

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

2. B型肝炎ウイルス陽性血清との 非特異反応の除去について

伊勢 やよい 飯田 孝 佐藤 功 栄
鈴木 貴和 嶋田 孝吉

(昭和57年12月7日 受領)

Key words: HBsAg, HBeAg, Latex agglutination test, non-specific reaction, anti-*Toxoplasma* antibody

緒言

ラテックス凝集反応を応用したトキソプラズマ抗体検出法は、B型肝炎ウイルス陽性血清と非特異反応を起こし、その原因として、HBe抗原陽性血清中のHBs抗原がラテックス粒子飽和剤であるウシ血清アルブミンと反応していることはすでに明らかにされている(伊勢ら, 1981)

本報では、上記非特異反応を除く方法として、HBe抗原陽性血清中のHBs抗原が会合ヒト血清アルブミンと強く反応することに着眼し、種々の検討を行ったので、その結果を報告する。また妊婦血清の上記非特異反応の頻度およびトキソプラズマ抗体以外のラテックス凝集反応についても検討したので併せて報告する。

材料および方法

(1) 被検血清

B型肝炎ウイルス陽性血清は東京都臨床医学総合研究所肝炎グループより、妊婦血清は都病産院より提供を受けた。

(2) トキソプラズマラテックス感作抗原

トキソプラズマ虫体膜より精製した抗原(有滝ら, 1981)を坪田, 小沢(1977)の方法に従っ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, 日本)も併用した。

(3) ヒト血清アルブミンの精製

ヒト血清アルブミン(HSA)の精製は図1に示す如く、Iwata *et al.* (1968)の方法に従い、トリクロル酢酸(TCA)およびエタノールを用いて行った。

(4) 会合HSA感作血球による凝集反応

会合HSA感作血球の作成はImai *et al.* (1979)の方法に従った。すなわち、10%の羊血球浮遊液40mlに等容のHSA(30mg/ml)を加え、2.5%グルタルアルデヒド20mlを滴下し、24°C 2時間反応させた後、PBS(pH 7.2)で3回洗浄後、1%正常家兎血清および1%サツカロース添加PBSに浮遊した。凝集反応は血清をマイクロプレートで希釈し、1%会合HSA感作羊血球25 μ lを加え、37°Cで1時間反応後、凝集像を観察した。

(5) ラテックス凝集反応試薬

リウマチ因子測定用試薬およびLE因子測定用試薬はハイランド社(USA)、CRP試薬は富士臓器社(日本)のものを使用した。

結 果

(1) グルタルアルデヒドによる会合HSA作成条件の検討。

図2に示した方法に従い、HSAをグルタルアルデヒドにより会合させる過程のうち、特に重要なHSAとグルタルアルデヒドの量関係について検討した。すなわち、5~40mg/mlのHSAに終濃度0.1~10.0%のグルタルアルデヒドを加え、37°C 1時間反応させた後、PBS

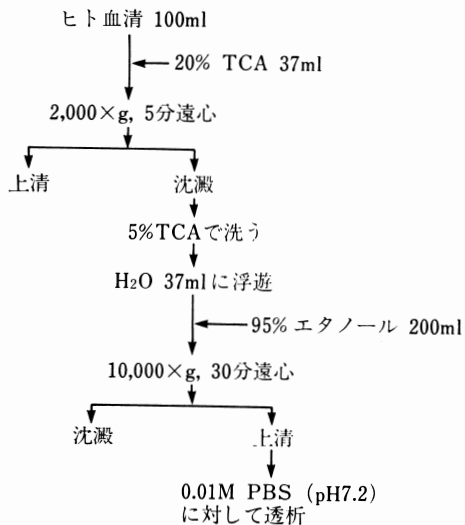


図1 ヒト血清アルブミンの精製法

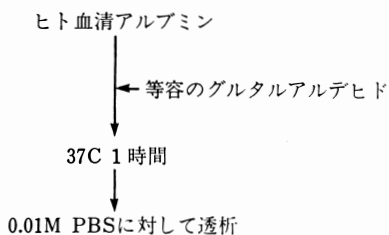


図2 会合ヒト血清アルブミンの作成方法

で透析し、未反応のグルタルアルデヒドを除去した。上記方法により調整した会合 HSA による HBs 抗原の吸収は以下の通りに行った。HBs 抗原陽性血清に等

表1 会合ヒト血清アルブミン作成における HSA とグルタルアルデヒドの量関係*

グルタルアルデヒド (%)	HSA (mg/ml)			
	5	10	20	40
0	8	8	8	8
0.1	7	6	3	0
0.2	3	3	3	0
0.4	3	2	2	0
1.0	2	2	0	ND†
2.0	2	1	0	ND†
4.0	2	1	0	ND†
10.0	2	0	0	ND†

