

トキソプラズマ IgG 抗体の検出に関する 基礎的研究

佐藤 宏 康* 原田 誠三郎* 安部 真理子*
後藤 良一** 圓子 隆信*** 森田 盛大*

I 緒 言

トキソプラズマ (Tp) 原虫に感染した人血清中に出現する特異的抗体を検出するためには、他種抗原や細菌との交差反応がない色素試験がよいといわれている。しかし、この方法は生きた原虫を用いることや accessory factorが必要であることなどの技術上の制約¹⁾があるので、一般的には赤血球またはラテックス粒子に原虫抽出物を吸着させた間接赤血球凝集反応や間接ラテックス凝集反応が行われている。しかし、これらの方法では免疫グロブリンのクラス別ができない。これに対して、最近血清学的検査に導入された ELISA 法による測定成績は色素試験による測定成績との間に推計学的に有意な相関がみられることから、Tp 症患者のスクリーニングや診断の目的に応用可能であると報告されている²⁾。ELISA 法による Tp IgG 抗体の検出法は内外の研究者により報告されている。しかし、その多くはマウス^{3,4,5)}または組織培養細胞⁶⁾に感染させた原虫を可溶化したものを抗原として用いている。NAOT⁷⁾の如く原虫成分を遠心分画によって精製している場合もある。著者らはマウス由来の Tp 抗原を Sepharose 4 B ゲル濾過法によって人血清中の Tp IgG 抗体と反応する抗原部分を抽出し、その抗原を用いて定量的に Tp IgG 抗体を測定し、既存の検査キットと比較検討したので、その成績について報告する。

II 材料と方法

A 材 料

1 Tp 原虫

Tp gondii 株は秋田県中央家畜保健衛生所より分与を受けたのち、当所にてマウス継代して使用した。なお、Tp 保存は DMSO 添加 MEM 培地に入れて -80°C で凍結した。

2 マウス

市販の dd 系マウス (9~10 週令オス) を用いた。

3 Sepharose 4 B カラム

直径 2.2 cm, 長さ 90 cm, ベットポリウム 312 ml のカラムと Pharmacia 社の Sepharose 4 B のゲルを用いた。

4 イムノプレート

Nunc 社の イムノプレート I 型を用いた。

5 Horserdich peroxidase (HRPO) 結合 IgG

HRPO 結合抗ヒト IgG および HRPO 結合抗ウサギ IgG はいずれも TAGO 社製を用い、前者は 2000 倍、後者は 3000 倍に希釈して使用した。

6 Tp 抗体陽性ヒト血清及び Tp 抗体陰性ヒト血清

Microbiological Research Corporation 製を 80 倍に希釈して用いた。

7 被検血清

昭和 59 年に秋田県内の成人 102 名から採取した血清を被検血清としたが、この内 44 検体は III-5 抗原および残りの 58 検体は III-6 抗原の比較検討にそれぞれ使用した。なお、被検血清は採取後使用時まで -20°C に保存した。

B 方 法

1 マウスへの原虫接種法と回収方法

ペニシリン 200 U/ml, ストレプトマイシン 200 r/ml を含むマイナス PBS で 2.5×10^7 /ml に調整した原虫浮遊液の 0.2 ml をマウスの腹腔内に接種した。感染 4 日後に頸椎を脱臼させ、開腹したのち、ヘパリン 10 U/ml を含む前記 PBS を用いて腹腔内に貯溜した Tp 原虫を回収した。

2 Tp 粗抗原の調製

回収した原虫を 150 メッシュの細胞濾過器 (池本理科 KK) で濾過後、図 1 に従って Tp の免疫抗原及び ELISA 用粗抗原を調整した。

3 正常抗原の調整

10 週令のオスマウスの腹腔内に Freund の incomplete adjuvant を 1 ml 接種し、4 日後にヘパリンを含む PBS を用いて腹腔内細胞を回収した。図 2 に従って調製した

