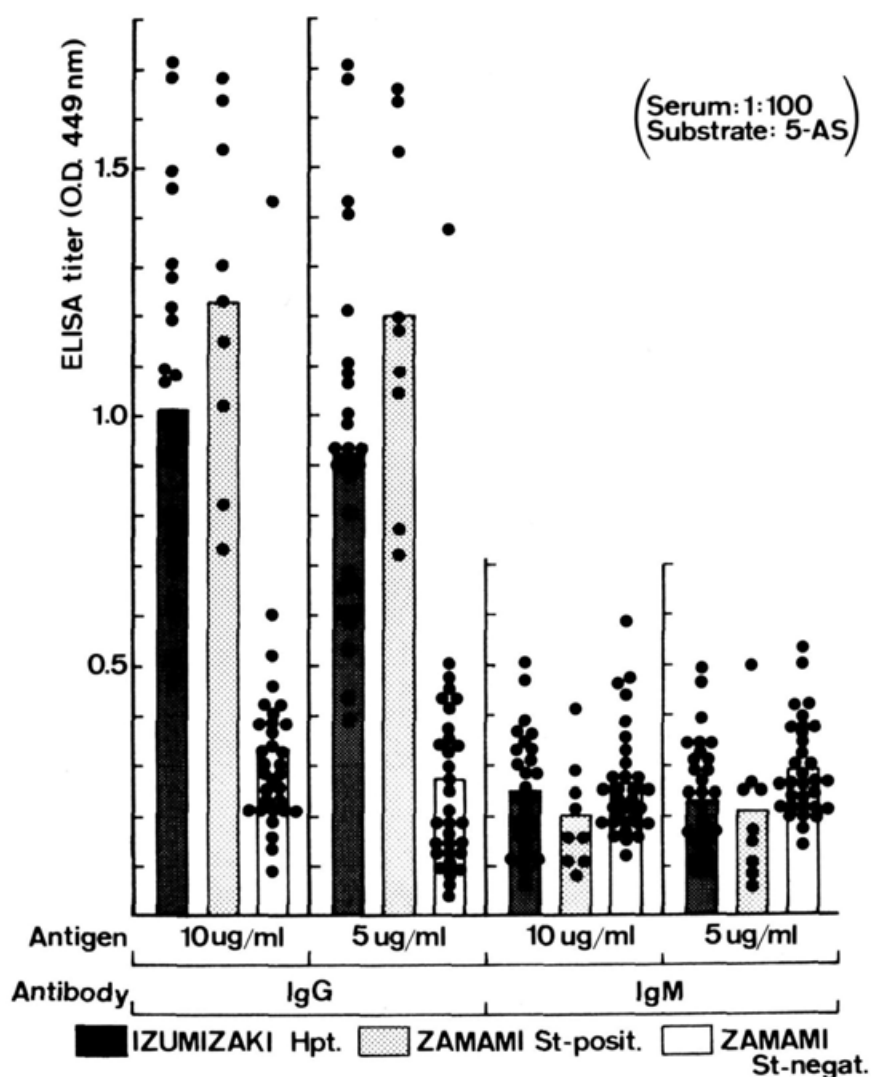


Fig. 11 ELISA responses of sera from human strongyloidiasis. Antigen(larval extract) at concentrations of 5 and 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ was used, and antibody levels were measured separately for IgG and IgM using anti- γ chain(IgG) and anti- μ chain(IgM) antibody conjugates. IZUMIZAKI Hpt.: sera from patients in Izumizaki hospital. ZAMAMI St-posit.: sera from Strongyloides-positive inhabitants on Zamami Island. ZAMAMI St-negat.: sera from Strongyloides-negative inhabitants as control.

考 察

糞線虫症研究の歴史は比較的長く、臨床、病理学的、また、形態、生態学的研究が数多くみられる。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⁵⁻⁸⁾、臨床的立場からは城間らが一連の報告を行っている⁹⁻¹³⁾。しかし、人体における糞線虫症に関するこれまでの報告は、その多彩な病態を反映して大半が症例報告や治療経験に関するものであり、内外を問わず、その病態病理に関する解析的な研究はきわめて少ない。特に免疫学的立場からの研究はまだほとんど手つかずの状態にあり、我が国では佐藤が1933年に行った古い報告があるのみである¹⁴⁾。国外でも Brannon & Faust(1949)¹⁵⁾、Rifaat *et al.*(1977,1979)^{16,17)}が抗原の作製を試み、Dafalla(1972)¹⁸⁾、Ambroise-Thomas *et al.*(1974)¹⁹⁾、Coudert *et al.*(1975)²⁰⁾、Trobouley-Duret *et al.*(1976)²¹⁾が幼虫を抗原とした間接蛍光抗体法や抽出抗原による皮内反応を試みているにすぎない。その理由として、本線虫は動物を用いた感染実験が困難であり、実験室内で継代維持することができないことや虫体が微小であり、充分な量の抗原を得ることが困難であることなどがあげられる。

