

# Staphylococcus Protein A を用いてのトキソプラズマ IgM 抗体検出法について

亀井喜世子

帝京大学医学部寄生虫学教室

(昭和53年7月10日 受領)

## はじめに

先天性トキソプラズマ症児の血清学的診断, 妊婦についての妊娠中の初感染と妊娠前からの慢性不顕性感染との区別, 後天性トキソプラズマ症の診断にとつては, IgM 抗体の検出が特に重要な意義がある. 従来 IgM 抗体の検出法には, 抗ヒト IgM 標識抗体を用いての免疫蛍光法 (Remington *et al.*, 1968), ラジオイムノアッセイ (RIA) (Warren *et al.*, 1976), 酵素抗体法 (Voller *et al.*, 1976; Kenneth *et al.*, 1977) など, ゲル濾過 (Eichenwald and Shinefield, 1963), 薄層クロマトグラフィー (横田, 1968; Iida, 1976) などによつて血清から IgM 分画をとり, これについて一般の血清試験を行なう方法などが行なわれているが, これらの方法は一般の検査室でも容易に実施しうる日常的な方法とはいえない。

*Staphylococcus aureus* の細胞壁のペプチドグリカンに共有結合的に結合している Protein A は特異的にヒト免疫グロブリン G (IgG) のサブクラス 1, 2, 4 の Fc 部位 (Forsgren and Sjöquist, 1966; Krörvall and Frommel, 1970) やいくつかの動物の IgG 分子と反応 (Jensen, 1958; Grov *et al.*, 1964; Forsgren and Sjöquist, 1966) して沈澱を形成する特性をもち, 細胞表面の抗原の研究 (Ghetie *et al.*, 1974; Tokuda *et al.*, 1977) や *in vitro* での免疫学的, 血清学的反応の研究上注目され, 使用されている。

そこで我々は一般検査室でも日常的に実施しうる IgM 抗体検査法として被検血清を Protein A を多量にもつブドウ球菌菌体で吸収し, 吸収前後の血清について新しく市販された信頼性のおけるラテックス凝集試験

を行なうというシステムをとりあげ, その方法および有用性について検討することにした。

## 材料と方法

被検血清: 帝京大学にトキソプラズマ抗体検査を依頼され, 赤血球凝集試験陽性として保存されていた血清および他研究機関より分与を受けた患者血清および研究室内感染者の初期血清を用いた. 血清は 56C, 30分不活化のうえ -80C に保存した。

ブドウ球菌浮遊液: 東京大学医科学研究所生物製剤試験製造施設で次の方法によつて試作している *Staphylococcus aureus* 248βH 株菌体浮遊液を用いた. 毒素用培地 (毒素用ペプトン 100g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10g, 硫酸マグネシウム 1.5g, 肉水 5l, pH 7.0) を使い, L 字管で約 26 時間 248 βH 株を振とう培養し, 菌体を集め, 8,000rpm, 20分遠心後その沈澱を 0.05M PBS (pH 7.4) で遠心洗浄, 沈澱に 3%ホルマリン加 PBS を加え, 室温に 30分放置して殺菌固定した後 8,000rpm 20分遠心, その沈澱を PBS で 2回洗浄してホルマリンを除き, 沈澱に終濃度 50% (v/v) になるように 0.05M PBS (pH 7.4) を加え, 更に 0.2% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を防腐剤として加え stock suspension として 4C に保存した. 使用に際して PBS (pH 7.2) で一回洗浄後 10% (v/v) 浮遊液とし, これの遠心沈澱で血清を吸収した。

ラテックス凝集試験 (LA): LA は栄研化学から出ている Tp 抗原感作ラテックス懸濁液と血清希釈用緩衝液を用い坪田ら (1977) の方法に従い行なつた. トキソ-MT “栄研” 用トレイ (U字型ディスポーザブルプラスチックトレイ) を使い, 1) トレイの 1…9 穴に緩衝

液“榮研”をドロッパーを用いて0.025ml ずつ分注する。2) 被検血清をダイリューター (0.025ml) にとり、2倍段階希釈をつくる。3) ラテックス浮遊液“榮研”をよく振とうして均一な懸濁液としたのち、ドロッパーを用いて一滴 (0.025ml) ずつ滴下する。4) マイクロミキサーを用いてよく振とうし反応液をよく混合する。5) 室温に一夜放置したのち、凝集パターンを読み、抗体価は所定の凝集像を示す希釈倍数をもってあらわした。

