

## 有鉤囊虫症の血清診断法に関する研究

奈良県立医科大学寄生虫学教室

八 木 純

### STUDIES ON SERODIAGNOSTIC METHOD OF CYSTICERCOSIS CELLULOSAE

JUN YAGI

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received November 30, 1989

**Summary:** The present study was designed to determine optimum conditions of ELISA for the immunodiagnosis of *Cysticercus cellulosae* infection in humans and in pigs using four antigens extracted from *C. cellulosae* (Cyst fluid antigen, Ccf. Ag; Cyst body antigen, Ccb. Ag; Cyst wall antigen, Ccw. Ag; Conus derived antigen, Ccc. Ag). The usefulness of the proposed methods was assessed.

The following results were obtained.

1. Ccf. Ag was most useful for the immunodiagnosis of *C. cellulosae* infection in pigs. Optimum conditions in the ELISA were at the concentration of 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Ccf. Ag, 10,000 times diluted peroxidase-labelled anti-porcine IgG and at 100 dilution of test sera. More stable results were obtained by blocking the epitope of porcine IgG in Ccf. Ag with rabbit anti-porcine IgG antiserum.

2. In the case of cerebral cysticercosis cellulosae hominis, Ccf. Ag was most sensitive and specific for the serodiagnosis. The optimum conditions, when this antigen was used, were same as used for the infection in pigs. Under these test-conditions by ELISA, significant differences were obtained among cysticercosis and other parasite infections (taeniasis saginata, diphyllbothriasis latum, sparganosis mansoni, diplogonoporiasis grandis, fascioliasis, clonorchiasis, paragonimiasis, strongyloidiasis and ascariasis).

3. When patient sera absorbed with *T. saginata* antigens was used, much greater differences were obtained among cysticercosis and other parasitic infections with the ELISA using Ccf as an antigen.

These results indicate that the ELISA using Ccf as an antigen is most sensitive and specific for screening *Cysticercus cellulosae* infection.

#### Index Terms

*Cysticercus cellulosae*, ELISA, screening method, human, pig

#### 緒 言

第二次世界大戦後の混乱の時代とはうって変わって、今日我が国での寄生虫疾患は減少の一途を辿っているが、世界に目を向けると寄生虫疾患は減少どころか、発展途上国の人口の爆発的な増加に伴い、寄生虫罹患者数は増加の傾向が見られている。従って、食品より経口感染す

る有鉤囊虫症は、このような流行地からの食肉用ブタや生ハムなどの生鮮食料品の輸入により、今後我が国でも集団発生する可能性が危惧されている(荒木, 1986)。ところで、有鉤囊虫症の確定診断は組織病理学的同定にあるが、脳有鉤囊虫症の様に虫体の摘出同定が困難な場合があり、血清免疫学的診断法等の間接診断に依らざるを得ない場合が多い。当教室では以前より、オクタロニー

法を用いて、血清中の循環抗体並びに循環抗原の検出を行い、診断的価値を検討してきたが（荒木,<sup>2)</sup>1987；瀬川,<sup>3)</sup>1988；森田,<sup>4)</sup>1984）、これらの検査法では有鉤囊虫抗原並びに抗有鉤囊虫免疫血清が大量に必要であり、また反応から診断まで数日間必要な事から、今後想定しうる有鉤囊虫症の集団発生に遭遇した場合に、対応できる血清診断法の体系化の必要性に迫られてきた。

今回、有鉤囊虫を有鉤囊虫囊胞液、体部、囊胞壁、円錐部剝脱物の4種に分離し、酵素免疫測定法（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）を用いて、有鉤囊虫感染ブタ血清及び脳有鉤囊虫症患者血清に対して、それぞれの抗原の至適条件の設定を行い、一定の条件下で有鉤囊虫症や他の寄生虫症患者及び健康者に対する感度並びにその特異性を比較検討し、スクリーニング法としての有用性の検討を行った。

**材料および方法**

**(A) 実験対象**

実験の対象は、有鉤囊虫感染ブタ、非感染ブタ、ヒト脳有鉤囊虫症、有鉤囊虫以外の寄生虫症患者及び健康者である。

**(1) 有鉤囊虫感染ブタ血清**

韓国済州島の農家で飼育していた有鉤囊虫自然感染ブタ13頭（体重64~102 kg）を集め、それぞれ頸静脈から無菌的に採血した後、血清を分離し有鉤囊虫感染ブタ血清とした。また、これらのブタ1頭につき有鉤囊虫の感染数はおおよそ125~9521虫であった。

**(2) 有鉤囊虫非感染ブタ血清**

奈良県南和家畜保健所管内の農家で飼育されている有鉤囊虫に感染していない事が確認されているブタ32頭の頸静脈より無菌的に採血、血清分離し、有鉤囊虫非感染ブタ血清とした。

**(3) ヒト脳有鉤囊虫症患者血清**

臨床的に脳内に病巣を指摘され、皮下結節あるいは脳内囊胞を外科的に摘出し、それを形態学的に有鉤囊虫と確定診断しえた患者の血清を脳有鉤囊虫症患者血清（9例）とした。

**(4) 有鉤囊虫症以外の寄生虫症患者血清**

当教室で今まで経験した糞線虫症3名、回虫症5名、肺吸虫症5名、肝蛭症3名、肝吸虫症4名、大複殖門条虫症1名、無鉤条虫症4名、マンソン孤虫症4名、広節裂頭条虫症13名、以上42名の血清を比較対照として使用した。

**(5) 健康者コントロール血清**

臨床的にいずれの疾患をも有しない健康者9名から得た血清を実験に供した。

**(B) 抗原の作製**

上記の自然感染ブタを屠殺し、筋肉中の有鉤囊虫を取り出し、Fig. 1に示すように、有鉤囊虫囊胞液（cyst fluid）、体部（cyst body）、囊胞壁（cyst wall）、円錐部（conus）剝脱物に分離し、それぞれを抗原とした。

**(1) 有鉤囊虫囊胞液抗原（以下 Ccf. Ag とする）の作製**

囊虫体の囊胞の破損していない有鉤囊虫を滅菌生理食塩水で数度洗浄した後、1回ずつ注意深くピンセットでつまみ上げ、ツベルクリン用注射器で囊胞液のみを吸引し、無菌的に採取した。

囊胞液を4℃、10,000 gで30分間遠心し、その上清を蒸留水に対して、4℃、12時間透析し、凍結乾燥した物を抗原とした。

**(2) 有鉤囊虫体部抗原（以下 Ccb. Ag とする）の作製**

囊胞液を採取した後の有鉤囊虫の囊胞壁を破り0.1%滅菌食塩水で洗浄し、囊胞液を除去した囊虫を実体顕微鏡下で虫体を含む円錐部（体部）と囊胞壁とに分離し、

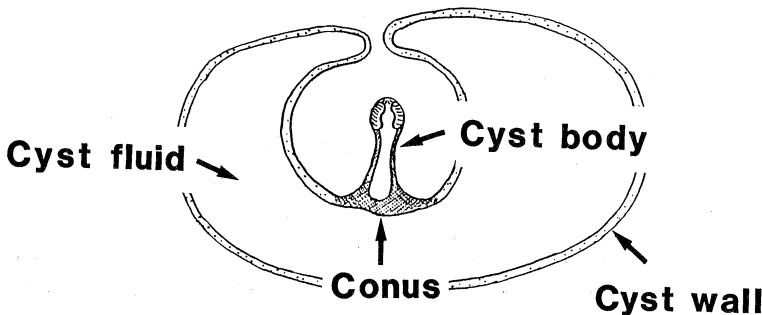


Fig. 1. Schematic illustration of the structure of *Cysticercus cellulosae*.

その内の有鉤囊虫体部を集め、0.1%滅菌食塩水で十分洗浄し、ガラスホモゲナイザーにて粉碎した後、乳鉢に入れて凍結、乳鉢にて粉末状になるまで叩き、融解しかけた時点で、これを再び凍結した。これらの凍結、粉碎を十分繰り返した後、4℃、10,000gで、30分間遠心した。この上清を蒸留水に対して、4℃、12時間透析し、凍結乾燥した物を抗原とした(辻, 1974)。

(3) 有鉤囊虫囊胞壁抗原(以下 Ccw. Ag とする)の作製

上述の方法にて分離した有鉤囊虫囊胞壁を、同様の方法で粉碎し、遠心、透析、凍結乾燥し、乾燥物を抗原とした。

(4) 有鉤囊虫円錐部由来抗原(以下 Ccc. Ag とする)の作製

有鉤囊虫の体部と囊胞壁を分離切断する際、囊胞壁内に翻入している頭節を翻出させるが、囊胞壁と体部を分離の際、その間のいわゆる円錐部を形成している白色の粥状物の剥脱組織を収集し、0.1%滅菌食塩水中に浮遊させ、乳鉢に入れ凍結、以下同様の方法で粉碎、遠心、透析、凍結乾燥し、乾燥物を抗原とした。

(5) 無鉤条虫抗原(以下 T. sag. Ag とする)の作製

凍結乾燥していた無鉤条虫の成熟体節から受胎体節に0.1%滅菌食塩水を入れガラスホモゲナイザーで粉碎し、それを4℃、2時間、超音波処理し、その後4℃、2日間抽出し、4℃、10,000gで30分間遠心分離し、上清を蒸留水に対し4℃、2日間透析し、それを凍結乾燥した物を抗原とした。

これらの抗原は、いずれも Lowry *et al.*<sup>6)</sup> (1951)の方法にて、ウシ血清アルブミンを基準として蛋白濃度を測定した。それぞれの抗原1mg中の蛋白量は Ccf. Ag では182 μg, Ccb. Ag では200 μg, Ccw. Ag では153 μg, Ccc. Ag では500 μg, T. sag. Ag では420 μgであった。

(C) 血中抗体測定のための ELISA 法の手技

(1) 有鉤囊虫各種抗原(Ccf. Ag, Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccc. Ag)を用いた有鉤囊虫感染ブタ並びにヒト有鉤囊虫症患者の血中抗有鉤囊虫抗体(IgG)を測定する為の ELISA 法の手技 (Fig. 2)

Ccf. Ag, Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccc. Ag を用い、それぞれの抗原量の至適条件を検討する為、有鉤囊虫各種抗原を0.05 M の炭酸塩緩衝液(pH 9.6)で、それぞれ30, 15, 5 μg/ml に希釈し microtiter plate (M 129 A, Dynatech 社製)の well に各々100 μml ずつ入れ、4℃、18時間放置し固相化した。

1%ウシ血清アルブミン(Sigma 社製)を含んだ同炭

1. Wells of the plate were coated with antigens (cyst fluid Ag, body Ag, cyst wall Ag, conus derived Ag) diluted with carbonate buffer (0.05 M, pH 9.6) at 4°C for 18 hours.
2. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
3. Blocked with the same carbonate buffer containing 1% BSA at 37°C for 1 hour.
4. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
5. Test diluted sera were reacted at 37°C for 1 hour.
6. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
7. Peroxidase labelled anti-porcine or anti-human IgG was added and incubated at 37°C for 1 hour.
8. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
9. OPD was reacted in dark room at 20°C for 30 minutes.
10. Enzymic reaction was stopped using 3N-sulfuric acid.
11. Absorbance was measured at 500 nm.

