

## トキソプラズマ酵素標識抗体法 (Toxo-EIA) の検討

小早川隆敏\* 保阪幸男\* 川端真人\*  
熊田三由\* 林滋生\* 片倉賢†  
鈴木康弘† 小林昭夫†

(昭和56年8月24日 受領)

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, ELISA, Toxo-EIA, Dye test, Hemagglutination test

近年トキソプラズマ症 (Tp 症) に対する免疫血清学的診断法の1つとして、酵素標識抗体法 (ELISA) が応用されるようになり、その有用性が論議されている (Voller *et al.*, 1976; Knapen and Panggabean, 1977; Walls *et al.*, 1977; Camargo *et al.*, 1978; Mineo *et al.*, 1980).

今回著者らは、新しく導入された ELISA Kit を用い、Tp 症に対する抗体価を測定し、色素試験 (Dye test, DT) および間接赤血球凝集反応 (Hemagglutination test, HA) による結果との比較検討を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 被検血清

被検血清としては、慈恵医大一般外来患者血清を用いた。同血清のうち、ELISA と DT との比較には46例を、また ELISA と HA との比較には100例を使用した。

この外、東京都内一般人血清38例についても、本 kit による ELISA を実施した。

#### 2. ELISA の術式

ELISA は、米国 Microbiological Associates により開発された *Toxoplasma gondii* EIA Kit (商品名 Toxoelisa) で、旭メディカル株式会社より提供されたものを用い、以下の術式にしたがって行った。すなわち、稀釈液 0.25ml を、Tp 抗原とコントロール抗原を交互に吸着させてあるキュベットストリップのウエルに分注し、これに被検血清 0.05ml ずつを Tp 抗原ウエルとコントロール抗原ウエルとに加える。また、同様に本 kit

付属の陽性コントロール (高力価, 低力価) と陰性コントロールの三種血清を別々にウエルに添加し、22~23C で2時間静置する。ついでリン酸緩衝液 (PBS-Tween) でウエルを洗浄したのち、酵素標識抗体 (抗ヒト IgG 結合アルカリフォスファターゼ) 液 0.25ml を各ウエルに分注し、22~23C に2時間静置する。再び PBS-Tween で洗浄し、酵素基質 (P-ニトロフェニルリン酸) 液 0.25ml ずつを各ウエルに分注する。上記温度に約45分間静置したのち、各ウエルに 3 N · NaOH 液 0.05ml を加えて反応を停止させ、波長 405nm における吸光度を分光光度計で測定する。

被検血清の ELISA 値は、Tp 抗原ウエルとコントロール抗原ウエルとの吸光度差により求める。ただし、その場合、上記三種コントロール血清による ELISA 値が、定められた許容範囲内になければならない。

陽性および陰性の判定は、本 kit の用法に定められている ELISA 値 0.21 以上を陽性、0.19~0.20 を疑陽性とし、0.18 以下を陰性とするという基準を適用した。

#### 3. 色素試験 (DT) および間接赤血球凝集反応 (HA)

DT は、Frenkel and Jacobs (1958) の変法 (小林ら, 1968; Kobayashi *et al.*, 1968) により行った。また HA は、Jacobs and Lunde (1957) の変法 (Kobayashi *et al.*, 1971) により行った。

DT あるいは HA と ELISA の比較は、二重盲検法に準拠して行った。すなわち、まず慈恵医大寄生虫学教室において DT および HA を実施し、ついで同一血清につき国立予防衛生研究所の研究室で ELISA を実施した。

