

トキソプラズマ虫体膜の抗原成分について

有滝千恵子 伊勢やよい 飯田孝
佐藤功栄 鈴木貴和 嶋田孝吉

(昭和56年9月14日 受領)

Key words: *Toxoplasma gondii*, membrane antigen purification, IgM antibody

緒言

トキソプラズマに感染した場合、まず Dye test で検出される抗体が出現する (Sabin and Feldman, 1948). この早期に関与する抗体は IgM 抗体であり、これに対応する抗原は虫体の膜成分であるとされている (Karim and Ludlam, 1975). したがって、トキソプラズマ感染の早期診断には膜成分を用いて検出する方法が有効と考えられるが、現在のところ抗原性のある膜成分の解析は勿論、その分離法の確立もなされていない。

そこで我々は、トキソプラズマ虫体膜からの抗原成分の分離法について検討を行い、さらに、得られた成分をラテックスに感作したものを抗原とし、種々のトキソプラズマ症の血清学的診断法との比較を行ったので、その成績について報告する。

材料及び方法

トキソプラズマ虫体成分の調製：マウス (ddY) の腹腔内に *Toxoplasma gondii* (RH 株) を接種し、3日後に腹水より虫体を採取した。ステンレスフィルター (200メッシュ) にてフィブリンを除去後、PBS で3度洗浄した。得られた原虫を蒸留水に浮遊させて破壊した後、400×g 15分遠心し、沈渣を得た (Lewis and Kessel, 1961). 沈渣に Triton X-100 (和光純薬社製) を最終濃度 20mM になるように加え、フレンチプレス (5501 M型, 大岳製作所) を用い、500kg/cm² の圧力下で破砕した。これを 10,000×g 20分間遠心し、その上澄をさらに 100,000×g 60分間遠心し、上澄液 (表1, sup-4) を得、これをラテックス凝集反应用抗原のため

東京都臨床医学総合研究所 (生体防衛)

の出発材料とした。

尚、赤血球凝集反応 (HA) 用抗原には、原虫を蒸留水で破砕した後、400×g 15分遠心して得た上澄をさらに 10,000×g 20分間遠心した上澄液 (表1, sup-2) を用いた。

ゲル濾過：ウルトラゲル AcA 44 (ファーマシア社) を支持体とし、溶出液には PBS を用いた。

抗原成分の測定：抗原成分の測定は坪田・小沢 (1977) の方法に従って、sup-4 をラテックス粒子 (0.9μm, 武田製薬) に感作したものを抗原とし、抗トキソプラズマ抗体陽性血清に対する凝集抑制反応によつて行つた。

蛋白および糖の定量：蛋白の定量は Folin-Lowry 法 (Lowry *et al.* 1951), 糖の定量はフェノール・硫酸法 (Dubois *et al.* 1956) を用いた。

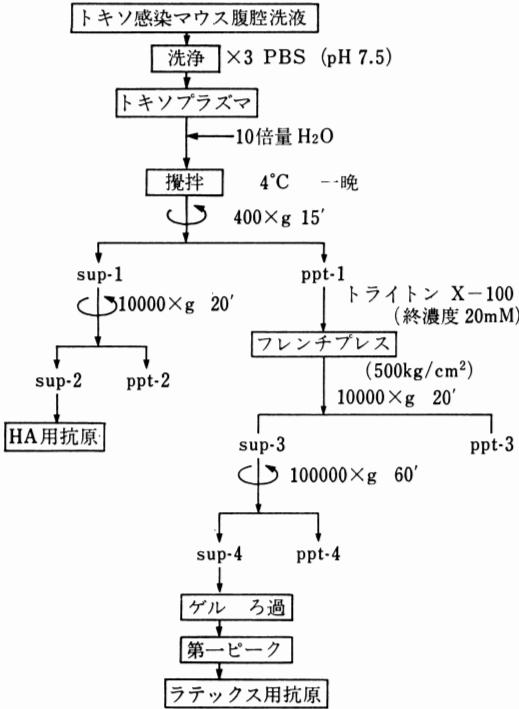
SDS-スラブ電気泳動：抗原の純度解析は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いた (Laemmli, 1970).