* 結果は会合 HSA 感作羊血球により凝集を示した最終管を指数対数 log₂n で示した

† incubate 中ゲル化したため測定できなかつた

量の会合 HSA を加え、室温で2時間反応させた後、会合 HSA 羊血球に対する凝集抑制能により測定した。また会合状態は液体クロマトグラフィー (東洋ソーダ社、高速液クロ G3,000SW) により確認した。

表1に示す如く、HSA 濃度 10mg/ml 以下では4%以上のグルタルアルデヒドで会合させた場合でも HBs 抗原は完全に吸収し得るとは言い難く、20mg/ml では1%で、40mg/ml では0.1%のグルタルアルデヒドで会合させた場合、HBs 抗原は100%吸収された。また液体クロマトグラフィーにより会合状態を確認したが、HSA の会合状態は上記の結果と一致した。図3には HSA 20 mg/ml における液体クロマトグラフィーの溶出パターンを一例として示した。

以上の結果より以後の実験では、HSA 20mg/ml を1%のグルタルアルデヒドで会合した会合 HSA を使用し

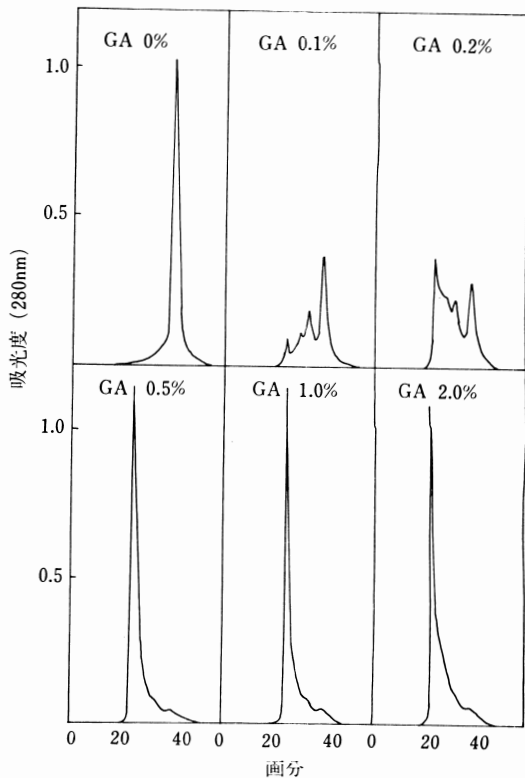


図3 HSA (20mg/ml) を各種濃度のグルタルアルデヒドで作成した会合 HSA の高速液体クロマトグラフィーによる溶出パターン。

カラム : TSK-Gel G3000SW 0.75×60cm
展開液 : 0.01M PBS (pH 7.2)
流速 : 1ml/min

た。尚、会合 HSA は 0.1% NaN_3 を加え、4 C で保存した。

(2) トキソプラズマラテックス凝集反応への応用。

我々は、トキソプラズマラテックス凝集反応での HBs 抗原による非特異反応を除去するために、従来のトキソプラズマラテックス凝集反応に使用する希釈液に会合 HSA を加えることを試み、その条件を検討した。

i) 希釈液に加える会合 HSA の濃度

HBs 抗原による非特異反応の吸収に必要な会合 HSA 量を調べるために、ラテックス凝集反応の希釈液に会合 HSA を 0.5 ~ 10.0% の割合に加え、HBe 抗原陽性血清、対照として抗トキソプラズマ抗体陽性血清および正常血清を希釈し、室温で 2 時間反応させた後、トキソプラズマラテックス感作抗原を加えその凝集価を測定した。

表 2 に示す通り、HBs 抗原による非特異反応は会合 HSA 濃度 1% で完全に吸収され、3% 以上では抗トキソプラズマ抗体価も低下した。従って非特異反応を取り除くための会合 HSA 濃度は 1% が最適であると考えた。

ii) 吸収に要する反応時間

血清と会合 HSA との反応時間が HBs 抗原による非特異反応吸収除去におよぼす影響を知るために、被検血清を 1% 会合 HSA 添加希釈液で希釈し、室温で 1 分 ~ 2 時間反応させた後、トキソプラズマラテックスを加えその凝集価を測定し、結果を表 3 に示した。