今回、著者らは5名の比較的重症例の患者糞便を大量に濾紙培養する方法を工夫し、清浄な幼虫浮遊液を大量に得ることができた。得られた幼虫の一部は破碎後、抗原抽出を行い、残りは48時間飼養し、その間の代謝、排泄物質(ES抗原)を連続的に採取した。抽出抗原は、これで免疫した家兎の抗血清(anti-Ss)との間でOuchterlony法を行い、著明な沈降線の形成を認めることができた。また、10名中5名の患者血清との間でも弱いながら沈降線を形成し、抽出液の抗原性(antigenicity)と患者血清中の本線虫に対する特異抗体の存在を確認することができた。ES抗原はOuchterlony法では明瞭な沈降線を形成しなかったが、これは使用した抗原の蛋白濃度の不足が原因と考えられ、通常、Ouchterlony法の50倍の鋭敏度を有するとされるCIEを実施することによって、ES抗原にも

患者抗体に対する抗原性の存在を認めることができた。

抽出抗原は、広東住血線虫、イヌ蛔虫、イヌ糸状虫など、非対応の他種線虫抽出抗原に対する抗血清との間でも沈降線を形成し、著明な交差反応の存在を認めることができた。本線虫の場合も、他種線虫類がそうであるように、種間でかなりの交差反応性の存在することが予想されてはいるが、実際にこのような交差反応性を検討した例はなく、わずかにイヌ糸状虫抽出抗原を用いた補体結合反応によって糞線虫感染者の血清抗体を検出し得ることを報告したのがあるだけである²²⁾。後述するようなmicro-ELISAにおける交差反応も含め、このような他種寄生線虫類との類属反応の存在は、糞線虫症の蔓延地域では今日なお他種線虫感染症も高度に浸淫している現状を考え合わせると、無視できない問題であり、特に沖縄県の場合、我が国における唯一の広東住血線虫症浸淫地域であり、本線虫と広東住血線虫との間で著しい交差反応の認められたことは免疫診断上十分に考慮されなければならないことと思われる。

得られた抗原はいずれもかなり濃縮したが、蛋白濃度は抽出抗原でわずかに1.98 mg/ml、ES抗原は0.75 mg/ml、液量も各々9.0 ml、3.7 mlしかなかった。かかる少量の抗原しか得られないことから、充分な量の免疫学的検査を実施するためには、微量の抗原量を用いて、しかも感度の高い免疫検査法を導入することが不可欠であり、このため、micro-ELISAによる免疫検査の可能性を検討した。反応の至適抗原、抗血清濃度を求めるために行ったblock titrationの結果、非特異的反応が少なく、比較的良好な反応性を示す至適抗原希釈は抽出抗原で1:320(蛋白濃度6.2 µg/ml)、ES抗原で1:160(蛋白濃度4.7 µg/ml)、抗血清濃度は1:160程度と判断され、この条件で免疫家兎の抗体価を測定し、免疫開始後の急激な抗体価の上昇を捉えることができた。両抗原とも、対応するanti-Ssに対する反応性が非対応の抗血清に対するよりも著明に高かった。しかし、ES抗原では対応する抗血清に対する反応が低い反面、非対応抗血清、特

に広東住血線虫に対する抗血清との間の反応が高く、抽出抗原に比べて特異性に欠ける面がみられた。抽出抗原はまた、糞線虫陽性者の間で本線虫に対する著明なIgG抗体を検出し得た。本法における陽性の判定基準を設けるために、厳密には本症の非浸淫地域住民血清を陰性対照とする十分な検討が必要とされるが、今回得たような糞線虫陽性者と陰性者との抗体反応の明らかな差は、本法が免疫検査として応用し得ることを示唆するものと考えられる。ここで用いたmicro-ELISAの方法によれば、使用する抗原濃度は5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度で充分である。また、マイクロタイタープレートを用いることによって被検血清1検体の検査に要する抗原液量は0.3ml (蛋白量1.5 μg)で良く、今回と同じ程度の抗原量が得られれば、本法によって約1万検体の検査が実施できることになり、個々の免疫診断法にとどまらず、さらにスクリーニングテストとして広汎な疫学調査への応用も可能であると思われる。

ま と め

糞線虫症の免疫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り得た幼虫からの抗原調製とmicro-ELISAによる免疫検査法の検討を試みた。抗原には破碎した幼虫から抽出した抽出抗原と生幼虫を48時間飼養して得た分泌、排泄抗原を用いた。抽出抗原で免疫した家兎の抗血清や患者血清とこれら抗原との間で寒天ゲル内沈降反応 (Ouchterlony法, counter immunoelectrophoresis) を行い、明らかな沈降線の形成を認めることができた。これらの抗原を5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度でmicro-ELISAに用いた結果、免疫家兎における抗体価の上昇を適格に捉えることができた。また、糞線虫陽性者と陰性者血清の間で測定した抗体価は、陽性者血清で高い値を示し、糞線虫陰性者血清との間に大きな差が認められた。以上の結果より、大量培養した幼虫から抗原を調製することは可能であり、微量の抗原を用いた感度の高いmicro-ELISAによって糞線虫症の免疫学