被検血清：築地産院より提供を受けた妊婦血清 1,179 検体について検討した。尚、検体は検査まで -70C に保存した。

結果

ゲル濾過法によるトキソプラズマ抗原成分の分離：図1は sup-4 をウルトラゲル AcA 44 によりゲル濾過した場合の溶出像である。280nm での吸光度のパターンからは主要なピークは void volume に溶出するもの (UP-1) とほぼ Fr. 70~110 にかけてのなだらかなピーク (UP-3~5) が存在したが、Folin-Lowry 法により蛋白の定量を行つたところ、主として UP-1 に呈色反応が認められたのみであつた。一方、フェノール・硫酸法

表 1 抗原作製法



により糖を測定すると UP-1 および Fr. 113 付近をピークとする画分 (UP-6) に、その反応が認められた。従って、UP-1 は糖蛋白もしくは、糖および蛋白の集合体であり、UP-6 は、単純糖であろうと推定された。一方、UP-3~UP-5 は 280nm に吸収を示すが、上記両反応に

呈色を示さなかつた。この画分に対して種々の検討を行った結果、この画分の主成分は膜成分の可溶化に用いた Triton であることがわかつた。

ゲル濾過法によつて得られた画分に対して、抗トキソプラズマ抗体陽性血清および sup-4 をラテックスに感作した抗原を用いる凝集抑制反応を行い、抗原成分の分布を測定した。その結果 UP-1 および Fr. 70 付近に溶出する部位 (UP-2) に抑制反応が認められた。これらの画分をさらに精製するため濃縮後、同一の条件でリクロマトグラフィーを行った。UP-1 は溶出液に PBS を用いた場合、抗原活性は初回のクロマトグラフィー同様、void volume に出現したが (図 2-A)、5 mM の Triton を含む溶出液を使用した場合には、抗原活性は void volume よりやや遅れた位置に溶出され (図 2-B)、標準試料による比較からこの分子量は約 90 万と推定された。一方、UP-2 画分についてリクロマトグラフィーを行った場合、280nm に吸収をもつ成分の殆んどは会合し、void volume に溶出したが、大部分の抗原活性をもつ成分はもとの位置に溶出し、比活性が大きく高まつた。この分子量は約 20 万程度と算定されたが、収量が低いため、蛋白であるか、多糖類であるかの同定は困難であつた (図 3)。

SDS-PAGE による分析：写真 1 にはリクロマトグラフィーによつて得た UP-1 および UP-2 に加えて、UP-3~6 および出発材料である sup-4 の SDS-PAGE による分析結果を示した。膜成分破砕画分である sup-4 は細胞内成分を多く含む sup-2 とは泳動パターンを異に

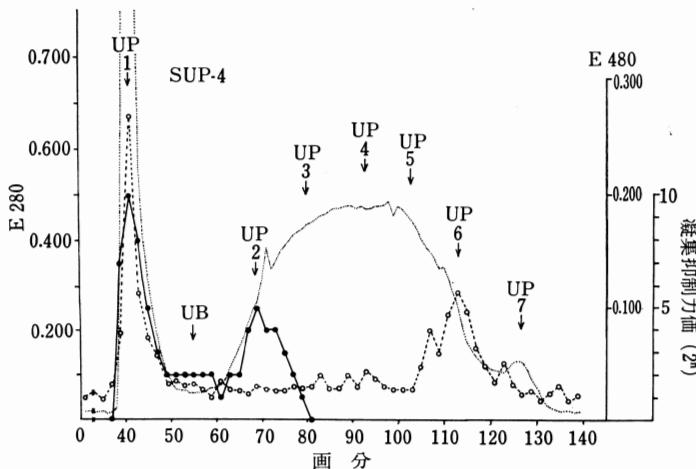


図 1 ウルトラゲル AcA 44 によるゲル濾過の溶出パターン 280nm での吸光度 (·····), 糖 (480nm, O·····O), 凝集抑制力価 (●——●), 溶出液: PBS

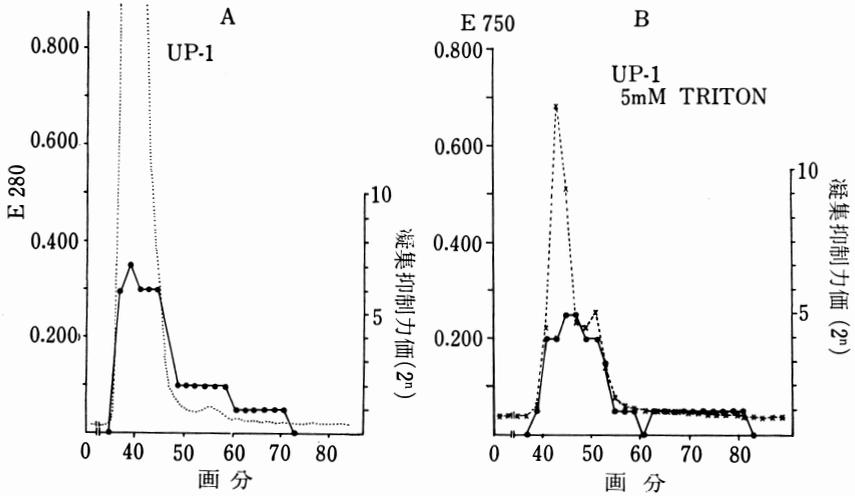


図 2 UP-1 のリクロマトグラムの溶出パターンゲル：ウルトラゲル AcA 44
 溶出液：A) PBS
 B) 5 mM Triton-PBS 280nm での吸光度 (·····),
 Lowry 法 (750nm, ×····×), 凝集抑制力価 (●—●)

