

ラジオイムノアッセイによるトキソプラズマ 血中抗原の検出

亀井喜世子 吉池彰洋

(昭和56年9月28日 受領)

Key words: *Toxoplasma gondii*, circulating antigen, radioimmunoassay

はじめに

抗体検出による診断では、抗体が血中あるいは組織液中に現われる感染約2週後からでないといふ検出不能であるため、早期発見あるいは感染時期の推定に難点があつた。またトキソプラズマ感染をすでにうけている母体から産出された新生児におけるトキソプラズマの垂直感染の有無をいち早くかつ明白に把握する上で、従来の抗体検出法は、決定的な検査法とはいいがたい。しかし新生児から特異トキソプラズマ抗原を検出することが可能であれば、ただちに垂直感染の成立を断定することができ、従来行われてきたトキソプラズマ血清反応にみられなかつた大きな進歩が期待できる。このことは血清反応がたまたま陽性をしめした妊婦に対し、慢性あるいは安全な感染であるか、活動性の感染であるかを知り、適切な指針を与える上においてもあてはまるであろう。

そこでわれわれは近年開発され微量物質の検出にその威力を発揮しているRIAを用いて、実験的に感染させた動物の血中抗原の検出を中心に検討し、併せて感染初期と思われるヒトの血清からの抗原検出をもこころみたと報告する。

材料と方法

ウサギ抗トキソプラズマ膜抗原

トキソプラズマに感染していないウサギ(ニュージーランド系, ♀, 体重20kg)を免疫動物として使用した。トキソプラズマ RH 株感染3日目のマウス腹水を生理

食塩水で洗浄採取し、ステンレス網(200メッシュ)で濾過後、生理食塩水で3回洗浄、2,500回転10分遠心したのち上清を取り除き沈渣を求め、その10倍量の蒸留水を加えて虫体を破壊した。えられた材料を一晚4℃に放置後、1.7%食塩水を蒸留水と等量加え15,000回転30分遠心して沈渣をえた。この沈渣を蒸留水で3回洗浄、最後に少量の蒸留水に浮遊させた。沈渣0.1mlの蒸留水浮遊液をウサギ一羽あたりの免疫材料とした。免疫は膜浮遊液を Freund complete adjuvant (FCA) と共にウサギ背部の皮内に注射後、2週間おいて初回免疫と同量の抗原を FCA とともに追加免疫した。更に10日おいて FCA を加えない抗原により追加免疫をこころみた。最後の免疫から10日後に採血しその血清をウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清として使用した。なおこの抗血清は間接ラテックス凝集反応による抗体価が2,048倍であつた。

免疫グロブリンの精製

ウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清を飽和硫酸で分画し、PBS (pH 7.2) で一晚透析後、Sephadex G-200カラムクロマトグラフィーを行った。その第2ピークを集め、凍結乾燥法で濃縮した精製免疫グロブリンを以後の¹²⁵I-標識抗膜抗原グロブリンとして用いた。

¹²⁵I-標識ウサギ抗トキソプラズマ膜抗原グロブリン

えられたグロブリンはダイナボット RI 研究所において¹²⁵Iの標識を行った。

トキソプラズマ RH 株感染マウス血清

マウス (ddY, 4週, ♀) にトキソプラズマ RH 株 5×10^7 個を腹腔内接種し、接種後1, 2, 3, 4日に心臓から採血、その血清を使用した。マウスは接種後4日目に全例死亡した。血清は使用まで-20℃に保存した。

本研究費は昭和55年度厚生省心身障害研究国庫補助金の補助をえた。

帝京大学医学部寄生虫学教室

トキソプラズマ Beverley 株感染マウス, スナネズミ血清

マウス (ddY, 4 週令, ♀), スナネズミ (当教室産, ♀♂, 体重, 週令不同) に Beverley 株感染マウスの脳を乳剤とし, マウス, スナネズミとも 1 匹あたり約 500 個のシストを腹腔内に接種した. 接種後 1 日目から 5 匹を 1 群として心臓より採血しその血清を検査材料として用いた. 血清は使用まで -20°C に保存した.

感染初期を思わせる患者血清と慢性感染患者血清

感染初期を思わせる患者血清はそのほとんどが実験室内感染者より得られた材料である. 患者の中の 1 名は自然感染をうけたのちたまたま実験室内感染に遭遇した例である. さらに急性リンパ節型トキソプラズマ症例, 慢性経過をたどったリンパ節型トキソプラズマ症例, 不顕性感染者からの血清, 対照として抗トキソプラズマ抗体陰性の正常人血清を使用した. これらの血清は一部は -20°C に, 一部は -80°C に保存した.

