

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

寄生虫学雑誌 (1981.06) 30巻3号:197~204.

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

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

中 尾 稔* 松 田 肇*
田 中 寛* 永 田 傳†

(昭和55年9月22日 受領)

Key words: micro-ELISA, schistosomiasis japonica, peroxidase-conjugated antibody, O-phenylenediamine, O-tolidine, 5-aminosalicylic acid

Engvall and Perlmann (1972) によつて特異抗体を定量するために考案された酵素抗体法 (ELISA) は今日、寄生虫学領域でも免疫血清学的診断法として応用され、既に、旋毛虫症 (Ljungström *et al.*, 1974), トリパノソーマ症 (Ruitenbergh and Buys, 1977), マラリア (Spencer *et al.*, 1979), 住血吸虫症 (Huldt *et al.*, 1975; McLaren *et al.*, 1978; Tanaka *et al.*, 1979) など多数の報告がなされている。このように本法が重視される理由として、本法が安全性と経済性の両面でラジオイムノアッセイ (RIA) に勝り、かつ同程度の成績が期待できる (Schinski *et al.*, 1976) ということが挙げられる。

特に、マイクロタイタープレートを用いた酵素抗体法 (ELISA プレート法) は一患者一穴法により、一度に多数の検体を処理できるという利点から流行地の野外実験室で行う血清疫学調査に適している。ところがその測定系に用いる標識抗体と基質の選択、及び反応方法、特に血清や標識抗体の反応時間に統一性が欠けるためその標準化が急がれている。

現在、標識抗体は主にアルカリフォスファターゼとペルオキシダーゼの二種が使われているが、前者は高価なために広く応用されていない。

本研究では日本住血吸虫症の免疫診断を目的として、比較的廉価に得られるペルオキシダーゼ標識抗体を用い、その三種の基質を比較し、鋭敏な基質による測定系

の簡便化と安定化を検討したので報告する。

材料と方法

1. 実験に使用した抗原は、山梨系日本住血吸虫感染マウスの腸管をプロナーゼ及びコラゲナーゼによつて消化し、虫卵を分離後、0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で抽出した虫卵粗抗原である。

2. 被検血清は、日本住血吸虫感染者30名 (レイテ、フィリピン) のプール陽性血清と対照としての一般健康者30名 (東京) のプール陰性血清である。

3. 標識抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗人 IgG 羊血清 (MILES YEDA 製, 抗 H & L 鎖, ロット番号 S586) を使用した。

4. 比較した基質は、5-aminosalicylic acid (5AS), O-phenylenediamine (OPD), O-tolidine (OT) の三種である。各基質の調製は次の様に行つた。

5 AS: 5 AS (関東化学) 80mg を 100ml の 70°C 蒸留水に溶解し、0.1N NaOH で pH 6.0 に合わせ、その 90ml に使用直前に 0.05% H₂O₂ を 10ml 加える。

OPD: OPD (Eastman Kodak) 10mg を 1ml のメタノールに溶解し、蒸留水を 99ml 加え、使用直前に 3% H₂O₂ を 0.1ml 加える。

OT: OT (Sigma) 21.2mg を 1ml の Dimethylformamide に溶解し、0.2M 酢酸緩衝液 (pH 3.6) を 98ml 加え、使用直前に 0.4% H₂O₂ を 1ml 加える。

各基質は実験当日に調製した。特に、OPD の基質液は感光性があるため遮光した。

また、調製した各基質液は、OT, OPD は透明であり、5 AS は弱く着色している。

5. 酵素抗体法 (ELISA プレート法) の手技は、プ

This study received support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

* 東京大学医科学研究所寄生虫研究部

† 東京医科歯科大学医動物学教室

プレート抗原感作, プレート洗浄, 血清反応, プレート洗浄, 標識抗体反応, プレート洗浄, 基質反応 (発色) の順に行つた。

マイクロタイタープレートは各種プレートを比較し, 選択の結果, 血清や標識抗体のプレートへの非特異的吸着による基質の発色が殆どみられない Cooke Microtiter M129A を使用した。反応は抗原, 血清, 標識抗体, 基質の液量をプレート穴当たり0.3mlで行つた。

抗原感作は, 0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で Lowry-Folin 法による蛋白濃度を $10\mu\text{g/ml}$ に調製した抗原液を用い, 37C で2時間湿潤箱中で行い, そのままプレートを 4C で1~3昼夜保存した。