* 秋田県衛生科学研究所 ** 現 横手保健所 *** 現 医務薬事課

した。次に3回洗浄後、80倍から2倍階段希釈したヒト血清の100 μ lをFrac. 9抗原と正常抗原の穴に添加して型の如く反応させたのち、Titertek Multiskan MCを用いて、波長492nmで測定した。Frac. 9抗原の吸光度と正常抗原の吸光度の差0.1をcutoff値とし、最大血清希釈倍数の逆数をもって抗体価とした。

160倍以上を抗体陽性とした。

III 成績

A 抽出Tp抗原の分析成績

1 抗Tp粗抗原ウサギ血清及び抗正常抗原ウサギ血清との反応成績

粗Tp抗原のSepharose 4 Bカラムクロマトグラフィー分画を炭酸緩衝液で20倍に希釈し、その50 μ lをイムノプレートにコーティングした。5万倍に希釈した抗Tp粗抗原ウサギ血清および10万倍に希釈した抗正常抗原ウサギ血清との反応は図3に準じて行ない。その成績を

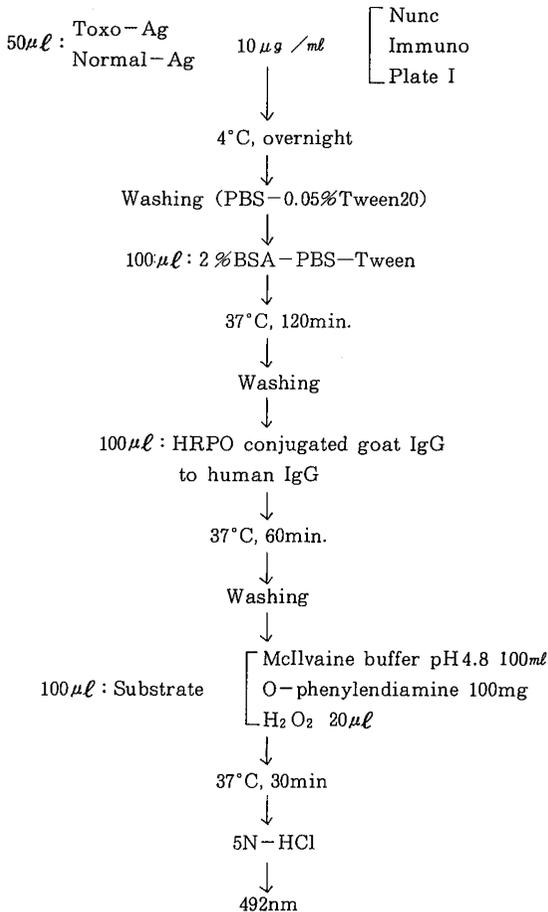


図3 HRPO-ELISAによるTp IgG抗体の測定法

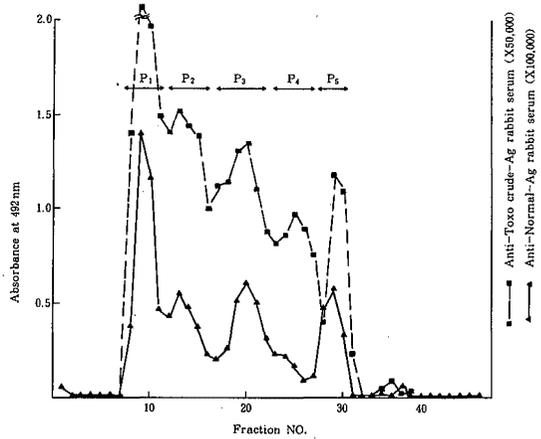


図4 各Frac.と抗血清との反応

図4に示した。前者とは5つのピーク(P)を示した。左からP1~5とした。後者とは4つのPを示した。

2 抗Frac. 9ウサギ血清及び抗Frac. 9 IgG-Nとの反応成績

III A 1と同様に各Frac.は20倍希釈および各抗血清は10万倍に希釈して反応させ、その成績を図5に示した。Frac. 9ウサギ血清および抗正常抗原ウサギ血清は4つのPを形成したが、いずれもFrac. 9の吸光度が最大であった。一方、抗Frac. 9 IgG-Nとの最大吸光度はFrac. 9で認められ、Frac. 20以上ではほとんど認められなかった。特に、Frac. 29, 30のP₅部分の活性は検出されなかった。

