

有鉤囊虫症の免疫学的研究

—有鉤囊虫囊胞液抗原の抗原分析—

奈良県立医科大学寄生虫学教室

相 坂 章 爾

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON CYSTICERCOSIS CELLULOSAE —ANALYSIS OF ANTIGENS IN *CYSTICERCUS CELLULOSAE* CYST FLUID—

AKIYOSHI AISAKA

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received March 26, 1990

Summary: In this study, the antigenic components of cyst fluid antigen of *Cysticercus cellulosae* (Ccf Ag.) were analyzed by three methods; two-dimensional immunoelectrophoresis (Two-DI: first electrophoresis with agarose gel, with polyacrylamide gel or with isoelectric focussing); gel filtration; and western-blotting method against rabbit anti-serum and sera of cerebral cysticercosis cellulosae patients.

In the three different Two-DI methods, Ccf Ag. showed at least 6 precipitin arcs (one in β to slow α , 3 in β to α and 2 in fast γ regions). Three precipitin arcs and one arc were detected at the positions of 152 kDa and 418 kDa, respectively. Three arcs and one arc were detected within the ranges of pH 4.4 to 6.4 and of pH 4.4 to 5.4, respectively.

The Ccf Ag. was subjected to molecular sieving chromatography using Sephadex G-200. Protein amounts and antigenic activities were monitored by optical absorbance at 280nm (A_{280}), and antigen-binding activity with ELISA. The second peak (F-II) of A_{280} (152 kDa) was found to have the strongest binding to the anti-Ccf specific rabbit serum (Anti-Ccf abs).

Furthermore, F-II fraction was analyzed using isoelectric focussing and subsequent western-blotting technique. The band of pI 5.40 to 5.50 was immuno-stained not only with the Anti-Ccf abs but also with the sera of cerebral cysticercosis cellulosae patients.

These results indicate that antigenic substance (molecular weight: 152 kDa, pI: 5.40 to 5.50) was recognized as the specific and useful antigen for serodiagnosis of cysticercosis cellulosae.

Index Terms

Cysticercus cellulosae, antigen analysis, cyst fluid antigen, two-dimensional immunoelectrophoresis, gel filtration, western-blotting

緒 言

有鉤囊虫症 (cysticercosis cellulosae) の確定診断は寄生組織中の有鉤囊虫を摘出し、直接、顕微鏡にて虫体を組織病理学的に診断する事による。ところが、脳有鉤

囊虫症の診断は、その囊虫の摘出が困難な為に、診断における血清学的診断法の必要性は極めて重要となり、その体系化が急がれている。当教室においては以前より、有鉤囊虫症の血清診断法の検討を行い、ゲル内二重拡散法を用いた circulating antigen の検出及びその診断へ

の応用(森田, 1984¹⁾), ゲル内二重拡散法を用いた特異抗体の検出及びその診断への応用(荒木, 1987²⁾; 瀬川, 1988³⁾), ELISA法を用いた有鉤囊虫症スクリーニング法の検討(八木, 1989⁴⁾)等の報告を行っている。更に, これらいずれの報告も有鉤囊虫の抗原のうち, 有鉤囊虫囊胞液抗原(cyst fluid antigen, Ccf Ag.)が特異性と感受性において最も優れた抗原であるという結論となっている。今回著者はこのCcf Ag.を用い, ゲル濾過法及び種々の電気泳動法を行い, その抗原性について分析し, 血清学的診断法に使用する為, 更に特異性の高い抗原物質の検索を目的とした。

材 料

(1) 有鉤囊虫囊胞液抗原(Ccf Ag.)の作製

韓国済州島の農家で飼育されていた有鉤囊虫自然感染ブタ14頭(雄5頭, 雌9頭)を使用し, 採血, 屠殺, 解体して, そのうち3頭の筋肉中より有鉤囊虫の囊胞を損傷する事なく宿主組織より剝離し, Fig.1のシェーマに示す様な有鉤囊虫虫体を分離摘出し, 滅菌生理食塩水にて数回洗浄した後, 囊虫の囊胞壁を滅菌ツ反用ディスポーザブルシリンジを用いて穿刺し, 囊胞液のみを注意深く採取, 無菌的に処理した後, 4°C, 10,000 rpmで30分間遠心, その上清をseamless cellophane tube(Union Carbide社製)に入れ, 4°Cの蒸留水に対して12時間透析し, 凍結乾燥した物をCcf Ag.とした。また, 同抗原蛋白質量はLowry *et al.* (1951⁵⁾)の方法で測定したところ, 乾燥粗抗原1mg中182 µgであった。

(2) 有鉤囊虫体部抗原(Ccb Ag.), 有鉤囊虫囊胞壁抗原(Ccw Ag.), 無鉤条虫抗原(T. sag Ag.)の作製

分離したCcb, Ccw, 更にT. sag受胎節を集め0.1%滅菌食塩水で十分洗浄し, それぞれ滅菌ガラスホモゲナイザーで磨砕した後, 乳鉢に入れて凍結し, 乳棒で粉末状になるまで叩き, 融解しかけた段階で再び凍結, この操作を数回繰り返した。更にCcf Ag.作製時と同様に遠心, その上清を透析, 凍結乾燥した物をCcb Ag., Ccw Ag., T. sag Ag.とした。なお, 蛋白質量はCcb Ag., Ccw Ag., 及びT. sag Ag.の乾燥粗抗原1mgにつきそれぞれ200 µg, 153 µg, 420 µgであった(Lowry *et al.*, 1951⁵⁾)。

(3) 脳有鉤囊虫症患者血清及び有鉤囊虫感染ブタ血清

脳有鉤囊虫症患者血清と有鉤囊虫感染ブタ血清中, オクタロニー法でCcf Ag.に対し, 適当な抗体価を持ち, 沈降線の出現状況が良好と確認された血清をそれぞれ2検体ずつ選び, 等量に混和し, ゲル濾過分画のELISA法による抗原活性の検討に使用した。また免疫転写法によ

るCcf Ag.の抗原性の検討では, 同様に脳有鉤囊虫症患者血清8検体(そのうち, 八木の報告⁴⁾での抗体価陰性のnon responder 3名を含む)を使用した。

(4) 無鉤条虫症患者血清

無鉤条虫症患者血清のうち, ゲル内沈降反応及びELISA法でCcf Ag.とより強く交差反応を呈した4症例の患者血清を用いて, 免疫転写法によるCcf Ag.の無鉤条虫症患者血清との交差反応の検討に使用した。

(5) 抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清(Anti-Ccf)の作製

Ccf Ag.を粗抗原量で1.2 mg採り, それを1 mlの滅菌生食水で溶解し, 1 mlのFreund's complete adjuvant(Difco社製)を加え十分混和し, その懸濁液を3 kg前後の雄のNew Zealand white rabbit 2羽の背部皮内2ヶ所に0.5 mlずつ分注し, 毎週1回, 計6回繰り返して接種した。抗体価の上昇をオクタロニー法にて確認し, 最終皮内接種後, 10日目にboosterとしてCcf Ag. 10 mgを滅菌生食水10 mlで溶解し, 0.45 µmのマイクロフィルター(Milli pore社製)で濾過し, ウサギ耳静脈よりゆっくり静注した。その7日後, 心臓穿刺により全血採血した。血液を遠心分離し, 得た2羽の血清の同量を混和し, 抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清とした。

(6) 抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清(Anti-Ccf abs)の作製

Fig.2に示す様に, 正常ブタ血清(normal pig serum, NPS) 10 mlにT. sag Ag. 30 mg, Ccb Ag. 50 mg, Ccw Ag. 50 mg(いずれも, 蛋白質量として)を加え溶解させた後, 攪拌しながら2.5%のグルタルアルデヒドを2 ml滴下し, その後室温にて3時間放置し, ゲル化させた。このゲルに0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.2) 100 mlを加え細かくホモゲナイズし, 均一なゲル浮遊液を作製した。この浮遊液を4°C, 3,000 rpmで10分間遠心して, 上清を

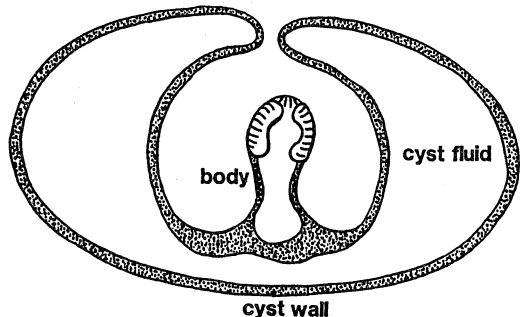


Fig. 1. Schematic illustration of the structure of *Cysticercus cellulosae*.