プレート洗浄は0.15M PBS pH 7.2-0.05% Tween 20-0.005% NaN_3 を洗浄液として, 抗原感作, 血清反応, 標識抗体反応後に5分間隔で3回室温で行つた。

血清と標識抗体は0.15M PBS pH 7.2-0.05% Tween 20-1% Bovine serum albumin で希釈し, その反応は 37C で30~60分間湿潤箱中で行つた。

基質との反応は速かに基質液をプレートに入れ, 室温 (約 25C) で反応させた。5 AS はプレート穴当たり $25\mu\text{l}$ の 1N NaOH で酵素反応を停止させ, OPD は同様に $25\mu\text{l}$ の 8N H_2SO_4 で行つた。なお OPD は感光性があるため暗所で反応させた。OT は反応停止を行わなかつた。各基質の吸光度はプレート直読式分光光度計 (MTP-12, コナ, 日製産業) により測定した。

結 果

1. 各基質の発色性

各基質の発色性を調べるために, プレート上で経時的に吸光度を測定した (Fig. 1)。各基質における酵素濃度は 5 AS, OPD, OT の順に低くなる様に実験条件を設定した。

5 AS はかつ色 (吸収波長 450nm) に発色する。酵素濃度が高い条件では短時間で発色するが, 図に呈示した様な酵素濃度が低い条件では徐々に吸光度は増加した。そのため基質との反応は少なくとも1時間以上必要であった。また反応停止後1~2時間は吸光度は安定していたが, 一晚放置すると自然酸化されて, 陽性血清, 陰性血清共に吸光度が上昇した。

OPD は黄色に発色し, 硫酸で反応停止を行うと橙色 (吸収波長 500nm) に変化する。また5 AS の場合より酵素濃度が低い条件でも5 AS より早く発色し, 反応時間30分でも十分な吸光度に達した。反応停止後の吸光度は非常に安定しており一晚放置しても殆ど変化しなかつ

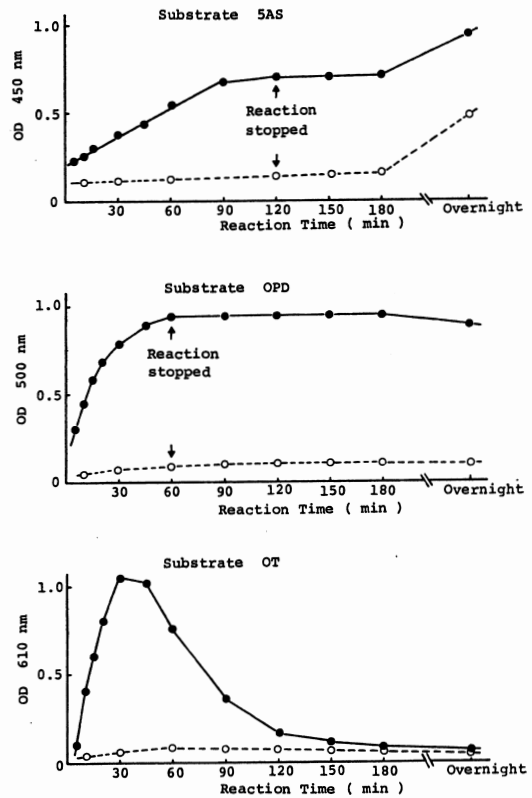


Fig. 1 Development of coloration of three substrates for peroxidase-conjugated antibody.

● : pooled positive serum. ○ : pooled negative serum.

た。

OT は青色 (吸収波長 610nm) に発色する。また5 AS や OPD の場合よりさらに酵素濃度が低い条件でも5 AS や OPD より早く発色した。ところが, 反応30分以後, 自然に退色した。そのため OT の至適な反応時間は30分前後であつた。硫酸で反応停止を試みたが, 発色が黄色に変化し, その後透明に退色するので, 反応停止を行う意義がないと判定した。

2. 血清, 及び標識抗体の反応時間

血清, 及び標識抗体の至適な反応時間を決定するために安定な基質である OPD を用い, 抗原を吸着させたプレート上での血清との反応時間を15, 30, 60, 120, 240分と変化させ, その後の標識抗体との反応時間を30分で固定して吸光度変化をみた (Fig. 2)。また同様に血清との反応時間を固定して標識抗体との反応時間を変化させ, その吸光度変化をみた (Fig. 3)。

