

## トキソプラズマ抗体の分析

### 2. 実験感染の経過にともなう免疫グロブリンの推移

鈴木俊夫 米谷武士 関川弘雄

関野敏 大鶴正満

新潟大学医学部医動物学教室

横山政徳

新潟県衛生研究所

(昭和46年2月13日 受領)

#### はじめに

生体が抗原性刺激—感染を含めた—を受けると、それに反応して血中に最初に現われてくる免疫グロブリンは分子量の大きな $\gamma$ Mであるが、やがてそれより少し遅れて現われてくる $\gamma$ Gに置き換えられ、数週以内に血中抗体の大部分が $\gamma$ Gによつて占められるようになる。しかし、同一抗原での再度の刺激による二次反応では $\gamma$ Mの産生は少なく、早期より $\gamma$ Gの著明な増加がみられる。このような生体における反応は動物の種類ならびに与えられた抗原性刺激の種類などによつて多少の差異がみられるとはいえ、かなり共通した現象であることが、ヒトを含めた動物での広汎な研究より明らかにされている。(Stelos, 1958; Uhr *et al.*, 1962; Svehag and Mandel, 1962; Bauer *et al.*, 1963) また、こうした生体反応をヒトの感染症における病期の推定とか、初感染か再感染かの鑑別に役立てようという試みがなされている。(Schluederberg, 1965; Murray *et al.*, 1965)

トキソプラズマ(以下Tpと略す)症についても Remington and Miller(1966), Remington *et al.*(1968 a, b) Staib *et al.*(1969)のヒト血清についての検討, Staib *et al.*(1966), 亀井ら(1968)のウサギを用いての実験などが報告されている。

今回、著者らはTp Beverley株を感染させた動物より経時的に採血して抗体寒天平板法によつて $\gamma$ M,  $\gamma$ Gを定量するとともに、2-Mercaptoethanol処理法、蔗糖密度勾配超遠心法、Sephadex G-200ゲル濾過法、蛍光抗体間接法などによつてそれらの抗体活性を調べ、両者の相関について検討を加えるとともに、これらの分析法

の本症診断への実用の可能性について考察したので報告する。

#### 実験材料および実験方法

##### 1. 実験動物に対するTp感染ならびにその採血

1) 実験動物: 新潟市内の動物商より購入した体重2,000~2,500gのウサギ, 200~300gのモルモット, 20~30gのマウスを用いた。

2) *Toxoplasma gondii*: RH, Beverley株とも東大医科研細菌感染研究部より分与をうけ継代中のものを用いた。

3) Tp接種と採血: Beverley株感染4カ月目の脳を取り出し滅菌生理的食塩水を加えて乳鉢で磨砕し、シストを数え、5羽のウサギおよび30匹のモルモットの皮下に300個あて、40匹のマウスの腹腔に100個あてそれぞれ接種した。感染させたウサギは全部接種前と接種後毎週採血した。モルモット、マウスでは接種前は全部より採血したが、接種後は半数ずつ交互に隔週にわたつて採血した。分離した血清は-20°Cに凍結保存しておき、あとで取り出して一括測定し、測定条件による誤差を少なくした。

##### 2. 赤血球凝集反応(以下HAと略す)

Lewis and Kessel-医科研法(常松, 1963)にしたがつて行なつた。

##### 3. 2-Mercaptoethanol(以下2-MEと略す)処理

0.5mlの免疫血清を磷酸緩衝食塩水(pH 7.2)(以下PBSと略す)で4倍に希釈し、0.1M 2-MEに室温16~18時間透析したあと、4°Cの(低温)室内で48時間PBSに透析した。処理した血清についてHAによる抗

体価を測定し、処理前の値と比較した。

4. 蔗糖密度勾配超遠心分離（以下密度勾配遠心と略す）

Remington and Miller (1966) 記載の方法に準じて行ない、超遠心分離には Spinco Model L 2-65 B, SW 40 Ti を使用した。免疫血清 0.25 ml を 13% 蔗糖溶液 0.25 ml に混和し、13%より37%の密度勾配に調製した 10 ml の蔗糖溶液の上に静かに重ね、35,000rpm 22時間遠心したあと、管底に穴をあけて 0.5 ml ずつの分画に分け、4°C の低温室内で24時間純水に透析し、さらに24時間 PBS に透析した。これらの分画について HA により抗体価を測定した。

5. Sephadex G-200ゲル濾過（以下ゲル濾過と略す）

Flodin and Killander (1962) の方法によつた。すなわち、0.1M Tris-HCl (pH 8.0) in 0.2 M NaCl の緩衝液に平衡にした Sephadex G-200を 2.5×70cm の高さに充填して免疫血清 0.6ml を添加し、上記の緩衝液で 20—40ml/hr の速度で溶出し、1.5 ml ずつ集めて 280 m $\mu$  で吸光度を測定した。かくて蛋白質の溶出のみられた分画より 4本ずつ集め、4°C 48時間純水に透析したあと凍結乾燥し、これを PBS 1 ml に溶解した。これらの分画について HA により抗体価を測定した。