ラジオイムノアッセイ (RIA)

Fig. 1 に方法を図示した. まず初めに①所定の濃度に希釈したウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清の 0.5ml をプラスチック チューブ (栄研 1 号, $1.2 \times 8 \text{ cm}$) に入れ 37°C 4 時間反応させた後, 4°C に一晩放置後 PBS (pH 7.2), A 液 (0.01M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 0.1M NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.1% BSA, 0.1% NaN_3) で余分な抗体を除去した. ②被検血清を所定の濃度に希釈し, その 0.5ml を試験管に加え, 37°C 2 時間反応させたのち PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄後, 放射能活性をオートウエルガンマカウンター (Aloka, JDC-755) で測定した.

成 績

固相の調整に用いるウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清の濃度

固相の調整に用いるウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清の至適濃度を知るために, 50 倍, 100 倍希釈の 2 濃度で試験管を 37°C 4 時間, ついで 4°C overnight で感作し, 洗浄, 50 倍希釈の被検血清 0.5ml を加えて, 37°C 2 時間作用させた. ポリエチレンチューブを洗浄後, 比放射能 17.7 の ^{125}I -標識ウサギ抗トキソプラズマ膜抗原グロブリンを A 液により 1,000 倍に希釈しその 0.5ml を洗った試験管に加え, 37°C 2 時間反応させた後さらに PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄した. 結果は Fig. 2 に示す如く, RH 株感染マウスはそのほとんどがプラスカウントに, 一方正常マウス血清, 感染後 1 年以上経過した Beverley 株

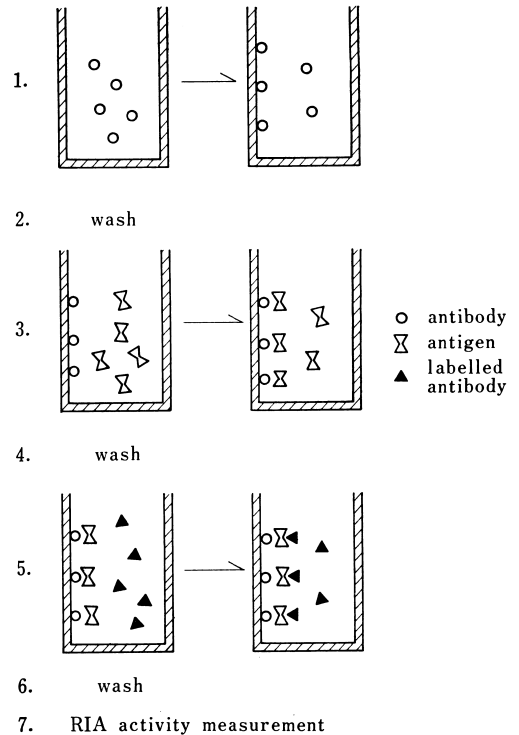


Fig. 1 Schematic representation of the solid-phase RIA.

1. antibody coating
3. antigen incubation
5. labelled antibody incubation

感染マウスはマイナスカウントになり, 血中抗原のあると思われる RH 株急性感染マウスは明らかに他の正常マウス, Beverley 株感染マウスから区別することができた. グラフから明らかなように 50 倍希釈マウス血清を用いた場合において 100 倍希釈マウス血清を使用した場合に比べて, より明白な結果をえた. したがって以後被検血清は 50 倍希釈を使用した. 感染後, 1, 2, 3, 4 日経たマウスを全採血し血清をえた. なお 1 群を 5 匹とし, 試験は個々の血清についておこない, 結果は 5 匹の平均値で表わした. 感染後各日ごとにえられた血清をそれぞれ $1/50$ 抗血清, $1/100$ 抗血清を用いて反応をしらべたところ Fig. 3 に示す結果をえた. $1/50$, $1/100$ 希釈抗血清を用いたいずれの系においても感染後 1 日目から抗原が検出された. 2 日目には抗原量はやや多くなり 3 日目にその活性は最高となり死に近い 4 日目は下降した. ここでもやはりウサギ抗トキソプラズマ血清は $1/100$ 希釈液より $1/50$ 希釈液を用いた場合においてカウントもより高く, 正常マウス群, 慢性 Beverley 株感染マウス血清と明ら

