

## 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

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30日 受領)

**Key words:** HB virus, Latex agglutination test, false positive, serum albumin, anti-*Toxoplasma* antibody

### 緒言

近年、血清トキソプラズマ（以下トキソ）抗体の検出には、従来の間接赤血球凝集反応に代つて、非特異反応が少なく、再現性が高い等の理由から、ラテックスを担体とする凝集反応（LA法）が広く応用されている。

しかしながら我々は、抗トキソ抗体の抗体価測定の過程で、LA法を利用した抗トキソ IgM 抗体の検出中に非特異反応が起こることを見出し、これを追求したところ、B型肝炎ウイルスとの関連が想定されるにいたつた。

そこで我々は、B型肝炎ウイルス抗原陽性血清につき、トキソラテックス感作抗原と非特異的に反応する成分について詳細に検討した。その結果をここに報告する。

### 材料および方法

#### 1) トキソ抗原

トキソ虫体膜を Triton X-100 の存在下でフレンチプレスにて破砕後遠心し、得られた上清（粗抗原、以下 C-Ag と略す）およびゲル濾過して得た精製抗原（UP-1）（有滝ら, 1981）を坪田, 小沢（1977）の方法に従つてラテックス粒子に感作して使用した。また市販のラテックス感作抗原（栄研化学, 東京）も併用した。

#### 2) 試験血清

都臨床研肝炎グループより提供を受けたB型肝炎ウイルス抗原陽性血清（HBe 抗原陽性血清および HBe 抗体陽性血清）、対照として正常人血清および抗トキソ抗体陽性血清（B型肝炎ウイルス抗原陰性）を使用した。

東京都臨床医学総合研究所（生体防衛）

#### 3) Protein A による IgG の吸収

亀井（1978）の方法に従い、protein A を多量に含む黄色ブドウ球菌の菌体で血清中の IgG を吸収した。

#### 4) 蔗糖密度勾配遠心法による血清の分画

Vesikari and Vaheri（1968）の方法に従い、10%から40%（w/v）の sucrose gradient 4.5ml に、2倍に希釈した血清0.1ml を重層し100,000×g で16時間遠心した。

#### 5) HBs 抗原の検出

HBs 抗原の検出には、逆受身赤血球凝集反応（Reversed-Passive Hemagglutination test 以下 RPHA と略す）を使用した（Vyas and Shulman, 1970）。

#### 6) ゲル濾過

Ultragel AcA 44（カラムサイズ：6×100cm）を用い、トキソ抗原をゲル濾過した。溶出は PBS（pH 7.2）で行つた。

#### 7) 各種動物血清アルブミン

ラット、ウサギ、ヤギ、ヒトおよびマウスの血清より、Iwata *et al.*（1968）の方法によりアルブミンを分画し使用した。またウシ血清アルブミン—BSA—（和光純薬）および卵白アルブミン（東京化成）を購入使用した。ラテックスへの感作はトキソ抗原と同様に行つた。

8) 会合ヒト血清アルブミンによる HBs 抗原の吸収  
会合ヒト血清アルブミン（以下会合 HSA と略す）の調整は次の如く行つた。40mg/ml のヒト血清アルブミン10ml に1%グルタルアルデヒドを等量加え、37C 1時間反応させた後、PBS で透析し、未反応のグルタルアルデヒドを除去した。HBs 抗原の吸収は、血清に20mg/ml の会合 HSA を等量加えた。

#### 9) ゲル内拡散法

表 1 LA 抗原と各種血清との反応

| 試験血清     | 吸 収       | HA 反応 | LA 反応 |      |      |
|----------|-----------|-------|-------|------|------|
|          |           |       | 市販抗原  | C-Ag | UP-1 |
| HBe 抗原陽性 |           | —     | +     | +    | +    |
|          | protein A | —     | +     | +    | +    |
|          | 会合 HSA    | —     | —     | —    | —    |
| HBe 抗体陽性 |           | —     | —     | —    | —    |
| 抗トキソ抗体陽性 |           | +     | +     | +    | +    |
| 正 常      |           | —     | —     | —    | —    |

オクタロニー法は Ouchterlony (1958) の方法に従い、免疫電気泳動法は Scheidgger (1955) の方法に従って行った。

## 結 果

1) HBe 抗原陽性血清と、種々のトキソラテックス感作抗原との反応。

表 1 に示す如く、HBe 抗原陽性血清は、抗トキソ抗体陰性にもかかわらず、すべてのトキソラテックス感作抗原（以下、LA 抗原）と反応し、protein A で吸収後もその活性は残存した。一方、会合 HSA で HBe 抗原陽性血清中の HBs 抗原を吸収した場合には、これらの非特異反応は全て消失した。