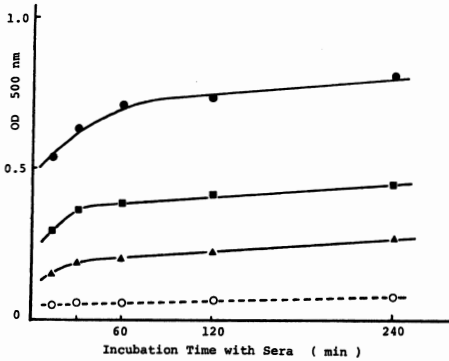


Fig. 2 Kinetics of binding of pooled positive and negative sera to microplates coated with *S. japonicum* crude egg antigen.

Protein concentration of antigen at $10\mu\text{g}/\text{ml}$.

● : pooled positive serum diluted at 1 : 80.

■ : pooled positive serum diluted at 1 : 320.

▲ : pooled positive serum diluted at 1 : 1280.

○ : pooled negative serum diluted at 1 : 80.

Goat anti-human IgG conjugated peroxidase diluted at 1 : 800.

These diluted sera were incubated for different times and followed by 30 min incubation with conjugate.

O-phenylenediamine (OPD) used as a substrate.

Reaction of substrate for 30 min.

陽性血清濃度 1 : 80, 標識抗体濃度 1 : 800 の実験条件で, 血清との反応時間を变化させた場合は60分以降ほぼ安定した吸光度が得られ, 標識抗体との反応時間を变化させた場合も60分以降ほぼ安定した吸光度が得られた。また血清, 及び標識抗体は低濃度になる程, 安定に達する時間が早まった。

陰性血清については血清, 標識抗体いずれも反応時間が長くなると徐々にではあるが, 吸光度の上昇が認められた。

以上の結果から血清, 及び標識抗体の至適な反応時間は, これらの濃度が低濃度の場合は30分から60分程度であり, 高濃度の場合は60分から120分程度を必要とすると思われた。

測定系の簡便化を目的として, 基質を変えることによ

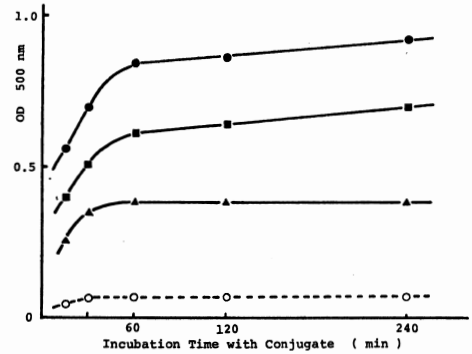


Fig. 3 Kinetics of binding of conjugate to micro-plates coated with *S. japonicum* crude egg antigen after incubation with pooled positive and negative sera.

Protein concentration of antigen at $10\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pooled positive (●, ■ & ▲) and negative (○) sera diluted at 1 : 80.

● & ○ : conjugate diluted at 1 : 800.

■ : conjugate diluted at 1 : 1,600.

▲ : conjugate diluted at 1 : 3,200.

These diluted conjugate were incubated for different times after 30 min incubation with sera.

O-phenylenediamine (OPD) used as a substrate.

Reaction of substrate for 30 min.

り測定系に要する時間を短縮することが可能であることを確認するため, 血清と標識抗体の反応時間を同一として各基質につきその時間を 15, 30, 60, 120 分と変化させ吸光度を測定した (Fig. 4)。

OT の場合は反応時間 15 分でも高い吸光度を示し, OPD と 5 AS の場合は反応時間 15 分では十分な吸光度を示さなかった。十分な吸光度が得られる反応時間は OPD では 30 分以上, 5 AS では 60 分以上であった。一方, 反応時間が長くなると陰性血清での吸光度も上昇した。これは血清, 及び標識抗体のプレートへの非特異的吸着による発色と思われた。本実験から陽性血清と陰性血清の識別を容易にするために, 非特異的吸着の起らない条件を求めると, 各基質における血清と標識抗体の各々の反応時間は OT と OPD の場合は 30 分, 5 AS の場合は 60 分と判定された。

この反応時間で全過程を終了するには抗原感作の時間を除き, 5 AS では約 4 時間, OPD と OT では約 2 時間半を要した。OPD と OT の使用により大幅な測