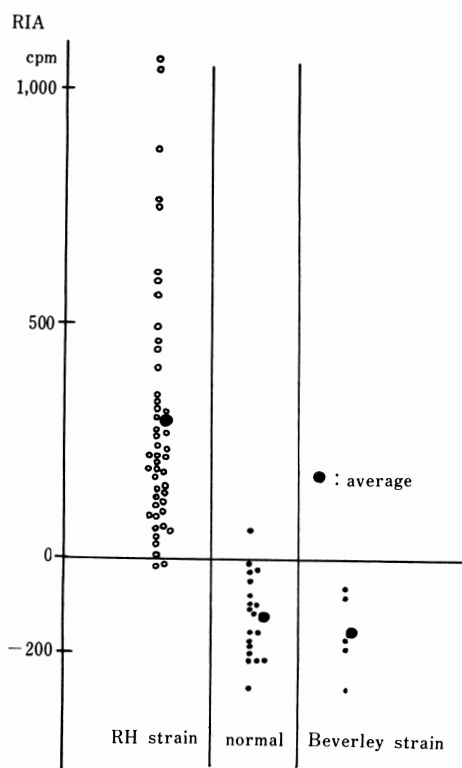


Fig. 2 Frequency distribution of the toxoplasma antigen activity measured in sera from mice infected with toxoplasma RH strain, Beverley strain and control non-infected groups.

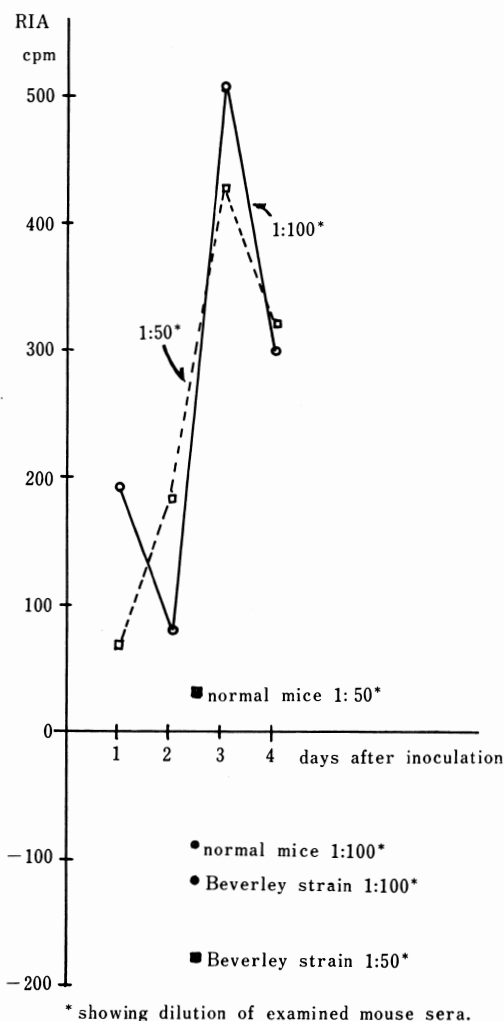
かに区別することができた。

マウス、スナネズミに Beverley 株感染後の抗原活性の推移

マウス、スナネズミを Beverley 株シストにより感染させ、その感染経過にもなる抗原活性を調べた。Fig. 4 に示すように Beverley 株感染マウスでは感染後 2 日目から抗原活性は徐々に上昇し、5 日目にやや下降した。抗原値はその後又上昇し、感染 7 日目にピークに達し、流血抗体があらわれると思われる頃に下降した。いつばうスナネズミはトキソプラズマ弱毒株に感受性が高いことが示されている (Suzuki and Tsunematsu, 1974) が、今回の実験で、マウスと全く同じ量のシストの接種に対して感染後 1 日目から抗原活性が現われ、2 日目にピークに達したのち、急激に下降し 6 日目には全例死亡した。

初期感染を思わせる患者の抗原活性

初期感染を思わせる患者、あるいは実験室内感染者の血清について検討した結果を Table 1 に示した。表中



* showing dilution of examined mouse sera.
Fig. 3 TP antigen measured by RIA activity in the sera from mice inoculated with RH strain.