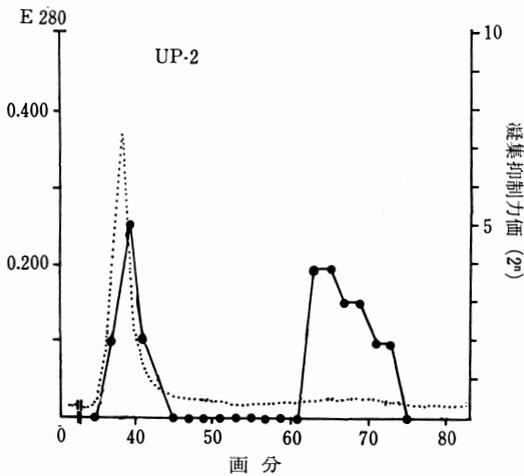


図 3 UP-2 のリクロマトグラムの溶出パターン
 ゲル：ウルトラゲル AcA 44, 溶出液：PBS
 280nm での吸光度(·····), 凝集抑制力価(●—●)

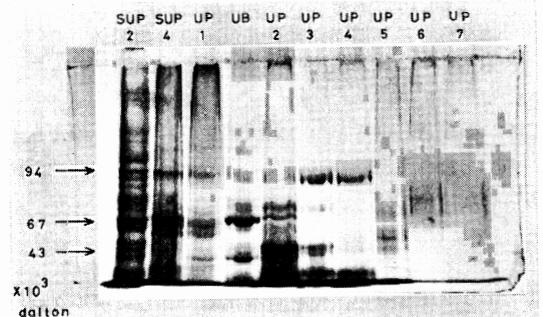


写真 1 SDS-PAGE の泳動パターン

分離された抗原成分の特異性について：分離された抗原成分のうち特に UP-1 の特異性を検討した。UP-1 をラテックス粒子に感作して作製した抗原につき、市販抗原および赤血球凝集反応 (HA 法) との相関を検討した。抗原の作製は坪田・小沢 (1977) の方法に従い、UP-1 の 0.02mg/ml (BSA 当量) をラテックス (2%) と等量混合し、37C 30分反応させたものを使用した。また HA 法抗原はトキソ抗原として sup-2 を使用し、医科研法に準拠した。

まず、HA 法に対しては、両方で32倍以上の力価を示す血清に関しては高い相関性が認められたが (r=0.66)、32倍未満の力価をもつ血清では HA 法が陰性であるにも拘らず、LA 法で陽性を示す例が存在した (図 4)。

また、市販のラテックス抗原との相関性については

しており、共通するバンドは少ない。また、UP-1 には約14本のバンドが存在し、予想通り低純度であった。一方、UP-2 はリクロマトグラフィーにより比較的比活性の高い成分として得られたものではあるが、この成分は SDS-PAGE によると、数多くのバンドを示し、高純度とは言い難いものであった。ただし、UP-1 と共通するバンドは少く、この両者が各々別個の抗原成分であることが示唆された。

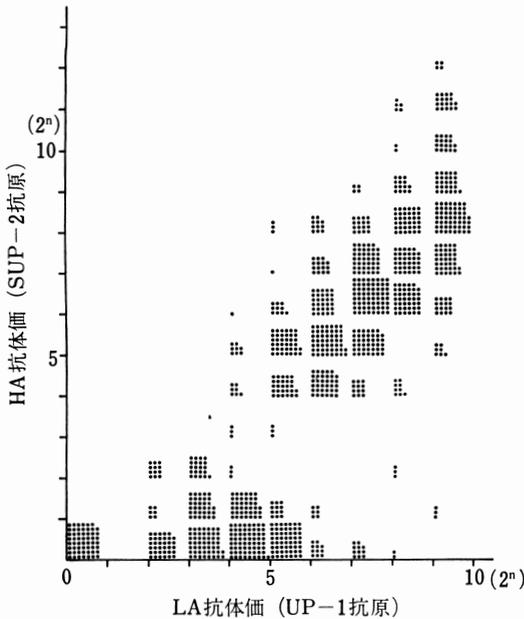


図 4 UP-1 感作ラテックス凝集反応との血清反応との相関赤血球凝集反応との相関図 ($r=0.66$)

UP-2 を抗原とする場合の方が感度が高い ($y=0.94x+2.94$) と言う点を除けば両者の間には良好な相関性が認められた ($r=0.77$, 図 5).