色素試験：小林ら (1968) の方法によつた。

赤血球凝集試験：抗原の作成は医科研法 (常松, 1963), その他は Lewis and Kessel の原法 (Lewis and Kessel, 1961) に従つておこなつた。抗原感作には所定の陽性血清を用いての box titration の結果から、特異的に最高抗体価を与える抗原濃度を使用した。

血清グロブリンの定量：ヒト血清グロブリンの定量にはヘキスト社からでているアガロースゲルプレート (商品名, Tri-Partigen IgG, IgM および IgA) を使用した。濃度既知ヒトグロブリン血清の3段階希釈液および被検材料を正確に  $5 \mu\text{l}$  ずつ抗原孔に入れ、室温で48時間水平状態で静置、形成された沈降輪の直径を0.1 mmの単位まで測定した。既知濃度血清の沈降輪の大きさから検量線を作成し、被検血清の抗体蛋白濃度を求めた。

メルカプトエタノール処理：1 : 5 希釈血清0.2ml

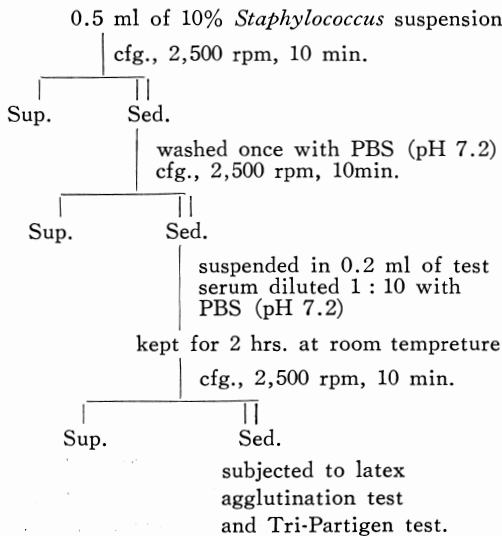


Fig. 1 Procedures for the absorption of IgG with protein A-rich *S. aureus*.

を1.0ml ブドウ球菌浮遊液の遠心沈渣で吸収し, Brubb and Swahn (1958) の方法に従い, これに0.2M 2-ME (PBS pH 7.2で希釈) を等量に加え37C, 120分作用させ, 透析チューブに入れ, PBS (pH 7.2) に対して48時間, 4C で透析しラテックス凝集試験で抗体価を測定した。無処置対照は2-ME のかわりに PBS (pH 7.2) を等量に加え同様に処理した血清である。

Sephadex G-200 カラマクロマトグラフィー：患者血清を Rowe and Fahey (1965) の方法に従いゲルろ過し PBS (pH 7.2) で溶出し夫々 IgM, IgG を主成分とする peak 1, peak 2 のフラクションを得た。Ficoll を利用して濃縮し, Tri-Partigen で各 Ig クラス濃度を測定し, 実験に供した。

## 結 果

(1) ブドウ球菌菌体を用いた IgG 吸収条件の検討：

Fig. 1 に示した方法に従い菌体表面に存在する Protein A に、血清中の IgG 分子を吸着させ形成された菌体と IgG の複合体を遠心分離により除去するという過程につき菌体量と吸収時間の関係を重点的に検討した。

1) 吸収に要する菌体量：血清 IgG の完全除去に必要な菌体量を知るために、10%菌体浮遊液0.6ml, 0.5 ml, 0.4ml, 0.3ml, 0.2ml, 0.1ml の遠心沈渣に10倍希釈 (PBS pH 7.2) 被検血清0.2ml を加え室温2時間反応後遠心、その上清につきラテックス凝集試験, Tri-Partigen テストを行ない、抗体価、蛋白量を夫々測定した。トキソプラズマに対する中等度抗体価および高抗体価を示した2血清についての成績を代表例として Table 1 に示した。患者 994 では10%菌体浮遊液0.2ml の遠心沈渣により抗体価は20倍以下となり全 IgG 量の大部分が除去され、高抗体価を示した 72,336 では10%菌体浮遊液0.3ml の沈渣により、抗体価、全 IgG 共除去された。従つて特異的 IgM 検出のための被検血清の吸収操作として10倍希釈血清0.2ml について、10%菌体浮遊液0.5ml 遠心沈渣を採用すれば実地の試験では十分であると考へられた。