Fig. 2. Procedure of ELISA with antigens extracted from four parts of *Cysticercus cellulosae*.

酸塩緩衝液200 μl ずつ入れ、37℃、1時間放置し、ブロックを行った。被検血清を順次階段希釈し、100 μl ずつ入れ、37℃、1時間反応させた。次に、peroxidase 標識抗ブタ IgG (Miles-Yeda 社製)、並びに同標識抗ヒト IgG (Cappel 社製)を5,000, 10,000倍に希釈し、それぞれ100 μl ずつ入れ、37℃、1時間反応させた。ここまでの各段階の最後にいずれも0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝食塩水で十分洗浄を行った。最後に、30%の過酸化水素水10 μl で活性化した10 mg/dl の o-phenylene diamine (ナカライテスク社製)を100 μl ずつ入れ、20℃、30分間酵素反応させ、次いで、3N-硫酸100 μl を入れる事により、酵素反応を停止させた。その反応産物を分光光度計(コロナ社製、主波長500 nm, 副波長610 nm)で、吸光度を測定した(Voller *et al.*<sup>7)</sup>, 1976)。

(2) 有鉤囊虫感染ブタ血清中の特異 IgG 抗体を測定する為の ELISA 法の手技(ブタ IgG 成分ブロック法) (Fig. 3)

有鉤囊虫感染ブタ血清中の特異抗体の測定に関して、荒木<sup>2)</sup>(1987)、瀬川<sup>3)</sup>(1988)はオクタロニー法を用いて検討を加えているが、有鉤囊虫囊胞液抗原が最も感受性が良く、特異性においても優れている事が証明されている。ここで、Ccf. Ag を用いて、ELISA 法にて特異抗体の測定を試みた。

まず、Ccf. Ag はその抗原中に、宿主であるブタの血清成分が含まれている事が考えられ、免疫電気泳動法に

より検討を行なった。

Ccf. Ag と抗ブタ血清との間に Fig. 4 に示す様に  $\gamma$  分画に 1 本,  $\beta$  分画に 4 本,  $\beta$  から  $\alpha$  分画にかけて 1 本の沈降線を認め, 更に抗ブタ IgG 抗体との間に  $\gamma$  分画の沈降線を 1 本認め, Ccf. Ag 中にブタ IgG 成分が混在していることが証明された。ここで ELISA 法を行うに際して得られる結果を安定させる為, このブタ IgG 成分をブロックすべく, 下記に述べた手技を行った。

microtiter plate の well にそれぞれ Ccf. Ag を炭酸

1. Wells of the plate were coated with antigens (cyst fluid antigen) diluted with carbonate buffer (0.05 M, pH 9.6) at 4°C for 18 hours.
2. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
3. Blocked with the same carbonate buffer containing 1% BSA at 37°C for 1 hour.
4. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
5. Blocked with the epitope of porcine IgG with anti-porcine IgG rabbit serum at 37°C for 1 hour.
6. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
7. Test diluted sera were reacted at 37°C for 1 hour.
8. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
9. Peroxidase labelled anti-porcine IgG was added and incubated at 37°C for 1 hour.
10. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
11. OPD was reacted in dark room at 20°C for 60 minutes.
12. Absorbance was measured at 500 nm.

Fig. 3. Procedure of ELISA with Ccf Ag blocked the epitopes of porcine IgG and with rabbit anti-porcine IgG antiserum.

塩緩衝液にて  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈し,  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ  $4^\circ\text{C}$ , 18 時間放置し固相化させた。次に, ウシ血清アルブミンを 1% になる様に同炭酸塩緩衝液で溶解し, それぞれの well に  $200 \mu\text{l}$  ずつ分注し,  $37^\circ\text{C}$ , 1 時間放置し, ブロックを行った。更に, Ccf. Ag 中のブタ IgG 成分の抗原性をブロックする為に, 抗ブタ IgG ウサギ血清 (Cappel 社) を 1% ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水で 100 倍に希釈し, それぞれ  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ,  $37^\circ\text{C}$ , 1 時間で抗原抗体反応をさせ, 固相化した抗原中に含まれるブタ IgG 成分のエピトープをブロックし, 得られる結果の安定化を試みた。また, コントロールとして抗ブタ IgG ウサギ血清の代わりに 1% ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水  $100 \mu\text{l}$  を入れた。以下, 上述の ELISA 法と同様の手技で測定を行った。

(3) ヒト有鉤囊虫症の無鉤条虫抗原吸収 ELISA 法による特異 IgG の測定 (Fig. 5, 寄生虫抗原吸収 ELISA 法)

有鉤囊虫特異抗体の検出は, 荒木<sup>2)</sup> (1987), 瀬川<sup>3)</sup> (1988) らがオクタロー法を用いて検討し, 無鉤条虫抗原を用いて抗血清を吸収すると, 他の寄生虫抗原に対して交差反応を認めない, としている。ここで, 著者は上述の ELISA 法で用いた有鉤囊虫症患者血清並びに無鉤条虫症患者血清, その他の寄生虫症患者血清を用いて, 予め無鉤条虫抗原と反応する抗体を吸収し交差反応を除去させた後 ELISA 法を行い検討を加えた。

手技は, 上述の ELISA 法と同様に microtiter plate の well に Ccf. Ag  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Ccb. Ag  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に 0.05 M, pH 9.6 の炭酸塩緩衝液で希釈した溶液をそれぞれ  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ,  $4^\circ\text{C}$ , 18 時間放置し固相化さ

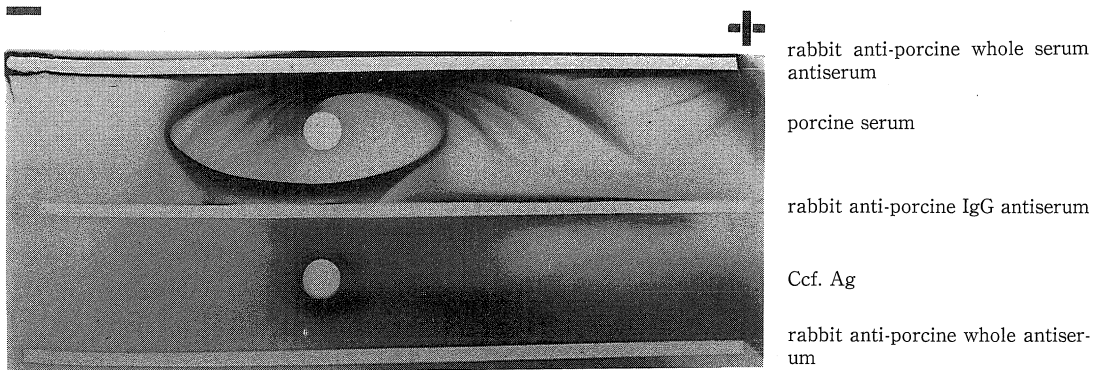


Fig. 4. Immunoelectrophoretic analysis of cross-reactivity among Ccf. Ag against anti-porcine serum.

せた。次に、1% BSA を含む同炭酸塩緩衝液を 200  $\mu$ l ずつ入れ、37°C、1 時間放置し、ブロックを行った。ここで、次に入れる被検血清は予め 100 倍に希釈し、その希釈液と同量の 420  $\mu$ g/ml の濃度の無鉤条虫抗原溶液を混じ、37°C、30 分間ブレインキュベーションし、無鉤条虫と交差反応する抗体を除去した後 100  $\mu$ l ずつ入れ、37°C、1 時間反応させた。以下上述の ELISA 法と同様に反応、洗浄を繰り返し、測定を行った。

## 結 果

(A) 有鉤囊虫感染ブタにおける Ccf. Ag, Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccc. Ag を用いての ELISA 法による抗有鉤囊虫抗体 (IgG) 測定のための至適条件の決定

peroxidase 標識抗ブタ IgG 抗体の希釈濃度を Ccf. Ag, Ccb. Ag, Ccw. Ag では 10,000 倍に、Ccc. Ag では、5,000 倍に設定し、microtiter plate への固相化抗原量を 30, 15, 5  $\mu$ g/ml と変化させ、オクタロー法で抗体価の高かった感染ブタ血清と非感染ブタ血清を 3 の倍数に希釈し、ELISA 法を行った。

(1) Ccf. Ag を用いた場合 (Fig. 6)

Fig. 6 に示す様に、固相化 Ccf. Ag 量が 30  $\mu$ g/ml の場合、感染ブタ血清の吸光度は順次、0.934, 1.013, 0.925, 0.924, 0.766, 0.568, 0.401, 0.373 となり、非感染ブタ血清では、0.483, 0.514, 0.429, 0.361, 0.295, 0.281, 0.269, 0.271 と測定できた。15  $\mu$ g/ml の

1. Wells of the plate were coated with antigens (cyst fluid Ag, body Ag) diluted with carbonate buffer at 4 °C for 18 hours.
2. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
3. Blocked with the same carbonate buffer containing 1% BSA at 37°C for 1 hour.
4. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
5. Test diluted sera were preincubated with *Taenia saginata* antigen at 37°C for 30 minutes.
6. Test preincubated sera added and reacted at 37°C for 1 hour.
7. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
8. Peroxidase labelled anti-human IgG was added and incubated at 37°C for 1 hour.
9. Washed with PBS (pH 7.2) containing 0.02% Tween 20.
10. OPD was reacted in dark room at 20°C for 30 minutes.
11. Enzymic reaction was stopped using 3N-sulfuric acid.
12. Absorbance was measured at 500 nm.

Fig. 5. Procedure of ELISA using test sera absorbed with *T. saginata* Ag.