2) HBe 抗原陽性血清中の非特異反応成分についての検討。

HBe 抗原陽性血清の LA 抗原に対する非特異反応と HBs 抗原の R-PHA 力価との関係を調べた結果は以下の通りである。HBe 抗原陽性血清では R-PHA 力価が  $2^{12}$  以上のものはその全てに非特異反応が見られたが、力価が低くなるに従い非特異反応を起こす血清数は減少した（表 2-a）。また、HBe 抗体陽性血清（表 2-b、血

表 2-a HBe 抗原陽性血清の非特異反応と R-PHA 力価との関係

| R-PHA 力価* | n† | LA 反応 |      |      |
|-----------|----|-------|------|------|
|           |    | 市販抗原  | C-Ag | UP-1 |
| 12以上      | 12 | 12    | 12   | 12   |
| 11        | 4  | 4     | 4    | 3    |
| 10以下      | 4  | 2     | 4    | 0    |

\* 凝集を示した最終管の希釈倍数を指数対数 (log<sub>2</sub>) で示した

† サンプル数

各 LA 抗原で非特異反応を起こしたサンプル数を表示した

表 2-b HBe 抗原陽性血清と HBe 抗体陽性血清における非特異反応

| 血清 No.                               | R-PHA <sup>  </sup> | LA 反応 |      |      |
|--------------------------------------|---------------------|-------|------|------|
|                                      |                     | 市販抗原  | C-Ag | UP-1 |
| 1 HBsAg(+)*<br>HBeAg(+) <sup>†</sup> | 12                  | +     | +    | +    |
| 2 "                                  | 12                  | +     | +    | +    |
| 3 "                                  | 12                  | +     | +    | +    |
| 4 "                                  | 8                   | +     | +    | —    |
| 5 "                                  | 10                  | +     | +    | —    |
| 6 "                                  | 11                  | +     | +    | +    |
| 7 HBsAg(+)*<br>HBeAb(+) <sup>‡</sup> | 12                  | —     | —    | —    |
| 8 "                                  | 11                  | —     | —    | —    |
| 9 "                                  | 10                  | —     | —    | —    |
| 10 HBsAg(-) <sup>§</sup>             | 0                   | —     | —    | —    |
| 11 "                                 | 0                   | —     | —    | —    |
| 12 "                                 | 0                   | —     | —    | —    |

\* HBs 抗原陽性血清

† HBe 抗原陽性血清

‡ HBe 抗体陽性血清

§ HBs 抗原陰性血清

<sup>||</sup> 凝集を示した最終管の希釈倍数を指数対数 (log<sub>2</sub>) で示した。

清 No. 7, 8, 9) では R-PHA 力価が  $2^{12}$  以上のものでも非特異反応は起らなかった（表 2-b）。

一方、蔗糖密度勾配遠心法により、HBe 抗原陽性血清を分画し、各画分について LA 抗原に対する非特異反応および HBs 抗原の R-PHA 活性を測定したところ、LA 抗原に対する非特異反応は 19s 画分より重い位置に出現し、R-PHA 活性の出現した位置と一致した（図 1）。

3) トキソ LA 抗原中の HBe 抗原陽性血清に対する非特異反応成分について。

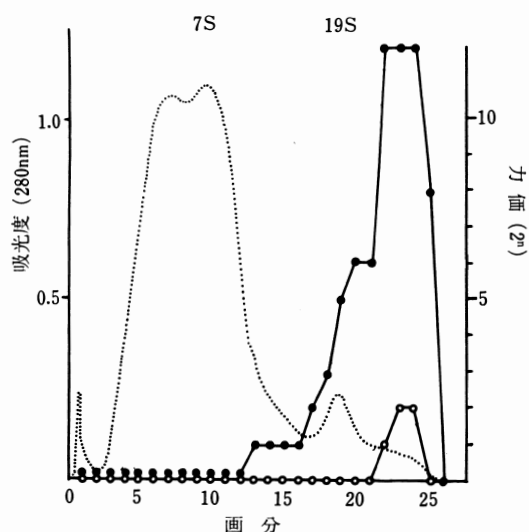


図1 密度勾配遠心法による HBe 抗原陽性血清の分画

遠心条件: sucrose gradient 10~40% (w/v)  
4.5ml, 100,000×g 4C 16時間  
……280nm による吸収, ●—● R-PHA 活性,  
○—○ LA 活性