K.T, I.H は急性リンパ節炎型トキソプラズマ症患者で、黄色ブドウ球菌プロテインA吸収法 (Kamei, 1978) により IgM 抗体が証明されている。H.I, I.Y, A.C, M.K は実験室内感染による初感染、N.Y は自然感染があつたのちたまたま実験室内感染をうけた患者である。感染後 7 日から約 4 週までの血清について調べたが、感染の新しい時期に抗原がみつめられた。感染が古いと思われる患者、あるいは不顕性感染者いずれもラテックス凝集反応による流血抗体は 10,000 倍以上の高値を示したが、正常人と同様抗原活性は全然認められなかつた。

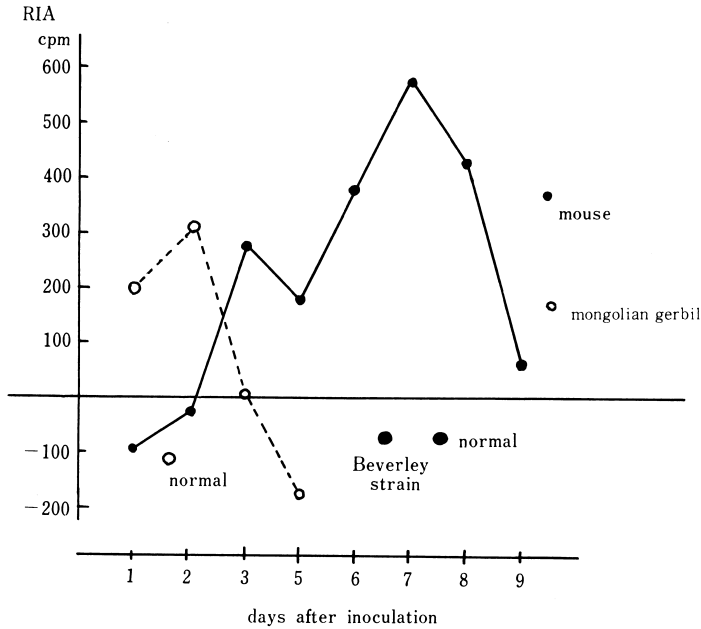


Fig. 4 Time course of toxoplasma antigen in infected mice and mongolian gerbils detected by RIA. Beverley strain was used.

考 察

トキソプラズマ症は本邦において約25%の成人が罹患経験があるとされるが、そのほとんどが慢性の不顕性感染として経過するものと思われる。しかし妊婦あるいは新生児にとって、その感染時期が臨床問題となる場合がしばしばある。従来は感染時期を知るために感染初期抗体である IgM 抗体を証明すべく、蛍光抗体法 (Remington *et al.*, 1966), IgM-ELISA 法 (Naot, *et al.*, 1981), 黄色ブドウ球菌吸収後残存抗体の測定 (Kamei, 1978) 等が開発されてきたが、これらはすべて抗体の検出であるため、血中抗体があらわれたのちでないと試験をおこなうことができなかつた。しかし最近、RIA, ELISA のような血中のごく微量物質でも検出可能な試験方法が開発され、その威力を発揮し、寄生虫学の分野でも住血吸虫症 (Nash, *et al.*, 1974; Deelder, *et al.*, 1976; Houba, *et al.*, 1976), トキソプラズマ症 (van Knapen, *et al.*, 1977; Araujo, *et al.*, 1980) など血中抗原を検出する方法がこころみられ応用されている。われわれは RIA を使つて実験的に感染させた動物の血中抗原、あるいは初感染を思わせる患者の血中抗原の検出をこころみ、本法により血中抗原の検出が可能であるとの結論をえた。ここにいう血中抗原は実際どのような物質であるか、本報告で指摘すること

Table 1 Demonstration of toxoplasma antigen detected by RIA in humans acquiring acute toxoplasmosis and chronic latent toxoplasma infection

Patient	Diagnosis	Post infection	RIA, cpm
K.T.	Lymph. T.	recidiv.	545
M.K.	Lab. infect. (primary)	before infect. 10 d	-117 262
I.H.	Lymph. T.	unknown	143
H.I.	Lab. infect. (primary)	8 d 15 d	438 408
N.Y.	Lab. infect. (secondary)	7 d 23 d	138 71
I.Y.	Lab. infect. (primary)	about 4 w	273
A.C.	Lab. infect. (primary)	about 4 w	99
T.Y.	latent infect.		-114
Y.T.	Lymph. T.	2 y	-265
Normal 1			-164
Normal 2			-189
Normal 3			- 75

ができなかつたが, Tönjum (1962), Woodworth, *et al.* (1960), Fulton (1965) らの報告にある “soluble antigen” “toxotoxin” 等を検出している可能性も考えられる。