場合、感染ブタ血清では、0.743, 0.781, 0.772, 0.744, 0.664, 0.578, 0.381, 0.363 となり、非感染ブタ血清では、0.382, 0.432, 0.321, 0.293, 0.286, 0.275, 0.248, 0.253 となった。5  $\mu$ g/ml の場合、感染ブタ血清では、0.648, 0.619, 0.591, 0.574, 0.544, 0.475, 0.474, 0.480 となり、非感染ブタ血清では、0.446, 0.451, 0.450, 0.435, 0.326, 0.268, 0.213, 0.248 となり、Ccf. Ag を使用した場合、固相化抗原量は 15  $\mu$ g/ml で十分である事が実証された。

(2) Ccb. Ag を使用した場合 (Fig. 7)

Fig. 7 に示す様に、固相化 Ccb. Ag 量が 30  $\mu$ g/ml の場合、感染ブタ血清の吸光度は順次、0.433, 0.481, 0.675, 0.586, 0.439, 0.371, 0.303, 0.296 となり、非

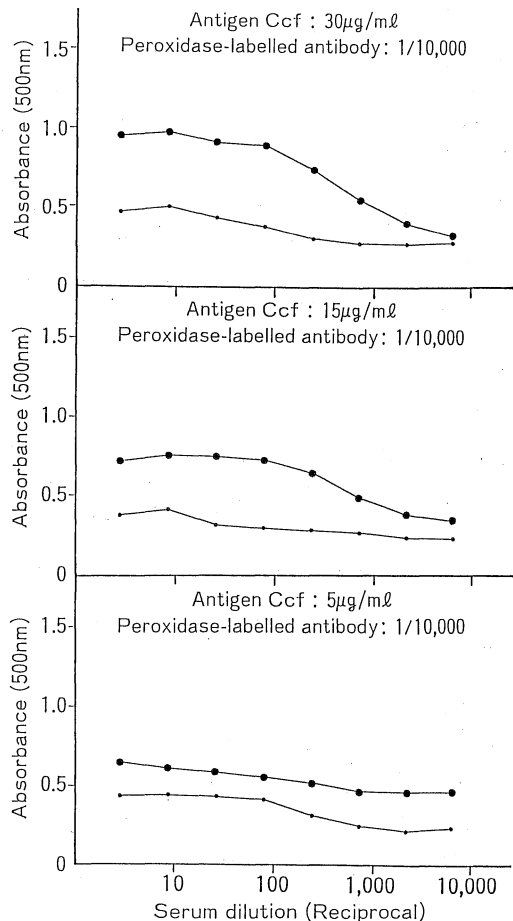


Fig. 6. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccf. Ag for diagnosis of cysticercosis in pigs. ●: infected pig, ○: uninfected pig

感染ブタ血清では、0.380, 0.326, 0.238, 0.281, 0.302, 0.293, 0.270, 0.241となった。15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、感染ブタ血清では、0.715, 0.617, 0.568, 0.475, 0.373, 0.321, 0.305, 0.332となり、非感染ブタ血清では、0.415, 0.458, 0.536, 0.451, 0.397, 0.483, 0.343, 0.305となった。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、感染ブタ血清では、0.513, 0.605, 0.638, 0.571, 0.461, 0.353, 0.252, 0.221となり、非感染ブタ血清では、0.265, 0.435, 0.475, 0.428, 0.374, 0.287, 0.238, 0.249となり、これらの濃度の Ccb. Ag を使用した場合、有鉤囊虫感染ブタの血清学的診断にあまり有用で無いことが実証された。

(3) Ccw. Ag を使用した場合 (Fig. 8)

Fig. 8 に示す様に、固相化 Ccw. Ag 量が 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、感染ブタ血清では、0.451, 0.636, 0.776, 0.621, 0.610, 0.463, 0.385, 0.326となり、非感染ブタ血清では、0.341, 0.400, 0.425, 0.431, 0.484, 0.374, 0.323, 0.307となった。15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、感染ブタ血清では、0.687, 0.619, 0.621, 0.534, 0.549, 0.437, 0.386, 0.344となり、非感染ブタ血清では、0.438, 0.413, 0.371, 0.331, 0.432, 0.381, 0.335, 0.308となった。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、感染ブタ血清では、0.671, 0.716, 0.734, 0.573, 0.538, 0.439, 0.331, 0.275となり、非感染ブタ血清では、0.476, 0.381, 0.369, 0.401, 0.367, 0.328, 0.285, 0.261となり、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  , 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及び 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のいずれの濃度の Ccw. Ag を

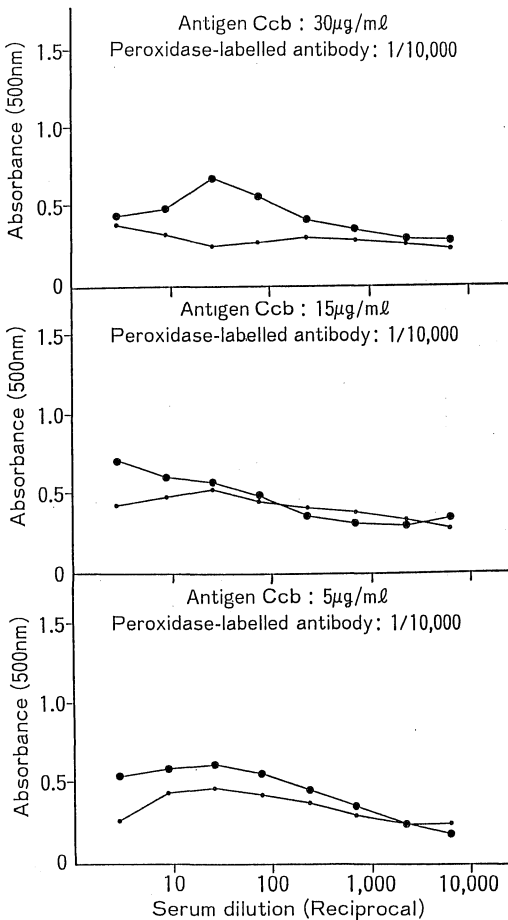


Fig. 7. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccb. Ag for diagnosis of cysticercosis in pigs. ● : infected pig, ○ : uninfected pig

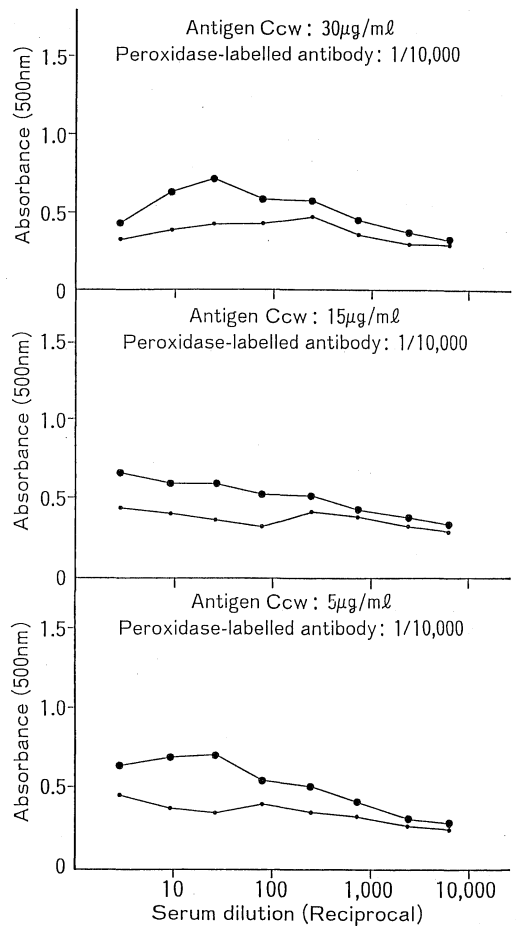


Fig. 8. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccw. Ag for diagnosis of cysticercosis in pigs. ● : infected pig, ○ : uninfected pig

使用した場合においても、有鉤囊虫感染ブタの血清学的診断において、あまり有用ではないことが実証された。

(4) Ccc. Ag を使用した場合 (Fig. 9)

Fig. 9 に示す様に、固相化 Ccc. Ag 量が  $30 \mu\text{g/ml}$  の場合、感染ブタ血清では、0.796, 0.903, 0.871, 0.868, 0.926, 0.898, 0.873, 0.831 となり、非感染ブタ血清では、1.035, 0.871, 0.835, 0.750, 0.615, 0.702, 0.853, 0.685 となった。  $15 \mu\text{g/ml}$  の場合、感染ブタ血清では、1.217, 0.934, 0.875, 0.938, 0.986, 0.926, 0.871, 0.870 となり、非感染ブタ血清では、0.789, 0.808, 0.561, 0.674, 0.783, 0.798, 0.870, 0.835 となった。  $5 \mu\text{g/ml}$  の場合、感染ブタ血清では、0.864, 0.740, 0.675, 0.941, 0.960, 0.848, 0.874, 0.913 とな

り、非感染ブタ血清では、0.925, 0.886, 1.071, 0.915, 0.883, 0.824, 0.831, 0.823 となり、  $30 \mu\text{g/ml}$ ,  $15 \mu\text{g/ml}$  及び  $5 \mu\text{g/ml}$  のいずれの濃度の Ccc. Ag を使用した場合においても有鉤囊虫感染ブタの血清学的診断に有用ではない事が実証された。

以上の結果から、有鉤囊虫感染ブタの ELISA 法による血清学的診断に関して Ccf. Ag が最も有用で、  $15 \mu\text{g/ml}$  の濃度で十分な反応が得られる事が実証された。

(B) Ccf. Ag を用いた有鉤囊虫感染ブタにおける ELISA 法による血清学的診断の検討 (Fig. 10)

上記の実験で得られた至適条件下で有鉤囊虫感染ブタ 13 頭、非感染ブタ 32 頭の血清を用いて ELISA 法を行った所、非感染ブタにおいて非特異的反応が強く出現し、安定した結果を得る事ができなかった。ここで Ccf. Ag 中のブタ血清 IgG 成分を抗ブタ IgG 抗体でブロックした場合と抗ブタ IgG 抗体の代わりに 1% ウシ血清アルブミンを含む磷酸緩衝生理食塩水を入れた場合と比較検討してみると、有鉤囊虫感染ブタにおいて抗ブタ IgG ウサギ血清で well の抗原をブロックした群 (blocked group) では、得た吸光度は  $0.663 \pm 0.105$  であったのに対し、1% ウシ血清アルブミンでブロックした群 (non-blocked group) では、得た吸光度は  $0.548 \pm 0.183$  であった。また、対照として有鉤囊虫非感染ブタ 32 頭の血清で同様の検討を行った結果、抗ブタ IgG ウサギ血清でブロックした群 (blocked group) では、得た吸光度は  $0.411 \pm 0.045$  であるのに対し、1% ウシ血清アルブミンでブロックした群 (non-blocked group) では、得た吸光度は  $0.290 \pm 0.051$  であった。