6. 免疫グロブリン（以下 IG と略す）の定量

1)  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の作製：ウサギ、モルモット、マウスのプール血清を純水に透析し沈澱した Euglobulin を遠心して集め、少量の PBS に溶かし、前記同様の方法で Sephadex G-200 によつてゲル濾過を行ない、最初に溶出してくる分画の前半を集めて濃縮したのち、PBS に24時間透析した。この分画中に含まれる  $\alpha_2$ -Macroglobulin, Lipoprotein を除くため右田 (1968) の方法により分離用寒天電気泳動を行ない、 $\gamma$ M を精製した。Euglobulin を分離した上清から硫酸塩析法により粗  $\gamma$ -Globulin を取り、透析によつて完全に脱塩したあと、DEAE-cellulose カラムを用いて 0.01 M PB (pH 7.8) で  $\gamma$ G を溶出した。さらに、混入するわずかの  $\beta$ -Globulin を除去するため分離用寒天電気泳動を行ない、純粋な  $\gamma$ G を得た。

2) 抗血清作製：抗モルモットおよび抗マウス  $\gamma$ M,  $\gamma$ G はウサギの足蹠、皮下に、また抗ウサギ  $\gamma$ M,  $\gamma$ G はヤギの皮下にそれぞれの  $\gamma$ M および  $\gamma$ G を Freund の complete adjuvant と混じて注射し作製した。しかし、これらの抗血清中には多少とも他の成分に対する抗体の混入がみられるため（特に抗  $\gamma$ M に抗  $\gamma$ G の混入がみられた）、吸収して特異的な抗血清とした。

3) 抗体寒天平板作製（以下 Imm. pl. と略す）

Fahey and McKelvey (1965) 記載の方法を一部改変して行なつた。すなわち、7 ml の PBS に 3% になるよう Agarose を溶かし、これと予備試験で決定した至適倍数に PBS で希釈した抗血清 7 ml とを 56°C の恒温槽中で混和し、水平において 10×7 cm の透明プラスチックの容器に流して固まらせた。

4) 定量法：Imm. pl. に直径 2.2 mm の小孔をあけ、これに被検血清 5  $\mu$ l を Microsyringe を用いて注入し、容器に蓋をして 20°C の孵卵器中で 24時間反応させ、生じた沈降輪の直径を正確に計測した。 $\gamma$ G では既知濃度の  $\gamma$ G によつて求めた標準直線から血中濃度を算定できたが、 $\gamma$ M では標準直線を求めるに足るだけの  $\gamma$ M を得ることが困難であつたため、実験使用前の動物によつて求めた測定値の平均値の百分率で表わした。

5) 吸収試験：各週に採血したウサギ血清をそれぞれ 0.5 ml ずつ取り、PBS で 10 倍に希釈した HA 抗原を 0.2 ml ずつ加えよく振盪して 4°C 18時間静置したあと、3,000rpm 10分遠心して沈澱を除き、凍結乾燥して 0.5 ml の水に溶解した。対照として HA 抗原のかわりに PBS を加え同様の処理をしたものを作り、Imm. pl. を用いて吸収、非吸収による  $\gamma$ M,  $\gamma$ G 量の差を比較した。

8. 蛍光抗体間接法（以下 IFAT と略す）

1) 蛍光抗体の作製：抗  $\gamma$ M, 抗  $\gamma$ G 血清から硫酸塩析法によつて粗  $\gamma$ -Globulin を取り、DEAE-cellulose を用いて精製した  $\gamma$ G に浜島ら (1965) の記載する方法により、fluorescein isothiocyanate (FITC) を 4°C 5時間反応させて標識した。遊離色素は Sephadex G-25 カラムを通して除去したあと、DEAE-cellulose に吸着させ PBS (0.005 M PB, pH 7.8) in 0.1 M NaCl で溶出してくる部分を集めた。

2) 染色法：Remington *et al.* (1968) にしたがう RH 株感染 3 日目のマウスの腹水の塗抹標本を作つた。検査血清は PBS で 8 倍より 4,096 倍まで倍数希釈して塗抹標本にかぶせ、37°C 30 分間反応させた。1 次反応終了後 PBS で十分に洗滌して反応にあずからなかつた血清を洗い流したあと、蛍光抗体液をかぶせて同様に 37°C 30 分間反応させた。2 次反応終了後 PBS で十分に洗滌して、緩衝グリセリンで包埋し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

9. 免疫電気泳動法：前報 (1970) に記載したと同様の条件で行なつた。感染後各週に採血したマウスのプール血清を泳動して両側に溝を作り、一方には HA 抗原、

他方にはマウス Ig に対する抗血清を入れ、被検血清と HA 抗原との間に現われる沈降線がどのクラスの Ig に相当するかを同定した。

### 実験成績

#### 1. ウサギにおける成績

Beverley 株シスト 300 個あて接種したウサギ 5 羽のうち 1 羽が 20 日目に斃死したため、4 羽について実験を行なった。接種後 17 週目まで毎週採血し保存しておいた血清について Imm. pl. により  $\gamma$ M,  $\gamma$ G を定量するとともに、HA 価を測定して感染経過によるそれらの変動をみたのが Fig. 1 である。いずれの例でも  $\gamma$ M は接種後 2 週目には増加を示し、2 週目に最高値を示した No. 3 を除けば 3~4 週目に最も高くなり、その後は次第に低下して 6~7 週目には接種前の値にもどった。 $\gamma$ G も 2 週目にやや増加するが、3~4 週目より著明に増加して 5~6 週目には最高値を示し、その後は漸次減少するのがみられた。HA 価もこれら Ig, ことに  $\gamma$ G, の増減にかなり一致した動きを示した。

再感染による既往性反応を調べる目的で、感染 15 週目に No. 1 と No. 3 のウサギに RH 株 30,000 個皮下に接種したが、No. 1 のウサギに接種後 1 週目から  $\gamma$ G および HA の上昇がみられたほか著しい変動は認められなかった。