表から明らかなように、非特異反応の吸収は非常に早く、実際の試験では 10 ~ 20 分間の吸収で十分であると考えた。

表 2 各種濃度の会合 HSA による非特異反応吸収度*

会合 HSA (%)	被検血清		
	HBeAg(+)†	TOX(+)<‡	正常血清
0	6	7	0
0.5	2	7	0
1.0	0	7	0
2.0	0	7	0
3.0	0	6	0
4.0	0	6	0
5.0	0	5	0

* 結果はトキソプラズマ抗原感作ラテックスで凝集を示した最終管を指数対数 $\log_2 n$ で示した

† HBe 抗原陽性血清

‡ 抗トキソプラズマ抗体陽性血清

表 3 反応時間の検討

反応時間	被検血清		
	HBeAg(+)*	TOX(+)<‡	正常血清
0	6	7	0
1 min.	2	7	0
10 "	0	7	0
30 "	0	7	0
1 hr.	0	7	0
2 "	0	7	0

結果はトキソプラズマ抗原感作ラテックスで凝集を示した最終管を指数対数 $\log_2 n$ で示した

* HBe 抗原陽性血清

‡ 抗トキソプラズマ抗体陽性血清

表 4 妊婦血清のトキソプラズマラテックス凝集反応における非特異反応の頻度

処理方法			例数 (%)
無処理	protain A による吸収	会合 HSA による吸収	
-	-	-	2,039 (85.5)
+	-	+	311 (13.0)
+	+	+	13 (0.6)
+	+	-	21 (0.9)
総計			2,384 (100)

(3) 妊婦血清の抗トキソプラズマ抗体測定中における HBs 抗原による非特異反応の頻度

妊婦血清、2,384 例につきラテックス凝集反応による抗トキソプラズマ抗体価を測定した結果、345 例 (14.5%) が陽性であり、Protein A 法 (亀井, 1978) による IgM 抗体測定では 34 例が陽性であった。このうち会合 HSA の吸収操作により 21 例が陰性となり、全体の 0.9% を占めた (表 4)。この 21 例はすべて HBe 抗原陽性であった。

(4) その他のラテックス凝集反応を利用した測定法における非特異反応について

リウマチ因子測定 (RA test), LE 因子測定 (LE test) および CRP 測定 (CRP test) における HBe 抗原陽性血清との反応性について検討した。定性試験 (RA test は 20 倍希釈の血清, LE test, CRP test は原液血清を使用し, ガラス板法で行う) ではいずれも非特異反応を起こさなかったが、マイクロタイター法による定量試験で RA test において、HBe 抗原陽性血清群と陰性群との間に有意の差が見られた (表 5)。

表 5 HBe 抗原陽性血清と各種ラテックス凝集反応

	n*	RAtest	LEtest	CRPtest
HBe 抗原陽性群	20	5.3±0.4†	0	0
HBe 抗原陰性群	20	2.5±0.6†	0	0

結果は凝集を示した最終管を指数対数 $\log_2 n$ で示した

* サンプル数 † 平均値±標準偏差

考 察

ラテックス凝集反応は従来の赤血球凝集反応にくらべ、特異性、再現性において優れていると報告されている(坪田, 小沢1977; 亀井1978). また小林ら(1977)によつても色素試験や Jacobs and Lund (1957) 法による赤血球凝集反応との優れた定性的一致が認められており, すでに定量用測定キット(栄研化学)も市販されている. しかしながら, このラテックス凝集反応にも非特異反応が起こることが判明し, その原因として HBe 抗原陽性血清中の HBs 抗原が非特異的にラテックス感作抗原と反応していることが明らかにされた(伊勢ら, 1981).

そこで本研究は, 現在広く使用されているラテックス凝集反応によるトキソプラズマ抗体測定法を大幅に変えることなく, HBs 抗原による非特異反応を除く方法として会合 HSA を用いることを試み, その方法を実際行うにあつた条件および有用性を検討することを目的としたものである.

グルタルアルデヒドにより HSA を会合させる条件は, HSA の濃度によつて異つたが, 今回の検索では, 20mg/ml 濃度の HSA に対して最終濃度が 1% になるようにグルタルアルデヒドを加えた場合, ほぼ 100% HSA が会合すること, またこの条件下で作成した会合 HSA は, HBs 抗原と最も強く反応し, ラテックス凝集反応に用いる希釈液に 1% の割合に加えるだけで, ラテックス凝集反応における HBs 抗原による非特異反応は除去され, しかも抗トキソプラズマ抗体の検出を阻害しないことが確認された. また会合 HSA の保存は 4°C で十分であつた.