2) 吸収に要する反応時間：被検血清と菌体浮遊液との接触時間が、血清 IgG の吸収除去におよぼす影響を知るために、10%菌体浮遊液0.5ml の遠心沈渣に10倍希釈 (PBS pH 7.2) 被検血清0.2ml を加え、室温で1分、10分、30分、1時間、2時間反応させ、その遠心上清につきラテックス凝集試験, Tri-Partigen テストをおこなつた結果を Table 2 に示した。表から明らかな様に吸

Table 1 Absorption of IgG from human sera with varied amounts of protein A-rich *S. aureus*

Absorption		Patient serum 994		Patient serum 72336	
		LA*	TP**	LA	TP
Absorbed with sediment of	unabsorbed	320	1.96 IgG mg/ml	10,240	2.36 IgG mg/ml
	0.1ml	40	0.92	10,240	1.42
	0.2ml	<20	0.16	160	0.58
	0.3ml	<20	undetected by Tri-Partigen test	<20	undetected by Tri-Partigen test
	0.4ml	<20			
	0.5ml	<20			
	0.6ml	<20			
	<20				

Increasing amounts of protein A-rich *S. aureus* were added to 0.2ml of human serum diluted 1 : 10 with PBS pH 7.2

LA\* : Latex agglutination test

TP\*\* : Tri-Partigen test

収は非常に短時間で終了するので、実地の試験においては20~30分の吸収時間で十分であると考えられるが、以下の実験では残存 IgG 抗体の影響を最小にとどめるために反応時間を2時間とした。

(2) 血清グロブリン IgG, IgM, IgA の吸収について：ブドウ球菌菌体量10%菌液0.5ml分と吸収時間2時間の条件において、全 IgG および IgG 抗体のほぼ全量が検出限度以下に吸収されることがわかったが、IgM と IgA に対する影響は不明である。そこでこれらに対する影響を調べるため、次の実験を行なった。

1) 全IgM, 全 IgA の吸収：10倍希釈血清中に含まれる全 IgM, 全 IgA の量は少量で、測定誤差が大きくなるので、正常人血清を Sephadex G-200でゲルろ過し、peak 1 (IgM と IgA が主) と peak 2 (IgG と IgA が主) を分け、各々 Ficoll を用いて濃縮した上で、その2段階階希釈液をつくり、ブドウ球菌で吸収し、吸収前後のフラクションについて Tri-Partigen IgG IgM, IgA を用いてそれぞれの蛋白量の変動を調べた結果が Table 3 である。IgM では 3.2mg/ml が 2.5mg/ml, 1.92mg/ml が 1.24mg/ml, 1.16mg/ml が 0.7mg/ml というように蛋白量の減少が見られたが、低濃度の場合でも50%以上の減少をみることがなかった。一方 IgG では蛋白量が 3 mg/ml 以上では未吸収 IgG が認められたが、2.16mg/ml 以下では Tri-Partigen IgG では検出不可能となりほぼ吸収除去されていることが再確認された。しかし Sephadex G-200ゲルろ過分画 peak 1, peak 2 に混入して含まれる IgA 分画については吸収前後に見るべき変動が認められなかった。

Table 2 Determination of incubation time

Incubation time	Patient serum 72336	
	Latex agglutination	Tri-Partigen
unabsorbed	10,240	1.4 IgG mg/ml
1 min.*	<20	undetected by Tri-Partigen test
10 min.	<20	
30 min.	<20	
1 hr.	<20	
2 hrs.	<20	

\* not including a time for centrifugation

2) 特異 IgM 抗体の吸収：特異 IgM 抗体を有する研究室内感染者 (I. Y) 血清を上記と同様に Sephadex G-200ゲルろ過による分画、Ficoll による濃縮を行ない、ラテックス凝集試験、および Tri-Partigen テストで吸収前後の抗体価および蛋白量の変化を調べた。その結果 Fig. 2 に示されるが如く、peak 1 は吸収前全 IgM は 2.09 mg/ml, 吸収後は 1.99mg/ml であり、抗体価は吸収前 32倍、吸収後16倍と判定されたが実質的にはほぼ同様であることから特異 IgM の吸収はわずかであることが示された。一方 peak 2 においては全 IgG はそれぞれ 2.37 mg/ml, 限度以下を示したが、抗体価は吸収により16倍であったものが2倍以下に低下し、特異抗体が IgG であることが示された。