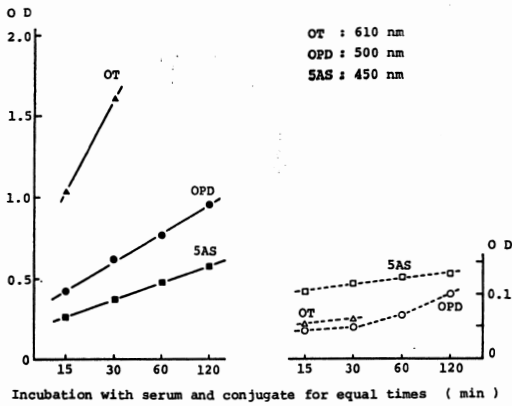


Fig. 4 Equal incubation times with serum and conjugate and sensitivity of micro-ELISA with three substrates.

Plates were coated with *S. japonicum* crude egg antigen at 10µg/ml. Pooled positive (●, ■ & ▲) and negative (○, □ & △) sera diluted at 1 : 80.

▲ & △ : OT, conjugate diluted at 1 : 3,200.
● & ○ : OPD, conjugate diluted at 1 : 1,600.
■ & □ : 5 AS, conjugate diluted at 1 : 800.
Both serum and conjugate were incubated for different times.
Reaction of substrates for 30 min with OT and OPD, and for 60min with 5 AS.

定系の時間短縮が可能であった。

3. 各基質に対する標識抗体濃度

OT, OPD, 5 AS では酵素に対する感受性が非常に異なるため、各基質に対する標識抗体濃度の影響をみた (Fig. 5)。この時の血清と標識抗体の反応時間は OT と OPD では30分、5 AS では60分で行い、基質の反応時間は OT と OPD では30分、5 AS では60分で行った。

低濃度な標識抗体で十分な吸光度が得られるのは OT で、高濃度な標識抗体を必要とするのは5 AS であった。OPD ではその中間濃度であった。OT や OPD では高濃度の標識抗体を用いると、陽性血清は高い吸光度を示すが、陰性血清の吸光度もやや高くなった。

陰性血清で吸光度が抑えられ、陽性血清で比較的高い吸光度の得られる標識抗体濃度は 5 AS では 1 : 200 ~ 1 : 400, OPD では 1 : 1,600 ~ 1 : 3,200, OT では 1 : 3,200 ~ 1 : 6,400 であった。図には呈示しなかったが、OT は標識抗体濃度 1 : 3,200 では吸光度1.0以上に発色した。

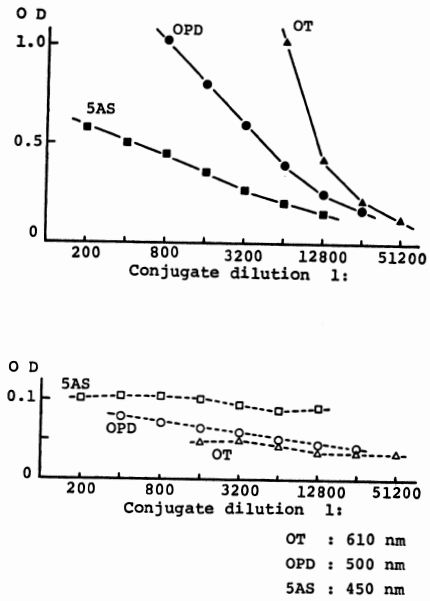


Fig. 5 Comparison of dose-response curves for conjugate dilutions using three substrates.

Plates were coated with *S. japonicum* crude egg antigen at 10µg/ml. Pooled positive (●, ■ & ▲) and negative (○, □ & △) sera diluted at 1 : 80.

▲ & △ : OT. ● & ○ : OPD. ■ & □ : 5 AS.
Incubation of both serum and conjugate for 30 min with OT and OPD, and for 60 min with 5 AS.
Reaction of substrates for 30 min with OT and OPD, and for 60min with 5 AS.