妊婦血清の抗トキソプラズマ抗体測定中における HBs 抗原による非特異反応は, 妊婦 2,384 例中 21 例 (0.9%) に見られた.

ところで, 妊婦のトキソプラズマ感染については妊娠中の初感染と妊娠前からの慢性不顕性感染を区別することは重要であり, その判断基準には IgM 抗体の有無が

指標となる. 我々は, 現在, IgM 抗体の測定には亀井(1978)の方法に従い, protein A による吸収法を用いているが, 本法は, protein A により IgG を吸収し, 残存する IgM の抗体活性を測定することを原理としている. ところが, protein A により HBs 抗原は吸収されず残存する. 妊婦 2,384 例の血清は protein A で吸収後, ラテックス凝集反応で 34 例が陽性を示したが, このうち 21 例は会合 HSA 添加により陰性となつた. すなわち, この 21 例は本法による抗トキソプラズマ IgM 抗体測定中に検出された HBs 抗原による非特異反応であり, 本法陽性 34 例中の 62% をも占めている. この結果, 残り 13 例が真に抗トキソプラズマ IgM 抗体を有するものと判断された.

現在市販されているラテックス凝集反応試薬のうち, RA test, LE test および CRP test はラテックス感作方法がトキソプラズマラテックス凝集反応と異なり, 飽和剤としての BSA を使用していない(Singer and Plotz, 1957). ラテックス凝集反応における HBs 抗原による非特異反応の原因として, 飽和剤である BSA もその一因であると考えられる(伊勢ら, 1981) ことから, LE test, CRP test で非特異反応が見られなかつたことは, 上述の考えを支持するものである. しかしながら, RA test での非特異反応の出現は, BSA 以外に非特異反応を惹起するものがあることを示唆している. 現在我々は RA test における非特異反応物質について検討中である.

ま と め

ラテックス凝集反応によるトキソプラズマ抗体検出における HBs 抗原による非特異反応を除くために, 会合 HSA を用いる方法を検討した. 実験の結果, (1) 会合 HSA の作成には, 20mg/ml の HSA に対して, 最終濃度が 1% になるようにグルタルアルデヒドを加える. (2) 上記方法で作成した会合 HSA をトキソプラズマラテックス凝集反応に使用する希釈液に 1% 加えることにより, HBs 抗原による非特異反応は除去される. (3) 妊婦血清 2,384 検体中のトキソプラズマラテックス凝集反応の非特異反応陽性の頻度は 0.9% で, この反応は会合 HSA を加えることにより全て消失した.

以上の結果から今回検討した方法を用いることで現在使われているラテックス凝集反応を大幅に変えることなく, HBs 抗原による非特異反応を除き, より特異的な反応としてのラテックス凝集反応を確立したと考える.

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, 557-562.
- 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 cooccurring with HBeAg. *Gastroenterology*, 79, 242-249.
- 3) 伊勢やよい・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) Iwata, T., Iwata, H. and Holland, J. F. (1968) : Isolation of albumin from human serum by means of trichloacetic acid and ethanol. *Clin. Chem.*, 14, 22-30.
- 5) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.*, 43, 308-314.
- 6) 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.
- 7) 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 (トキソテスト-MT) の検討. 寄生虫誌, 26, 175-180.
- 8) Singer, J. M. and Plotz, C. M. (1956) : The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.*, 21, 888-892.
- 9) 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全性. 寄生虫誌, 26, 276-285.

Abstract

STUDIES ON NON-SPECIFIC REACTIONS IN *TOXOPLASMA* LATEX
AGGLUTINATION TEST. 2. A METHOD FOR ELIMINATING
NON-SPECIFIC REACTIONS DUE TO THE PRESENCE
OF HEPATITIS B VIRUS ANTIGEN

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

(*Department of Biophylaxis, Tokyo Metropolitan Institute Medical
Sciences, Tokyo, Japan*)

In the previous paper, we reported that hepatitis B gntigen (HBsAg) positive sera containing hepatitis e antigen (HBeAg) reacted non-specifically with latex sensitized with *Toxoplasma* antigens.

In this study, a method for eluminating this non-specific reaction by absorbing the sera with polymerized human serum albumin (poly-HSA). The most efficient poly-HSA for this purpose was obtained by the incubation of 20 mg/ml of HSA with glutaraldehyde at a final concentration of 1%. Using 1% poly-HSA, the non-specific reaction disappeared completely in the test.

The non-specific reactions due to the presence of HBeAg were found in 0.9% of 2,384 serum samples from pregnant wemen and they were eliminated completely by the absorpition treatment mentioned above.