検査を実施し得ることを確認した。

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。

文 献

- 1) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 2) Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Prog. Allergy* 6: 30-154, 1962.
- 3) Prince, A.M. and Barke, K.: Serum hepatitis antigen(SH): Rapid detection by high voltage immunoelectroosmophoresis. *Science* 196: 593-595, 1970.
- 4) 中尾稔, 松田肇, 田中寛, 永田傳: 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, 1981.
- 5) 田中寛: 糞線虫症の研究. I. 奄美大島に於ける疫学的観察. *順天堂医学雑誌* 3: 22-30, 1957.
- 6) 田中寛: 糞線虫症の研究. II. 培養法の検討と各期虫体の形態的研究. *順天堂医学雑誌* 3: 91-100, 1957.
- 7) 田中寛: 糞線虫症の研究. III. 実験感染例及び自然感染例における経過, 症状, 治療法等の研究. *順天堂医学雑誌* 7: 155-162, 1975.
- 8) Tanaka, H.: Experimental and epidemiological studies on strongyloidiasis of Amami Oshima Island. *Jap. J. Exp. Med.* 28: 159-182, 1958.
- 9) 城間祥行: 沖縄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. *お茶の水医学雑誌* 7: 1501-1506, 1959.
- 10) 城間祥行: 沖縄における糞線虫症の研究. II. 糞線虫症重症例の観察. *お茶の水医学雑誌* 7:

- 1507-1515, 1959.
- 11) 城間祥行：沖縄における糞線虫症の研究。III。Gentiana violetの糞線虫寄生雌成虫駆虫効果について。お茶の水医学雑誌 7：1515-1524, 1959.
 - 12) 城間祥行, 上塚俊逸, 松岡昇, 田中寛：サイアベンダゾールによる糞線虫症の治療。沖縄医学会雑誌 11: 76-79, 1971.
 - 13) 城間祥行, 真境名豊次, 内原栄輝, 安座間清：重症糞線虫症例の検討。沖縄医学会雑誌 13：97-100, 1976.
 - 14) 佐藤佐一：糞線虫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。福岡医科大学雑誌 26: 1526-1586, 1933.
 - 15) Brannon, M.J. and Faust, E.C.: Preparation and testing of a specific antigen for diagnosis of human strongyloidiasis. Am. J. Trop. Med. 29: 227-239, 1949.
 - 16) Rifaat, M.A., Salem, S.A., Abdel-Aal, T.M. and Attia, M.M.: Effect of enzymes on the serological activity of the antigen of *Strongyloides stercoralis*. The First Mediterranean Conference on Parasitology, Izumir, 5-10 October, 1977.
 - 17) Rifaat, M. A., Salem, S. A., Abdel-Aal, T. M. and Attia, M. M. : Effect of temperature on the serological activity of the antigen of *Strongyloides stercoralis*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 9: 81-87, 1979.
 - 18) Dafalla, A. A. : The indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of strongyloidiasis. J. Trop. Med. Hyg. 75: 109-111, 1972.
 - 19) Ambroise-Thomas, P., Yoeli, M. and Scheinsson, G. P. : Étude serologique de la strongyloidose humaine par immunofluorescence indirecte-applications pratiques au diagnostic et au contrôle post-therapeutique. Third International Congress of Parasitology, Munich, 25-31 August, 1974.
 - 20) Coudert, J., Ambroise-Thomas, P., Kien, T. T. and Pothier, M.A. : Diagnostic serologique de l'anguilllose humaine par immunofluorescence (resultats preliminaires) . Bull. Soc. Pathol. Exot. 61: 74-80, 1968.
 - 21) Tribouley-Duret, J., Tribouley, J. and Pautrizel, R. : Intéret des tests d'allergie cutanée pour le diagnostic de la strongyloidose. Bull. Soc. Path. Exot. 69: 360-367, 1976.
 - 22) Kanani, S. R. and Rees, P. H. : 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, 1970.

Studies on the Preparation of Antigen and Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Immunodiagnosis of Strongyloidiasis

Yoshiya Sato, Akihiko Takai, Junko Maeshiro
Masamitsu Otsuru and Yoshiyuki Shiroma*

Department of Parasitology, School of Medicine, University of the Ryukyus
* Izumizaki Hospital, Naha

Key words: Parasite, *Strongyloides stercoralis*, micro-ELISA, Immunodiagnosis

The preparation of antigen from the larvae of *Strongyloides stercoralis* obtained by faecal mass-culture and the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (micro-ELISA) using the antigen for immunodiagnosis of human strongyloidiasis were tried.

The larval extract and metabolic products (ES antigen) after cultivation of living larvae for 48 hours were prepared as antigen. These antigens formed obvious precipitin bands in the gel-diffusion tests (Ouchterlony test and counter immunoelectrophoresis) with antiserum of a rabbit immunized with the larval extract and with sera from human strongyloidiasis. When the antigens were further applied to the micro-ELISA at protein concentrations of 5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a rapid rise of antibody level could be detected in the rabbit after immunization with the larval extract. The ELISA titers were also higher in human strongyloidiasis than those in *Strongyloides*-negative controls.

The results indicate that the micro-ELISA technique developed in the present study can be used for immunodiagnosis of strongyloidiasis.