4. 各基質による血清抗体価測定

陽性血清を 1 : 40 から 2 倍希釈で 1 : 10,240 まで希釈し、各基質について至適な条件を用いて血清抗体価を測定した (Fig. 6)。抗体価の終末点は陰性血清濃度 1 : 40 での吸光度の 2 倍以上の値が得られる最終希釈濃度とした。この方法は、陰性血清 36 例における血清濃度 1 : 40 での吸光度の統計学的上限値がそれらの平均の 2 倍値に相当した結果による。5 AS は標識抗体濃度 1 : 400, OPD は 1 : 1,600, OT は 1 : 3,200 で行った。

血清抗体価は 5 AS では 1 : 320, OPD では 1 : 2,560, OT では 1 : 2,560 となった。5 AS の場合は他より低い抗体価を示したが、これは調製した基質液自体の弱い着色によつて、陰性血清の吸光度が OPD や OT よりもやや高くなるためと、基質が鋭敏でないからであろう。

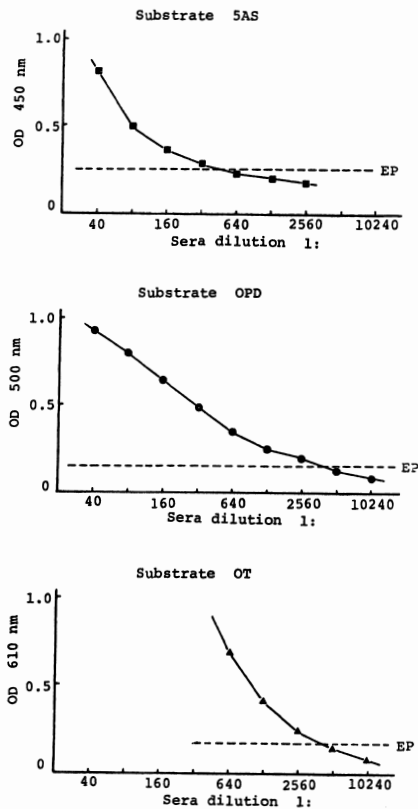


Fig. 6 Comparison of antibody titration of pooled positive serum using three substrates.

Plates were coated with *S. japonicum* crude egg antigen at 10 μ g/ml.

■ : 5 AS, conjugate diluted at 1 : 400.

● : OPD, conjugate diluted at 1 : 1,600.

▲ : OT, conjugate diluted at 1 : 3,200.

Incubation of both serum and conjugate for 30 min with OT and OPD, and for 60 min with 5 AS.

Reaction of substrates for 30 min with OT and OPD, and for 60 min with 5 AS.

EP, end point of reaction; 2 folds of OD of pooled negative serum diluted at 1 : 40.

また各基質について、血清希釈による吸光度の傾斜を比較すると 5 AS と OT では急な、OPD ではゆるやかな勾配となる。おそらくこの勾配の急なもの程、肉眼による抗体価の観察が容易であると思われる。

5. 以上、得られた結果により各基質の長短所を比較し、最良と思われる反応様式をまとめて Tables 1, 2 に示した。

Table 1 Advantages and disadvantages of the substrates for peroxidase-conjugated antibody

Criterion	5AS	OPD	OT
Sensitivity	low	high	high
Visualization of reaction	easy	less easy	easy
Background noise	high	low	low
Photosensitivity	low	high	low
Stability	low-high	high	low

5AS : 5-aminosalicylic acid

OPD : O-phenylenediamine

OT : O-tolidine

考 察

本研究で行った日本住血吸虫症の酵素抗体法 (ELISA プレート法) は、虫卵粗抗原をプレート上に固定して、血清と反応させ、どれだけの抗原抗体結合物ができたかを酵素の助けを借りて測定するのがその基本原理である。本法には、一度に多数の検体を扱えることや陽性と陰性血清を基質の発色によって肉眼的に識別できることなど、利点が多い。しかし、検体数の多い場合、測定系が簡易であることが望ましいし、肉眼による観察を容易にするためには、陰性血清の発色を最低に抑えなければならない。

陰性血清の発色の主な原因はプレートへの血清、及び標識抗体の非特異的吸着によるものと思われる。また、本法における他種疾患との交差反応についてもこの問題を解決してから論ずるべきである。今回、著者らの実験では、非特異的吸着の現象を防いで反応を安定させるために、プレートの選択、血清と標識抗体の濃度、血清と標識抗体と基質の反応時間などについての検討が必要であった。特に、鋭敏な基質を用いる場合は良いプレートを選択することが陰性血清の発色を抑えるために重要であった。

ペルオキシダーゼを標識抗体として、その基質に鋭敏でないものを用いた場合、至適な発色を得るためには高濃度の標識抗体を消費して、測定系に長時間を要した。多数の検体を扱うには測定系は経済的で、簡便であるべきである。

測定系の簡便化を図るためには低濃度の標識抗体で、血清や標識抗体の反応時間を短縮しても強い発色の得られる鋭敏な基質を選択することが重要である。この目的で基質を比較した報告は少ない。Ambroise-Thomas