表3 トキソ抗原 C-Ag および Up-1 による抑制試験

| 試験血清     | 抗原成分 |      | 対照 |
|----------|------|------|----|
|          | C-Ag | UP-1 |    |
| HBe 抗原陽性 | +    | -    | -  |
| 抗トキソ抗体陽性 | +    | +    | -  |

抑制試験は試験血清に抗原成分を加え 37°C 30分加温した後遠心した上清に LA 抗原を加え、凝集阻止の有無をみた。対照として抗原の代りに PBS を加えた。

上述の非特異反応がトキソ虫体由来のものかどうか調べるために、トキソプラズマ粗抗原である C-Ag および精製抗原である UP-1 による非特異反応に対する抑

制試験を行った。表3に示すように、HBe 抗原陽性血清における非特異反応は、C-Ag でのみ抑制され、UP-1 では抑制されなかった。従って UP-1 にはこの非特異反応成分が含まれていないものと考えられる。

HBe 抗原陽性血清が会合 HSA と反応するという報告 (Imai *et al.* 1979) がある。ところでラテックス凝集反応には非特異反応を防ぐため BSA が使用されており、上述の非特異反応に、虫体成分以外にもラテックス粒子飽和蛋白である BSA も関与している可能性がある。そこで BSA をはじめ、各種動物の血清アルブミンをトキソ抗原と同様にラテックスに感作させ、HBe 抗原陽性血清との反応性について検討した。その結果、ヒト、ウサギ、ウシ、ヤギ、モルモット、マウス、ラットの各血清アルブミンで感作したラテックスは、HBe 抗原陽性血清と反応を起こした。しかし卵白アルブミン感作ラテックスと HBe 抗原陽性血清との間には反応がみられなかった (表4)。

そこで BSA の代りに、抗原感作後の飽和剤として卵白アルブミンを使用したところ、表5に示す如く、UP-1 では非特異反応は起こらなかったが、C-Ag ではやはり非特異反応がみとめられた。

4) C-Ag の HBe 抗原陽性血清に対する非特異反応成分の分析。

C-Ag を Ultragel-AcA 44で分画し、HBe 抗原陽性血清との非特異反応に対する各分画の抑制活性を調べた。抑制活性は第1ピーク (フラクション番号 40-50) の UP-1 部分にも認められたが、むしろ遅れて溶出される70-115番のフラクションに主な活性部分が蛋白の第2ピークと一致して認められた (図2)。

5) トキソ虫体成分に混入したマウス血清成分の同定。

C-Ag 中のマウス血清成分の混入の有無を調べるために、オクタロニーおよび免疫電気泳動を行った。写真1に示す如く、抗マウス全血清に対して数本の沈降線が観察され、マウス血清アルブミン (MSA) に対応する沈

表4 各種動物血清アルブミン感作ラテックスと HBe 抗原陽性血清との反応

| 試験血清                              | アルブミン |    |     |    |       |     |     |    |
|-----------------------------------|-------|----|-----|----|-------|-----|-----|----|
|                                   | ヒト    | ウシ | ウサギ | ヤギ | モルモット | マウス | ラット | 卵白 |
| HBe 抗原陽性 (R-PHA 2 <sup>12</sup> ) | 7     | 8  | 7   | 6  | 6     | 6   | 6   | 0  |
| 正常                                | 0     | 0  | 0   | 0  | 0     | 0   | 0   | 0  |

結果は凝集を示した最終管の希釈倍数を指数対数 (log 2) で示した

表 5 抗原感作後ラテックス粒子飽和に用いる蛋白の検討

| 試験血清     | BSA*  |       | 卵白アルブミン* |       |
|----------|-------|-------|----------|-------|
|          | C-Ag* | UP-1† | C-Ag*    | UP-1† |
| 抗トキソ抗体陰性 |       |       |          |       |
| HBe 抗原陽性 | +     | +     | +        | -     |
| HBe 抗体陽性 | -     | -     | -        | -     |
| 抗トキソ抗体陽性 | +     | +     | +        | +     |
| 正常       | -     | -     | -        | -     |

\* 飽和に用いた蛋白

† 感作抗原

降線も出現した。

考 察

抗トキソ抗体検出法として間接ラテックス凝集反応試験法は、間接赤血球凝集試験法に比べ、特異性、再現性においてすぐれていると言われている(小林, 1977)。また本法を利用した抗トキソ IgM 抗体の検出法は他法に比べ簡易かつ迅速で日常検査として有用である(亀井, 1978; 伊勢ら, 1981)。しかしながら、今回の我々の検索で、HBe 抗原陽性血清が、抗トキソ抗体陰性にもかかわらず、ラテックス感作抗原と反応し、しかも protein A を利用した IgM 抗体検出法(亀井, 1978)の上で