(3) ブドウ球菌菌体による血清の吸収とラテックス凝集試験の組合わせによるトキソプラズマ IgM 抗体検査の実施への応用：

Table 3 Total IgM, IgG and IgA contents before and after absorption of serum fractions with protein A-rich *S. aureus*

Absorption	First peak*				Second peak*			
	IgM		IgA		IgG		IgA	
	mg/ml	uptake %	mg/ml	uptake %	mg/ml	uptake %	mg/ml	uptake %
-	3.2	21.9	0.2	0	3.07	74.0	0.52	0
+	2.5		0.2		0.8		0.52	
-	1.92	35.4	0.1	0	2.16		0.24	0
+	1.24		0.1		—		0.24	
-	1.16	39.7			1.22			
+	0.7				—			
-	0.8	47.5			0.59			
+	0.42				—			
-	0.5	36.0						
+	0.32							
-	0.3	46.7						
+	0.16							

\* First and second peak resulted from Sephadex G-200 column chromatography were concentrated with Ficoll.

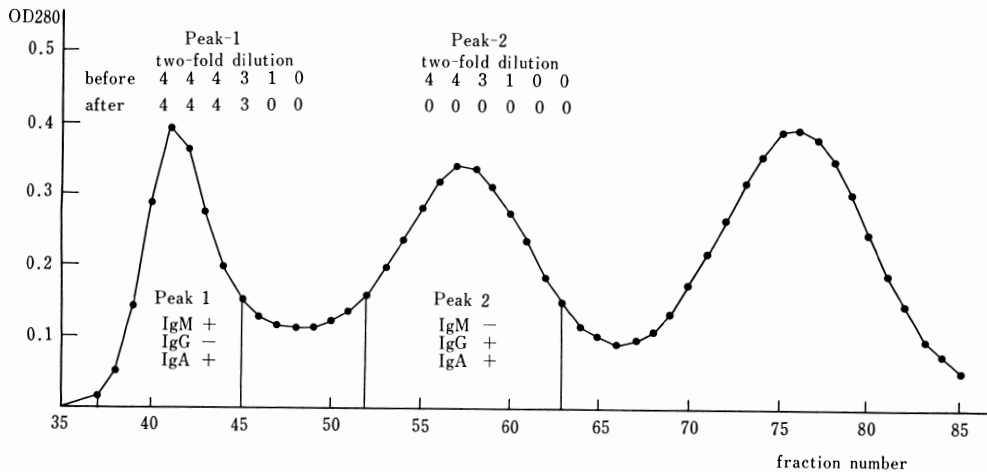


Fig. 2 Immunoglobulin contents of peak 1 and peak 2 fractions obtained by gel filtration of patient I. Y. serum on Sephadex G-200 column chromatography and latex agglutination patterns of peaks before and after absorption with protein A-rich *S. aureus*.

sample : I. Y. serum column : 4×60cm fraction : 3 ml  
elution solution : PBS pH.7.2 flow rate : 18 ml/hr.

1) 検査成績：被検血清は妊婦の血清を主とし、リンパ腺症などトキソプラズマ症の疑われる患者を副とし、赤血球凝集試験でいずれも陽性と判定されたもの183検体および、研究室内感染者4名の血清である。前者の183検体についてブドウ球菌菌体による吸収前後の抗体価と

ラテックス凝集試験を調べたところ、別記の2例のリンパ腺トキソプラズマ症と診断された2名、妊娠10ヶ月の妊婦1名以外の血清は、吸収前いずれもラテックス凝集試験陽性であったものが、吸収後は陰性に転化したものである。従ってこれらの検体には IgM 抗体は含ま

Table 4 Demonstration of IgM antibody by means of IgG absorption and latex agglutination

Patient	Diagnosis	Post-infection	Latex agglutination		
			Preabsorption	Postabsorption	2-ME treatment
H. I.	Lab. Infect. (primary)	8 d	40	40	20
		15 d	160	20	0
N. Y.	Lab. Infect. (secondary)	7 d	80	0	N. T.*
		23 d	>1,280	40	0
I. Y.	Lab. Infect. (primary)	4w	320	80	0
A. C.	Lab. Infect. (primary)	4w	640	80	N. T.
K. T.	Lymph: T.	recidiv.	>1,280	80	160
I. H.	Lymph. T.		1,280	80	0
			>1,280	80	0
O. K.	Pregnant	seroconversion	160	160	N. T.