No. 1 のウサギの 2, 3, 4, 6, 9, 15 週目の血清を密度勾配遠心によつて分け HA 活性を調べたが、このなかの 2, 4, 6, 9 週目の血清のパターンのみを Fig. 2 に示した。これによると、感染初期には第 1 の山 ( $\gamma$ M) にあつた抗体活性が、感染時期が進むにつれて次第に第 2 の山 ( $\gamma$ G) に移動していくのがみられる。左上に示した数字はその血清のもとの HA 価と、これを 2-ME で処理した際の HA 価とを対比したものである。処理によつて HA の陰転したのは 2 週目の血清のみであつて 3 週目以後の血清では HA 価の低下も認められなかった。

Tab. 1 は No. 2 のウサギの血清について行なつた IFAT での  $\gamma$ M,  $\gamma$ G 値の変動を示したものである。1~2 週目では  $\gamma$ M の方が  $\gamma$ G より高値を示すが、3 週目以後は  $\gamma$ G の値が  $\gamma$ M をしのぐようになる。

Tp 感染によつて増加した Ig は全て Tp に結合する特異的な抗体であるかどうかを知る目的で、No. 3 のウサギの各週の血清に HA 抗原を加えて吸収し、非吸収血清との間の  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の差をみたのが Tab. 2 である。吸収によつて色素試験 (以下 DT と略す)、HA は全て陰転したが、 $\gamma$ M,  $\gamma$ G の著しい減少は認められなかった。

#### 2. モルモットにおける成績

Tp 接種後、毎週半数ずつ採血して保存したモルモツ

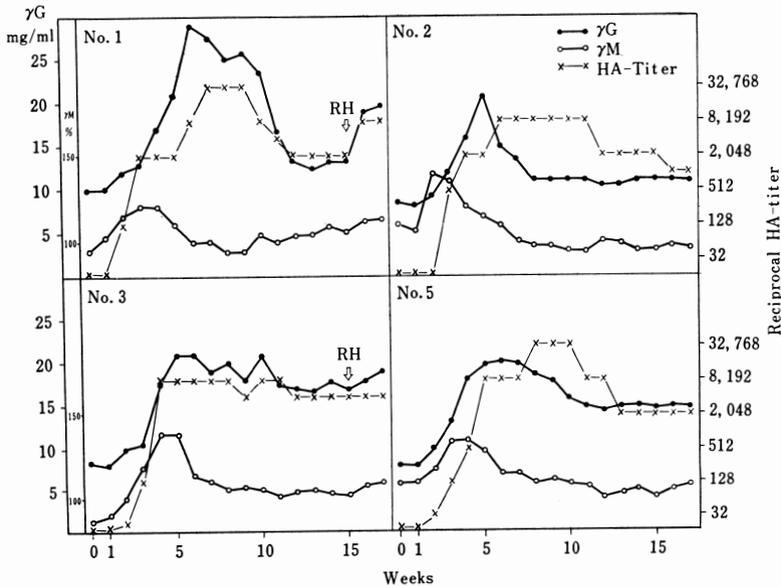


Fig. 1 Changes in immunoglobulin levels and HA titer in rabbits during the course of infection.

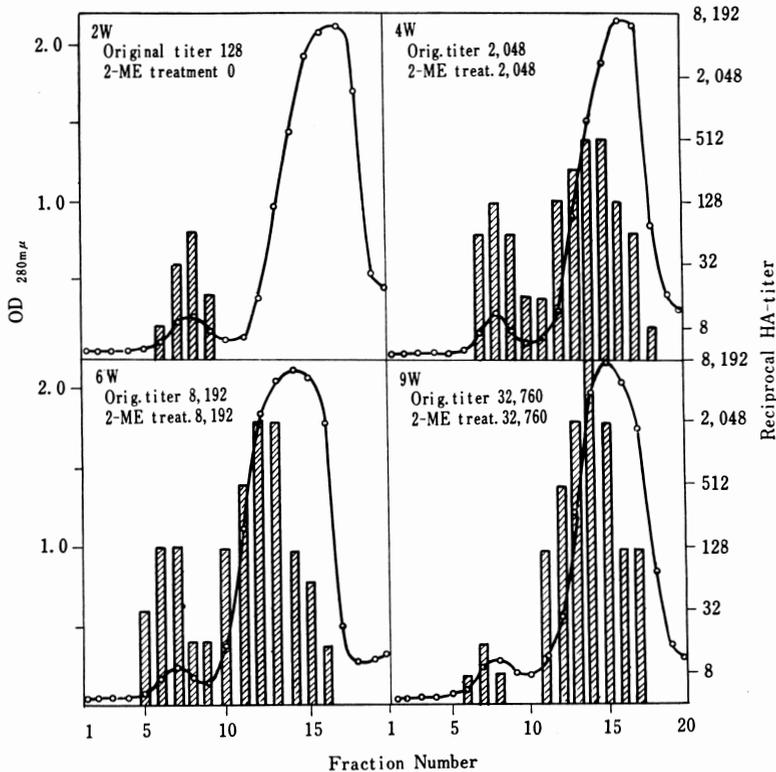


Fig. 2 Distribution of HA activity of fractions separated by sucrose density gradient ultracentrifugation in infected rabbit sera. (Rabbit No. 1) Bars and lines of graph indicate HA-titer and absorbancy respectively.