以上の様に、有鉤囊虫感染ブタ群及び非感染ブタ群において、抗ブタ IgG ウサギ血清のブロックにより各々平均値で 0.115, 0.121 の吸光度上昇を認めるが、有鉤囊虫感染ブタ群では抗ブタ IgG ウサギ血清によってブロックする事により、標準偏差は 0.183 から 0.105 に減少し、データを安定させる事ができた。また正常域を非感染ブタ群の  $M+2 \text{ SD}$  とすると、抗ブタ IgG ウサギ血清でブロックしていない群 (non-blocked group) では、有鉤囊虫感染ブタ群 13 頭の中に 2 頭の明らかな陰性を出しているのに対し、抗ブタ IgG ウサギ血清でブロックした群 (blocked group) では、有鉤囊虫感染ブタ全てに陽性の吸光度が得られ、抗ブタ IgG ウサギ血清でブロックする事により、更に安定したデータを得る事ができた。しかし、有鉤囊虫感染ブタ群と非感染ブタ群に Student's t 検定を行った結果、抗ブタ IgG ウサギ血清でブロックした群 (blocked group)、及びブロックしていない群 (non-blocked group) は、共に 1% の水準で有意差を得

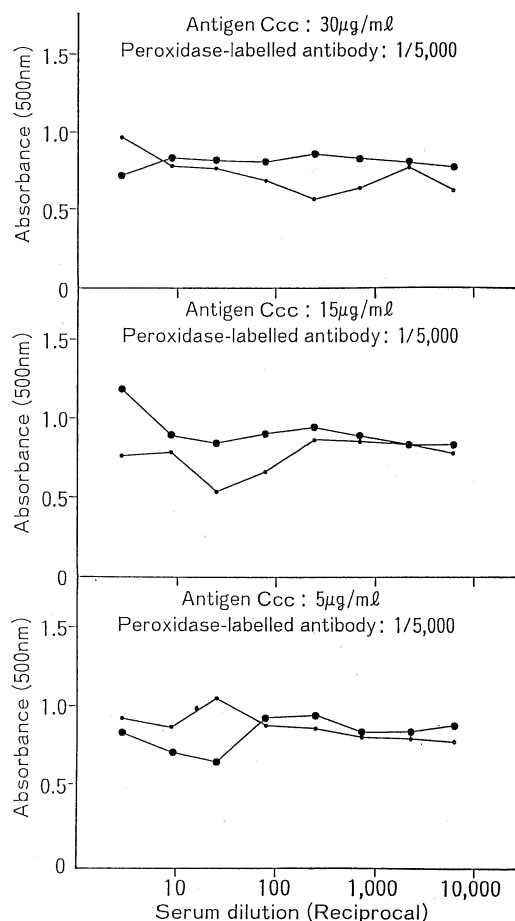


Fig. 9. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccc. Ag for diagnosis of cysticercosis in pigs. ● : infected pig, ○ : uninfected pig

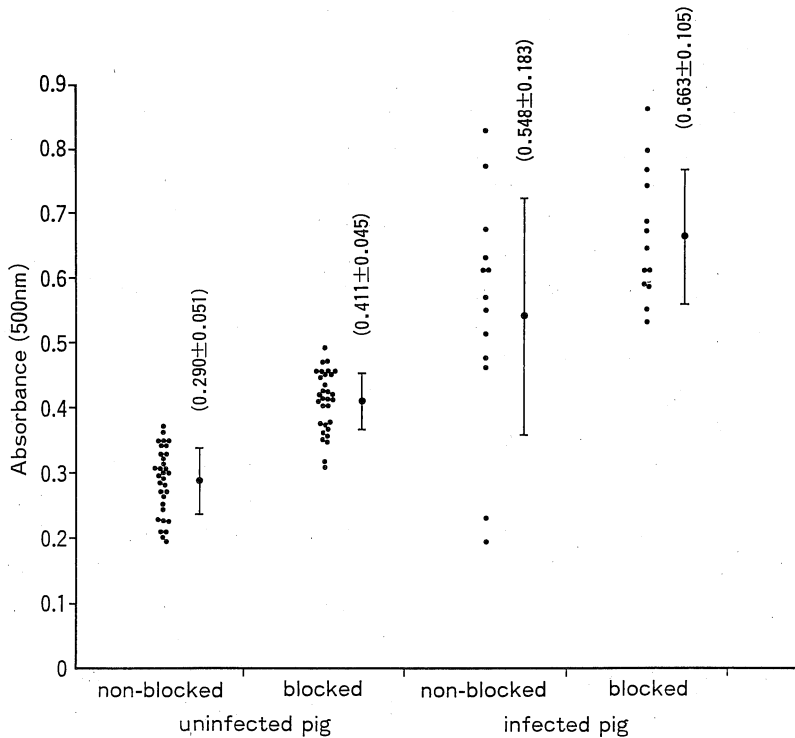


Fig. 10. Antibody titers to Ccf in sera of uninfected and/or infected pigs before or after blocking their IgG-epitopes.

ており、統計学的には同等の結果であった。

(C) ELISA法による脳有鉤囊虫症における Ccf. Ag, Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccc. Ag を用いた血清学的診断の至適条件の決定

(1) Ccf. Ag を用いた ELISA 法における至適条件の決定 (Fig. 11)

peroxidase標識抗ヒト IgG 抗体の希釈濃度を10,000倍に設定し、microtiter plate への固相化 Ccf. Ag 量を30, 15, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と変化させ、オクタロニー法で抗体価の高かった患者血清と健常者血清を3の倍数に希釈し、ELISA 法を行った。Fig. 11 に示す様に、固相化 Ccf. Ag 量が30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清の吸光度は順次 0.878, 0.854, 0.768, 0.659, 0.500, 0.305, 0.183, 0.117 となり、健常者血清では、0.341, 0.207, 0.098, 0.073, 0.049, 0.059, 0.061, 0.051 となった。15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清では、0.880, 0.841, 0.746, 0.610, 0.483, 0.293, 0.171, 0.085 となり、健常者血清では、0.329, 0.215, 0.110, 0.068, 0.046, 0.029, 0.027, 0.022 となった。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清では、0.793, 0.744, 0.671, 0.524, 0.390, 0.234, 0.096, 0.074 とな

り、健常者血清では、0.329, 0.220, 0.122, 0.073, 0.051, 0.046, 0.037, 0.037 となった。以上より Ccf. Ag を使用した場合、固相化 Ccf. Ag 量は5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で十分な反応が得られ、被検血清希釈濃度は10倍から200倍希釈が適当な測定条件である事が実証された。

(2) Ccb. Ag を用いた ELISA 法における至適条件の決定 (Fig. 12)

peroxidase 標識ヒト IgG 抗体の希釈濃度を10,000倍希釈に設定し、microtiter plate への固相化 Ccb. Ag 量を30, 15, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と変化させ、Ccf. Ag と同様に患者血清、健常者血清を希釈し、ELISA 法を行った。Fig. 12 に示す様に、固相化 Ccb. Ag 量が30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清の吸光度は順次、0.890, 0.841, 0.659, 0.512, 0.451, 0.268, 0.244, 0.195 となり、健常者血清では、0.183, 0.171, 0.159, 0.134, 0.110, 0.098, 0.105, 0.117 となった。15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清では、0.878, 0.768, 0.634, 0.476, 0.402, 0.354, 0.268, 0.195 となり、健常者血清では、0.144, 0.146, 0.122, 0.134, 0.085, 0.085, 0.096, 0.110 となった。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清では、0.468, 0.427, 0.305, 0.207,



0.171, 0.120, 0.085, 0.066 となり, 健常者血清では, 0.066, 0.061, 0.049, 0.050, 0.029, 0.061, 0.037, 0.022 となった. 以上により Ccb. Ag を使用した場合, 固相化 Ccb. Ag 量は  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  で十分な反応が得られ, 被検血清希釈濃度は 3 倍から 200 倍希釈が適当な測定条件である事が実証された.

(3) Ccw. Ag を用いた ELISA 法における至適条件の決定 (Fig. 13)

peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体の希釈濃度を 10,000 倍希釈に設定し, microtiter plate への固相化 Ccw. Ag 量を 30, 15,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  と変化させ, 同様に患者血清,

健常者血清を希釈し, ELISA 法を行った. Fig. 13 に示す様に, 固相化 Ccw. Ag 量が  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  の場合, 患者血清の吸光度は順次, 1.163, 1.002, 0.734, 0.515, 0.332, 0.173, 0.078, 0.075 となり, 健常者血清では, 0.676, 0.434, 0.249, 0.124, 0.120, 0.054, 0.041, 0.049 となった.  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  の場合, 患者血清では, 1.007, 0.873, 0.654, 0.417, 0.224, 0.124, 0.078, 0.056 となり, 健常者血清では, 0.549, 0.390, 0.202, 0.085, 0.054, 0.027, 0.031, 0.030 となった.  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の場合, 患者血清では, 0.588, 0.485, 0.390, 0.244, 0.180, 0.093, 0.054, 0.054 となり, 健常者血清では, 0.500, 0.302, 0.173, 0.088, 0.101, 0.044, 0.034, 0.022

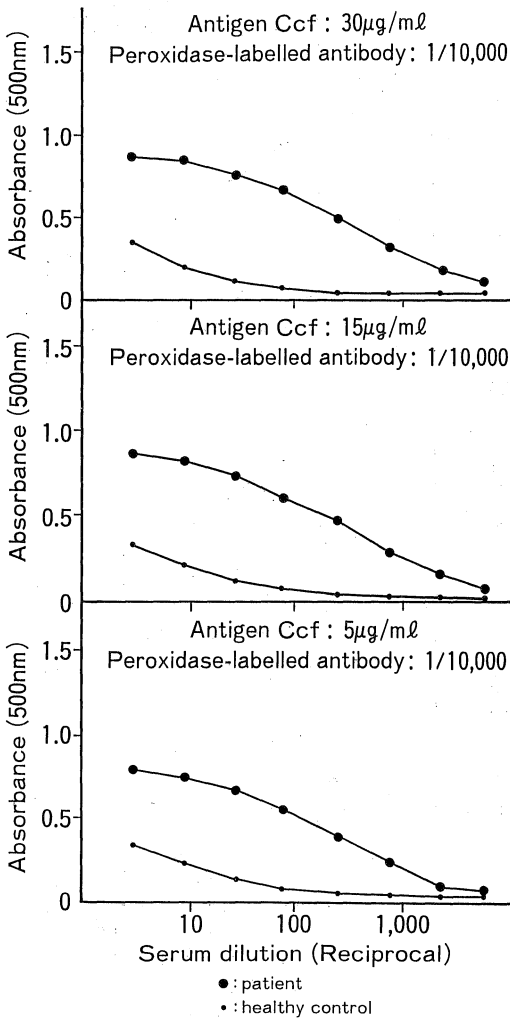


Fig. 11. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccf. Ag for diagnosis of cysticercosis in human.