\* N. T. : Not tested

れず、恐らく感染後少くとも2ヶ月以上を経過した人に由来する血清であろうと推定された。一方、リンパ腺トキソプラズマ症と診断された2名の患者および研究室感染初期、妊娠10ヶ月の妊婦1名の血清はIgGを吸収した後もTable 4に示されるが如く、抗体価の残存するのが認められた。K. T. は1.5年前発熱、倦怠、筋肉痛、リンパ腺腫脹をもって発病し、1~2ヶ月後抗体価の著しい上昇が確認されてトキソプラズマ症と診断された患者であり、発病1年後の血清は吸収により残存抗体を認めなかったが、最近症状が再燃した例である。I. H. は東京女子医大内科片平、小児科横田先生により診断された患者で、寄生虫学教室山浦先生を通して血清の分与を受けた。研究室内感染者はいずれもトキソプラズマの実験、作業に従事しており、本人の好意により感染初期血清の恵贈をうけた。H. I. は感染前抗体価陰性、感染の機会のあつた当日よりピリメサミンとサルファモノメトキシンの併用療法を行ない、無症状に経過した。N. Y. は以前から抗体陽性であつたが明瞭な感染の機会があつたので、上記と同様の処置をうけ、無症状に経過した。I. Y. は発熱、リンパ腺腫脹、倦怠があり、入院後抗体が陽転しているのがわかり、研究室内感染が想定された例である。A. C. はI. Y. の同僚で、同室で作業していたため血清検査をおこなつた結果陽転しているのが知られた例でI. Y. 症例は東京都立駒込病院内科の志村先生により、詳細は報告される予定である。

2) 残存抗体に対する2-メルカプトエタノール (2-

ME) 処理の影響：残存抗体がIgM抗体によるものかどうか確認するため、ブドウ球菌菌体で血清を吸収後、2-ME処理し、透析して2-MEを除き、2-ME処理前後の抗体価を調べた。被検血清は貴重で少量であつたため5名の血清についてのみ実施できたが、リンパ腺トキソプラズマ症K. T. と研究室内感染者H. I. の2検体を除いた3例についていずれも2-ME処理による抗体活性の低下が認められ、残存抗体活性はIgM抗体であることが裏書きされた。なお2検体において2-ME処理後も残存抗体活性があつた原因については血清量の制約のため、追求することが出来なかつた。

## 考 察

本研究は一般検査室で容易に実施しうるIgM抗体検査法として、被検血清をProtein A保有ブドウ球菌菌体で吸収してIgG抗体を除き、残存するIgM抗体をラテックス凝集試験で証明するシステムをとりあげ、その方法に関する重要な条件および実地での有用性を検討することを目的としたものである。ブドウ球菌を利用したIgM抗体証明法はすでに風疹(Ankerst *et al.*, 1974; Mallinson *et al.*, 1976; 吉川ら, 1976)、赤痢患者(宮田, 1977)についての報告が見られるがトキソプラズマ症についてはまだ報告されていない。IgG吸収の方法にはブドウ球菌菌体そのものを用いる方法(Ankerst *et al.*, 1974; Mallinson *et al.*, 1976; 吉川ら, 1977)精製されたProtein Aを用いる方法(Sjöquist *et al.*, 1972)および

宮田 (1977) によつて報告された Protein A Sepharose CL-4B (Pharmacia 社) を使つた microcolumn 法とがある。宮田はこれら三者を比較して microcolumn 法を推奨しているが、我々の経験によれば、溶出フラクションにおける IgG の混入が比較的多く費用もかさむなど、今回採用した 248  $\beta$ H 株菌体吸収よりおとる点があつた。吸収には一般に Cowan 1 株が用いられる。248  $\beta$ H 株は Masuda *et al.* (1975) により患者材料から分離された Protein A-rich 株である。