われわれの使用したウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清は, 水抽出後のトキソプラズマ虫体膜のみを抗原として作成した抗血清であるが, これを用いたことが感染後血中抗原をいち早く検出する結果につながったものと考えられる。又トキソプラズマは分裂増殖の方法として出芽法 (Endodygeny) という特殊な分裂増殖の方法をとる事が知られている (Kepka *et al.*, 1970)。この際母細胞が破壊され, その破壊産物が血中に存在し, それが抗血清と作用して血中抗原の検出にあづかっていることも考えられる。いずれにしても感染初期のみにみられる抗原物質が血中に存在することは明白である。

マウス, スナネズミはトキソプラズマ感染に対してもつとも高い感受性を示す動物であると考えられている。マウスの流血中の抗原量がかりにマウス体内における増殖トキソプラズマ数を反映するものと仮定すると, いったん増殖したトキソプラズマは感染4~5日目ごろ何らかの理由でその数が低下し, その後ふたたび増殖を開始する。しかしマウスが致死寸前になるとトキソプラズマの増殖にとつても条件が悪くなるため急激にその数が低下するものと解釈される。いつぼうスナネズミはトキソプラズマ感染に対する感受性がマウスよりいつそう高いため, 感染3日目ごろになるとすでに致死状態におこまれ, 体温低下などトキソプラズマの増殖にとつても条件が悪くなるため, トキソプラズマ増殖数が急激に低下するものと考えられる。いずれにせよ流血中の抗原量は免疫結合体形成, さらに宿主側の免疫能低下現象 (鈴木ら, 1977) による影響など一義的に論ずることのできない複雑な経過をたどって消長することが予想され, くわしい解折については今後の検討をまたなければならない。

本研究で使用したウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清は somatic 抗原に対して全く反応性を欠いていたためいかなる量を使用しても検量曲線を作成できなかつた。いつぼう膜抗原は不溶性で特殊な表面活性剤, あるいはブタノール等のある種の有機溶媒を用いれば溶解する (亀井ら, 1981) が, 膜成分の一部を抽出するにすぎず, 抗原量を測定するための検量曲線はいずれの系をとつた場合にも作成することはできなかつた。さらに今回使用したウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清はトキソプラズマ somatic 抗原との間に Ouchterlony 法でみるかぎり, 沈降線を生じなかつた。以上の結果は, 今回用いた

ウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清が, トキソプラズマ膜のみと, きわめて高い特異反応をいとなむことを示しているといえよう。さらに問題のトキソプラズマ膜抗原血清を純化されたトキソプラズマ膜抗原と反応させたところ, Ouchterlony 法によつてみるかぎり, 沈降線はみとめられなかつた。恐らく純化されたトキソプラズマ膜抗原はほとんど単一化された物質であるため, 膜全体を抗原として作られた今回のウサギ抗トキソプラズマ膜抗原血清との反応が検出できないほど弱かつたのではないかと考えられる。

以上のように流血抗原の構成成分は, なお検討の余地を残しているが, 本報でおこなわれた RIA により, 急性トキソプラズマ症患者から流血抗原を検出することはきわめて有望視される。特に慢性感染の成立している動物ないしヒトの流血中には本法でみるかぎり, トキソプラズマ抗原は検出されず, 急性例との明白な区別が可能であつた。この事実は, 本法が新生児, 妊婦などにおいて, 特に決定をせまられる急性トキソプラズマ症の診断に今後実用化され, 活用されていく上で大きな利点と考えられる。

要 旨

トキソプラズマの診断に用いられる血清反応には色素試験を始めとして, 直接凝集反応, 間接赤血球凝集反応, 補体結合反応, 蛍光抗体法, 間接ラテックス凝集反応, 酵素抗体法, ラジオイムノアッセイ (RIA) がある。しかしいずれの方法も抗体の検出を目的としたもので, 急性感染期の血中抗原の検出を試みたものは少ない。われわれは感度, 再現性の非常にすぐれた RIA を用いて, トキソプラズマ感染者, 同感染ネズミならびにスナネズミの血中からの抗原の検出を行つた。トキソプラズマ RH 株感染マウスでは感染翌日から血中抗原が検出され, 感染3日目に最高値に達し, 後に減少した。トキソプラズマ弱毒株である Beverley 株感染マウスについて血中抗原の出現状況を見るとやはり感染翌日から抗原が検出され, 感染7日目に最高となり, 血中抗体の出現と共に減少した。急性リンパ節トキソプラズマ症, 研究室内感染で感染後約4週間のヒト血清から血中抗原を検出することができた。