Table 1 Changes in antibody activity of immunoglobulin titrated by indirect fluorescent antibody technique (Rabbit No. 1)

Weeks after inoculation	IFAT-titer	
	$\gamma$ M	$\gamma$ G
1	64	32
2	1,024	512
3	1,024	2,048
4	1,024	4,096
7	512	>4,096
10	32	>4,096
15	16	2,048
25	16	2,048

ト血清について Imm. pl. を用いて  $\gamma$ M,  $\gamma$ G を測定, その分布を Fig. 3 に示した. 実線は各週の測定値の平均値を結んだものであり, 斜線で囲んだ部分は接種前の 22 匹のモルモットより採取した血清について測定した値の平均値の標準偏差の範囲を示したもので,  $\gamma$ M では  $100 \pm 8.97\%$ ,  $\gamma$ G では  $12.4 \pm 3.59\text{mg/ml}$  である.

Table 2 Immunoglobulin levels of infected rabbit sera before and after adsorption with *Toxoplasma* lysate

Weeks after inoculation	$\gamma$ M (%)		$\gamma$ G (mg/ml)	
	before	after	before	after
3	118	115	10.5	12.0
4	138	128	18.0	16.0
5	138	138	21.0	18.0
6	113	115	21.0	19.0
7	110	110	19.0	16.0
8	105	105	20.0	20.0
9	107	110	18.0	14.5
10	104	108	21.0	20.5
11	101	98	17.5	14.0

$\gamma$ M は接種後早期に上昇して 3 週目には平均値で最高値を示し, 個々の例でも正常平均値の標準偏差の範囲を越すものが多くなるが, その後は次第に低下してきて平均値ではほぼ正常範囲の変動を示した.  $\gamma$ G でも 2 週目より増加するものが増え, 3 週目には最高値に達し

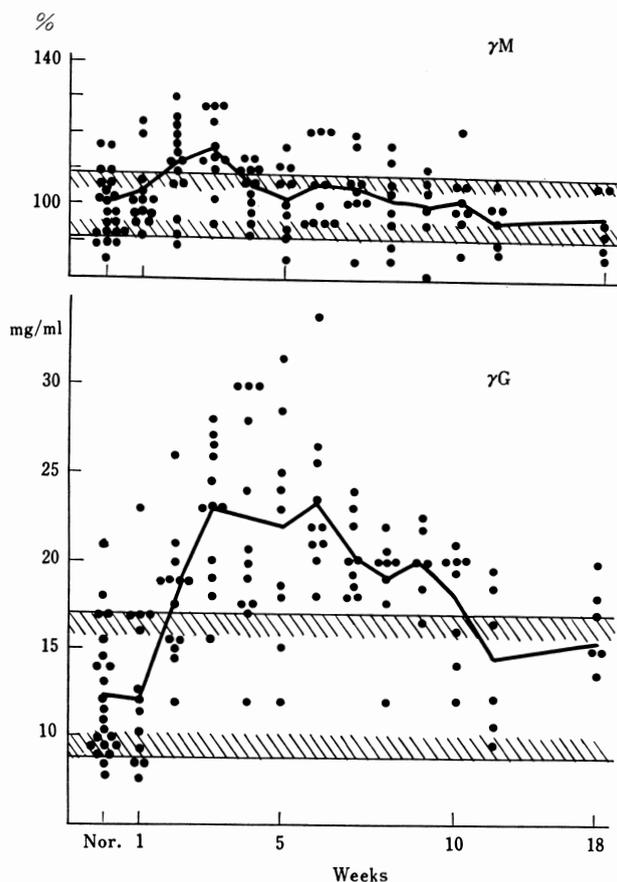


Fig. 3 Distribution of immunoglobulin levels in guinea pigs after infection.

て6週目頃まで持続し、その後は次第に低下して11週目にはほぼ正常値にもどった。

ゲル濾過で検討すると  $\gamma$ M の活性は2, 3, 4週目にのみ認められ、それ以後はきわめて活性が低かった。2-ME 処理によつても、2週目の血清の抗体価は全く陰転し、3週目の血清でも陰転または低下するものが多かったが4週目以後のものでは全て不変であった。

### 3. マウスにおける成績

Fig. 4は Imm. pl. を用いて測定したマウスの  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の変動の分布を示したものである。斜線で囲んだ部分は30匹の正常マウスについて測定した平均値の標準偏差の範囲を示したもので、 $\gamma$ M は  $100 \pm 8.39\%$ 、 $\gamma$ G は  $13.1 \pm 4.03\text{mg/ml}$  である。

$\gamma$ M は接種後1週目より増加するものが多く、平均値では3週目に最高値となり、その後漸次低下してくる傾向がみられるが、ウサギ、モルモットに比べてきわめて緩やかで、個々の例でも正常平均値の標準偏差の範囲を

越すものが多かった。このような高値はかなり長期間持続し、少数例についてはあるが15週目に測定した値でも正常平均値よりかなり高かった。 $\gamma$ G は2週目より増加するものが多く、平均値では3, 4, 5週目で最高値を示し、その後は次第に低下してきて15週目の測定ではほぼ正常に近い値を示していた。

Fig. 5は各週に採血したマウスのプール血清をゲル濾過し、6ml ずつ集めた分画について HA により抗体価を検したもののの中から3, 9週目採血の血清におけるパターンを示したものである。3週目には第1の山に活性が強く、第2の山に弱い活性しかみられなかったものが、9週目にはほとんどの活性が第2の山に移っているのが確かめられた。しかし、この際でも弱いながらも第1の山にも活性が残っていた。