血清試験として新しく市販された定量用キット (栄研化学) ラテックス凝集試験をとりあげた理由は、この試験が従来一般の検査室で用いられていた 3 社のキット製品による赤血球凝集試験にくらべ、特異性、再現性において格段に優れていることが経験されたからである。この試験はすでに小林ら (1977) によつても色素試験や Jacobs and Lunde (1957) 法による赤血球凝集試験 (HA) との優れた定性的一致が認められており、陽性限界設定と、凝集像判定の容易さと相まつて検査室向きの試験としてその将来性に期待がもたれている。

吸収条件についてはまずブドウ球菌菌体量の決定を行なつた。その結果は実験 (1)-(1) (Table 1) に示されるが如く、IgM 抗体を含まない高抗体価血清 (ラテックス凝集試験 10,240 倍) においても一定量以上の菌体で吸収すれば、特異 IgG 抗体が検出限度 (20 倍) 以下まで吸収されることがわかつた。Protein A は平均 IgG の 5% 程度ふくまれている IgG 3 を吸収しないとされているが、他の 179 例の赤血球凝集試験陽性血清についても残存特異抗体の存在が認められなかつたことは、実際問題として残存抗体が認められる時、IgG 3 の存在をさほど気にかける必要のないことを示唆するであろう。

健康者および研究室内感染者の血清の Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーの peak 1 の濃縮液について調べた結果によると菌体による全 IgM の 21.9% から 47.5% (平均 37.9%) の範囲で吸収が認められ、特異 IgM も若干吸収されることが推測された。IgM の吸収については Ankerst *et al.* (1974) は 2.5%, Mallinson *et al.* (1976) は 29% の数値をあげており著者の数値はこれより大きい。吸収の程度が血清の IgM サブクラスの差によるものか、吸収に用いた菌体のレセプターの差によるものかは不明であるが、吸収 IgM の量をへらすことに関連して今後検討すべき問題のひとつである。全 IgA は上記の血清の 2 フラクションについては菌体によつて認めうべき吸収を示さなかつた。

検査法の実施における有用性の検討は、感染初期血清の入手難のため、限られた範囲にとどまっている。研究室内感染で、初感染 3 名および再感染 1 名の感染初期の血清では、時期を追つて採取した血清についてくわしく追跡しえなかつたのは残念であるが、いずれの血清についても予期の如く、吸収後に残存抗体があることが認められた。リンパ腺症の感染初期の 1 例および再発の 1 例の血清についても吸収残存抗体が認められている。後者については再発 6 ヶ月前の血清は残存抗体がなかつた。残存抗体の免疫グロブリンクラスの決定については今回は被検血清量僅少のため 2-ME 処理による IgM 不活化試験のみ行なわれた。検査可能な 7 検体のうち、2-ME 感受性を示した残存抗体は 5 検体であり、これらが IgM 抗体であることはほぼ確実であろうと推定された。再発リンパ腺症で 2-ME 耐性を示した高抗体価血清の残存抗体が何であるかの決定は血清量不足のため今回は行なうことが出来なかつた。以上の如くブドウ球菌菌体による IgG 吸収は極めて簡単な操作で能率よく行われること、ラテックス凝集試験は簡便で優秀な試験であること、少数ではあるが、感染初期血清について IgM 抗体の検出が確かに可能であることが経験されたことなどから、著者の検査法はトキソプラズマ IgM 抗体検出法として優れた実用性をもつものと評価された。

## まとめ

トキソプラズマ IgM 抗体の検出のため、Protein A 保有ブドウ球菌菌体で被検血清を吸収した後、ラテックス凝集試験で残存抗体を定量する方法を開発した。実験の結果、(1) 吸収条件としては 10% 菌体浮遊液 0.5ml の遠心沈渣で 10 倍希釈血清 0.2ml を 30 分程度吸収すれば全 IgG、IgG 抗体がほぼ完全に除去される。(2) 全 IgM も 40% 前後吸収されるが IgM 抗体価への影響は少なく、全 IgA はほとんど吸収されない。(3) 赤血球凝集試験陽性血清 180 検体では残存抗体が証明されず陳旧感染者であると判定された。これとは別にリンパ腺トキソプラズマ症の 2 名、研究室内感染者の 4 名、妊娠 10 ヶ月の妊婦 1 名計 7 名の血清では残存抗体活性が認められ、その内、5 名の血清の残存抗体は 2-メルカプトエタノール処理により消失するところから、IgM 抗体によることが確認された。以上の結果から今回開発した方法は手技の簡易、迅速、結果の正確なことにより、一般検査室でも容易に実施しうる有用な方法であろうと推定された。