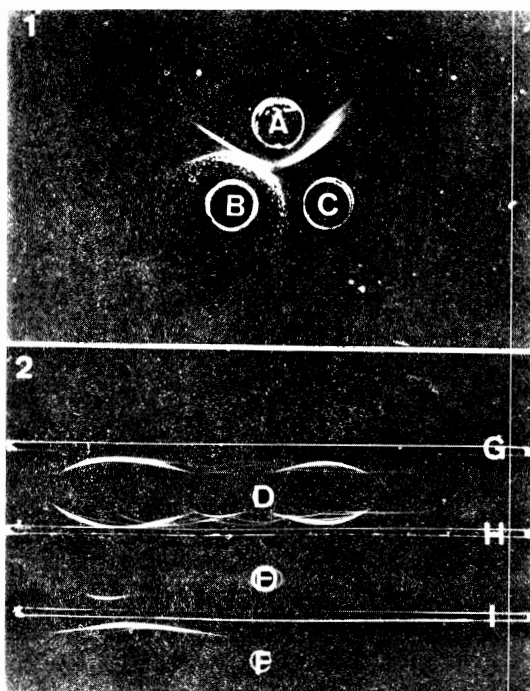


写真 1 C-Ag 中に混入したマウス血清成分の同定  
 1—オクタロー法 A: 抗マウス全血清, B: C-Ag, C: マウス血清アルブミン  
 2—免疫電気泳動法 D: マウス血清, E: C-Ag, F: マウス血清アルブミン, G, H, I: 抗マウス全血清

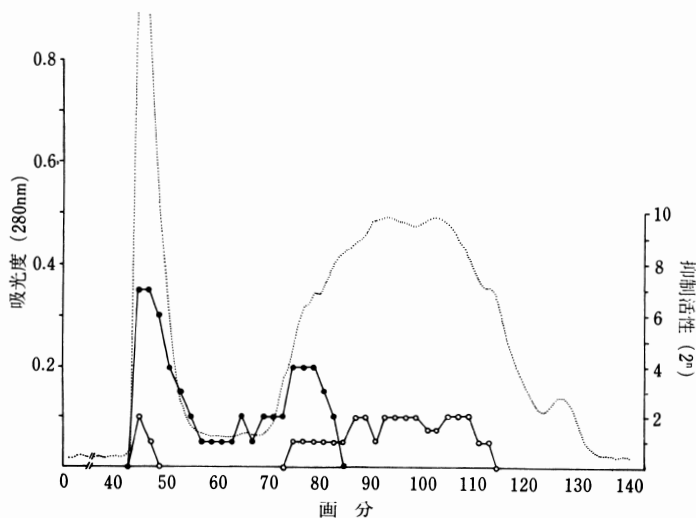


図 2 C-Ag の Ultragel AcA 44 によるゲル濾過像  
 溶出条件: カラムサイズ 6×100cm 溶出 buffer 1/200M PBS  
 …… 280nm による吸収, ●—● トキソプラズマ抗原活性,  
 ○—○ 非特異反応抑制活性

IgM抗体と類似した反応性を示すことが認められた。

そこで我々はまず、LA 抗原と反応するB型肝炎ウィルス抗原陽性血清中の成分について検討した。LA 抗原との非特異反応は、HBs 抗原陽性でしかも HBe 抗原陽性血清のみにかぎられると言う結果を得た。さらに会合 HSA でこの反応は抑制された。Imai *et al.* (1979) は会合 HSA は HBe 抗原陽性血清中の HBs 抗原と反応すると報告していることから、この非特異反応は HBe 抗原陽性血清中の HBs 抗原が関与していると考えられた。蔗糖密度勾配遠心法での分析で、この非特異反応成分が、HBe 抗原陽性血清中の 19s 画分より重い画分中に出現し、R-PHA 活性の出現位置とも一致したことは、上述の考えを支持するものである。