左上に示した数字はそれに用いたプール血清の2-ME 処理前後の抗体価を示したものである。なお、その他のプール血清も2-ME で処理して調べているが、4週目

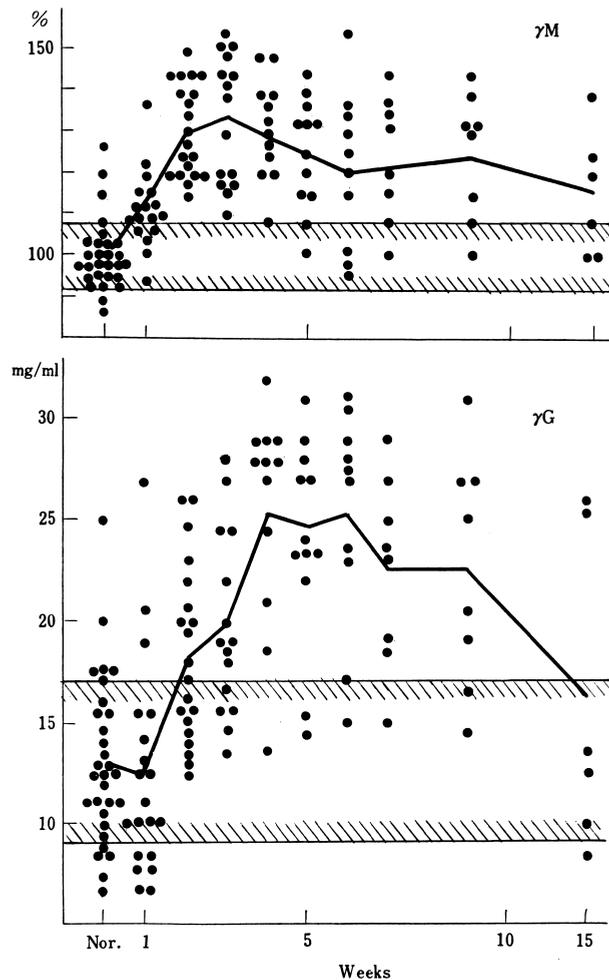


Fig. 4 Distribution of immunoglobulin levels in mice after infection.

でも陰転，5～7週目では低下したが，15週目では不変であった。

Fig. 6は2～7週目の血清の免疫電気泳動によってHA抗原との間に形成された沈降線を抗マウスIg血清との間に形成された沈降線によって同定して抗体活性の推移をみたものである。それによると，2，3週目に出現する沈降線は $\gamma$ Mのみであるが，4週以後になると $\gamma$ Gに相当する沈降線が次第に明瞭となってくる。しかし， $\gamma$ Mの沈降線も依然としてみられ，7週目の血清にもなお明らかに認められた。

さらにまた，Tab. 3に示したようなIFATによる $\gamma$ M， $\gamma$ Gの活性値の測定成績からも明らかなように， $\gamma$ Mにかなり長期に亘って活性が残ることが確かめられた。

#### 考 察

現在Tp症を診断するにあたり基礎的な検査法として用いられているDT，HAは特異性の点では高く評価されているが，これらの成績だけからではTp感染と現在との関係，さらには感染より発症までの期間などを推定することは難かしく，補助診断法としての価値もかなり限定されたものとなっている。

前報(1970)にも述べたように，目下著者らが進めつつある一連の研究は，感染時期の推定に役立つような方法を見つけ出し，本症をより確実に診断するための手段として用いたいという目的によってなされているもので，その最初の試みとして，前報ではTpを感染させた動物，Tp症の疑われた患者，Tp血清反応陽性者

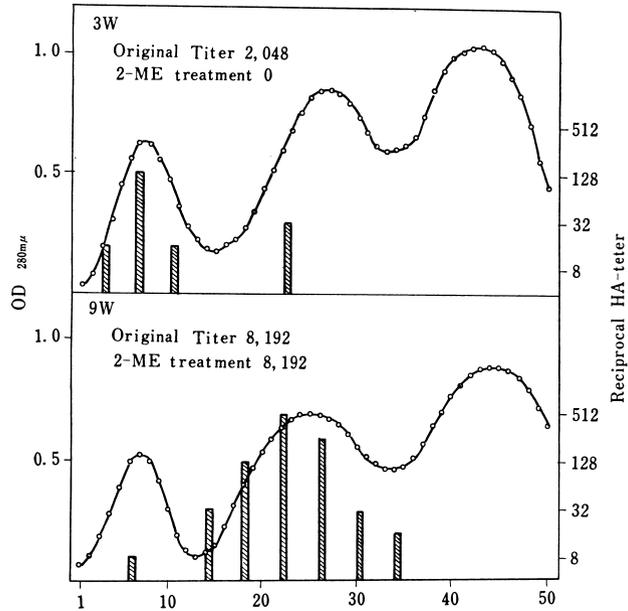


Fig. 5 Distribution of HA activity of fractions separated by gel-filtration with Sephadex G-200 in infected mouse sera. Bars and lines of graph indicate HA-titer and absorbancy respectively.