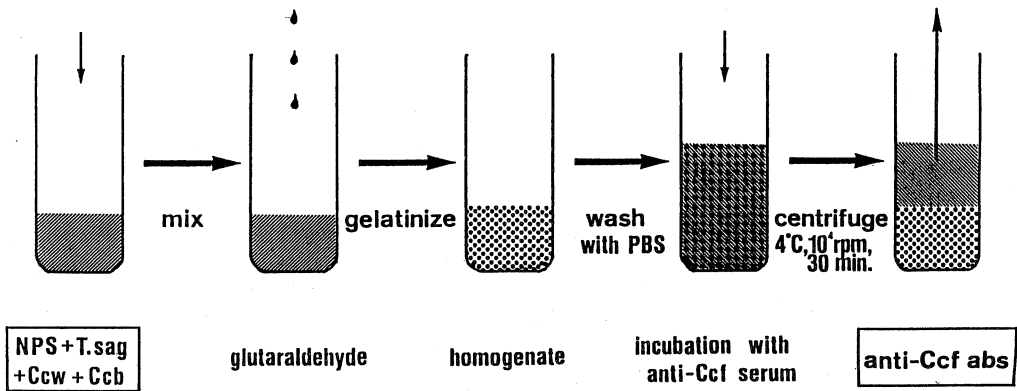


Fig. 2. Preparation of parasitic Ccf-specific anti-serum with immunoabsorbance consisting of NPS, T. sag Ag., Ccw Ag. and Ccb Ag.

捨て、更に、ゲル中に残存するアルデヒド基を飽和させる為、T. sag Ag. 1.5 mg (蛋白量)を加え、リン酸緩衝液 100 ml に再度浮遊させ、室温で 30 分間放置した後、遠心し上清を除去した。このゲルに 0.2 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH 2.9) を加えて、再度浮遊させ、室温で 20 分間放置した後、遠心し上清を除去した。この操作を 2 回繰り返し、残存するアルデヒド基をブロックした。次に、このゲルを 0.2 M のリン酸水素二カリウム溶液に浮遊させ、遠心後上清を除去した。再びリン酸緩衝液を用いて、遠心沈澱を数回繰り返し、上清の吸光度 (280 nm) が 0.05 以下になるまで洗浄を行った。この様にして作製したゲルに抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清 5 ml を加え、よく混和し、37°C、3 時間振盪湯浴で incubate した後、4°C、10,000 rpm で 30 分間遠心した。その上清を集め、抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清とした (Avrameas and Ternynck, 1969⁹⁾。

方 法

(1) 第 1 次元目の電気泳動にアガロースを用いた 2 次元免疫電気泳動法

ゲルとしてバルビタール緩衝液 (pH 8.2) にアガロース (Sigma 社製) を 0.9% になる様に調整し、90°C、20 分間加熱溶解し、そのうち 13 ml を取り 11.0 × 7.5 cm の脱脂ガラス板上に置き、放置しゲル化させた。次に、Fig. 3 に示す様に、このアガロースゲルを用いて、第 1 次元目の電気泳動として、陰極側に 2.3 cm、下縁より 2.0 cm の位置に径 0.4 cm の well をあけ Ccf Ag. を入れた。泳動は電圧 22 V/11.0 cm とし、4.5 時間通電した。泳動後、well より 0.5 cm 上を通電方向と平行にゲルを切り、上部のゲルを除去した。予め通電中に、9 ml のペロナ

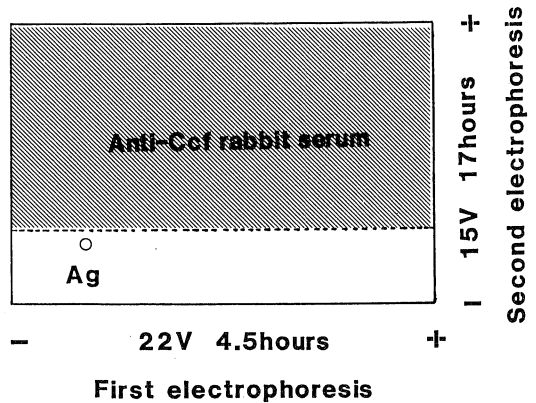


Fig. 3. Technique of Laurell's two-dimensional immunoelectrophoresis.

ル緩衝液で 90 mg のアガロースを溶解し、54°C の恒温槽に入れ放置し、また Anti-Ccf 1 ml も同様に保温した後、混和し抗血清加 0.9% アガロース溶液を調整しておき、泳動後その除去したゲルの部分に同溶液を注ぎ、室温にてゲル化させた。その後、第 1 次元目の電気泳動で抗原を分析したゲルを陰極とし、抗体の含んでいるゲルを陽極として、15 V/7.5 cm の電圧で 17 時間泳動を行い、第 2 次元目の電気泳動とした。泳動後、4°C の湿室で 18 時間放置し、沈降線を発現させた。その後、ペロナール緩衝液加生理食塩水 (ペロナール緩衝液と生理食塩水を 1:19 の割合にて混じた液) に入れ、3 日間十分洗浄し、Whatman I 号濾紙 (Whatman 社製) を上層して包み、乾燥後、Amido Black 10 B (Sigma 社製) で 3 分間蛋白染色、次いで 2% 酢酸溶液で数回洗浄、脱色、乾燥後沈降線を観察した (Laurell, 1965⁷⁾)。

(2) ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法

Davis (1964⁸⁾) の方法を少し改変し、ポリアクリルアミド (Nacalai Tesque 社製) の粗孔ゲルの濃度を 2.5 %、細孔ゲルの濃度を 7.5 % とし、内径 0.5 cm、長さ 10 cm のガラス管を用いて、泳動槽としてディスク電気泳動槽 (富士理研社製) を使用し、電極液としてトリス・グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用い、Ccf Ag. を粗孔ゲルに加え、定電流でガラス管 1 本につき 3 mA の条件で泳動を行った。泳動終了はマーカーであるブromフェノール青 (和光純薬社製) がゲルの下端より 0.5 cm の位置になるところで終了した。ゲルはトリクロール酢酸 (Nacalai Tesque 社製) にて固定、クマシーブリリアント青 (Sigma 社製) にて蛋白染色した。また、得られたバンドの分子量の測定は Hedrick and Smith (1968⁹⁾) の報告に従って、同じ Ccf Ag. を用いて異なった濃度 (5 %, 7.5 %, 10 %, 15 %) のポリアクリルアミドゲルで同時に泳動、その電気的易動度とブromフェノール青の易動度から算出した。

(3) 第 1 次元目の電気泳動にポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を用いた 2 次元免疫電気泳動法

Fig. 4 に示す様に、上記手技にて泳動したポリアクリルアミドゲルディスクを長軸に正確に半分となる様に切断し、その半分を 11×7.5 cm のガラス板に陰極より 2 cm の部分に長軸に平行となる様、切断面を下にして置き、そのガラス板の残りの部分に先程と同様の手技にて作製した抗血清を含む 0.9 % アガロース溶液をその上下左右に均等に平板上に載せ室温でゲル化させた。このゲルを短軸方向と平行に、7.5 V/7.5 cm の電圧で 10 時間泳動、第 2 次元目の電気泳動とし、その後の処理は上述

の方法 (1) と同様に施行し、沈降線を観察した。

(4) 第 1 次元目の電気泳動に薄層等電点電気泳動を用いた 2 次元免疫電気泳動法

第 1 次元目の泳動として pH 3~10 のアンホラインを含むポリアクリルアミド薄層ゲル (Pharmacia LKB Biotechnology 社製) を用いて、Ccf Ag. を 5 mA、定電流で通電、電圧が上昇しきった段階で泳動を終了し、同抗原を等電点で分析、分離した後、これらの抗原を含むゲルを幅 0.7 cm で切り、第 1 次元目の電気泳動とした。この泳動時、緩衝液として陽極に 1 M 磷酸溶液、陰極に 1 M 水酸化ナトリウム溶液を使用した。次に Fig. 5 に示す様に 11×7.5 cm のガラス板に陰極より 2 cm の部分にゲルを長軸に平行に置き、そのガラス板の残りの部分に先程と同様の手技にて作成した抗血清を含む 0.9 % アガロース溶液をその上下左右に均等に載せ室温でゲル化させた。このゲルを短軸方向に平行に 7.5 V/7.5 cm の電圧で 10 時間泳動を行い、第 2 次元目の電気泳動とした。また、泳動後の処理は上述の方法(1)と同様に行い、沈降線を観察した。

(5) Ccf Ag. のゲル濾過法による分析

Sephadex G-200 (Pharmacia LKB Biotechnology 社製) を用いて、内径 2.6 cm、長さ 43 cm のカラムを作成し、Ccf Ag. (蛋白量が 27.5 mg/ml) を磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) 4 ml で溶解し、定量ポンプ (2120 Varioperpex II pump, Pharmacia LKB Biotechnology 社製) にて同緩衝液の流速を 6 ml/h に設定し、分析した。カラムにより分画された抗原はフラクションコレクター (2112 Redirac fraction collector, Pharmacia LKB Biotechnology 社製) にて 1 本のチューブに 4 ml

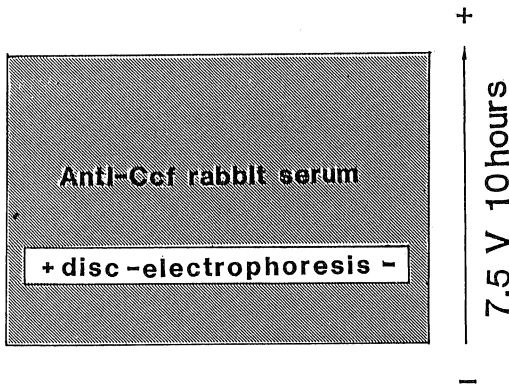


Fig. 4. Technique of two-dimensional immunoelectrophoresis.