## 謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲をいただいた常松之典教授ならびに実験の面で種々御援助いただいた教務員佐藤律子さんに感謝いたします。なお菌体浮遊液を供与された東大医科研生物製剤試験製造施設齊藤勝氏に御礼申し上げます。本研究経費は昭和52年度厚生省心身障害研究国庫補助金によるところが大きい。

## 文 献

- 1) Ankerst, J., Christensen, P., Killen, L. and Kronvall, G. (1974) : A routine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to rubella virus: Absorption of IgG with *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 130, 268-273.
- 2) Brubb, R. and Swahn, B. (1958) : Destruction of some agglutinins but not of others by two sulfhydryl compounds. Acta. Path. Microbiol. Scand., 43, 305-309.
- 3) Eichenwald, H. F. and Schinefeld, H. R. (1963) : Antibody production by the human fetus. J. Pediat., 63, 870.
- 4) Forsgren, A. and Ljöquist, J. (1966) : "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudoimmune reaction with human  $\gamma$ -globulin. J. Immunol., 97, 822-827.
- 5) Ghetie, V., Fabricius, H. A. and Nilsson, K. (1974) : Movement of IgG, receptors on the lymphocyte surface induced by protein A of *Staphylococcus aureus*. Immunology, 26, 1081-1091.
- 6) Grov, A., Myklestad, B. and Oeding, P. (1964) : Immunochemical studies on antigen preparation from *Staphylococcus aureus*. I. Isolation and chemical characterization of antigen A. Acta. Path. Microbiol. Scand., 61, 588-596.
- 7) Iida, K. (1976) : Studies of toxoplasma antibody IgG and 19S IgM by the method of Sephadex plate gel filtration. Acta. Obst. Gynec. Jap., 23, 185-194.
- 8) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit. 43, 308-314.
- 9) Jensen, K. (1958) : A normally occurring *Staphylococcus* antibody in human serum. Acta. Path. Microbiol. Scand., 44, 421-428.
- 10) Kenneth, W. W., Bullock, S. L. and Donna, K. E. (1977) : Use of the enzyme-linked immuno-adsorbant assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol., 5 (3), 273-277.
- 11) 小林昭夫・熊田三由・常松之典(1968) : トキソプラズマ色素試験の基準化に関する研究, (2) Accessory factor としての血漿の使用について. 寄生虫誌, 17, 81-85.
- 12) 小林昭夫・平井徳幸・鈴木康弘・西川洋治・渡辺直熙(1977) : トキソプラズマラテックス凝集反応(トキソテスト-MT)の検討. 寄生虫誌, 26, 175-180.
- 13) Kronvall, G. and Frommel, D. (1970) : Definition of staphylococcal protein-A reactivity for human immunoglobulin G fragments. Immunochemistry, 7, 124-127.
- 14) Lewis, W. P. and Kessel, J. F. (1961) : Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis. Arch. Ophth., 66, 471-476.
- 15) Mallinson, H., Roberts, C. and Bruce, W. B. G. (1976) : Staphylococcal protein A; its preparation and an application to rubella serology. J. Clin. Path., 29, 999-1002.
- 16) Masuda, S., Sakurai, S. and Kondo, I. (1975) : Simple and effective method for selecting protein A-deficient mutants by cosedimentation with sensitized sheep erythrocytes. Infect. Immunol., 12, 245-251.
- 17) 宮田義人(1977) : 赤痢患者および保菌者の血中抗体について, 第IV報, Protein-A Sepharose CL-4B を用いた IgG 抗体吸収法による解析. 感染症学雑誌, 51, 540-548.
- 18) Remington, T. S., Miller, M. J. and Brownlee, I. (1968) : IgM antibodies in acute toxoplasmosis: I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatrics, 41, 1082-1092.
- 19) Rowe, D. S. and Fahey, J. (1965) : A new class of human immunoglobulin. II. Normal serum IgD. J. Exp. Med., 121, 185-199.
- 20) Sjöquist, J., Meloum, B. and Hjelm, H. (1972) : Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. Eur. J. Biochem., 29, 572-578.
- 21) Tokuda, S., Arrington, T. and Goldberg, E. H. (1977) : Simpler technique for serological detection of H-Y antigen on mouse lymphocytes. Nature, 261, 433-434.
- 22) 坪田宣之・小沢 光(1977) : トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究(第1報) マイクロタイター用試薬の調整条件と安定性. 寄生虫誌, 26, 276-285.
- 23) 常松之典(1963) : トキソプラズマ症の診断について. モダンメディア, 9, 443-449.
- 24) Voller, A., Bidwell, D. E., Batlett, A., Fleck,