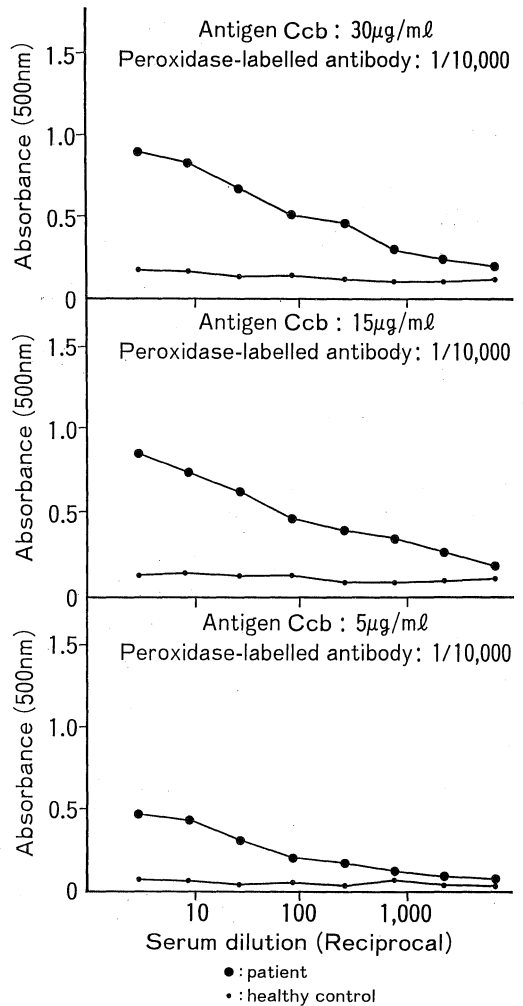


Fig. 12. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccb. Ag for diagnosis of cysticercosis in human.

となった。以上により Ccw. Ag を使用した場合、固相化 Ccw. Ag 量は  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  で十分な反応が得られ、被検血清希釈濃度は、10 倍から 100 倍希釈が適当な測定条件である事が実証された。

(4) Ccc. Ag を用いた ELISA 法における至適条件の決定 (Fig. 14)

peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体の希釈濃度を 5,000 倍希釈に設定し、microtiter plate への固相化 Ccc. Ag 量を 30, 15,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  と変化させ、同様に患者血清、健常者血清を希釈し、ELISA 法を行った。Fig. 14 に示す様に、固相化 Ccc. Ag 量が  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清の吸光度は順次、1.203, 1.037, 0.915, 0.683,

0.488, 0.298, 0.251, 0.171 となり、健常者血清では、0.817, 0.659, 0.480, 0.285, 0.183, 0.159, 0.149, 0.134 となった。 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清では、1.095, 1.024, 0.854, 0.622, 0.402, 0.268, 0.195, 0.129 となり、健常者血清では、0.902, 0.500, 0.280, 0.195, 0.144, 0.129, 0.107, 0.105 となった。 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の場合、患者血清では、0.866, 0.756, 0.602, 0.488, 0.293, 0.198, 0.124, 0.095 となり、健常者血清では、0.668, 0.539, 0.341, 0.183, 0.100, 0.076, 0.056, 0.046 となった。以上により Ccc. Ag を使用した場合、固相化 Ccc. Ag 量は  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  で十分な反応が得られ、被検血

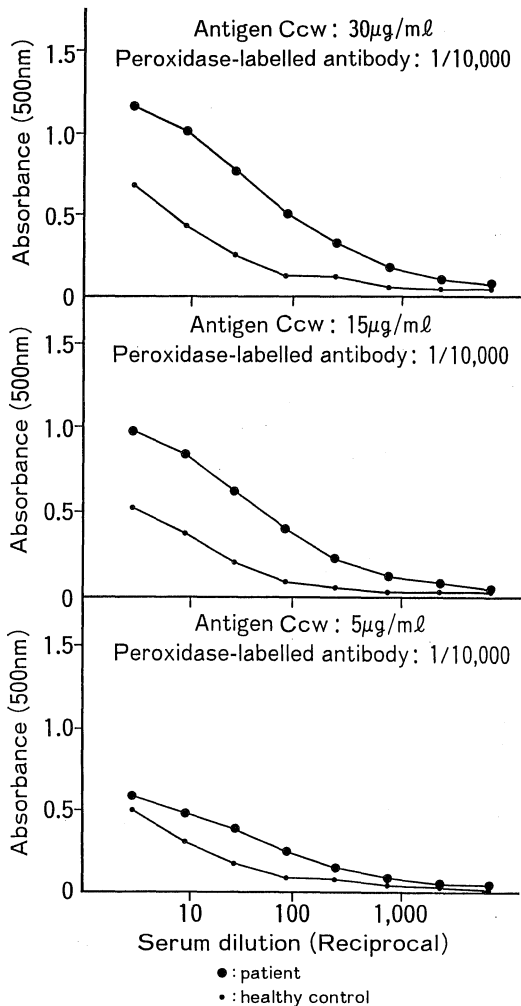


Fig. 13. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccw. Ag for diagnosis of cysticercosis in human.

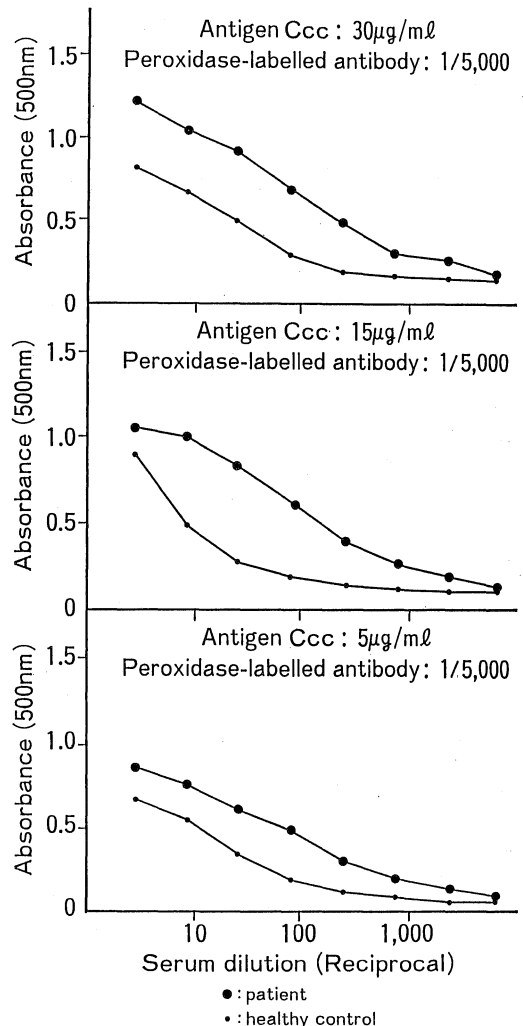


Fig. 14. Determination of optimum conditions of ELISA using Ccc. Ag for diagnosis of cysticercosis in human.

清希釈濃度は、30 倍から 100 倍希釈が適当な測定条件である事が実証された。

この様に、脳有鉤囊虫症患者血清の免疫学的診断において、これらの 4 種の抗原の内 Ccf. Ag を用いた ELISA 法が、最も少ない抗原量で十分な反応が得られ、非特異的な抗体の吸着が少なく、最良の抗原である事が証明された。また Ccb. Ag を用いた ELISA 法は、感度も比較的良好で、被検血清の濃度が濃い条件では、患者血清と健常者血清との間に有意差を認めた。Ccw. Ag や Ccc. Ag を用いた ELISA 法の場合、非特異的吸着が多く、患者血清と健常者血清との間に有意差を認める事ができなかった。

(D) Ccf. Ag, Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccc. Ag の各種抗原を用いた ELISA 法の至適条件における脳有鉤囊虫症患者血清と、その他の寄生虫症患者血清並びに健常者血清との交差反応の検討 (Fig. 15)

(1) Ccf. Ag を用いた場合 (抗原量:  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 血清希釈:  $1/100$ , peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体:  $1/10,000$ )

脳有鉤囊虫症患者血清では、吸光度は  $0.978 \pm 0.480$  ( $n=9$ ) となり、無鉤囊虫症患者血清では、 $0.443 \pm 0.159$  ( $n=4$ )、広節裂頭条虫症患者血清では、 $0.268 \pm 0.081$  ( $n=13$ )、その他の条虫症患者血清(マンスン孤虫症 4 例、大複殖門条虫症 1 例)では、 $0.248 \pm 0.079$  ( $n=5$ )、吸虫症患者血清 (肺吸虫症 5 例、肝絛虫症 3 例、肝吸虫症 4 例)では、 $0.273 \pm 0.078$  ( $n=12$ )、線虫症患者血清 (糞線虫症 3 例、回虫症 5 例)では、 $0.300 \pm 0.093$  ( $n=8$ )、健常者血清では、 $0.209 \pm 0.053$  ( $n=9$ ) となった。更に、それぞれの疾患に Student's t 検定を行った結果、脳有鉤囊虫症患者血清で得られた吸光度は、無鉤囊虫症患者血清との間に 10% の水準で有意差を認め、またその他の寄生虫症患者血清や健常者血清との間に 1% の水準で有意差を認めた。更に健常者血清の吸光度の  $M+2SD$  を正常値の上限とすると、脳有鉤囊虫症患者血清では、9 名中 7 名が陽性となり、2 名が偽陰性となった (偽陰性率 22.2%)。また無鉤囊虫症患者血清では、4 名中 3 名、広節裂頭条虫症患者血清では、13 名中 3 名、その他の条虫症患者血清では、5 名中 2 名、吸虫症患者血清では、12 名中 2 名、線虫症患者血清では、8 名中 3 名、健常者血清では 9 名中 1 名がそれぞれ偽陽性となり、無鉤囊虫症を含めた偽陽性率は、51 名中 14 名で 27.5% となった。

(2) Ccb. Ag を用いた場合 (抗原量:  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 血清希釈:  $1/100$ , peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体:  $1/10,000$ )

脳有鉤囊虫症患者血清では、吸光度は  $0.766 \pm 0.23$  ( $n$

$=9$ ) となり、無鉤囊虫症患者血清では、 $0.565 \pm 0.090$  ( $n=4$ )、広節裂頭条虫症患者血清では、 $0.325 \pm 0.076$  ( $n=13$ )、その他の条虫症患者血清では、 $0.306 \pm 0.119$  ( $n=5$ )、吸虫症患者血清では、 $0.349 \pm 0.077$  ( $n=12$ )、線虫症患者血清では、 $0.359 \pm 0.088$  ( $n=8$ )、健常者血清では、 $0.261 \pm 0.071$  ( $n=9$ ) となった。更にそれぞれの疾患に Student's t 検定を行った結果、脳有鉤囊虫症患者血清で得られた吸光度は、無鉤囊虫症患者血清との間に有意差はなく、その他の寄生虫症患者血清や健常者血清との間に 1% の水準で有意差を認めた。更に同様に  $M+2SD$  を正常値の上限とすると、脳有鉤囊虫症患者血清では、9 名中 2 名が偽陰性となった。また無鉤囊虫症患者血清では、4 名中 4 名、広節裂頭条虫症患者血清では、13 名中 2 名、その他の条虫症では、5 名中 2 名、吸虫症では、12 名中 2 名、線虫症では、8 名中 2 名、健常者血清では、9 名中 1 名が偽陽性となり、無鉤囊虫症を含めた偽陽性率は、51 名中 13 名で 25.5% となった。