First electrophoretic run was performed on a gel of the disc-electrophoresis.

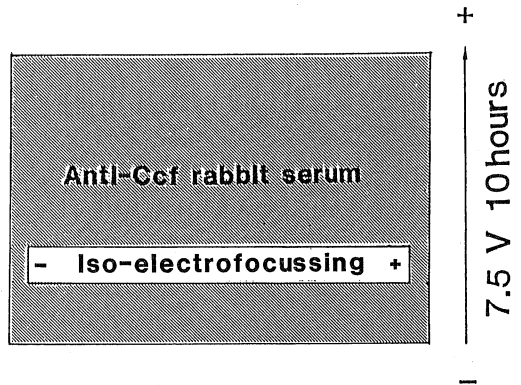


Fig. 5. Technique of two-dimensional immunoelectrophoresis.

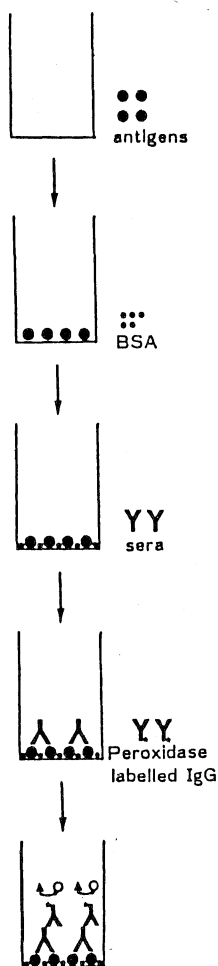
First electrophoretic run was performed on a gel of the iso-electrofocussing.

ずつ採集し、分光光度計 (55 B, Perkin-Elmer 社製) を用いてそれぞれのチューブの蛋白量を波長 280 nm にて測定した。

(6) Ccf Ag. 分画抗原の抗原活性を測定する為の ELISA 法の手技

前記ゲル濾過にて分画された抗原を Fig. 6 に示す様、それぞれ蛋白濃度で 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に炭酸緩衝液 (0.05 M, pH 9.6) にて希釈し、96 穴マイクロタイタープレート (PRO-BIND Assay plate, Falcon 社製) のそれぞれの well に 100 μl ずつ入れ、4°C, 18 時間放置し、

固相化させた。次に、1% のウシ血清アルブミン (BSA, Sigma 社製) を含む同炭酸緩衝液を 200 μl ずつ入れ、37°C, 1 時間放置し、ブロッキングを行った。前述の方法で作製した抗有鉤囊虫嚢胞液ウサギ免疫血清 (Anti-Ccf) 及び抗有鉤囊虫嚢胞液特異吸収血清 (Anti-Ccf abs) を 1% の BSA を含む炭酸緩衝生理食塩水で、それぞれ 1,000 倍と 50 倍に希釈後、well に 100 μl ずつ加え、37°C, 1 時間反応させた。peroxidase 標識抗ウサギ IgG (Miles-Yeda 社製) を 1% BSA を含む炭酸緩衝生理食塩水で 10,000 倍に希釈し、それぞれの well に 100 μl ず



Wells of the plate were coated with antigens diluted with carbonate buffer (0.05M, pH9.6) at 4°C for 18 hours.

Washed with PBS (pH7.2) containing 0.02% Tween20.

Blocked with the same carbonate buffer containing 1% BSA at 37°C for 1 hour.

Washed with PBS (pH7.2) containing 0.02% Tween20.

Diluted sera were reacted at 37°C for 1 hour.

Washed with PBS (pH7.2) containing 0.02% Tween20.

Peroxidase labelled IgG was added and incubated at 37°C for 1 hour.

Washed with PBS (pH7.2) containing 0.02% Tween20.

OPD was reacted in dark room at 20°C for 30 minutes.

Enzymic reaction was stopped using 3N-sulfuric acid.

Absorbance was measured at 500nm.

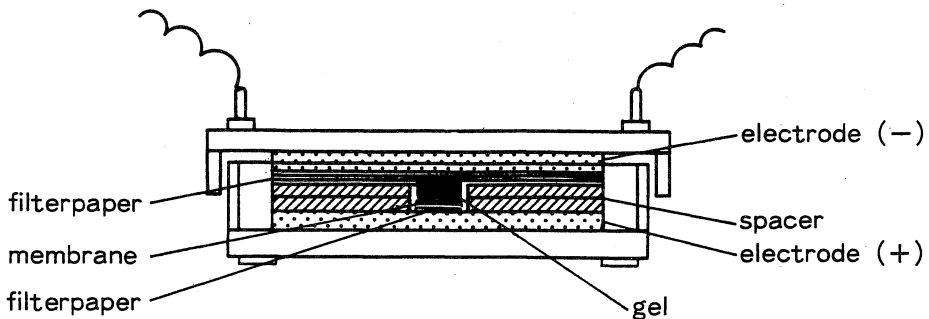
Fig. 6. Procedure of ELISA.

つ入れ 37°C, 1 時間反応させた. 以上それぞれのステップで 0.02 % の Tween 20 を含む 磷酸緩衝生理食塩水で十分洗浄を行った. 基質として, *o*-phenylene diamine (OPD, Nacalai Tesque 社製) 10 mg を 0.2 M dibasic sodium phosphate 25 ml と 0.1 M citric acid 25 ml の混合液に溶解, 使用直前に 30 % の過酸化水素水 10 μ l を加え OPD を活性化し, それぞれの well に 100 μ l ずつ入れ酵素反応を行った. 反応は暗室内, 20°C にて 30 分間行い, 3 N- 硫酸 100 μ l 入れ酵素反応を停止させた. その反応産物を分光光度計(主波長 500 nm, 副波長 610 nm : MTP 12 A, コロナ社製)にて吸光度を測定した.

(7) 免疫転写法 (western-blotting) の手技

前記方法で電気泳動した薄層等電点電気泳動ゲルの抗原成分をニトロセルロース膜 (Bio-Rad 社製) に転写する為に, 平板型転写装置 (セミドライタイプ, 日本泳動社製) を使用, Fig.7 に示した様にセットし, 転写用緩衝

液は 125 mM トリスと, 960 mM グリシンを混和 pH 8.7 に調整し更に, メタノールを 20 % となる様に混じ, 泳動を行った. 転写は 140 mA の定電流で, 室温にて 30 分間通電した. 通電終了後, Fig.8 に示す様に, 転写後のニトロセルロース膜を蒸留水で軽く洗浄, 1 % BSA を含む 磷酸緩衝生理食塩水中で室温にて 30 分間放置し, ブロッキングを行った. 次に, 前述の方法で作製した抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ血清, 抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清及び脳有鉤囊虫症患者血清をそれぞれ 1 % BSA を含む 磷酸緩衝生理食塩水で 10,000 倍と 100 倍に希釈し, その溶液中に転写したニトロセルロース膜を入れ室温にて 1 時間反応させた. peroxidase 標識抗ウサギ 1 gG 抗体を同様に 1 % の BSA を含んだ 磷酸緩衝生理食塩水で 1,000 倍に希釈し, その溶液中にニトロセルロース膜を入れ室温にて 1 時間反応させた. またそれぞれの段階の反応の後, ニトロセルロース膜を 0.05 % の Tween 20 を含む 磷酸



Condition : 140 mA, 4 V, 30 minutes, room temperature
 Transfer medium : Nitrocellulose membrane (0.45 μ m)
 Buffer : 125 mM Tris • 960 mM glycine/20% methanol, pH 8.7

Fig. 7. Schematic illustration of instrument of semi-dry blotting system.

Nitrocellulose membrane(after transfer)
 ↓ washed with D.W.
 Blocked with BSA, for 60min. at room temperature
 ↓ washed with PBS/0.05% Tween 20
 Reacted with anti-sera, for 60min. at room temperature
 ↓ washed with PBS/0.05% Tween 20
 Reacted with Peroxidase labelled antibody, for 60min. at room temperature
 ↓ washed with PBS/0.05% Tween 20
 Development of Color (Substrate : DAB)

Fig. 8. Procedure of immuno-stain.