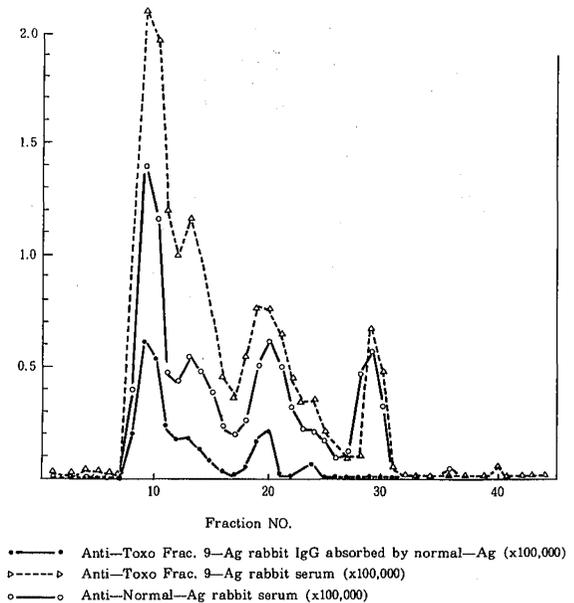
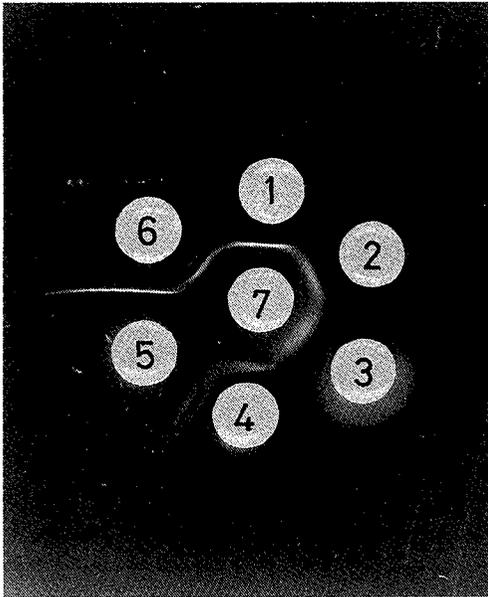


図5 各Frac.と抗Frac.9及びそのIgGとの反応

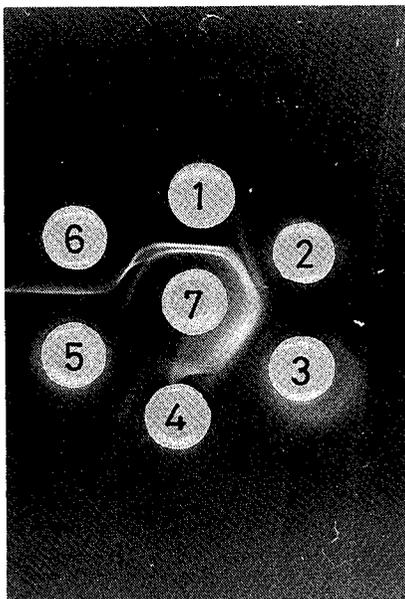
3 Frac. 9 抗原の沈降反応成績

マイクロオクタブロニイ法でFrac. 9 抗原と各抗血清との沈降反応を行なった結果を図6に示した。すなわち、抗正常抗原ウサギ血清を1、抗Frac. 9 ウサギ血清を2、2を硫酸塩析したIgGを3、3をDE-53でゲル濾過したIgGを4、4を正常抗原で吸収したIgGを5にそれぞれ入れた。上段中央には正常抗原、下段中央にはFrac. 9 抗原を入れた。その結果、5（抗Frac. 9