Table 2 A summary of micro-ELISA procedure using three kinds of substrates for peroxidase-conjugated antibody

	5 AS	OPD	OT
1 Antigen coating	37 C 2 hr.	37 C 2 hr.	37 C 2 hr.
Protein concentration	20-10 $\mu\text{g/ml}$	10-5 $\mu\text{g/ml}$	10-1 $\mu\text{g/ml}$
Plates are kept at 4 C overnight after coating.			
2 Washing	3×5 min.	3×5 min.	3×5 min.
3 Serum incubation	37 C 1 hr.	37 C 30 min.	37 C 30 min.
4 Washing	3×5 min.	3×5 min.	3×5 min.
5 Conjugate incubation	37 C 1 hr.	37 C 30 min.	37 C 30 min.
6 Washing	3×5 min.	3×5 min.	3×5 min.
7 Substrate reaction	25 C 1 hr.	25 C 30 min.	25 C 30 min.
Reaction stop	1 drop of 1 N NaOH	1 drop of 8 N H ₂ SO ₄	—
Total of reaction time except antigen coating.	about 4 hr.	about 2.5 hr.	about 2.5 hr.

and Desgeorges (1978) は 5 AS と OT を比較し、鋭敏な OT の使用によつて標識抗体、抗原量の節約と測定系の時間短縮が可能であり、高感度の測定系が得られると論じている。著者らが比較した 5 AS, OPD, OT においても、OT が最も鋭敏で、次に OPD, 5 AS の順となり、ほぼ同様の結果を得た。

OT の鋭敏性は測定系を簡略化し、標識抗体量についても 5 AS を用いた場合の約 $1/8 \sim 1/16$ で十分であり、その節約に大いに貢献する。また、発色は鮮やかな青色であるために肉眼による観察は非常に容易である。発色の安定は短時間であつたが、その欠点はプレート直読式分光光度計の利用で速かに吸光度を測定すれば解決するので、OT を用いた本法は大量の検体を処理する流行地での血清疫学調査に適していると思われる。

OPD は感光性のために基質との反応を暗所で行うという煩雑さがあり、肉眼による発色の観察は OT や 5 AS に劣る。しかし、その発色は最も安定しているので正確な抗体価を測定する場合に使用すべき基質であると思われる。標識抗体量についても 5 AS を用いた場合の約 $1/4 \sim 1/8$ で済み、測定系の簡略化も可能であるため、現在、当研究室では OPD を採用するに至つた。

5 AS を用いて血清抗体価測定を行うと、その抗体価は OPD や OT を用いた場合よりも低くなる。これは基質の感度に起因するため、本法による抗体価測定では用いた基質を明記する配慮が必要であらう。また、血清と標識抗体の反応時間の長短による血清抗体価測定への影響は危惧される問題である。これらの反応時間を 30

分と 60 分で比較すると、60 分では 30 分より陽性血清で高い吸光度が得られるが、陰性血清の吸光度も血清と標識抗体の非特異的吸着により上昇するため、結果的には 30 分でも 60 分でも同一の抗体価となつた。従つて、陰性血清を対照とした血清抗体価測定は血清と標識抗体の反応時間に大きな影響を受けないものと思われる。

プレートへ感作する抗原量についても、鋭敏な基質の使用により節約が可能で、通常に用いる $10 \mu\text{g/ml}$ の抗原量を $5 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ に減らしても OT や OPD では高い吸光度が得られた。これは今後、診断用抗原の価値を高めるための抗原精製が進み、高価な抗原を得た場合に有利な条件とならう。

ペルオキシダーゼ標識抗体の基質には突然変異性や発癌性が懸念されており、今後の使用に際し、安全性の配慮が必要である。

要 約

日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法として、酵素抗体法 (ELISA プレート法) を行つた。ペルオキシダーゼを標識抗体として使い、5-aminosalicylic acid (5AS), O-phenylenediamine (OPD), O-tolidine (OT) の三種の基質をプレート直読式分光光度計の利用により比較検討し、以下の様な結果を得た。

1. 発色の安定性と鋭敏性を比較すると、前者は OPD が、後者は OT が最も優れていた。OT の場合、基質反応 30 分以降に自然に退色するのが欠点であつた。