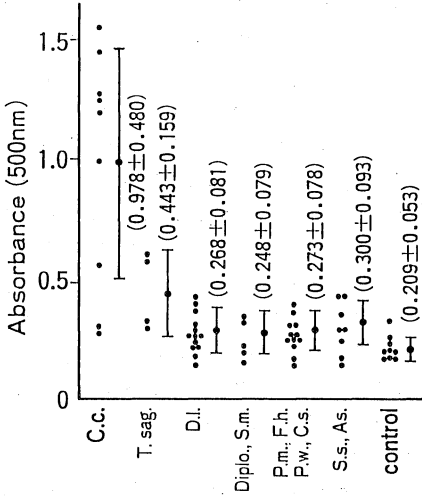
(3) Ccw. Ag を用いた場合 (抗原量:  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 血清希釈:  $1/100$ , peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体:  $1/10,000$ )

脳有鉤囊虫症患者血清では、吸光度は  $0.610 \pm 0.272$  ( $n=9$ ) となり、無鉤囊虫症患者血清では、 $0.448 \pm 0.130$  ( $n=4$ )、広節裂頭条虫症患者血清では、 $0.298 \pm 0.107$  ( $n=12$ )、その他の条虫症患者血清では、 $0.324 \pm 0.105$  ( $n=5$ )、吸虫症患者血清では、 $0.349 \pm 0.086$  ( $n=12$ )、線虫症患者血清では、 $0.364 \pm 0.085$  ( $n=8$ )、健常者血清では、 $0.251 \pm 0.075$  ( $n=9$ ) となった。更にそれぞれの疾患に Student's t 検定を行った結果、脳有鉤囊虫症患者血清で得られた吸光度は、無鉤囊虫症患者血清との間に有意差はなく、広節裂頭条虫症患者血清、健常者血清との間に 1% の水準で、その他の条虫症、吸虫症、線虫症患者血清との間に 5% の水準で有意差を認めた。更に同様に  $M+2SD$  を正常値の上限とすると、脳有鉤囊虫症患者血清では、9 名中 3 名が偽陰性となった。また無鉤囊虫症患者血清では、4 名中 2 名、広節裂頭条虫症患者血清では、13 名中 2 名、その他の条虫症では、5 名中 2 名、吸虫症では、12 名中 2 名、線虫症では、8 名中 4 名が、健常者血清では、9 名中 1 名が偽陽性となり、無鉤囊虫症を含めた偽陽性率は、51 名中 13 名で 25.5% となった。

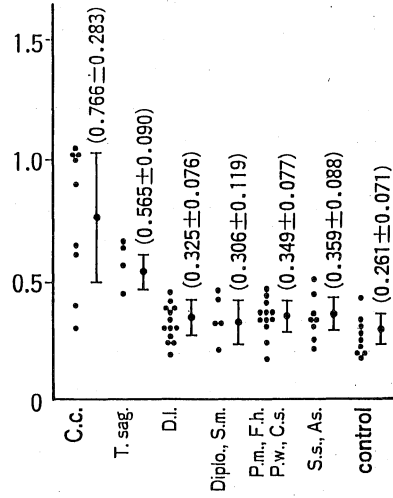
(4) Ccc. Ag を用いた場合 (抗原量:  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 血清希釈:  $1/100$ , peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体:  $1/5,000$ ,

脳有鉤囊虫症患者血清では、吸光度は  $0.788 \pm 0.267$  ( $n=9$ ) となり、無鉤囊虫症患者血清では、 $0.753 \pm 0.168$  ( $n$

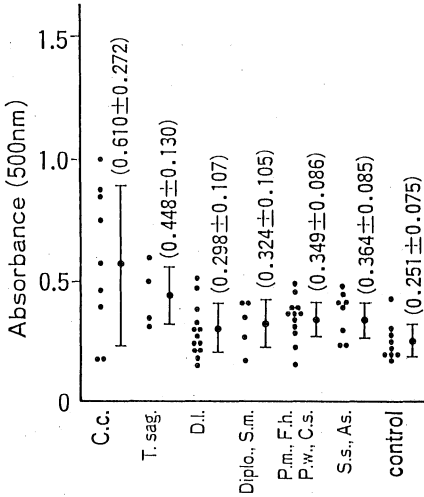
Antigen Ccf : 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
 Serum : 1/100  
 Peroxidase-labelled Antibody : 1/10000



Antigen Ccb : 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
 Serum : 1/100  
 Peroxidase-labelled Antibody : 1/10000



Antigen Ccw : 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
 Serum : 1/100  
 Peroxidase-labelled Antibody : 1/10000



Antigen Ccc : 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
 Serum : 1/100  
 Peroxidase-labelled Antibody : 1/5000

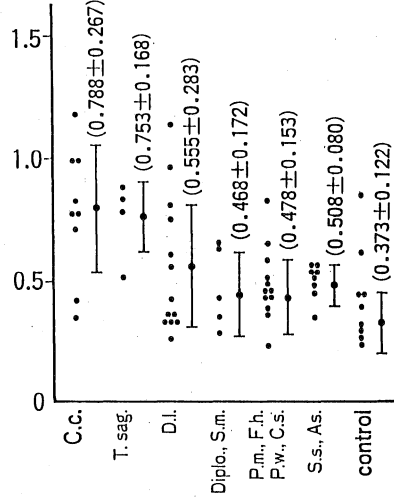


Fig. 15. Antibody titers to four *C. cellulosa* antigens in patients suffering from cysticercosis and from other parasitic infections detected with ELISA.

=4), 広節裂頭条虫症患者血清では,  $0.555 \pm 0.283$  (n=13), その他の条虫症患者血清では,  $0.468 \pm 0.172$  (n=5), 吸虫症患者血清では,  $0.478 \pm 0.153$  (n=12), 線虫症患者血清では,  $0.508 \pm 0.080$  (n=8), 健常者血清では,  $0.373 \pm 0.122$  (n=9) となった. 更にそれぞれの疾患に Student's t 検定を行った結果, 脳有鉤囊虫症患者血清で得られた吸光度は, 無鉤条虫症患者血清との間に有意差はなく, 広節裂頭条虫症患者血清との間に10%の水準で, その他の条虫症患者血清との間に5%の水準で, 線虫症患者血清との間に2%の水準で, 健常者並びに吸虫症患者血清との間に1%の水準でそれぞれ有意差を認めた. 更に同様に M+2 SD を正常値の上限とすると, 脳有鉤囊虫症患者血清では, 9名中2名が偽陰性となった. また無鉤条虫症患者血清では, 4名中3名, 広節裂頭条虫症患者血清では, 13名中4名, その他の条虫症では, 5名中2名, 吸虫症では, 12名中2名が偽陽性となり, 更に線虫症及び健常者では偽陽性者は無く, 無鉤条虫症を含めた偽陽性率は, 51名中11名で21.6%となった.

以上の様に, これら4種の抗原の有用性を比較検討してみると, Ccf. Ag が他の部位抗原と比べて最も特異性が有り, 無鉤条虫症患者血清との間に有意差を認めた唯一の抗原であった. また M+2 SD を正常値の上限として, その他の寄生虫症患者及び健常者の偽陽性率を見ると Ccf. Ag は, 26.1%であり Ccc. Ag での21.6%よりも高値を示しているが, 有意差が高いという点で Ccf. Ag が最もスクリーニングに適した抗原であるという事が実証された.

(E) 無鉤条虫抗原 (T. sag. Ag) での吸収血清を用いた抗有鉤囊虫特異 IgG 抗体の検出による有意差の検討 (Fig. 16)

上記実験結果より, 脳有鉤囊虫症患者血清の ELISA 法による免疫学的診断として Ccf. Ag が最適で, 次いで Ccb. Ag が適しているとの結果を得た. さらに有鉤囊虫症と最も近縁寄生虫である無鉤条虫症との区別を明確にする為に, 被検血清を無鉤条虫抗原で吸収し, その交叉反応性を除去し, 前述と同様の操作で有鉤囊虫特異 IgG 抗体の検出を試みた.

(1) Ccf. Ag を用いた場合

脳有鉤囊虫症患者血清では, 吸光度は  $0.283 \pm 0.207$  (n=8) となり, 無鉤条虫症患者血清では,  $0.068 \pm 0.026$  (n=4), 広節裂頭条虫症患者血清では,  $0.044 \pm 0.026$  (n=13), その他の条虫症患者血清では,  $0.044 \pm 0.019$  (n=5), 吸虫症患者血清では,  $0.053 \pm 0.032$  (n=12), 線虫症患者血清では,  $0.063 \pm 0.028$  (n=8), 健常者血清で

は,  $0.052 \pm 0.020$  (n=10) となった. 更にそれぞれの疾患に Student's t 検定を行った結果, 脳有鉤囊虫症患者血清で得られた吸光度は, 無鉤条虫症及び線虫症患者血清との間に5%の水準で, 広節裂頭条虫症患者血清との間に2%の水準で, その他の条虫症, 吸虫症, 健常者血清との間に1%の水準でそれぞれ有意差を認めた. また同様に M+2 SD を正常値の上限とすると, 脳有鉤囊虫症患者血清では, 8名中2名が偽陰性となった. また無鉤条虫症, 大複殖門条虫症, マンソン孤虫症, 健常者血清では, 偽陽性を呈した血清はなく, 広節裂頭条虫症, 吸虫症, 線虫症の血清では, それぞれ1名ずつ偽陽性となり, 無鉤条虫症を含めた偽陽性率は52名中3名で5.7%と

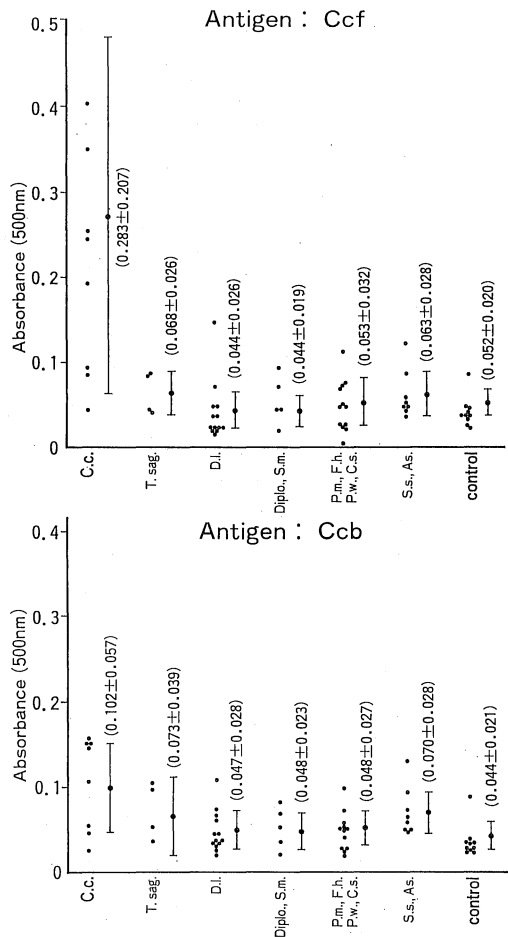


Fig. 16. Specific antibody titers to Ccf. and Ccb. Ag in patients suffering from cysticercosis and from other parasitic infections detected in absorbed in sera with *T. saginata* Ag using ELISA.