IgG-N）は正常抗原とはバンドを形成しなかったが、Frac. 9 抗原とは薄いながらも見かけ上1本のバンドを形成した。しかし、Frac. 9 抗原は抗正常抗原ウサギ血清に対するバンドも検出されたことから、Frac. 9 を抗原として使用する場合には正常抗原の存在を考慮する必要が認められた。一方、5と6、5と4の間に形成されたバンドは、5の中に含まれる吸収用正常抗原と抗正常抗原ウサギ血清との反応に起因すると推定された。



1. Anti-Normal-Ag rabbit serum
2. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit serum
3. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit
IgG : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$
4. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit
IgG : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, DE-53
5. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit
IgG : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, DE-53, N-Ag
6. Anti-Toxo crude-Ag rabbit serum
7. Normal-Ag



1. Anti-Normal-Ag rabbit serum
2. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit serum
3. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit
IgG : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$
4. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit
IgG : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, DE-53
5. Anti-Toxo Frac. 9-Ag rabbit
IgG : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, DE-53, N-Ag
6. Anti-Toxo Crude-Ag rabbit serum
7. Toxo Frac. 9-Ag

図6 Frac. 9 抗原の性状

4 各 Frac. と Tp 抗体陽性ヒト血清および陰性ヒト血清との反応成績

20倍に希釈した各Frac. とTp抗体陽性および陰性ヒト血清並びに抗Frac. 9 IgG-Nとの反応成績を図7

に示した。Tp抗体陽性ヒト血清はFrac. 9で最大活性を示し、抗Frac. 9 IgG-Nと極めて類似しパターンを示した。一方、抗体陰性ヒト血清は、Frac.10でわずかに示した反応を除き、ほとんど反応しなかった。