緩衝生理食塩水で十分洗浄した。次に、基質として3, 3ジアミノベンチジン (DAB, Dotite 社製) 10 mg を 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) 50 ml で溶解, 使用直前に 30% 過酸化水素水 5 μ l を加えて使用し, ニトロセルロース膜を同溶液中に浸し, 発色させた。発色後, 同ニトロセルロース膜を蒸留水で十分洗浄, 風乾後, バンドの出現状態を観察し, Dual wave length TCL Scanner CS-930 (島津社製) にて, 波長 340 nm で densitometric scan を行った。

(8) 等電点電気泳動ゲルよりの抗原物質の抽出及びその分析

西山(1987¹⁰)が行った方法と同様に, ゲル濾過法により得た F-II 分画を pI 4.00 から pI 6.50 のアンホラインを含んだ薄層ポリアクリルアミドゲル (Pharmacia LKB Biotechnology 社製) で電気泳動を行い, そのゲルを幅 0.25 cm ずつ切り, 0.5 ml の PBS で 4°C, 48 時間放置, ゲル中の抗原物質を抽出した。この様に抽出した抗原物質のうち pH 5.40 から pH 5.50 に一致する分画を混合し, 以下の実験に供した。

i) 紫外外部吸収スペクトルの検討

その抽出した抗原物質を日立社製分光光度計 (U-3210) にて紫外外部吸収スペクトルを測定し, 検討を加えた。

ii) 熱安定性に対する検討

その抽出した物質を 100°C, 1 時間加熱し抗原物質の熱変性を比較検討した。方法として, 加熱抗原物質と非加熱抗原物質を 0.05 M, pH 9.6 の炭酸緩衝液で蛋白濃度として 10 μ g/ml に希釈, 96 穴マイクロタイタープレートに固相化し, 前述の方法にて作製した抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清と反応させ, その吸光度の変化により, 抗原物質の熱変性を比較検討した。

結 果

(1) 第 1 次元目のゲルにアガロースを用いた 2 次元免疫電気泳動法による Ccf Ag. の分析

第 1 次元目の電気泳動にアガロースゲルを用い Ccf Ag. を Fig.9 に示す様に, 2 次元免疫電気泳動により分析すると, β から slow α にかけて強く染色された沈降線が 1 本, β から α にかけて 3 本以上, 原点即ち fast γ に少なくとも 2 本以上の沈降線が認められたが, α と slow γ に走る沈降線は認められず, 計 6 本以上の沈降線が認められ, 少なくとも 6 種以上の抗原性物質が証明された。また, β から slow α にかけて最も強い沈降線を作る抗原性物質は fast γ 上で 3 本の沈降線に分かれた。これは同抗原物質が 3 種の類属抗原の集合である為と考えられた。

(2) 第 1 次元目のゲルにディスク電気泳動を用いた 2 次元免疫電気泳動法による分析

第 1 次元目の電気泳動をディスク電気泳動 (Davis, 1964⁹) の方法で行い, それぞれの分子量を Headrick and Smith (1968⁹) の方法で決定し, また同ゲルをクマシープリリアント青にて蛋白染色し, 吸光度 550 nm の波長で densitometric scan したものを Fig. 10 の中段及び下段に図示した。更に, 前述した様に 2 次元免疫電気泳動を行い, 乾燥後蛋白染色したものを Fig.10 の上段に示し比較分析した。その結果, 分子量 152 kDa のバンドに一致する部位をピークとした沈降線が少なくとも 3 本, 分子量 418 kDa のバンドに一致する部位をピークとした少なくとも 1 本の沈降線が認められた。また, 分子量 112 kDa のバンドには明らかな抗原性を示すピークは得られなかった。

(3) 第 1 次元目の電気泳動を等電点電気泳動で行った 2 次元免疫電気泳動法による分析

Fig.11 には, 上段にアミドブラックで染色した 2 次元免疫電気泳動を, 下段はクマシープリリアント青で染色

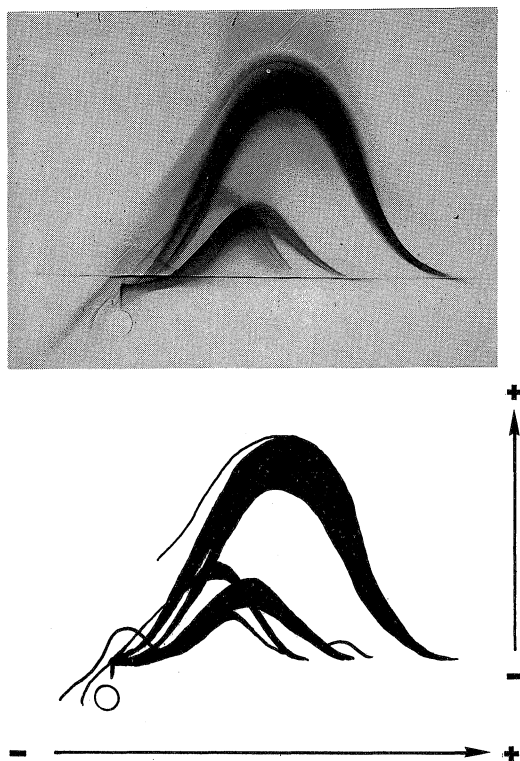


Fig. 9. Two-dimensional immunoelectrophoresis of Ccf Ag. (unabsorbed rabbit anti-serum to Ccf Ag. was used).

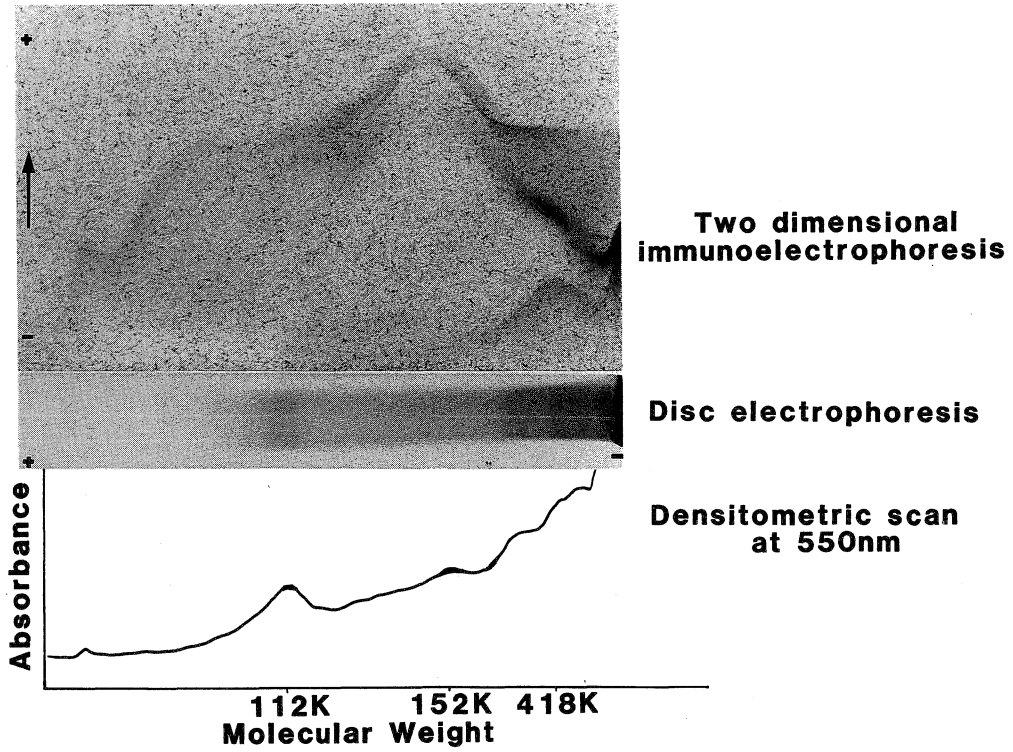


Fig. 10. Two-dimensional immunoelectrophoresis pattern of Ccf Ag.
First electrophoretic run : polyacrylamide gel disc electrophoresis.