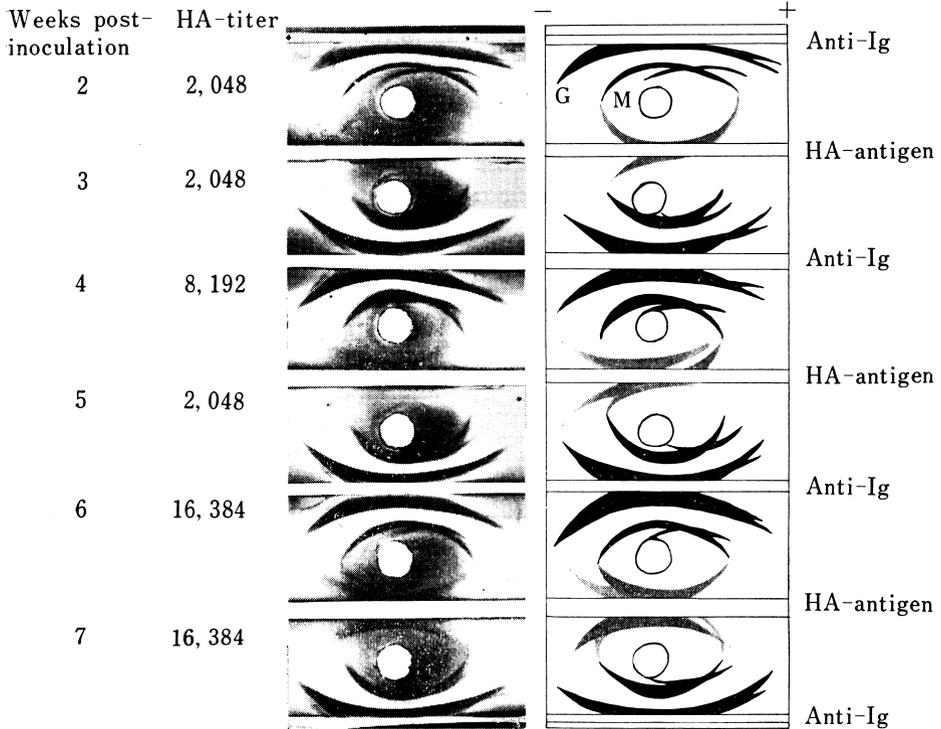


Fig. 6 Representative immunoelectrophoretic patterns of sera of mice bled weekly after infection

Tabel. 3 Changes in antibody activity of immunoglobulin titrated by indirect fluorescent antibody technique (in mice)

Weeks after inoculation	IFAT-titer	
	$\gamma$ M	$\gamma$ G
1	16	8
2	256	128
3	2,048	512
4	2,048	2,048
6	512	>4,096
9	512	>4,096
15	128	2,048
25	64	2,048

などの血清を Ouchterlony 法および免疫電気泳動法によって分析して比較した成績について報告した。しかし、このような手段で沈降抗体をさらに詳しく分析したとしても DT, HA などより特にすぐれた診断上の資料が得られるとは考え難く、他の分析方法による検討が必要であると考えられた。

先に行なつた実験で抗体産生量を血清試験の抗体価より間接的に推定するところでは、接種した Tp 株、用いた実験動物の種によりかなりの差がみられることがわかつた。動物種の相違については、モルモットの抗体産生能がウサギ、マウスに比べて劣つていると思われる成績であつたが、これを Imm. pl. 法を用いて直接 Ig の産生を追跡してみると量的な違いのみならず質的な差としてとらえることができた。すなわち、個体によりかなりのバラツキがあるが、一般的にみてモルモットがウサギ、マウスなどより抗体価が低いのは  $\gamma$ G の産生が少ないことに主な原因があるが、 $\gamma$ M の産生もかなり劣つていることが明らかとなつた。これに対して、マウスでは  $\gamma$ M の産生が特に著明であり、動物種によりこれら Ig の産生量に差のあることが知られた。このように同一の抗原性刺激による場合でも動物種が異なると各クラスの Ig の産生される割合が相違してくるという事実は、マラリア原虫感染については Stavitsky (1966)、ブタ回虫感染については Crandall and Crandall (1967) の報告にもみられる。特に後者の実験では、ブタ回虫を感染させたマウスの沈降抗体活性は主に  $\gamma$ M にあつたが、ラットでは  $\gamma$ G にあつたという報告は著者らの知見に類似したものとして興味もたれた。

Tp の実験感染での  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の変動を経時的に Imm. pl. によって定量してみると、動物種により多少相違してはいるが、初期には  $\gamma$ M が増加し、遅れて  $\gamma$ G が増

加してくるといふ他の感染症などにみられるのと同様の生体反応を観察することができた。また、それら Ig の抗体活性もその増減に関連した変動を示すことが当然予想されたが、どの程度の相関を示すかという点についての検討を要すると思われた。もし、両者間に直線的な関係が成立するならば Ig の定量によりその活性を予測することができるし、反対に活性値の測定によつて Ig 量の増減を間接的に推定することができるはずである。この相関を調べるために前記のような種々の方法を用いて検討した。

2-ME 処理の抗体価に及ぼす影響についてであるが、この方法は  $\gamma$ M は 2-ME の作用で活性を失なうが、 $\gamma$ G は影響がないという Deutsch and Morton (1957) の研究以来 Ig クラスを鑑別する手段として広く用いられている。Tp 症についても Staib *et al.* (1966) はマウス、ウサギに Tp を接種して経時的に採血し、2-ME 処理による DT 価への影響を調べ、感染初期では 2-ME に感受性の抗体が多いが、あとでは抵抗性の抗体が多くなるという事実はヒトの Tp 症診断の参考に資する可能性があると述べている。しかし、この実験は 13羽のウサギについてなされたものであり、しかも用いた Tp が BK 株という強毒株のため接種前すでに自然感染を起していたと思われる 1羽をのぞいた 12羽は 9日以内に全て斃死しているもので、急性期のきわめて短期間の反応しか観察していないわけである。Remington and Miller (1966) のヒト陽性血清についての実験では、ゲル濾過とか密度勾配遠心法などによつて分けた  $\gamma$ M 抗 Tp 抗体を含む分画に 2-ME を作用させると抗体価が著明に低下するか完全に陰転するが、そのままの血清では  $\gamma$ G 抗体が多く含まれているため、 $\gamma$ M 抗体の活性を検出するためには有効な方法ではなかつたという Staib *et al.* とは相反する見解を述べた。