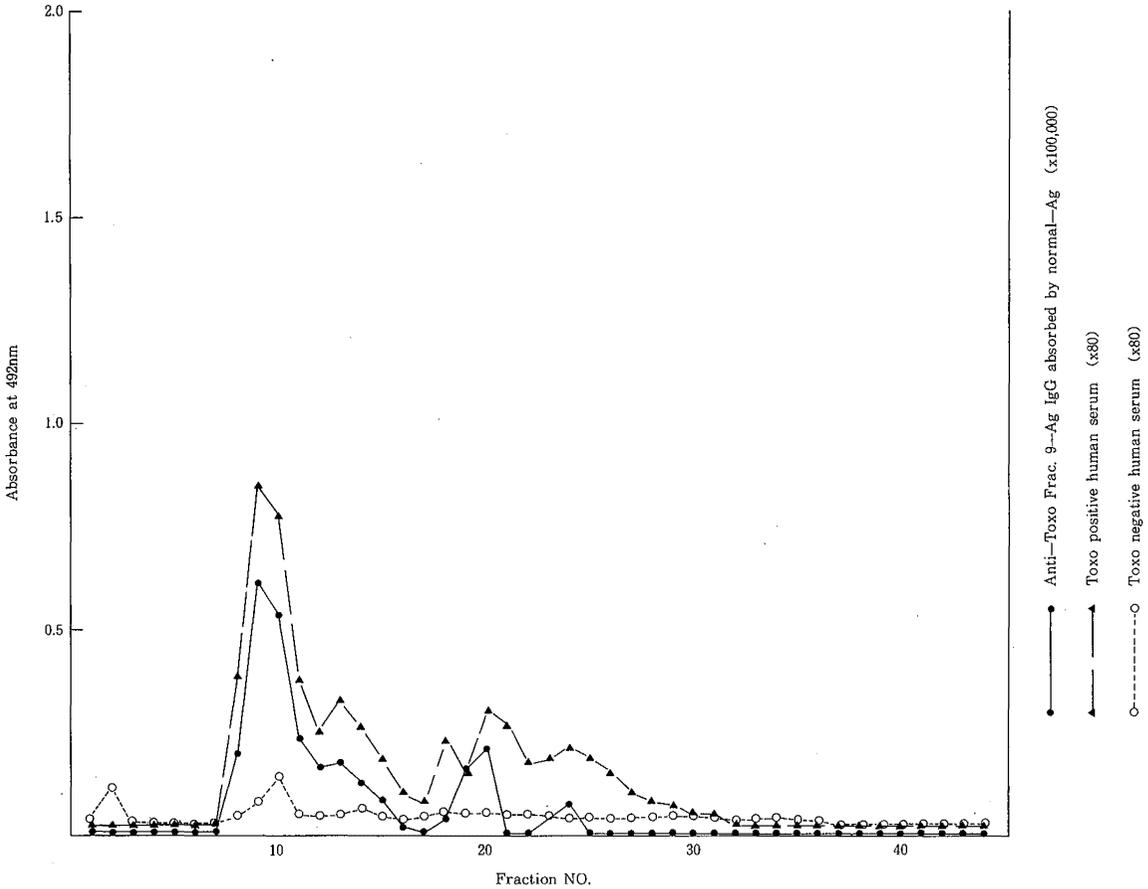


図7 各Frac. と対象ヒト血清との反応

5 Tp粗抗原, Frac. 9及びFrac.29の抗原活性

Sepharose 4 Bゲル濾過前のTp粗抗原, ゲル濾過後に最大活性を示したFrac. 9および抗Frac. 9 IgG-NとTp抗体陽性ヒト血清との反応が認められなかったFrac.29を抗原として, 被検ヒト血清44検体と反応させた。160倍希釈被検ヒト血清と各抗原を反応させた時の吸光度から正常抗原と反応させた時の吸光度を差し引いた値を縦軸に, Toxotest-MTの凝集抗体価を横軸にとり図8に示した。Frac.9抗原に対するO・D値が最大であったが, Frac.29抗原に対するO・D値は極めて低値であった。これに対してTp粗抗原は両者の中間に近いO・D値を示した。