### 結 果

#### 1. ELISA 値の頻度分布について

\* 国立予防衛生研究所寄生虫部

† 東京慈恵会医科大学寄生虫学教室

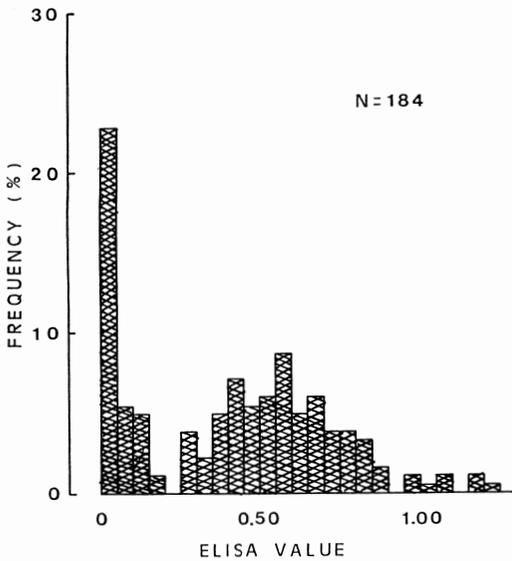


Fig. 1 Frequency distribution of ELISA values in 184 sera.

現在までに本 Toxoelisa kit により試験された 184 例の血清について、その ELISA 値の発現頻度分布をみると Fig. 1 のようになる。図にみられるように、ELISA 値の分布は、明らかに二峰性を示し、両峰間の谷は0.20を中心として、0.16~0.25の位置にあると推定される。無作為に抽出されたヒト集団の血清では、DT, HA およびラテックス凝集反応の抗体価分布が、やはり二峰性を示す(小林ら, 1977)ものであるが、本 kit による ELISA 値も同様に、陰性グループ陽性グループの二峰にわかれるものと考え、本 kit で定めている前記陽性判定基準はほぼ妥当なものと思われる。

2. ELISA と DT との比較

ELISA と DT との結果を比較すると、Table 1 にみられるように、定性的には46例中44例に完全な一致がみられ、不一致とされた2例は、いずれも DT 陽性、ELISA 疑陽性という結果であった。かりに、疑陽性以上をすべて陽性とみなせば、定性的一致率は100%となる。

Table 1 Qualitative agreement between DT and ELISA with 46 sera

Agreement				Disagreement						Grand Total (%)
DT + ELISA (%)	DT - ELISA (%)	Total (%)	DT + ELISA (%)	DT ± ELISA (%)	DT + ELISA (%)	DT - ELISA (%)	Total (%)			
29 (63.0)	15 (32.6)	44 (95.6)	2* (4.4)	0 (0)	0 (0)	2 (4.4)	46 (100)			

\* Their DT titers and ELISA values were 1 : 16 and 0.19, respectively.

Table 2 Anti-toxoplasma DT titers and ELISA values in 46 sera

Reciprocal of DT titers	ELISA values							Total	(% Posi. by ELISA)
	≤0.20	0.21 - 0.30	0.31 - 0.40	0.41 - 0.50	0.51 - 0.60	0.61 - 0.70	≥0.71		
≤4	15							15	(0)
4								0	(0)
16	2*	5	3	1	1			12	(83.3)
64			4	3	1	1		9	(100)
256					3	2	1	6	(100)
1024				1	2			3	(100)
4096					1			1	(100)
Total	17	5	7	5	8	3	1	46	(63.0)
(% Posi. by DT)	(11.8)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(67.4)	

\* Their ELISA values were 0.19.

Table 3 Qualitative agreement between HA and ELISA with 100 sera

Agreement			Disagreement				Grand Total (%)
HA + ELISA (%)	HA - ELISA (%)	Total (%)	HA + ELISA (%)	HA ± ELISA (%)	HA - ELISA (%)	Total (%)	
46 (46.0)	46 (46.0)	92 (92.0)	0 ( 0 )	8 ( 8.0)	0 ( 0 )	8 ( 8.0)	100 ( 100)

Table 4 Anti-toxoplasma HA titers and ELISA values in 100 sera

Reciprocal of HA titers	ELISA values									Total	(% Posi. by ELISA)
	≤0.14	0.15 -0.24	0.25 -0.34	0.35 -0.44	0.45 -0.54	0.55 -0.64	0.65 -0.74	0.75 -0.84	≥0.85		
≤16	46									46	( 0 )
64			1	3	3			1		8	( 100)
256			1	4	7	4	3	4	1	24	( 100)
1024			1	1	1	4	4	2		13	( 100)
4096					1		2	2	2	7	( 100)
≥16000								1	1	2	( 100)
Total	46		3	8	12	8	10	9	4	100	(54.0)
(% Posi. by HA)	(0)		(66.7)	(62.5)	(75.0)	( 100)	(90.0)	( 100)	( 100)	(46.0)	