- D. G., Perkins, M. and Oladehin, B. (1976) : A microplate enzyme immunoassay for toxoplasma antibody. *J. Clin. Pathol.*, 29, 150-153.
- 25) Warren, D., Gehle, K., Smith, O. and Fuccilo, D. A. (1976) : Radioimmunoassay for toxoplasmosis. *Infect. and Immunol.*, 14, 1253-1255.
- 26) 横田和子 (1972) : トキソプラズマ IgG抗体, 19S IgM, 7 S IgM の分離とトキソプラズマ症診断への応用. *東女医大誌*, 42, 112-120.
- 27) 吉川ひろみ・大友信也・野中実男・植田浩司 (1976) : 風疹ウイルス感染症における抗体 IgM の消長. *ウイルス*, 26, 133.



**Abstract**

A SIMPLE DIAGNOSTIC TEST FOR IgM ANTIBODIES TO *TOXOPLASMA* :  
MICRO-LATEX AGGLUTINATION TEST ON SERA PREABSORBED  
WITH PROTEIN A-RICH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

KISEKO KAMEI

(Department of Parasitology, Teikyo University School of Medicine  
Kaga 2-chome, Itabashi-ku, Tokyo, Japan)

In cases of such as toxoplasmosis, where inapparent infections are predominant, the detection of specific IgM antibodies is often desirable to differentiate a recent infection from a long-standing one. In order to establish a routine diagnostic test for toxoplasma IgM antibodies, the author investigated the procedures which demonstrate, by micro-latex agglutination test (LA) (Eiken, Tokyo), the residual antibody activities in sera preabsorbed with protein A-rich *S. aureus* and evaluated the usefulness of this technique with the following results. (1) The absorption of 0.2ml of 1:10 dilution of many test sera (including high LA titer serum from a convalescent lymphadenopathy patient) with 0.05 ml of *S. aureus* (sediments of 0.5 ml of 10% *S. aureus* suspension) for ten minutes or more, removed total IgG and specific IgG antibodies to the level undetectable by Tri-Partigen plate test and by LA test (initial dilution 1:20), respectively. (2) So far as the tests on concentrated peak 1 (chiefly IgM and IgA) and peak 2 (chiefly IgG and IgA) obtained by gel filtration of a healthy serum on Sephadex G-200 column chromatography concerned, ca 40% of total IgM but no appreciable amounts of total IgA were shown to be absorbed under the absorption conditions mentioned above, while total IgG decreased to an undetectable level. Absorption of specific IgM antibodies with *S. aureus* was also shown to be practically negligible by the similar experiment on fractions from a patient serum in acute phase. (3) One hundred eighty sera, including those of high LA titers, revealed no residual antibody activities after absorption with *S. aureus*. They are supposed to be derived from persons with long-standing infection. On the other hand, sera from 4 laboratory infection cases, from 2 toxoplasmic lymphadenopathy cases and from a pregnant woman showed more or less residual activities after the absorption. In 5 out of 7 sera tested the residual activity were shown to be 2-ME sensitive, indicating the presence of specific IgM antibodies. Immunoglobulin classes responsible for the 2-ME resistant residual activities of two sera could not be determined because of the shortage of available amount of sera concerned. (4) Micro-latex agglutination test gave specific, sensitive and reproducible results. The patterns of agglutination are more clearcut and easily readable than those of micro HA test carried out with the use of any commercial kit. (Data were not shown). (5) The simplicity and reliability of the procedures for the demonstration, by LA test, of residual antibody activities in sera preabsorbed with protein A-rich *S. aureus* led us to suppose that this technique would be most suitable as a routine screening test for IgM antibodies in ordinary laboratories.