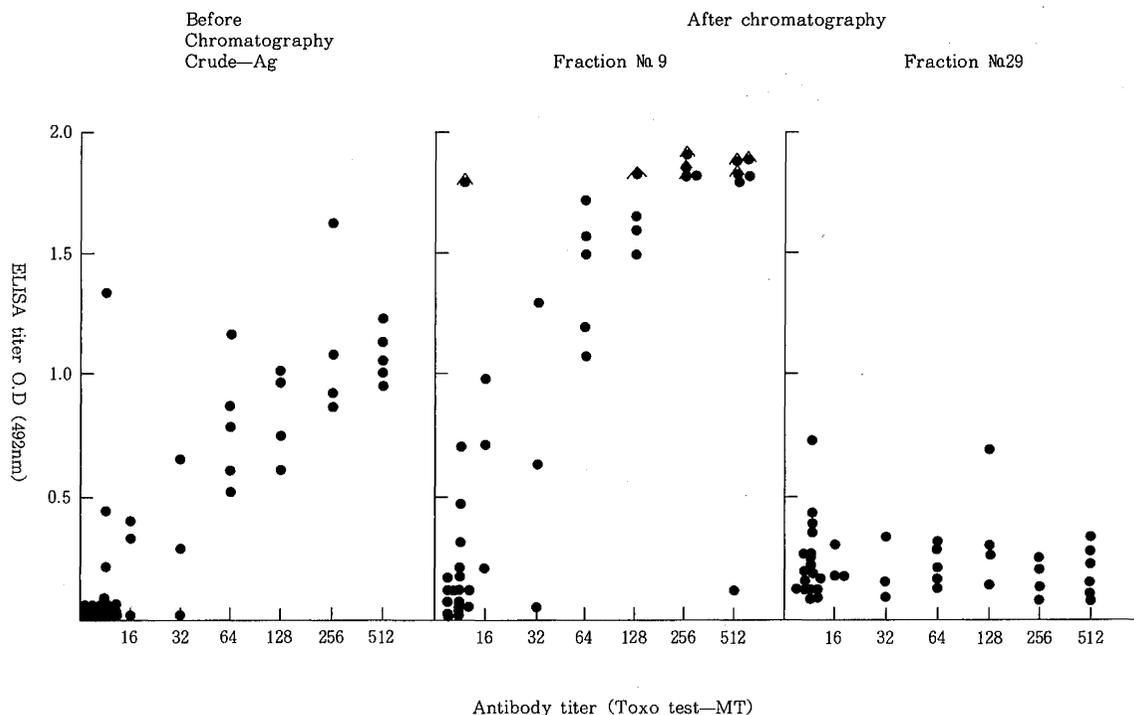


図8 粗抗原 Frac. 9 及び Frac. 29 とヒト血清との反応

6 HRPO-ELISA, Toxoelisa および Tox-test-MT による各抗体価の相関性

市販のToxotest-MTキットとToxoelisaキットを用いて測定した抗体価とHRPO-ELISA抗体価とを比較検討した。HRPO-ELISAとToxotest-MTとの関係は図9-aに示す如く、定性的な陽性一致率は77.6%であった。Toxotest-MT陰性、HRPO-ELISA陽性と判定されたのは10検体であった。しかし、抗体価の高い検体ではよく相関し、両値の相関係数は0.804であった。一方、HRPO-ELISAとToxoelisaとの関係は図9-bに示す如く、定性的な陽性一致率は94.8%であったが、両値の相関係数は0.703であった。なお、ToxoelisaとToxotest-MTの定性的な一致率は79.3%および両値の相関係数は0.516であった(図9-c)。

IV 考 察

Tp粗抗原をSephacrose 4 Bゲル濾過法分画抽出した44本のFrac.の内Frac. 1~7およびFrac. 32~44は抗Tp粗抗原ウサギ血清に対して反応しなかったが、最大の抗原活性がFrac. 9で認められた。しかし、このFrac. 9は、ゲル内沈降反応による観察から、マウス腹腔内

由来の正常抗原を含んでいる可能性が推定された。すなわち、Sephacrose 4 Bゲル濾過だけではTp IgG抗体と特異的に反応する抗原を単離精製することができないことを示唆した。有滝ら¹⁰もSephacrose 4 Bによるゲル濾過、CM-, DE-celluloseイオン交換クロマトグラフィー法などを行なったが、期待した分離効果は得られなかったと報告している。一方、ゲル内沈降反応では、抗Frac. 9 IgG-Nは正常抗原とは反応しなかったが、Frac. 9抗原とは薄いながらも見かけ上1本のバンドを形成し、また各Frac.とのELISA反応ではFrac. 9と20付近で活性を有していた。そしてFrac. 20まではTp陽性ヒト血清の反応と極めて類似の反応パターンを示したことから、抗Frac. 9 IgG-Nがヒト血清中の特異的Tp IgGの反応態度と類似している可能性が示唆され、従ってFrac. 9抗原にはヒトTp IgGと特異的に反応する抗原が含まれていると推定された。

粗抗原のゲル濾過により、Tp抗体陽性ヒト血清に対し高い活性を示す抗原部分(Frac. 9)とほとんど活性を示さない抗原部分(Frac. 29)とに分画された。Frac. 29を含むP部分は正常抗原により吸収されることから、マウス腹腔内細胞由来抗原ではないかと考えられた。また、Frac. 18~21の抗原部分はプールしてDEAE-Sephadex-A-25でイオンクロマトグラフィ