考 察

トキソプラズマ虫体膜を可溶化し、さらにゲルクロマトグラフィーを行うことによつて 2 つの抗原成分を得ることができた。ウルトラゲル AcA 44 を素通りしてくる抗原 UP-1 は、Triton を含む溶出液を用いて同条件でゲル濾過を行つた場合、その活性は void volume よりやや遅れて出現するため、分子量約 90 万の疎水性の高分子物質であることが推定された。SDS-PAGE による分析では、この画分は多くのバンドを与えるため、さらに精製を進める必要があつた。そこで、ウルトラゲル AcA 44 よりも大きい分画範囲をもつセファロース 4B によるゲル濾過や CM-, DE-セルロース等のイオン交換クロマトグラフィー法、等電位点クロマトグラフィー法等を行つたが、これらの精製法によつても期待した分離効果は得られなかつた。これは UP-1 が疎水性の高分子物質の会合体であることに起因するものと想定される。一方、UP-2 はリクロマトグラフィーによつて比活性の高い画分が得られたが、SDS-PAGE による分析結果が

ら高純度であるとは言い難かつた。ゲル濾過法による溶出位置から分子量約 20 万と推定されるが、収量が極度に低いためこの物性の解明については現在進行中である。

Jose *et al.* (1980) はトキソプラズマ虫体成分の多糖類を抗原とした場合、感染初期に生ずる IgM 抗体を効率よく検出し得ることを報告している。我々の実験で得られた UP-6 は多糖類であるが、抗トキソ陽性血清との反応性はなく、さらに、虫体よりフェノール処理により得られた糖画分を用いても、同様の結果を得た。さらに虫体より抽出した脂質を用いて抗トキソ抗体との反応性を調べたが、これには全く抗原性は認められなかつた。以上のことより、虫体のヒトに対する抗原成分は、蛋白が主体であろうと推定される。

UP-2 を濃縮後、リクロマトグラフィーを行つた場合、280nm に吸収をもつ大多数の成分 および抗原活性の一部が void volume に出現するようになる。また、sup-4 はフレンチプレス処理によつて得た画分であるが、これをさらに超音波処理 (10kc) し、ゲル濾過を行うと、UP-1 のピークが低下し、UP-2 のピークが高くなることなどから、UP-1 の一部は UP-2 の会合したものと考えられることができるが、SDS-PAGE の分析からすると、両者の間には共通するバンドは少なく、両者の抗原主成分は各々独立していることが示唆された。

UP-1 を感作したラテックスを抗原とする凝集反応 (LA 法) と赤血球凝集反応 (HA 法) との比較を行つた場合、両者の間には比較的良好的な相関が存在した (図 4)。しかし HA 法で陰性を示すが、LA 法では陽性を示す例がかなり存在した。これは HA 法が虫体細胞質成分を抗原とし、UP-1 は虫体膜由来であるため、両者の反応に用いる抗原成分の差がこの原因であり、特に IgM 抗体に対する感受性に起因するものと考えられる (飯田ら, 1981)。

一方、同じラテックスを担体とする凝集反応でも市販抗原と UP-1 を抗原としたものの比較を行つたが、両者は良く相関性を示した (図 5)。ただし、UP-1 を抗原とした場合、市販抗原よりも感度が増加するが、単にこれはラテックスに感作した抗原量の差に由来するものであると考えられる。一部 UP-1 の抗原に対して陰性を示し、市販抗原では陽性を示す例が認められた。これは後者の B 型肝炎ウィルスに対する非特異反応に由来すると想定される (伊勢ら, 1981)。