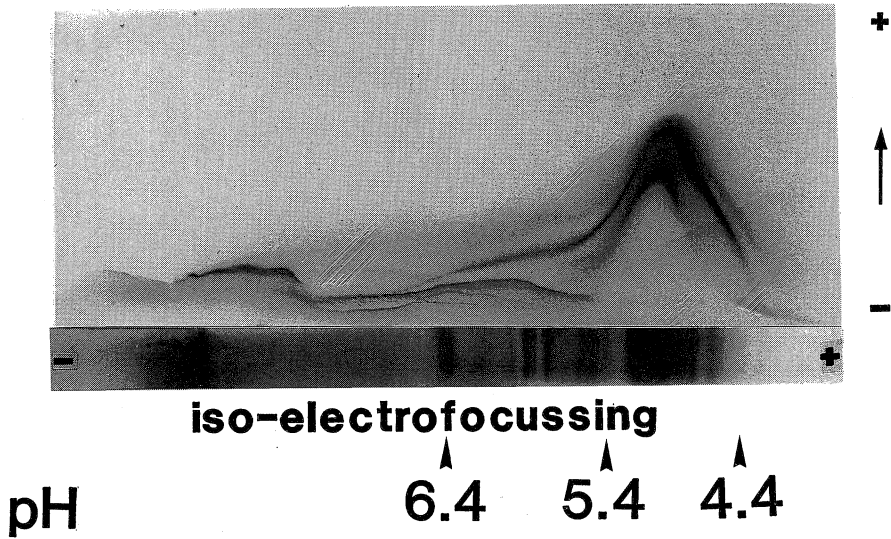


Fig. 11. Two-dimensional immunoelectrophoresis pattern of Ccf Ag.
First electrophoretic run : IEF (pH 3.50 to 10.00).

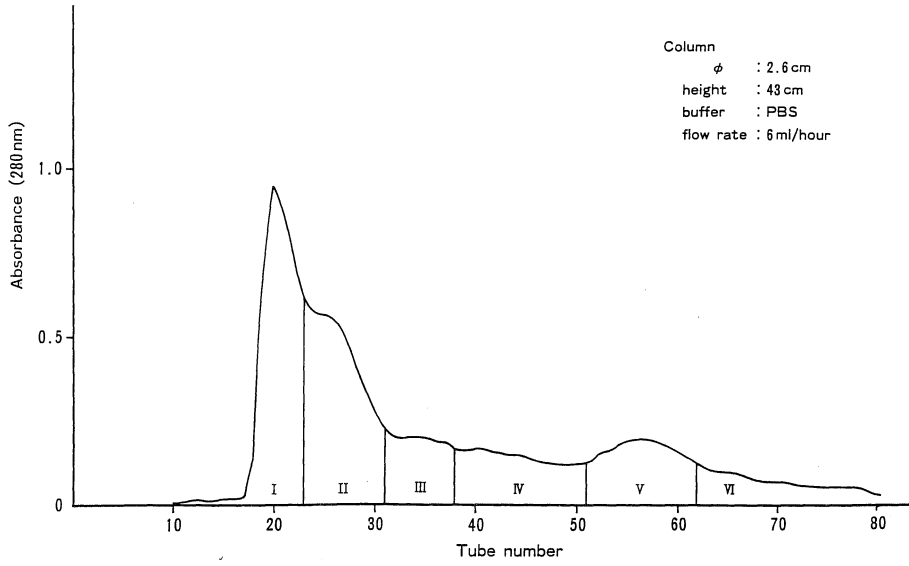


Fig. 12. Elution pattern of Ccf Ag. on Sephadex G-200.

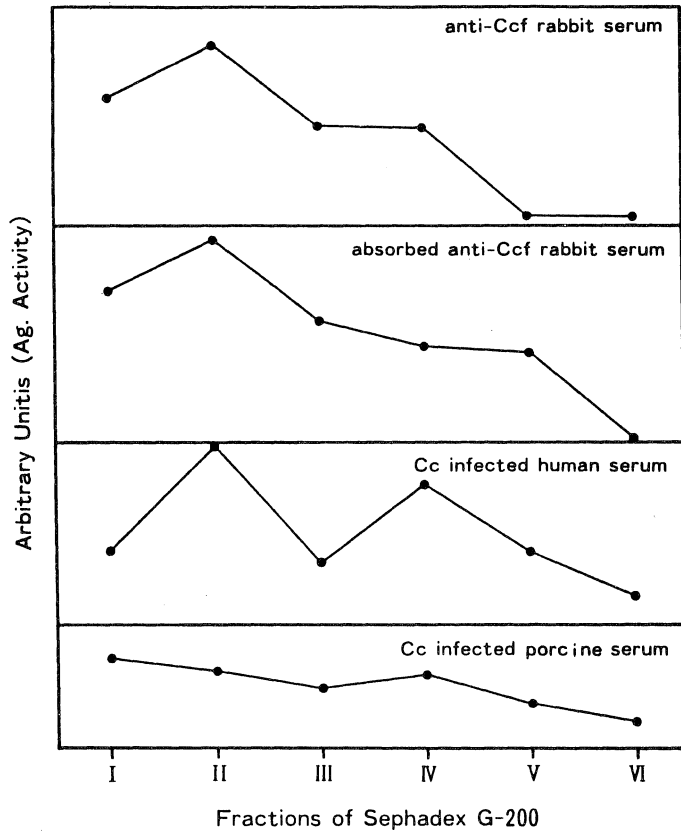


Fig. 13. Comparison of antigen activity for fractions.

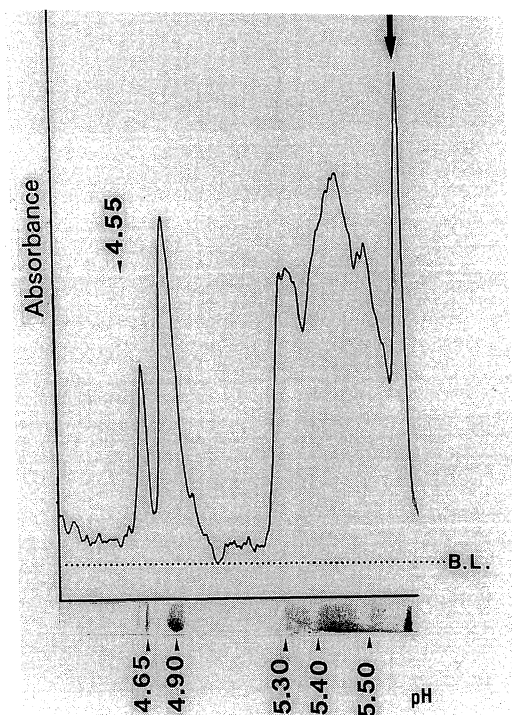


Fig. 14. Densitometric scan of F-II fraction after IEF analysis. The peak on the right (\downarrow) is produced by protein remaining at the application site.

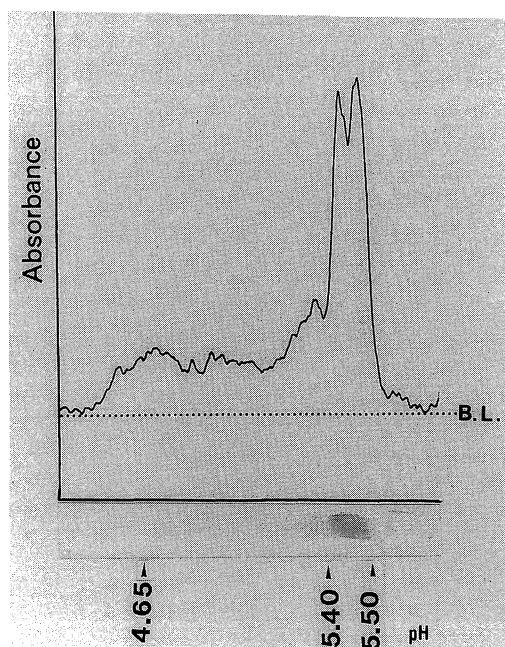


Fig. 16. Densitometric scan of F-II on nitrocellulose membrane after western-blotting (immunoabsorbed specific anti-Ccf antiserum was used).

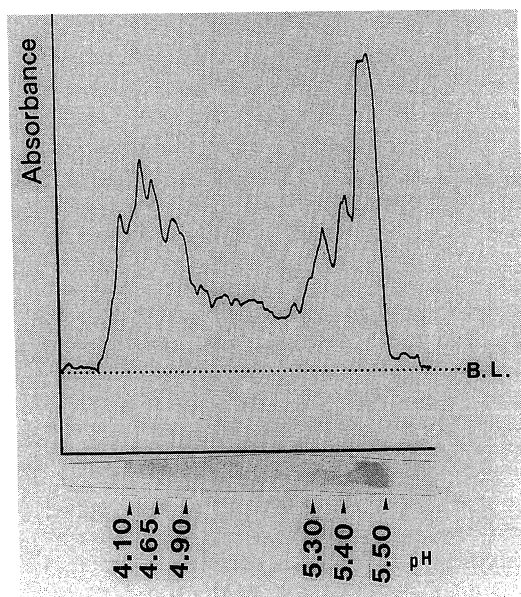


Fig. 15. Densitometric scan of F-II on nitrocellulose membrane after western-blotting (unabsorbed anti-Ccf Ag. antiserum was used).