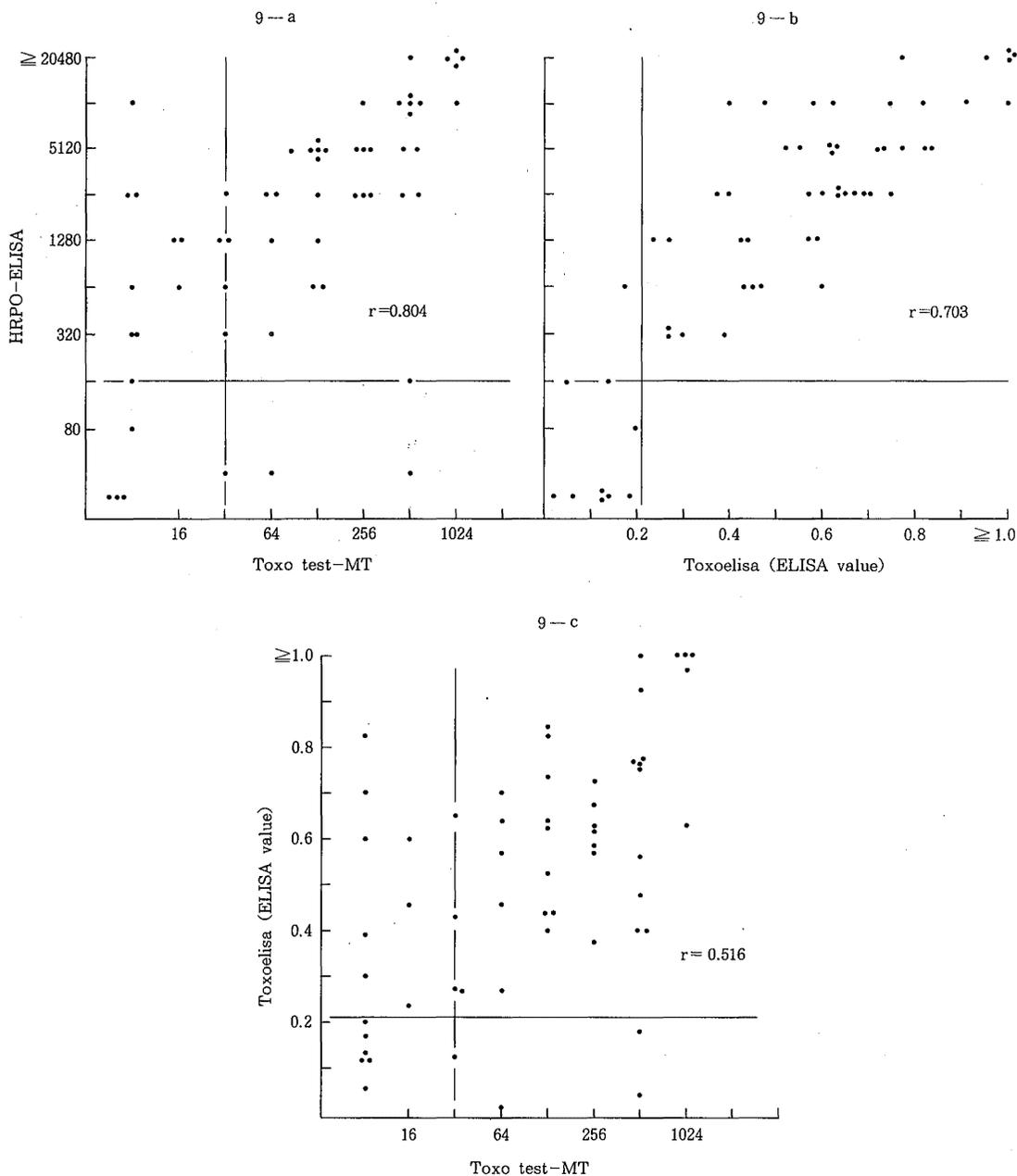


図9 HRPO-ELISA, Toxoelisa及びToxo test-MT抗体価の相関

を行なうとToxotest-MTの検査成績とは正の相関を示さないことはすでに報告した。¹¹⁾ Tp粗抗原中にはTp IgGと反応しない部分が含まれることから、抗原としての特異性が低いと予想された。また、正常抗原の対照を置かない場合、マウス由来の正常抗原との反応をチェックできないので、非特異的反応を抗体陽性と誤判