また、ELISA 値と DT による抗体価との間には、推計学的に明らかに有意の相関 ( $P < 0.02$ ) がみられた (Table 2)。

### 3. ELISA と HA との比較

ELISA と HA との結果を、陽性、陰性について比較してみると、Table 3 のようになる。両方法による結果が定性的に完全に一致したものは、100 例中92例であった。しかし、一致をみなかつた8例についても、それらはいずれも HA 疑陽性 (1:64) という例であり、したがって疑陽性を陽性の範疇に含めるとすれば、両反応の結果は100%一致したことになる。

ELISA 値と HA による抗体価を比較すると、Table 4 のようになる。両方法で得た各値を推計学的にみると、その両者間には、明らかに有意の相関関係が認められた ( $P < 0.001$ )。

以上のように、ELISA と DT あるいは HA の反応結果との間には、定性的にも定量的にも、極めて高い一致がみとめられた。

## 論 議

従来より TP 症の免疫学的診断法としては、DT が

その感度、特異性、結果の再現性などに優れることから、承認された国際基準が存することと相俟つて、各国で reference test として用いられてきた。しかし、これを実施する上の問題として、生きた *T. gondii* 虫体を必要とすること、accessory factor として適する特定のヒト血清を要すること、および IgG、IgM などのクラス別抗体を識別出来ないことなどの難点を有している。

これについて、広く用いられている方法に、手技も比較的簡単で、短時間に結果を得ることの出来る HA がある。この方法も DT と同様、クラス別の抗体識別が出来ないこと、特異性に幾分欠けること、また正常血清中にも存する Paul Bunnel 異種凝集素を除くための吸収操作を要することなどの難点がある。

その他、蛍光抗体法、補体結合反応、ラテックス凝集反応なども行われているが、それぞれ、多量の検体を扱うためには、多くの労力と時間を要することなどが指摘されている (Denmark and Chessum, 1978)。

近年、ELISA がその高い感度、施行場所を選ばぬこと、危険がないこと、比較的安価であること、クラス別抗体識別が可能であるなどの理由から、従来寄生虫症を

含む感染症における抗体価測定のみでなく、自己抗体検出にまで、その感度の点などから最も信頼しうる方法とされていた Radio immunoassay に代わり行われるようになってきた。今回、我々の得た ELISA による Tp に対する抗体価測定の結果は、それらの特性を充分反映し、従来の DT および HA による結果と、定性的にも定量的にも極めてよく相関したといえる。

我が国で、トキソプラズマ抗体の検出に ELISA を用い、IHA と比較した例に石郷岡ら (1979) の報告があり、ELISA 値と IHA 抗体価の間には相関があるとされている。しかし、同氏らの得られた吸光値は、IHA 抗体価 1 : 8,192 という高い群においても、いずれも 0.30 以下という低い値になっている。統計的には、IHA 抗体価と ELISA 吸光値との間に相関がみられるとしても、そこで得られる吸光値の変動幅が非常に低い点に問題なしとはいえない。ELISA における方法術式それ自体の基準化、陽性判定基準などに考慮の余地を残していると考えられる。

前述のように、著者らの本報告における例では、HA 抗体価 1 : 4,096 群における ELISA 値は 0.5~0.9 に達する高い値を示している。また、本試験中に HA および DT において高い抗体価を示す被検血清について、その各種段階血清希釈における ELISA を試み、いずれの例も 1 : 1,600 あるいは 1 : 3,200 以上に達する抗体価を示すことが確認された。

以上のことにより、本 Toxoelisa kit を用いて行う ELISA は、感度が高く、再現性もあり、*T. gondii* 感染に対する抗体価測定に充分利用しうるものであると考えてよい。

### 要 約

トキソプラズマ症の血清診断用として、米国 Microbiological Associates によつて新しく開発された、酵素標識抗体法 kit について、これを HA および DT との比較により検討を行った。