なった。

## (2) Ccb. Ag を用いた場合

脳有鉤囊虫症患者血清では、吸光度は  $0.102 \pm 0.057$  ( $n=8$ ) となり、無鉤条虫症患者血清では、 $0.073 \pm 0.039$  ( $n=4$ )、広節裂頭条虫症患者血清では、 $0.047 \pm 0.028$  ( $n=13$ )、その他の条虫症患者血清では、 $0.048 \pm 0.023$  ( $n=5$ )、吸虫症患者血清では、 $0.048 \pm 0.027$  ( $n=12$ )、線虫症患者血清では、 $0.070 \pm 0.028$  ( $n=8$ )、健常者血清では、 $0.044 \pm 0.021$  ( $n=10$ ) になった。更にそれぞれの疾患に Student's *t* 検定を行った結果、脳有鉤囊虫症患者血清で得られた吸光度は、無鉤条虫症及び線虫症患者血清との間に有意差を認めず、また広節裂頭条虫症、その他の条虫症、吸虫症及び健常者血清との間に 5% の水準で有意差を認めた。また同様に  $M+2SD$  を正常値の上限とすると、脳有鉤囊虫症患者血清では、8 名中 3 名が偽陰性となった。また無鉤条虫症と線虫症では 2 名ずつ、広節裂頭条虫症、その他の条虫症、吸虫症及び健常者の血清ではそれぞれ 1 名ずつが偽陽性となり、無鉤条虫症を含めた偽陽性率は 52 名中 8 名で 15.4% となった。

以上のように、抗原として Ccf. Ag を用いた ELISA 法で血清中の無鉤条虫抗原と交差する抗体を除去する事により、脳有鉤囊虫症と無鉤条虫症患者血清との間の有意差を、10% の水準から 5% の水準まで上げる事ができた。また Fig. 16 に示す様に偽陽性率もこの手技を行う事により 27.5% から 5.7% に減じる事ができた。ところが、Ccb. Ag を用いた場合、脳有鉤囊虫症と無鉤条虫症患者血清との間には有意差を認める事ができず、Ccb. Ag は無鉤条虫抗原と極めて類似した抗原性を持っている事が証明され、また偽陽性率も 25.5% から 15.4% に減じる事ができたものの、Ccf. Ag ほどの偽陽性率の低下を認める事はできなかった。

## 考 察

有鉤囊虫症はブタを中間宿主とし、その筋肉中に生存する有鉤囊虫を共に食する事により、終宿主であるヒトの小腸内で成虫となる。そこで有鉤条虫成虫の受胎体節が崩壊し、その中の虫卵が腸管内に逸脱遊離するか、あるいは不用意にその虫卵を経口摂取した時に、その孵化した六幼幼虫が腸管壁を穿通して血行性に散布され、ヒトもブタと同様に中間宿主となり、筋肉、皮下、脳内等あらゆる臓器に囊虫の寄生を生じて、有鉤囊虫症となる。また脳、眼球内に寄生した場合は、頭痛、てんかん発作、視野狭窄などの症状を呈する病原性の強い人畜共通寄生虫病の 1 つである。この疾患は韓国、中国大陸、ソビエト連邦、インド亜大陸、東南アジア、中南米、アフリカ

南部とブタを食用とする民族に広く分布する疾患であり、我が国では以前、沖縄県に分布していたが、現在ではほとんど新規感染の症例は見られず、旧満州国移住者、中国よりの婦国子女、在日韓国人にこの疾患を見る事が多い(新垣ら,<sup>9)</sup>1988)。また最近、流行地からの食肉用のブタやブタ肉の輸入の増加や、海外渡航者の増加が著しく、流行地でブタ肉を生または生に近い状態で摂取する事も多く、今後本症の発症が増加する傾向があると思われる(荒木ら,<sup>1)</sup>1986; 井関,<sup>9)</sup>1989)。

有鉤囊虫症の血清学的診断は、以前より多くの研究者達によって、種々の検討がなされてきた。補体結合反応 (Neito,<sup>10)</sup>1956)、間接血球凝集反応 (Proctor and Elsdon-Dew,<sup>11)</sup>1966; Mahajan *et al.*<sup>12)</sup>1974)、ラテックス凝集反応 (Kagan,<sup>13)</sup>1980)、皮内反応 (Harbert and Oberg,<sup>14)</sup>1975)、間接蛍光抗体法 (Rydzewski *et al.*<sup>15)</sup>1975; Barrango *et al.*<sup>16)</sup>1977; Flisser *et al.*<sup>17)</sup>1980)、オクタロニー法 (Proctor *et al.*<sup>18)</sup>1966; Flisser *et al.*<sup>19)</sup>1975)、免疫電気泳動法 (Maddison *et al.*<sup>20)</sup>1961; Flisser *et al.*<sup>19)</sup>1975)、ELISA (Diwan *et al.*<sup>21)</sup>1982; Knobloch and Delgado,<sup>22)</sup>1985; Costa *et al.*<sup>23)</sup>1985; Gottstein *et al.*<sup>24)</sup>1987) などが報告されているが、ヒト有鉤囊虫症の血清学的診断の場合、いずれも有鉤囊虫全虫体より抽出した粗抗原を使用している為、極めて多様な交差反応を呈し、偽陽性率が非常に高くなり有鉤囊虫症の確実な血清学的診断を困難なものにしている。また感染ブタの血清学的診断の場合、抗原中にブタの IgG 成分が混入している為、ELISA 法などの 2 抗体法を用いると、非特異的反応の率が高く、得られるデータが不安定なものとなっている (Jean and Lee,<sup>25)</sup>1985)。

当教室では、以前より有鉤囊虫感染ブタ及びヒト脳有鉤囊虫症について、比較的簡便なゲル内沈降反応 (オクタロニー法) や免疫電気泳動法を用いて、Ccf. Ag による循環抗原並びに循環抗体の血清学的診断を行ない、それらの診断上の有用性を検討、報告しているが、(森田,<sup>4)</sup>1984; 瀬川,<sup>9)</sup>1988)、ここで筆者は、有鉤囊虫の各部分より得た 4 種の抗原 (Ccf. Ag, Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccc. Ag) を用いて、有鉤囊虫感染ブタ並びにヒト脳有鉤囊虫症の ELISA 法による血清学的診断の有用性と、4 種の抗原の各々の鋭敏度並びにその特異性についての検討を行った。Ccf. Ag を使用した場合、有鉤囊虫感染ブタ血清と非感染ブタ血清との間に、また脳有鉤囊虫症と他の寄生虫症患者及び健常者血清との間に得られた ELISA 法の吸光度において、最も明らかな有意差を認め、反応の鋭敏度並びにその特異性という点において有用な抗原である事が証明された。また他の有鉤囊虫部分抗原

(Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccc. Ag) は ELISA 法のスクリーニングに用いる抗原としては適さないという事も証明された。更に過去の成績において Ccf. Ag が診断上の評価を得られていない事実は、本抗原の中にブタの血清成分、特にブタ IgG が混じている為 ELISA 法に適さないという事が証明された。ここで、固相化 Ccf. Ag 中のブタ IgG 成分の抗原性をブロックする事により、ELISA 法による有鉤囊虫感染ブタのスクリーニング検査において得られる結果を更に安定化させる事ができた。脳有鉤囊虫症患者の ELISA 法による血清学的診断の場合、他の寄生虫症患者に対しての偽陽性率という点では Gottstein *et al.*<sup>24)</sup> (1987) が同様に ELISA 法を用いて、他の寄生虫疾患との間に 51% の偽陽性、特に *Loa loa* で 100%、多包条虫症で 95%、単包条虫症で 90%、オンコセルカ症で 77%、バンクロフト糸状虫症で 75% の偽陽性を認めていると報告している。

またヒトのスクリーニング法として検討した脳有鉤囊虫症患者血清に対する無鉤条虫抗原で吸収しない一般的な ELISA 法では、有鉤囊虫症以外の寄生虫疾患での偽陽性率は、Ccf. Ag は 26.9%、Ccb. Ag 並びに Ccw. Ag では 25.5% であり Gottstein *et al.*<sup>24)</sup> (1987) の偽陽性率よりも半減する事ができた。これらの偽陽性率を減少する事ができたのは、患者血清並びに健常者血清を用いて条件設定を十分行った為と考えられる。しかしながら、このままの方法でスクリーニング法として使用するには偽陽性率が高すぎるように思われ、さらに偽陽性率の少ないスクリーニング法を検討する必要性が出てきた。そこで、ゲル内沈降反応を用いて教室の瀬川<sup>3)</sup> (1988) が報告した無鉤条虫抗原 (T. sag. Ag) で抗有鉤囊虫ウサギ血清を吸収すると、その他の寄生虫抗原との間に交差反応はほとんど呈さなくなる事をもとに、脳有鉤囊虫症並びに他の寄生虫症患者の血清を予め無鉤条虫抗原と反応させ、無鉤条虫抗原 (T. sag. Ag) と交差反応する抗体を吸収し、その上で ELISA 法として有益な抗原である Ccf. Ag 並びに Ccb. Ag を固相化した plate に入れ、同法を行うと、Ccf. Ag を使用した場合、脳有鉤囊虫症と無鉤条虫症患者血清との間の有意差は、吸収前の ELISA 法と比較して 10% 以下から 5% 以下となり、更に健常者並びに他の寄生虫症患者血清での偽陽性率も 26.9% から 5.7% に低下し、この反応の有用性を増す事ができた。ところが、Ccb. Ag を使用した場合、脳有鉤囊虫症患者血清中の Ccb. Ag と反応する抗体は殆んど T. sag. Ag と交差反応を示し、吸光度を上げていた為、被検血清吸収後の吸光度はあまり上昇せず、他の疾患との有意差を認める事はできなかった。