定するおそれがあると考えられた。従って、人血清中のTp IgG抗体検出にはFrac. 9抗原と正常抗原を用いる必要があると考えられた。これらの結果から、我々はFrac. 9抗原に対する吸光度から正常抗原に対する吸光度を引却し、cut off値を0.1として判定した。HRPO-ELISAで測定されたTp抗体価とToxolisaおよび

Toxotest-MTとの抗体価を比較した結果、Toxoelisaとの定性的な一致率(94.8%)は前報¹²⁾の97.4%よりいく分低率であった。これは陰性血清の検体数を大幅に除いたためと考えられた。Toxolisa値に対する相関係数($r=0.703$)はToxotest-MT値に対する相関係数($r=0.804$)より低かったが、Toxoelisa抗体価の表示が、血清希釈倍数ではなく、吸光度からELISA valueを算出することに起因するためと考えられた。これに対し、Toxotest-MTの場合は、マイクロタイターで血清希釈を行なうため、高い相関が得られたものと考えられる。

今後、Frac. 9抗原の精製と各P部分の抗原性について検討していく考えである。

V ま と め

Sepharose 4 Bゲル濾過により抽出されたTp抗原を用いて、人血清中のTp IgG抗体を特異的に検出できる可能性について報告した。

本論文の要旨は第34回(東京都, 1985)及び第35回(秋田市, 1986)の日本感染症学会東日本地方会総会において発表した。

文 献

- 1) 小林昭夫: トキソプラズマ症, 臨床と細菌, 8, 283-288 (1981)
- 2) 小早川隆敏たち: トキソプラズマ酵素標識抗体法 (Toxo-EIA) の検討, 寄生虫学雑誌, 30, 471-476 (1981)
- 3) 石郷岡清基たち: 酵素抗体法 (ELISA) によるトキソプラズマ抗体の検出, 衛生検査, 28, 862-866 (1979)
- 4) E・KONISHI et al: Reproducible Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Magnetic Processing System for Diagnosis of Toxoplasmosis, J. Clin. Microbiol. 17, 225-231 (1983)
- 5) TURUNEN H. J.: Detection of Soluble antigens of *Toxoplasma gondii* by a Four-Layer Modification of an Enzyme Immunoassay, J. Clin. Microbiol. 17, 768-773 (1983)
- 6) VAN Loon A. M., et al: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses Labeled Antigen for Detection of Immunoglobulin M and A antibodies in Toxoplasmosis: Comparison with Indirect Immunofluorescence and Double-Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, J. Clin. Microbiol., 17, 997-1004 (1983)
- 7) NOAT Y., et al: Characterization of *Toxoplasma gondii* antigens that React with Human Immunoglobulin M and Immunoglobulin G antibodies, Infect. Immun., 41, 331-338 (1983)
- 8) Lowry O. H., et al: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)
- 9) 石田俊介: 免疫化学, 中山書店, 159-164 (1972)
- 10) 有滝千恵子たち: トキソプラズマ虫体膜の抗原成分について, 寄生虫学雑誌, 30, 557-562 (1981)
- 11) 原田誠三郎たち: トキソプラズマ抽出抗原に関する血清学的研究(第1報), 第39回日本細菌学会東北支部総会, 仙台市 (1985)
- 12) 佐藤宏康たち: トキソプラズマ抽出抗原の血清学的研究(第2報), 第34回日本感染症学会東日本地方会総会抄録, 137, 東京都 (1985)