2. 肉眼による発色の観察は、OT と 5 AS が優れ、陽性と陰性血清の識別が容易であつた。

3. 鋭敏な基質を用いることで ELISA プレート法の簡便化が可能であった。5 AS では抗原感作の時間を除き、反応時間に約 4 時間かかったが、OPD や OT を用いることにより約 2 時間半に短縮することができた。

4. 標識抗体量は鋭敏な基質を用いることにより、5 AS と比較すると OPD ではその $1/4 \sim 1/8$ に、OT ではその $1/8 \sim 1/16$ に低下することができた。

流行地の野外実験室で本法による血清疫学調査を行う際、OT や OPD などの鋭敏な基質の使用とプレート直読式分光光度計の利用で反応の安定化、簡便化、及び経済性が得られるものと思われる。

文 献

- 1) Ambroise-Thomas, P. and Desgeorges, P. T. (1978) : Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. 1. Modalités techniques. Bull. W. H. O., 56, 609-613.
- 2) Engvall, E. and Perlmann, P. (1972) : Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol., 109, 129-135.
- 3) Huldt, G., Lagerquist, B., Phillips, T., Draper, C. C. and Voller, A. (1975) : Detection of antibodies in schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ann. Trop. Med. Parasit., 69, 483-488.
- 4) Ljungsröm, I., Engvall, E. and Ruitenberg, E. J. (1974) : ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay—a new technique for the sero-diagnosis of *Trichinella spiralis* infections. In Proceeding of the British Society for Parasitology. Parasitol., 69, XXIV.
- 5) McLaren, M., Draper, C. C., Roberts, J. M., Minter-Goedbloed, E., Lighthart, G. S., Teesdale, G. H., Amin, M. A., Omer, A. H. S., Bartlett, A. and Voller, A. (1978) : Studies on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test for *Schistosoma mansoni* infections. Ann. Trop. Med. Parasit., 72, 243-253.
- 6) Ruitenberg, E. J. and Buys, J. (1977) : Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the sero-diagnosis of human african trypanosomiasis (sleeping sickness). Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 31-36.
- 7) Schinski, V. D., Clutter, W. C. and Murrell, K. D. (1976) : Enzyme and ^{125}I -labeled anti-immunoglobulin assays in the immunodiagnosis of schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 25, 824-831.
- 8) Spencer, H. C., Collins, W. E., Chin, W. and Skinner, J. C. (1979) : The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. I. The use of in vitro-cultured *Plasmodium falciparum* as antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 927-932.
- 9) Tanaka, H., Matsuda, H. and Noseñas, J. S. (1979) : Detection of antibodies in *Schistosoma japonicum* infections by a micro-technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japan. J. Exp. Med., 49, 289-292.

Abstract

COMPARISON OF THREE KINDS OF SUBSTRATES FOR PEROXIDASE-
CONJUGATED ANTIBODY IN MICRO-ELISA FOR
SCHISTOSOMIASIS JAPONICA

MINORU NAKAO, HAJIME MATSUDA, HIROSHI TANAKA
(*Department of Parasitology, The Institute of Medical Science,
University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108*)

AND

TSUTAE NAGATA
(*Department of Medical Zoology, Tokyo Medical and Dental
University, Bunkyo-ku, Tokyo 113*)

Enzyme-linked immunosorbent assay using micro-plates (micro-ELISA) was performed for serological diagnosis of schistosomiasis japonica. Three kinds of substrates for peroxidase-conjugated antibody, 5-aminosalicylic acid (5AS), O-phenylenediamine (OPD) and O-tolidine (OT), were compared using a photometer which measured plates directly.

The results were summarized as follows:

1. OT and OPD were the superior substrates to 5AS in terms of sensitivity and stability of coloration, respectively. One disadvantage of OT was spontaneous color fading which took place after 30 min of reaction.

2. OT and 5AS were superior for visual observation. With these, positive and negative sera were easily distinguishable by naked eyes.

3. Simplification of the procedure of micro-ELISA was attained by using OT or OPD. With 5AS, 4 hours were required to complete the procedure of micro-ELISA excluding the time required for coating antigen onto plates. It has become possible, however, to reduce the time of procedure to about 2.5 hours by using OPD or OT.

4. OPD required only 1/4-1/8 of the amount of conjugate needed for 5AS. OT required only 1/8-1/16 thereof.

Use of sensitive substrates such as OPD or OT together with the photometer which measures plates directly will stabilize, simplify and economize sero-epidemiological surveys to be conducted in the field laboratory of endemic areas.