謝 辞

本研究の糸口を与えていただいた東邦大学医学部入江実教授, ならびに本研究の御指導, 御校閲を賜つた当教室佐々学教授, アイントープの標識を御願ひし

たダイナボット RI 研究所企画調査課、山梨秀己氏に深謝する。

文 献

- 1) Araujo, F. G. and Remington, J. S. (1980): Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, 141, 144-150.
- 2) Deelder, A. M., Klappe, H. T. M., van Aadeweg, G. J. M. J. and van Meerbeke, E. H. E. M. (1976): *Shistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigen in infected hamsters. *Exp. Parasitol.*, 40, 189-197.
- 3) Fulton, J. D. (1965): Toxic exudates in *Toxoplasma gondii* infections. *Exp. Parasitol.*, 17, 252-260.
- 4) Houba, Y., Koech, D., Strerrock, R. F., Butterworth, A. E., Kusel, J. R. and Mahmoud, A. A. F. (1976): Soluble antigens and antibodies in sera from baboons infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 117, 705-707.
- 5) Kamei, K., Sato, R. and Tsunematsu, Y. (1979): A routine method for assaying the anti-toxoplasma IgM antibodies. Latex agglutination test on human sera preabsorbed with Protein A-bearing staphylococcal cells. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 244, 383-390.
- 6) 亀井喜世子・磯久恵子・宮崎道雄 (1981): トキソプラズマ膜抗原の分離. 精製 (2). *寄生虫誌*, 30, 76.
- 7) Kepka, O. and Scholtyseck, E. (1970): Weitere untersukungen der feinstruktur vor *Frenkelia spec.* (M-Organismus, Sporozoa). *Protistologica*, 6, 249-266.
- 8) Naot, Y. and Remington, J. S. (1981): An IgM-ELISA test for diagnosis of congenital toxoplasma infection. *J. Pediatr.*, 98, 32-36.
- 9) Nash, T. E., Prescott, B. N. and Neva, F. A. (1974): The characteristics of a circulating antigen in shistosomiasis. *J. Immunol.*, 112, 1500-1507.
- 10) Raizman, R. E. and Neva, F. A. (1975): Detection of circulating antigen in a acute experimental infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.*, 132, 44-48.
- 11) Remington, J. S. and Miller, M. J. (1966): 19S and 7S antitoxoplasma antibodies. in the diagnosis of acute congenital and a acquired toxoplasmosis. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 121, 357-360.
- 12) Suzuki, M. and Tsunematsu, Y. (1974): Susceptibility of mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1967) to *Toxoplasma* infection. *An. Trpo. Med. Parasitol.*, 68, 33-39.
- 13) 鈴木康弘・渡辺直熙・小林昭夫 (1977): Toxoplasma 感染による宿主抗体産生系の非特異的抑制. *寄生虫誌*, 26, 30.
- 14) Tönjum, A. M. (1962): Soluble antigens produced by *Toxoplasma gondii*. *Acta. Pathol. Microbiol.*, 54, 96-98.
- 15) van Knapen, F. and Panggabean, S. O., (1977): Detection of circulating antigen during acute infection with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 6, 545-547.
- 16) Woodworth, H. C. and Weinman, D. (1960): II. Studies on the toxin of *Toxoplasma* (toxotoxin). *J. Infect. Dis.*, 107, 318-324.

Abstract

DETECTION OF CIRCULATING ANTIGEN DURING ACUTE INFECTIONS
WITH *TOXOPLASMA GONDII* BY MEANS OF RADIOIMMUNOASSAY

KISEKO KAMEI AND AKIHIRO YOSHIKE

(*Department of Parasitology, Teikyo University School of Medicine, Tokyo*)

The circulating *Toxoplasma* antigens were studied in relation to the diagnosis of acute toxoplasmosis in man and animals. Through the course of acute phase of *Toxoplasma* infection, the circulating antigen was demonstrated in the sera by means of radioimmunoassay from mice and mongolian gerbils. However, the circulating antigen was not detected in the animals with chronic latent toxoplasmosis. In the human sera from patients who acquired acute toxoplasmosis in the laboratory, and also in the human sera from patients with acute toxoplasmic lymphadenitis, appreciable amount of the antigen was measured, while circulating *Toxoplasma* antigen was not demonstrated in any human case with latent chronic toxoplasmosis. The radioimmunoassay for the antigen was considered to be applicable to the diagnosis of acute human toxoplasmosis.