ま と め

トキソプラズマ感染の早期診断には、膜成分を用いて

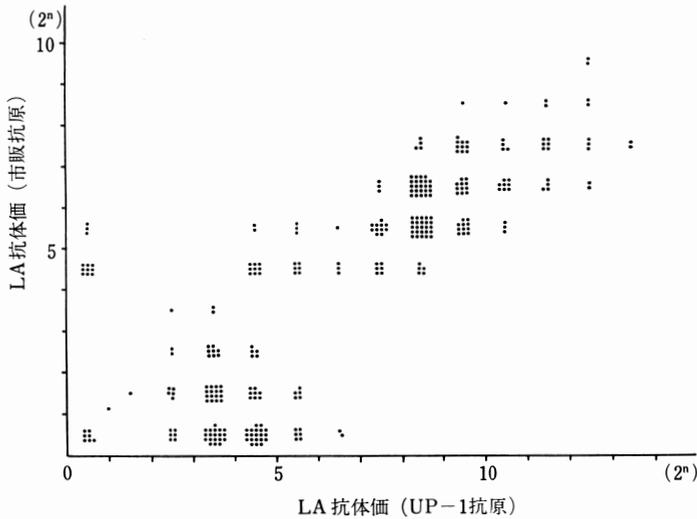


図 5 UP-1 感作ラテックス凝集反応とラテックス凝集反応 (市販抗原)との相関図 ($r=0.77$)

初期抗体を検出する方法が有効と考えられる。抗原性のある膜成分を分離するために、トキソプラズマ膜を Triton (20mM)-フレンチプレス (500kg/cm²) 処理で破砕した 100,000×g の上澄 (sup 4) をウルトラゲル AcA 44 にてゲル濾過を行った。280nm の吸収曲線は void volume (UP-1) とやや遅れてなだらかなピーク (UP-2~6) が得られた。UP-1 と UP-6 には糖が含まれ、UP-1 のみが Lowry 法での蛋白の呈色を示した。又、抗トキソプラズマ抗体陽性血清と sup 4 をラテックスに感作した抗原を用いて凝集抑制反応を行うと、UP-1 と UP-2 に活性が認められた。この抗原活性をもつ UP-1 をラテックスに感作したものと市販抗原および HA との相関性 (抗原性) を検討した結果、市販抗原とは相関係数 $r=0.77$ 、HA とは $r=0.66$ であった。

文 献

- 1) Dubois, D., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956): Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- 2) 飯田 孝・伊勢やよい・佐藤功栄・鈴木貴和・嶋田孝吉: (1981) トキソプラズマ感染における抗体の変動とその解析. *寄生虫誌* 30, 571-578.
- 3) 伊勢やよい・有滝千恵子・飯田 孝・佐藤功栄・鈴木貴和・嶋田孝吉: (1981) ラテックス凝集反応による抗トキソプラズマ抗体検出における非特異反応に関する研究. *寄生虫誌* 30, 579-585.
- 4) Jose, R. Mineo, Mario, E. Camargo, and Antonio, W. Ferreria, (1980): Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human Toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 27, 283-287.
- 5) Karim, K. A. and Ludlam, G. B. (1975): The relationship and significance of antibody titres as determined by various serological methods in glandular and ocular Toxoplasmosis. *J. Clin. Pathol.*, 28, 42-49.
- 6) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 7) Lewis, W. P. and Kessel, J. F. (1961): Hemagglutination in the diagnosis of Toxoplasmosis and Amebiasis. *Arch. Ophthalmol.*, 66, 471-476.
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 9) Sabin, A. B. and Feldman, H. A. (1948): Dyes as micro chemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.
- 10) 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. (1) マイクロタイター用試薬の調製条件と安定性. *寄生虫誌*, 26, 276-285.

Abstract

THE PURIFICATION OF MEMBRANE ANTIGENS OF *TOXOPLASMA*
GONDII FOR THE DETECTION OF EARLY ANTIBODIES
IN *TOXOPLASMA* INFECTION

CHIEKO ARITAKI, YAYOI ISE, TAKASHI IIDA, KOHEI SATO,
TAKAKAZU SUZUKI AND KOHKICHI SHIMADA

(Division of Body Defence, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo)

Membrane antigens are considered to be useful for the detection of antibodies in the early phase of *Toxoplasma* infection. We have purified those from *Toxoplasma gondii* (RH strain) by using detergent, and column chromatographies.

Crude membrane antigens were obtained by destruction of the organisms in distilled water and broken into smaller pieces under increasing pressure (500 Kg/cm²) at the presence of Triton X-100. After the centrifugation at 100,000×g for 60 minutes, the supernatant was applied on a column of Ultragel AcA 44. By the inhibition test with anti-*Toxoplasma* IgM antibodies, almost all of membrane antigens were found to be involved in the void volume through the column with phosphate buffered saline (pH 7.2).

By using Latex particles (0.9 μm) sensitized with the purified antigens, anti-*Toxoplasma* IgM antibodies were able to be sensitively detected from sera of pregnant women. Moreover, the titers of IgG antibodies by the Latex test showed good correlation with those by the hemagglutination test.