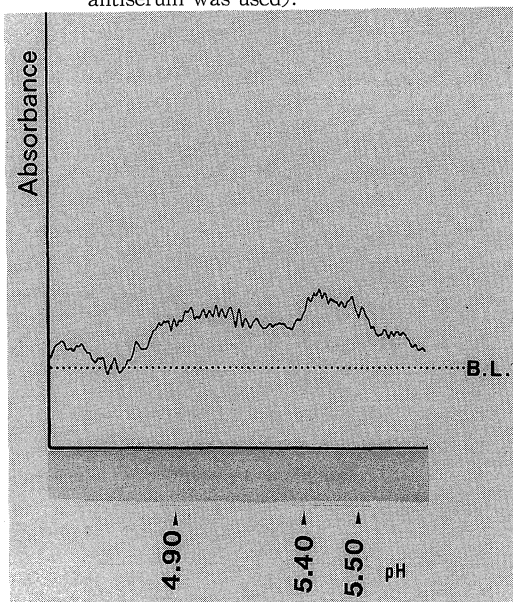


Fig. 17. Densitometric scan of F-II on nitrocellulose membrane after western-blotting (serum of patient with cysticercosis cellulosa was used).

した Ccf Ag. を薄層等電点電気泳動ゲル像を合成図示した。pI 4.40 から pI 6.40 にかけて連続した少なくとも 3 本の沈降線を、更に pI 4.40 から pI 5.40 にかけて連続した 1 本の沈降線を認めた。以上の様に広い範囲の等電点に渡って共通した抗原性が存在している事が証明された。(4) Ccf Ag. の Sephadex G-200 を用いたゲル濾過法による分析及びその抗原性の検討

Ccf Ag. と Sephadex G-200 を内径 2.6 cm, 高さ 43 cm のカラムに充填し、磷酸緩衝生理食塩水を流量 6 ml/h で溶出させ Fig.12 の様なピークが得られた。次に、これらのピークをそれぞれ Void volume より 6 分画に分離し、I から VI 分画とした。更に、これらの分画をそれぞれ蛋白濃度を 30 μ g/ml に炭酸緩衝液 (0.05 M, pH 9.60) で希釈し、間接 ELISA 法を用い上記手技にて作製した抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清、抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清、脳有鉤囊虫症患者血清、有鉤囊虫感染ブタ血清と反応させ、それぞれの血清に対する各分画の

抗原性を検討したところ、Fig.13 に示す様に、抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清の場合、分画 II に強い抗原性を、分画 IV に弱い抗原性を認めた。抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清 (Anti-Ccf abs) では分画 II に強い抗原性を認め、Ccf に特異的な抗原性は分画 II に存在している事が証明された。また、脳有鉤囊虫症患者血清を用いた場合、分画 II と分画 IV に強い抗原性を認めたが、有鉤囊虫感染ブタ血清では特に強い抗原活性は認められなかった。

(5) western-blotting 法による Ccf Ag. 分画 II の分析
上記実験により Ccf Ag. の各分画のうち、分画 II が抗原性において最も注目される為、この分画を等電点電気泳動法、western-blotting 法により転写し、免疫染色を行い抗原性の検討を行ったところ、Fig.14 に示す様にゲルのクマシーブリアント青と銀染色による蛋白染色では pI 4.65, 4.90, 5.40 から 5.50 に強いバンドを、pI 4.55, 4.80, 5.30 から 5.40 にかけて弱いバンドを認めた。抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清 (Anti-Ccf) を用

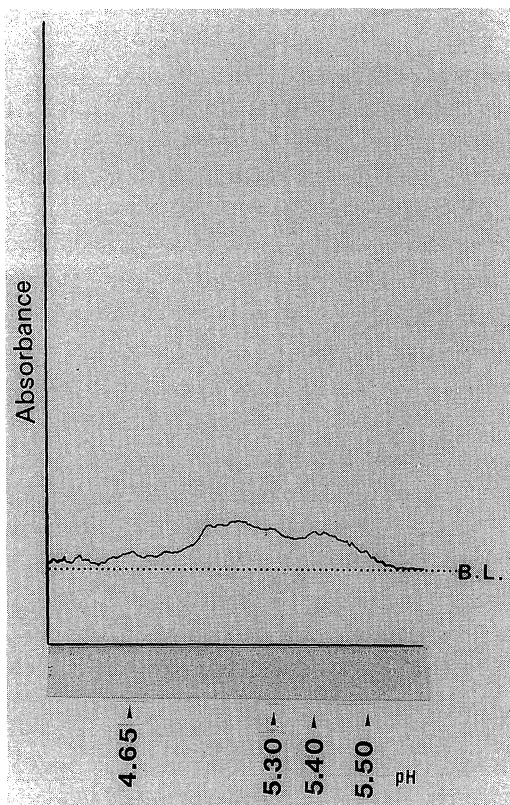


Fig. 18. Densitometric scan of F-II on nitrocellulose membrane after western-blotting (immuno-staining with serum of the patient with taeniasis saginata).

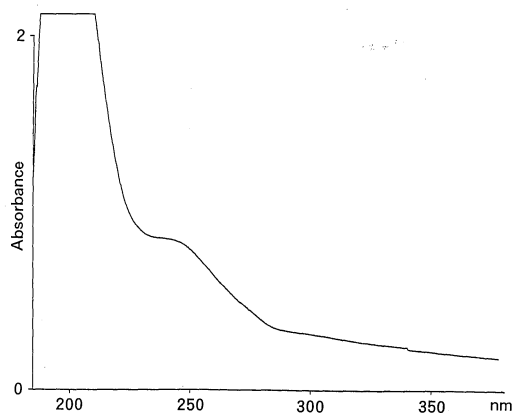


Fig. 19. Pattern of UV-absorbance of the antigen substance (152kDa, pI 5.40 to pI 5.50).

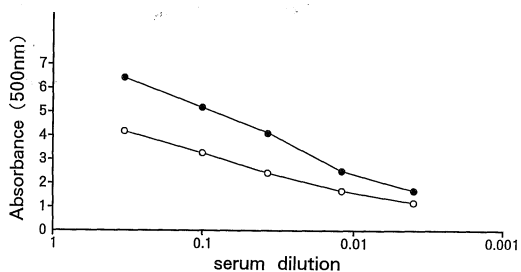


Fig. 20. Heart stability of antigenic activity of the antigen substance (152 kDa, pI 5.40 to pI 5.50).

○ : heated Ag.
● : unheated Ag.

いた場合、Fig. 15 に示す様に pI 4.10, 4.65, 4.80, 4.90, 5.30 から 5.50 にかけて抗原性を認め、特に pI 4.65, 4.80, 4.90, 5.30 から 5.40 にかけて中等度の、pI 5.40 から 5.50 にかけて強い染色性を認めた。更に、抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清 (Anti-Ccf abs) を用いた場合 Fig. 16 に示す様に pI 5.40 から 5.50 にかけてのバンドのみが免疫染色され、Ccf に特異的な抗原の epitope がこの pI 5.40 から 5.50 のバンドに存在する事が証明された。脳有鉤囊虫症患者 8 名の血清を使用した場合、抗体価陽性と診断された 5 名について、Fig. 17 に示す様に、Fig. 16 にて認めた Ccf Ag. に特異的と考えられる抗原物質 (pI 5.40~5.50) の位置に染色性を認めた。また、non responder 3 名に関しては、染色性は認められなかった。

また、有鉤囊虫抗原と最も交差反応性の強い抗体を持つ無鉤条虫症患者 4 名の血清では、Fig. 18 に示す様に脳有鉤囊虫症患者に特異的と考えられる pI 5.40~5.50 の抗原よりむしろ、pI 5.30 より酸性の等電点を持つ抗原物質と交差反応する事が認められた。

(6) 有鉤囊虫特異抗原 (pI 5.40~pI 5.50) の蛍光吸収スペクトル及びその抗原性の熱変性性の検討

Fig. 19 に示す様に Ccf Ag. の F-II 分画中の pI 5.40~5.50 の抗原の紫外吸収スペクトルは 250 nm 近傍にてピークを示した。更に、同抗原物質の熱変性性に対しては Fig. 20 に示す様に抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清に対して熱処理を加える前の抗原物質を固相化した場合、希釈血清は、順次 0.631, 0.513, 0.405, 0.256, 0.169 の吸光度を得たのに対し、熱処理後の抗原物質を固相化した場合、希釈血清は、順次 0.413, 0.336, 0.232, 0.167, 0.115 と吸光度の低下を示しているため、その抗原性が約 1/27 に減少する事が証明された。