著者らの実験では Beverley 株を接種した動物の血清を 2-ME で処理した際、マウスを除けば、接種後 2, 3週目ごろまでしか影響を受けないという成績を得ており、この方法で抗体活性の推移を正確に追跡するということは困難であつたし、またその他の方法に比べてもきわめて感度の低い方法であつて、ヒトの Tp 症でも急性期のしかも最も  $\gamma$ M 活性の高い時期にしか陽性にならないと思われるため、実用的価値も低いと判断された。

密度勾配遠心ならびにゲル濾過を用いて Tp の疑われた患者血清から  $\gamma$ M,  $\gamma$ G を含む分画を分け、それにつ

いて抗体活性を調べた成績について Remington and Miller(1966)が報告している。亀井ら(1968)も Beverley 株感染ウサギの感染時期による  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の抗体活性をみるため、ゲル濾過によって分けた分画について DT, HA, 補体結合反応を行ない検討した成績を報告した。

著者らも、これらの方法を用いて  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の活性を調べてみると感染経過によってかなり判然とした推移を示すことがわかった。また感染後かなり経過したもので、2-ME 処理には全く感受性のない血清でも活性が証明されるものがあつた。しかし、これらの方法によっても  $\gamma$ M,  $\gamma$ G 量とそれらの活性との関係を数値として比較することは不可能であり、また手技もかなり煩雑であるため、日常の手段として用いられないと思われた。

IFAT による  $\gamma$ M 活性の検出法は Remington *et al.* (1968 a, b) がヒトの Tp 症で検討し、この方法は最も鋭敏で、手技が簡単で、しかも少量の血清を用いて迅速に実施することができるとして推奨している。

著者らも Remington *et al.* の方法によりウサギ、マウスの血清について  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の IFAT 価 (活性値) を調べたところ、Ig 量とその活性値の変動との間には密接な関係があることをさらに確かめることができた。従つて IFAT は各クラスの Ig の抗体活性を調べるのに有効な方法の一つであると考えられた。しかし、モルモットの血清では prozone 現象と思われる反応が処々にみられ、パターンも一定しなかつたため今回の報告には記載しなかつた。

実験動物を用いての種々の検索の結果、Tp Beverley 株感染によつて起される各クラスの Ig 量の変動とそれらの活性値との間には、かなり緊密な相関が成立することが明らかとなつた。しかしながら、高い抗体価を示し、しかも感染前に比べるとかなり Ig の増加しているウサギの血清から HA 抗原によつて沈降抗体を吸収しても、全体の Ig 量は期待したほどの減少がみられないという事実の説明が困難である。このことについて第 1 の可能性として Beverley 株の慢性感染による緩和な刺激の持続により Tp と特異的に反応する抗体のほかに非特異的な抗体 (いわゆる natural antibody) の生成をも刺激し過剰に産生されてきたものか、第 2 の可能性としては沈降抗体以外の活性を持つ抗体が産生されたという推測が出てくる。いずれにせよ、Tp 感染以外に Ig の増加を起す原因を除外したとしても、あるクラスの Ig 量の増減が直ちにその活性値の高低を表わす指標

とはされ得ないことを示している。

著者らは以上のような動物実験によつて得られた成績を基礎としてヒトの Tp 血清反応陽性者ならびに Tp 症の疑われた患者について検索を続けており、臨床診断への応用をも検討して次報に発表する予定である。

## ま と め

ウサギ、モルモット、マウスに Tp Beverley 株を接種し、毎週採血して抗体寒天平板法 (Fahey 法) によつて  $\gamma$ M,  $\gamma$ G を定量するとともに 2-Mercaptoethanol, 蔗糖密度勾配超遠心法, Sephadex G-200 ゲル濾過法, 蛍光抗体間接法などを用いてそれらの抗体活性を調べ、感染経過による  $\gamma$ M,  $\gamma$ G の量的変動と抗体活性との関係について検討し、以下の結果を得た。

1) 免疫グロブリンの定量では、動物種により多少の相違があるが、感染の初期には  $\gamma$ M が増量し、のちに  $\gamma$ G が増加してくるのがみられた。

2) 抗体活性も、それら免疫グロブリンの量的変動にほぼ平行した増減を示し、両者間にはかなり明瞭な相関関係の成立することが知られた。

3) しかし、それらの血清に Tp RH 株虫体より抽出した抗原を加えて抗体を吸収しても免疫グロブリン量には著しい減少がみられず、このことは免疫グロブリンの定量値をもつてその活性を表わす指標とはされ得ないことを示していた。

稿を終るにあたり種々御教示いただいた東大医科研細菌感染研究部常松之典教授、鈴木守氏、亀井喜世子氏に感謝します。

なお、本論文の要旨は第30回日本寄生虫学会東日本大会にて発表した。

## 文 献

- 1) Bauer, D. C., Mathies, M. J. and Stavitsky, A. B. (1963): Sequences of synthesis of  $\gamma$ -1 macroglobulin and  $\gamma$ -2 globulin antibodies during primary and secondary responses to proteins, Salmonella antigens, and phage. J. Exp. Med., 117, 889-907.
- 2) Crandall, C. A. and Crandall, R. B. (1967): Macroglobulin antibody response to *Ascaris suum* infection. A comparison of precipitating antibody in rats and mice. Exp. Parasit., 21, 391-402.
- 3) Deutsh, H. F. and Morton, J. I. (1957): Dissociation of human serum macroglobulins. Science, 125, 600-601.