一方、HBe 抗原陽性血清と反応する LA 抗原の成分には、トキソ虫体成分およびラテックス粒子飽和に用いる BSA などが想定された。まず BSA について言えば、BSA をトキソ抗原と同様ラテックスに感作すると、HBe 抗原陽性血清と反応することから、ラテックスに感作された BSA は会合 HSA と同様、HBe 抗原陽性血清中の HBs 抗原と反応することが認められた。Imai *et al.* (1979) は、会合させたヒトおよびチンパンジー以外のアルブミンとは HBe 抗原陽性血清は反応しなかったと報告しているが、今回の我々の検索では、ラテックスに感作した BSA をはじめ各種アルブミン (ヒト、ラット、ウサギ、ヤギ、マウス) とともに HBe 抗原陽性血清は反応した。いずれもラテックスに感作したことにより HBe 抗原陽性血清との反応が鋭敏となったためと思われる。

一方、トキソ抗原による上記非特異反応に対する抑制試験で、粗抗原である C-Ag では抑制が起こり、精製された U P-1 抗原では抑制されなかった。このことは、C-Ag 中に、HBe 抗原陽性血清と非特異反応を起こす成分が混入していることを示している。

C-Ag 中には MSA の混入が認められ、しかも MSA も BSA と同様、HBe 抗原陽性血清と反応することから、C-Ag 中の非特異反応成分は、この混入した MSA ではないかと考えられた。会合していない BSA および MSA は、この HBe 抗原陽性血清との非特異反応を抑制せず、C-Ag では抑制することから、C-Ag 中の MSA は会合した状態にあることが推定される。さらにトキソ抗原に混入した MSA はラテックスに感作されることにより HBe 抗原陽性血清との非特異反応をより強めるものと考えられる。

## ま と め

HBe 抗原陽性血清は、トキソラテックス感作抗原と非特異的に反応するが、その反応成分は HBe 抗原陽性血清中の HBs 抗原と思われる。またトキソ粗抗原中の HBe 抗原陽性血清と反応する成分は、これに混入した MSA であることが示唆された。

一方、ラテックス粒子を飽和させる BSA も会合 HSA と同様、HBe 抗原陽性血清と反応する。

従つてラテックス凝集法による抗トキソ抗体の検出には B型肝炎ウィルス抗原との非特異反応に留意すべきである。

## 謝 辞

B型ウイルス抗原陽性血清の供与と有益なる御討論をいただきました東京都臨床医学総合研究所、吉沢浩司、津田文男両先生ならびに自治医科大学今井光信先生に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 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 (1981): トキソプラズマ虫体膜の抗原成分について。寄生虫誌, 30, 557-962.
- 2) Imai, M., Yanase, Y., Nojiri, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1979): A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins on hepatitis B virus particles co-occurring with HBeAg. Gastroenterology, 79, 242-249.
- 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): 妊婦のトキソプラズマ感染と児への影響。寄生虫誌, 30, 563-570.
- 4) Iwata, T., Iwata, H. and Holland, J. F. (1968): Isolation of albumin from human serum by means of trichloroacetic acid and ethanol. Clin. Chem., 14, 22-30.
- 5) 亀井喜世子 (1978): 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。寄生虫誌, 27, 453-461.
- 6) 小林昭夫・平井徳幸・鈴木康弘・西川洋治・渡辺直照 (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.
- 7) Ouchterlony, O. (1958): Diffusion-in-gel method for immunological analysis. Prog. Allergy, 5, 1-78.
- 8) Scheidegger, J. J. (1955): Une micro-methode de l'immuno-electrophoreses. Intern. Arch. Allergy, 7, 103-110.
- 9) 坪田宣之・小沢 光 (1977): トキソプラズマ

- 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.
- 10) Vesikari, T. and Vaheri, A. (1968): Rubella: a method for the rapid diagnosis of recent infection by demonstration of the IgM antibodies. Brit. Med. J., 1, 221-223.
- 11) Vyas, C. S. and Shulman, N. R. (1970): Hemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis. Science 170, 332-333.

**Abstract**

STUDIES ON NON-SPECIFIC REACTIONS IN *TOXOPLASMA*  
LATEX AGGLUTINATION TEST

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

(*Division of Body Defence, Tokyo Metropolitan Institute of  
Medical Sciences, Tokyo, Japan*)

Sera which contained hepatitis B and e antigens reacted non-specifically with latex sensitized with *Toxoplasma* antigens. The analysis with ultracentrifugation and inhibition test revealed that the factor which reacted with the antigens coated latex particles was hepatitis B virus involved in the sera. On the other hand, the substance in *Toxoplasma* antigens which reacted with hepatitis B virus was attributed to mouse serum albumin contained in the antigens.

Bovine serum albumin used in the test also reacted with sera containing hepatitis antigens as polymerized human serum albumin did. Thus, in the *Toxoplasma* latex agglutination test, possible occurrence of non-specific reaction due to hepatitis B virus antigens must be noticed.