その結果は、ELISA と DT の間では、被検血清 46 例中 44 例に定性的に完全な一致をみ、残る 2 例も DT 陽性で ELISA 値は疑陽性の範囲にあつた。ELISA と HA の間では、100 例中 92 例に完全な定性的一致がみられ、残る 8 例は、ELISA 陽性で HA は疑陽性の範囲にあつた。

また、ELISA 値と DT または HA 抗体価との間には、推計学的に有意の相関がみられた。

以上より、ELISA (Toxo-EIA) は、Tp 症患者のスクリーニングおよび診断の目的に、充分応用し得るものと考えられる。

稿を終るにあたり、本研究で使用した Toxoelisa kit を提供していただいた旭メディカル株式会社に感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Camargo, M. E., Ferreira, A. W., Mineo, J. R., Takiguti, C. K. and Nakahara, O. S. (1978) : Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent-assay and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infection and Immunity*, 21, 55-58.
- 2) Denmark, J. R. and Chessum, B. S. (1978) : Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the detection of *Toxoplasma* antibody. *Medical Laboratory Science*, 35, 227-232.
- 3) Frenkel, J. K. and Jacobs, L. (1958) : Ocular toxoplasmosis-pathogenesis, diagnosis and treatment. *A. M. A. Arch. Ophthalm.*, 59, 260-279.
- 4) 石郷岡清基・金田英子 (1979) : 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.
- 5) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A haemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 43, 308-314.
- 6) Knapen, von F. and Panggabean, S. O. (1977) : Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clinical Microbiol.*, 6, 545-547.
- 7) 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.
- 8) Kobayashi, A., Kumada, M. and Tsunematsu, Y. (1968) : Effects of anticoagulants on the dye test for Toxoplasmosis. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 21, 71-89.
- 9) Kobayashi, A., Kumada, M., Tsunematsu, Y., Kamei, K., Nobuto, K. and Hanaki, T. (1971) : Comparison of the dye test and haemagglutination tests by three different techniques in the serologic diagnosis of Toxoplasmosis. Results on sera from humans, dogs and cats. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 24, 115-124.
- 10) 小林昭夫・平井徳幸・鈴木康弘・西川洋昭・渡

- 辺直熙(1977) : トキソプラズマラテックス凝集反応 (トキシテスト-MT) の検討. 寄生虫誌, 26, 175-180.
- 11) Mineo, J. R., Camargo, M. E. and Ferreira, A. W. (1980) : Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human Toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 27, 283-287.
- 12) Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., Fleck, D. G. and Perkins, M. (1976) : A microplate enzyme-immunoassay for Toxoplasma antibody. *J. Clin. Path.*, 29, 150-153.
- 13) Walls, K. W., Bullock, S. L. and English, D. K. (1977) : Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J. Clinical Microbiol.*, 5, 273-277.

**Abstract**

EVALUATION OF THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY  
(Toxo-EIA) FOR THE DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS

TAKATOSHI KOBAYAKAWA, YUKIO HOSAKA, MASATO KAWABATA,  
MITSUYOSHI KUMADA, SHIGEO HAYASHI,

*(Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo 141)*

KEN KATAKURA, YASUHIRO SUZUKI AND AKIO KOBAYASHI

*(Department of Parasitology, Jikei University School of Medicine, Tokyo 105, Japan)*

A commercial ELISA-kit (Toxoelisa) newly developed for the diagnosis of toxoplasmosis was evaluated by comparing with dye test (DT) and indirect hemagglutination test (HA).

ELISA values were determined on 46 and 100 serum samples of which DT and HA titers had respectively been previously determined. A qualitative agreement rate of 95.6% (44/46) was observed between DT and ELISA, in the remaining 2 samples DT showed positive but ELISA values were in equivocal range. An agreement rate of 92.0% (92/100) was observed between ELISA and HA, and 8 samples of disagreement showed ELISA positive but HA equivocal.

Highly significant correlations were found in the titers between ELISA and DT ( $P < 0.02$ ), or HA ( $P < 0.001$ ).

The results obtained suggest that ELISA can be used as an additional serological tool for the diagnosis of toxoplasmosis.