考 察

本邦における有鉤囊虫症は、沖縄県の一部や旧満州に在任経験のある日本人や在日韓国人、特に済州島出身者に多く認められている。更に、最近では海外旅行者の急激な増加により、韓国、中国東北部(旧満州地区)、メキシコなどの有鉤囊虫症侵淫地への旅行者も増加し、また同地区から有鉤条虫の中間宿主であるブタ(食肉用)の輸入や生ハムの製造が許可され、今後本症が我が国において増加する可能性も危惧されている(荒木, 1986¹¹⁾)。こうした背景において、ブタ及びヒト有鉤囊虫症の診断の為に信頼性の高い血清診断法の確立が望まれている。

有鉤囊虫症の血清診断としては、抗体の検出として、Biagi and Tay (1958²²⁾)、Mosina (1965¹³⁾)がprecipitin

test で、Maddison *et al.* (1961¹⁴⁾)、Proctor and Elsdon-Dew (1966¹⁵⁾) がオクタロー法で、Mosina (1965¹³⁾)、Proctor *et al.* (1966¹⁶⁾) が間接血球凝集反応を、Leikina *et al.* (1966¹⁷⁾) がラテックス凝集反応を、Bugyaki (1961¹⁸⁾)、Froyd (1963¹⁹⁾)、Mosina (1965¹³⁾)、Dewhirst *et al.* (1960²⁰⁾) が皮内反応を、更に、酵素免疫測定法 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) で Diwan *et al.* (1982²¹⁾)、Coker-Vann (1984²²⁾)、Knobloch and Delgado (1985²³⁾)、Costa *et al.* (1985²⁴⁾)、Gottstein *et al.* (1987²⁵⁾) が報告している。しかしながら、これらの報告はいずれも特異性という点で多くの問題を残している。例えば、Gottstein *et al.* (1987²⁶⁾) の ELISA 法を用いた報告によると、感受性という点においてはほとんど問題はないものの、特異性という点においては 51% の高率に他の寄生虫疾患との交差反応を認め、特に包虫症、糸状虫症患者血清との間に交差反応性が高いと報告している。

当教室では、今までの有鉤囊虫症の血清診断の報告が全て有鉤囊虫全体をすりつぶしたのから抽出した物質を抗原として使用した免疫反応であることから、抗原の抽出という点に問題があると考えている。

そこで、有鉤囊虫の囊胞液の抗原性に注目し、研究を進め、同抗原が特異性と感受性において最も優れた抗原である事を証明し、「抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ血清を用いた有鉤囊虫症患者血清の血中循環抗原の証明及び診断への応用(森田, 1984¹¹⁾)」、「オクタロー法による有鉤囊虫部位別抗原(有鉤囊虫囊胞液抗原、有鉤囊虫体部抗原、有鉤囊虫囊胞壁抗原)の感受性及び特異性の検討(瀬川, 1988³⁾)」、「ELISA 法による有鉤囊虫囊胞液抗原を用いたスクリーニング法の検討(八木, 1989⁴⁾)」等の論文を報告した。これらにより、当教室では今まで諸外国で行われていた血清診断の交差反応の多い理由として、使用している抗原が有鉤囊虫の体部や囊胞壁及び円錐部剝脱抗原の混在した抗原であり、その為に交差反応がより強く出現していると報告している。また、Ccf の抗原性を研究した諸外国の報告は Larralde *et al.* (1986²⁷⁾)、Parkhouse and Harrison (1987²⁸⁾) や Larralde *et al.* (1989²⁹⁾) があり、本寄生虫に感染したブタやヒトの抗体を用いて検討がなされているが、同一の実験で報告する結果が異なり Ccf を用いた有鉤囊虫症の血清診断は、今だ黎明期を迎えた状態である。ここで、著者は Ccf Ag. の抗原性を 2 次元免疫電気泳動法、ゲル濾過法、ELISA 法、western-blotting 法を用いて検討を行い、更に同抗原の中に含まれている有鉤囊虫症に特異的な抗原物質の検討を行った。

まず、第1次元目の電気泳動でアガロースゲルを用いた2次元免疫電気泳動法により、Ccf Ag.の抗原性は少なくとも6種以上の抗原性を有し、最も強い β からslow α にかけての沈降線を形成する抗原物質は3種の類属抗原の集合である事が証明された。

また、第1次元目の電気泳動をDavis (1964⁸⁾)の方法によりSDSを用いずにディスク電気泳動を行い、それを2次元免疫電気泳動法により分析すると分子量152 kDaをピークとした少なくとも3種以上の抗原性を、また、分子量418 kDaをピークとした少なくとも1種以上の抗原性を認めた。

更に、第1次元目の泳動を等電点電気泳動法で行い、2次元免疫電気泳動法で分析したところ、pI 4.40からpI 6.40にかけて少なくとも3種の、pI 4.40からpI 5.40にかけて少なくとも1種の抗原性を認めた。

ここで、Ccf Ag.をSephadex G-200にてゲル濾過し、間接ELISA法にて抗原活性の検討を行ったところ、II分画(Sephadex G-200は分子量1,000から200,000の分画能力のある事から、この分画は、Fig. 10で示された分子量152 kDaのピークに一致する)に最も強い抗原性が認められ、またCcf中にのみ診断上有意義な抗原活性の存在する事が証明された。

更に、このII分画を等電点電気泳動法により電気泳動し、western-blotting法にて抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清、抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清を用い、抗原性の検討を行い、pI 5.40からpI 5.50にかけての広い範囲に等電点を持ったバンドにCcfに特異な抗原性が存在している事を証明した。

近年、有鉤囊虫症の血清診断において、western-blotting法の応用がなされているが(Gottstein *et al.* 1986²⁶⁾; Larralde *et al.*, 1986²⁷⁾; Gottstein *et al.*, 1987²⁵⁾; Laclette *et al.*, 1987³⁰⁾; Larralde *et al.*, 1989²⁹⁾; Estrada, 1989³¹⁾), いずれの報告においても、分析に用いた電気泳動はsodium dodecylsulfate (SDS)を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で、今回著者が行った手技とは異なるが、Larralde *et al.* (1986²⁷⁾, 1989²⁹⁾)では分子量108 kDaの蛋白を、Gottstein *et al.* (1987²⁵⁾)では26 kDaと8 kDaの蛋白を、Estrada *et al.* (1989³¹⁾)では分子量190 kDaと230 kDaの蛋白が血清診断に最も有用であると述べている。ところが、同一の著者でも、報告した論文毎に有鉤囊虫症の血清診断に応用できる抗原物質の分子量が異なり、未だ定説は無い。今回著者が報告した分子量152 kDaの抗原物質はSDSの様な強い界面活性剤を用いておらず、SDSの使用により、更に数種の抗原物質に分離する可能性もある

が、抗原を精製する段階でゲル濾過及び等電点電気泳動を行うので操作が簡易で大量に得る事ができ、得られた抗原を免疫診断に応用し易い状態で部分精製を行い、上述の結果を得る事ができた。有鉤囊虫抗原の抗原性の等電点による分析はGottstein *et al.* (1986²⁶⁾)が報告しているが、有鉤囊虫症患者血清と包虫症患者血清との間に殆ど差はないとしている。今回の結果ではpI 5.40からpI 5.50の広い範囲に渡る等電点を持つ抗原物質はCcfに特異的に存在する抗原活性である事が証明され、実際にこの手法は比較的抗体価が高く典型的な抗体反応性を示している脳有鉤囊虫症患者5名の血清に応用してみると、抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清でwestern-blotting法を行った場合と同様にpI 5.40からpI 5.50の抗原物質と反応する事が証明された。更に、Ccf Ag.と高い交差反応性を示す無鉤条虫症患者血清で行うと、同抗原物質の交差反応性はほとんど見られず、むしろpI 5.40より酸性の抗原物質に交差反応性が認められた。しかし、Gottstein *et al.* (1986²⁶⁾)はpI 4.60より酸性の抗原物質に有鉤囊虫に特異的な抗原物質が存在すると報告しているが、著者の結果では抗原性の検討に抗有鉤囊虫囊胞液ウサギ免疫血清を用いた場合pI 4.65で強い抗原性を示している。これをGottstein *et al.* (1986²⁶⁾)は特異抗原物質と報告したのではないかと推測される。なお、この抗原物質は著者の結果では抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清との反応性はなく、有鉤囊虫症の診断の根拠に欠けるのではないかと考えている。

また、同抗原物質のPAS染色を行ったところ、PAS染色性陽性であり、一種の糖蛋白であるということが証明された。

更に、同抗原物質の紫外外部吸収スペクトルによる分析では、吸収スペクトルのピークが280 nm近傍になく、250 nm近傍に存在し、これは今回表に結果を示していないが、同抗原物質を110°C、24時間塩酸で加水分解し、HPLC (L-8500型、日立社製)にてアミノ酸分析を行ったところ、モル比にてこの抗原物質はグリシン25.3%、グルタミン酸12.6%等のアミノ酸が比較的多く分布している事が証明された。また紫外外部吸収スペクトルが280 nm近傍にピークを持つ芳香族アミノ酸含量がチロシン1.8%、フェニールアラニン2.4%と比較的少なく、糖の混在が推測される為、芳香族アミノ酸が一定の割合で存在している一般的な蛋白物質のアミノ酸組成と異なる紫外外部吸収スペクトルを持っているものと推測された。同抗原物質の熱安定性について、100°C、60分の加熱により、抗原物質の一部が変性し、抗有鉤囊虫囊胞液特異吸収血清を第1抗体としたELISA法による抗原活性の