- 4) Fahey, J. L. and McKelvey, E. M. (1968) : Quantitative determination of serum immunoglobulin in antibody-agar plates. *J. Immun.*, 94, 84-90.
- 5) Flodin, P. and Killander, J. (1962) : Fractionation of human-serum proteins by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 403-410.
- 6) 浜島義博(1965) : 免疫組織学, 64-100, 医学書院.
- 7) 亀井喜世子・藤田絃一郎・鈴木守・常松之典(1968) : トキソプラズマ抗体の研究—感染経過に伴う IgM, IgG 抗体の出現状況について. *寄生虫誌*, 17, 315.
- 8) 米谷武士・鈴木俊夫・関野敏・大鶴正満・横山政徳(1970) : トキソプラズマ抗体の分析. 1. ゲル内拡散法による沈降抗体の分析. *寄生虫誌*, 19.
- 9) 右田俊介(1968) : 寒天電気泳動法. *臨床病理*, 臨時増刊11号, 19-31.
- 10) Murray, E. S., O'Connor, J. M. and Gaon, J. A. (1965) : Serologic studies of primary epidemic typhus and recrudescent typhus (Brill-Zinsser disease). II. Differences in immunoelectrophoretic patterns, response to 2-Mercaptoethanol and relationship to 17 S and 7 S antibodies. *J. Immun.*, 94, 734-740.
- 11) Remington, J. S. and Miller, M. J. (1966) : 19 S and 7 S anti-Toxoplasma antibodies in diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121, 257-363.
- 12) Remington, J. S., Miller, M. J. and Brownlee, I. (1968 a) : IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics*, 14, 1082-1091.
- 13) Remington, J. S., Miller, M. J. and Brownlee, I. (1968 b) : IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. *J. Lab. & Clin. Med.*, 71, 855-866.
- 14) Schluenderberg, A. (1965) : Immune globulins in human viral infections. *Nature*, 205, 1232-1233.
- 15) Staib, F., Seeliger, H. P. R. and Cura, J. (1966) : Orientierende Untersuchungen zur Bildung 2-Mercaptoäthanol-emphindlicher und -resistenter Antikörper bei der experimenteller Toxoplasma-Infektion. I. Mitteilung. *Z. med. Mikrobiol. u. Immun.*, 153, 20-30.
- 16) Staib, F., Seeliger, H. P. R. and Handwerker, R. (1969) : Orientierende Untersuchungen über das Vorkommen 2-Mercaptoäthanol-emphindlicher und -resistenter Toxoplasma-Antikörper beim Menschen. II. Mitteilung. *Z. med. Mikrobiol. u. Immun.*, 154, 344-348.
- 17) Stavitsky, A. B. (1966) : Cited by Crandall and Crandall.
- 18) Stelos, P. (1958) : Comparative study of rabbit hemolysins to various antigens. I. Hemolysis to beef red cells. *J. Inf. Dis.*, 102, 103-113.
- 19) Svehag, S. E. and Mandel, B. (1962) : The production and properties of poliovirus neutralizing antibody of rabbit origin. *Virology*, 18, 508-510.
- 20) 常松之典(1963) : Toxoplasma 症の診断について. *モダンメデシア*, 9, 443-449.
- 21) Uhr, J. W., Dancis, J., Franklin, E. C., Finkelstein, M. S. and Lewis, E. W. (1962) : The antibody response to bacteriophage  $\phi X_{174}$  in newborn premature infants. *J. Clin. Invest.*, 41, 1509-1513.

**Abstract**ANALYSES OF *TOXOPLASMA* ANTIBODIES.  
II. IMMUNOGLOBULIN BEHAVIOUR DURING THE COURSE OF  
EXPERIMENTAL INFECTIONTOSHIO SUZUKI, TAKESHI MAITANI, HIROHO SEKIKAWA, SATOSHI SEKINO  
MASAMITSU OTSURU*(Department of Medical Zoology, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan)*

AND

MASANORI YOKOYAMA

*(Niigata Public Health Laboratory, Niigata, Japan)*

The present studies were undertaken to investigate quantitative as well as qualitative nature of immunoglobulin responses during the course of chronic infection with *Toxoplasma gondii*, and to seek for a technique which may serve as a useful serologic adjunct in the clinical diagnosis.

Rabbits, guinea pigs and mice inoculated with Beverley strain were bled weekly to obtain serum specimens. The concentrations of  $\gamma$ M and  $\gamma$ G were measured by means of antibody-agar plate technique similar to that described by Fahey and Makelvey (1965) and the antibody activity was determined by sensitivity to 2-Mercaptoethanol, gel-filtration through Sephadex G-200, ultracentrifugation in a sucrose gradient and indirect fluorescent antibody technique.

By the use of physical and immunochemical technique, as above, the antibody activity was found to associate with  $\gamma$ M in the early phase of infection, while with  $\gamma$ G mostly in the late phase of infection, and the apparent correlation between the antibody activity and the concentration of these immunoglobulin classes was recognized. However, the adsorption of hypergamaglobulinemic sera with *Toxoplasma* lysate resulted in disappearance in dye and hemagglutination tests but had no demonstrable effect on immunoglobulin level. This result suggested that the immunoglobulin concentrations measured by antibody-agar plate were not to be useful as a indicator of antibody activity.

Through the course of the studies, it was revealed that the indirect fluorescent antibody technique was an available method to detect the antibody activity.