Ccf. Ag を使用して循環抗体をチェックし、免疫血清診断に応用した報告には、Nascimento *et al.*<sup>26)27)</sup> (1982 a, b), Flisser *et al.*<sup>17)</sup> (1980) があるが、それらは、血球凝集反応、オクタロニー法、免疫電気泳動法を用いて Ccb. Ag, Ccw. Ag, Ccf. Ag を使用し、比較検討を加えており、Ccf. Ag の感度は他の抗原と比較し、低いと結論づけている。また Larralde *et al.*<sup>28)</sup> (1986) と瀬川<sup>3)</sup> (1988) は、前二者との報告とは異なり、Ccf. Ag を使用し、Larralde *et al.*<sup>28)</sup> (1986) は ELISA 法と血球凝集反応を用い、瀬川 (1988) はオクタロニー法を用いて感受性並びにその特異性を比較検討し、Ccf. Ag の有用性を論じている。特に Larralde *et al.*<sup>28)</sup> (1986) は ELISA 法を用いて、有鉤囊虫症患者血清の 95% を検出する事ができると報告している。今回筆者の実験では、偽陰性率は 22.2% であり、つまり 77.8% の患者の検出が可能な事が示された。瀬川<sup>3)</sup> (1988) の報告では、脳有鉤囊虫症患者の specific bands を検出しているが、オクタロニー法を用いている為、診断的価値は非常に高いが、感受性に難があり、1回の検査で、Ccf. Ag の使用量並びに有鉤囊虫囊胞液抗原特異抗血清の使用量が極めて多く、また反応開始より診断確定まで数日間を要する為、スクリーニング検査法として集団検査に対応し難いと考えられた。今回行った無鉤条虫抗原吸収血清を用い、有鉤囊虫囊胞液を抗原として使用した ELISA 法は、脳有鉤囊虫症患者血清で得た ELISA 法での吸光度と無鉤条虫症患者血清で得た吸光度との間に 5% の水準で有意差を認める事ができ、また有鉤囊虫症以外の寄生虫疾患及び健常者で偽陽性率が 5.7% という特異的な反応が得られ、更に反応時間は前もって Ccf. Ag 固相化 plate を用意していれば、200 から 300 検体前後では 6 時間以内に反応が全て終了し、短時間で診断が可能であり、且つ使用抗原量も ELISA 法では 1 検体 50 ng とオクタロニー法の 1500 から 2000 分の 1 の抗原量で十分であり、本法がスクリーニング法として極めて有用である事が証明された。また、Flisser *et al.*<sup>19)17)</sup> (1975, 1980) は、ゲル内沈降反応にて、有鉤囊虫症患者血清の 50% に有鉤囊虫に対する特異抗体の欠如している nonresponder がいると報告しているが、筆者の ELISA 法による検討によると、脳有鉤囊虫症患者 10 名中 2 名に偽陰性患者がいる事が判明し、それらが Flisser *et al.* の云う nonresponder と考えられるが、偽陰性率は彼等の報告した 50% の半分以下で、ELISA 法の測定感度が良い事に起因していると考えられる。

## 結 語

1) 有鉤囊虫感染ブタの ELISA 法での至適条件において Ccf. Ag のみが有用で、固相化抗原量は、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  で、peroxidase 標識抗ブタ IgG 抗体の希釈は 10,000 倍希釈、被検血清希釈濃度は、20 倍から 200 倍希釈が至適条件であった。

2) 有鉤囊虫感染ブタの ELISA 法によるスクリーニング (血清学的診断法) として Ccf. Ag のブタ IgG 成分のエピトープをブロックする事で、より安定した結果を得る事ができた。

3) ヒト脳有鉤囊虫症の ELISA 法での至適条件において Ccf. Ag が最も有用であり、固相化抗原量は  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , peroxidase 標識抗ブタ IgG 抗体の希釈は 10,000 倍希釈、被検血清希釈濃度は 10 倍希釈から 200 倍希釈が至適条件であった。

4) ヒト脳有鉤囊虫症の ELISA 法によるスクリーニング (血清学的診断法) として Ccf. Ag を用いた場合、脳有鉤囊虫症患者血清の得た吸光度は、無鉤条虫症患者血清との間に 10% の水準で、また健常者並びに他の寄生虫症患者血清との間に 1% の水準で有意差を認めた。健常者血清の得た吸光度からそれぞれの抗原を用いた ELISA 法で正常値を算出する事により、健常者並びに有鉤囊虫症以外の寄生虫症患者血清の偽陽性率を求めると、Ccf. Ag では 26.9% であった。

5) 無鉤条虫抗原吸収被検血清を用いた ELISA では Ccf. Ag を用いた場合、脳有鉤囊虫症患者血清の得た吸光度は無鉤条虫症患者及び線虫症患者血清との間に 5% の水準で、広節裂頭条虫症患者血清との間に 2% の水準で、マンソン孤虫症、大複殖門条虫症、吸虫症更に健常者血清との間に 1% の水準でそれぞれ有意差を認める事ができた。

6) 偽陽性率に関して Ccb. Ag を用いた場合 15.4% であり、Ccf. Ag では、5.7% に減少した。従って Ccf. Ag が脳有鉤囊虫症のスクリーニング検査法としての ELISA 法で用いる抗原の内での他の寄生虫疾患に対しての有意差並びに偽陽性率の低さ、という点で最も優れた抗原であった。

以上有鉤囊虫症の診断として、有鉤囊虫部位別抗原を用いて ELISA 法の至適条件並びに有用性を検討し、Ccf. Ag を用いる事がスクリーニングとして有用である事を実証した。

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

閲を戴いた本学第 3 内科学教室辻井 正教授、本学細菌学教室榎葉周三教授、本研究遂行のため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 基穆博士に深甚な謝意を表すと共に、研究を終始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) 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 年度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。p1, 1986.
- 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) 森田 博：有鉤囊虫症の免疫学的研究 — 豚およびヒト有鉤囊虫症の血清中 circulating antigen の証明。奈医誌. 35 : 843, 1984.
- 5) 辻 守康：寄生虫蠕虫類の免疫電気泳動法について。寄生虫誌. 23 : 335, 1974.
- 6) 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.
- 7) Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. E.: Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans. Roy. Soci. Trop. Med. and Hyg. 70 : 98, 1976.
- 8) 新垣民樹, 長谷川英男, 盛島明浩, 池間 稔, 照喜名重順, 東恩納厚, 金城副則, 斉藤 厚, 安里龍二, 当真嗣勇：ガストログラフィンによる有鉤条虫症および無鉤条虫症の治験例。日熱会誌. 16 : 293, 1988.
- 9) 井関基弘：輸入食肉類と寄生虫感染。日本臨牀 47 : 123, 1989.
- 10) Neito, D.: Cysticercosis of the nervous system : diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurology 6 : 725, 1956.
- 11) Proctor, E. M. and Elsdon-Dew, R.: Serological



- tests in porcine cysticercosis. South Afr. J. Sci. **62**: 264, 1966.
- 12) **Mahajan, R. C., Chitkara, N. L. and Chopra, J. S.**: Evaluation of cysticercous and adult worm antigens in serodiagnosis of cysticercosis. Indian. J. Med. Res. **62**: 1310, 1974.
- 13) **Kagan, I. G.**: Serodiagnosis of parasitic diseases. Am. Soc. Microbiol. **3**: 724, 1980.
- 14) **Herbert, I. V. and Oberg, C.**: Serological studies on pigs experimentally infected with *Taenia solium* or *Taenia hydatigena*. J. Comp. Pathol. **85**: 487, 1975.
- 15) **Rydzewski, A. K., Chisholm, E. S. and Kagan, I. G.**: Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemagglutination, indirect immunofluorescent antibody, and agar gel precipitin tests. J. Parasitol. **61**: 154, 1975.
- 16) **Barrango, D. G., Sandoval-isles, M. E. and Valdes, V. M. T.**: Indirect immunofluorescence reaction in cysticercosis. Arch. Invest. Med. (Mex.) **9**: 51, 1977.
- 17) **Flisser, A., Woodhouse, E. and Larralde, C.**: Human cysticercosis: Antigens, antibodies and non-responders. Clin. Exp. Immunol. **39**: 27, 1980.
- 18) **Proctor, E. M., Powell, S. J. and Elsdon-Dew, R.**: The serological diagnosis of cysticercosis. Ann. Trop. Med. Parasitol. **60**: 146, 1966.
- 19) **Flisser, A., Tarrab, R., Willms, K. and Larralde, C.**: Double diffusion and immunoelectrophoresis in the diagnosis of human cerebral cysticercosis. Arch. Invest. Med. **6**: 1, 1975.
- 20) **Maddison, S. E., Whittle, H. and Elsdon-Dew, R.**: The antigens of tapeworms. preliminary note. South Afr. J. Sci. **57**: 273, 1961.
- 21) **Diwan, A. R., Coker-Vann, M., Brown, P., Subianto, D. B., Volken, 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. and Hyg. **31**: 364, 1982.
- 22) **Knobloch, J. and Delgado, E. A.**: Immunodiagnosis of cysticercosis: standardization of ELISA and its application to field conditions. Trop. Med. Parasitol. **36**: 157, 1985.
- 23) **Costa, J. M., Mineo, R., Livramento, J. A. and Camargo, M. E.**: Detection by the immunoenzymatic test ELISA of IgM anti-*cysticercus cellulosa* antibodies in the cerebrospinal fluid in neurocysticercosis. Arch. Neuropsiquiatr. **43**: 22, 1985.
- 24) **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.
- 25) **Jean, V. and Lee, T. J.**: Serological diagnosis for swine *Cysticercus cellulosa* infection in Korea. Korean J. Veterinary Res. **25**: 77, 1985.
- 26) **Nascimento, E.**: Immunochemical studies on aqueous extracts of the larvae and adults of *Taenia solium*. I — Immunogenicity and antigenic composition. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **24**: 353, 1982. a.
- 27) **Nascimento, E.**: Immunochemical studies on aqueous extracts of the larvae and adults of *Taenia solium*. II — Antigenic relation; chromatographic patterns: immunologic activity of scolices. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **24**: 359, 1982. b.
- 28) **Larralde, C., Laclette, J. P., Owen, C. S., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, 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. and Hyg. **35**: 965, 1986.

## Abbreviations

- C. C. : cysticercosis cellulosa  
 T. sag. : taeniasis saginata  
 D. l. : diphyllbothriasis latum  
 Diplo. : diplogonoporiasis grandis  
 S. m. : sparganosis mansonii  
 P. m. : paragonimiasis miyazakii  
 F. h. : fascioliasis hepatica  
 P. w. : paragonimiasis westermani  
 C. s. : clonorchiiasis sinensis  
 S. s. : strongyloidiasis stercoralis  
 A. s. : ascariasis lumbricoides