測定結果は加熱前の約1/27に低下しており、同抗原物質の熱に対する安定性は一部に耐熱性の抗原決定基が存在している為であるという事が証明された。

以上の結果から、Ccf Ag. 中の分子量152 KDa, pI 5.40 から pI 5.50 の一種の糖蛋白様の抗原物質が有鉤囊虫症の血清診断に応用でき、その特異性においても良好なものである事が証明できた。

結 語

有鉤囊虫の囊胞液を抗原とし、その抗原性を2次元免疫電気泳動法、ゲル濾過法、western-blotting法を用いて分析し、以下の結論を得た。

(1) 第1次元目の電気泳動のゲルをアガロースを用いて、2次元免疫電気泳動法を行い、 β から slow α にかけて1本、 β から α にかけて3本、fast γ に2本の少なくとも計6本の沈降線を認め、即ちこの抗原には6種以上の抗原物質が存在する事が証明され、また最も強い沈降線を認めた β から slow α に渡る沈降線は fast γ 上で3本に分かれ、この沈降線を形成する抗原物質が3種の類属抗原の集合である事が証明された。

(2) 第1次元目の電気泳動をディスク電気泳動とし、2次元免疫電気泳動法で分析すると、分子量152 kDa のバンドに、少なくとも3本の、分子量418 kDa のバンドに少なくとも1本の沈降線を証明した。

(3) 第1次元目の電気泳動を等電点電気泳動とし、2次元免疫電気泳動法で分析すると、pI 4.40 から pI 6.40 にかけて連続した少なくとも3本の、pI 4.40 から pI 5.40 にかけて少なくとも1本の沈降線を認めた。

(4) Ccf Ag. を Sephadex G-200 でゲル濾過し、I からVI分画とし、それぞれの分画をELISA法で抗原活性を比較したところ、分子量152 kDa に一致するその分画IIに有鉤囊虫に対し特異な抗原活性を認めた。

(5) 分画IIを等電点電気泳動法で分析し、western-blotting法で抗原性を検討したところ、Ccf に特異的な抗原性は pI 5.40 から pI 5.50 の広い範囲に等電点を持った一種の糖蛋白様の抗原物質が存在する事が証明された。

以上の結果より、本研究が有鉤囊虫症診断上更に有益な特異性を有する抗原を得る為の基盤となるものと考えられる。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った恩師奈良県立医科大学寄生虫学教室荒木恒治教授、御助言、御校閲を戴いた本学細菌学教室榎葉周三教授、本学病態検査学教室中野 博教授、本研究遂行の為御援助賜った韓国延世大学校外来教授、現本学非常勤講師趙 基穆博士に

深甚なる謝意を表すると共に、研究を始終御協力下さった本学寄生虫学教室助手西山利正博士並びに同教室諸兄姉に感謝致します。

本論文の要旨は第43回日本寄生虫学会西日本支部大会(1987年、岡山市)、第45回日本寄生虫学会西日本支部大会(1989年、倉敷市)において発表した。

文 献

- 1) 森田 博：有鉤囊虫症の免疫学的研究-豚およびヒトの有鉤条虫症の血清中 circulating antigen の証明。奈医誌。35：843, 1984.
- 2) 荒木恒治：話題の寄生虫病とその診断-特に有鉤囊虫症について。寄生虫誌。36：35, 1987.
- 3) 瀬川武彦：有鉤囊虫症に関する免疫学的研究 血清中の有鉤囊虫囊胞液特異的抗体の証明。奈医誌。39：235, 1988.
- 4) 八木 純：有鉤囊虫症の血清診断法に関する研究。奈医誌。40：745, 1989.
- 5) 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, 1951.
- 6) Avrameas, S. and Ternynck, T.: The crosslinking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. Immunochemistry 6: 53, 1969.
- 7) Laurell, C. D.: Antigen - antibody crossed electrophoresis. Analytical Biochemistry 10: 358, 1965.
- 8) Davis, B. J.: Disc electrophoresis-II Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404, 1964.
- 9) Hedrick, J. L. and Smith, A. J.: Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126: 155, 1968.
- 10) 西山利正：旋毛虫症における循環抗原検出並びにその抗原性の検討。奈医誌。38：1987.
- 11) 荒木恒治：輸入食品による寄生虫病の研究-特に最近多発せる顎口虫症および旋毛虫症を中心として-昭和60年科学研究学費補助金(総合研究A)研究課題番号59372001。研究成果報告書。1986.
- 12) Biagi, F. F. and Tay, J.: A precipitation reaction for the diagnosis of cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 7: 63, 1958.

- 13) **Mosina, S. K.**: Immunological methods for diagnosing experimental cysticercosis in cattle. Uchen. Zap. Kazan. Vet. Inst. **94**: 123, 1965.
- 14) **Maddison, S. E., Whittle, H. and Elsdon-Dew, R.**: The antigens of tapeworms. preliminary note. South Afr. J. Sci. **57**: 273, 1961.
- 15) **Proctor, E. M. and Elsdon-Dew, R.**: Serological tests in porcine cysticercosis. South Afr. J. Sci. **62**: 264, 1966.
- 16) **Proctor, E. M., Powell, S. J. and Elsdon-Dew, R.**: The serological diagnosis of cysticercosis. Ann. Trop. Med. Parasitol. **60**: 146, 1966.
- 17) **Leikina, E. S., Sokolovskaya, O. M., Poletaeva, O. G., Astakhova, O. O. and Moskvina, S. N.**: Immunodiagnosis of cysticercosis of cattle and methods of the evaluation of the results. Med. Parasitol. and Parasitic Dis. (Moscow) **35**: 157, 1966.
- 18) **Bugyaki, L.**: Diagnostic de la cysticercose a l'aide de l'intradermo-reaction. Bull. Epizoot. Dis. Afr. **9**: 15, 1961.
- 19) **Froyd, G.**: Intradermal tests in the diagnosis of bovine cysticercosis. Bull. Epizoot. Dis. Afr. **11**: 303, 1963.
- 20) **Dewhirst, L. W., Trautman, R. J., Pistor, W. J. and Reed, R. E.**: Studies on ante-mortem diagnostic procedures in bovine cysticercosis infections. J. Parasitol. **46**: 10, 1960.
- 21) **Diwan, A. R., Coker-Vann, M., Brown, P., Subianto, D. B., Yolken, R., Desowitz, R., Escobar, A., Gibbs, C. J. Jr. and Gajdusek, D. C.**: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **31**: 364, 1982.
- 22) **Coker-Vann, M., Brown, P. and Gajdusek, D. C.**: Serodiagnosis of human cysticercosis using a chromatofocused antigenic preparation of *Taenia solium* cysticerci in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **78**: 492, 1984.
- 23) **Knobloch, J. and Delgado, E. A.**: Immunodiagnosis of cysticercosis: standardization of ELISA and its application to field conditions. Trop. Med. Parasitol. **36**: 157, 1985.
- 24) **Cosa, J. M., Mineo, R., Livramento, J. A. and Camargo, M. E.**: Detection by the immunoenzymatic test ELISA of IgM anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in the cerebrospinal fluid in neurocysticercosis. Arch. Neuropsychiatr. **43**: 22, 1985.
- 25) **Gottstein, B., Zini, D. and Schantz, P. M.**: Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Trop. Med. Parasitol. **38**: 299, 1987.
- 26) **Gottstein, B., Tsang, V. C. W. and Shantz, P. M.**: Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacystode antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35**: 308, 1986.
- 27) **Larralde, C., Lacleste, J. P., Owen, C. S., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Rciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M. L., Govezensky, T., Montoya, R. M. and Goodsaid, F.**: Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and Hemagglutination tests. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35**: 965, 1986.
- 28) **Perkhouse, R. M. E. and Harrison, L. J. S.**: Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia sp.* metacestodes. Parasite Immunology **9**: 263, 1987.
- 29) **Larralde, C., Montoya, R. M., Sciutto, E., Diaz, M. L., Govezensky, T. and Colotorti, E.**: Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. **40**: 282, 1989.
- 30) **Lacleste, J. P., Mechant, M. T. and Willms, K.**: Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. J. Parasitol. **73**: 121, 1987.
- 31) **Estrada, J. J., Estrada, J. A. and Kuhn, R. E.**: Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. **41**: 50, 1989.