

## トキソプラズマ IgM 抗体検出用キット TOXOSTAT M の使用経験

亀井喜世子 濫谷敏朗

(平成 2 年 7 月 16 日掲載決定)

### 要 旨

トキソプラズマ症の IgM 抗体検出用としてアメリカ合衆国 Whittaker Bioproducts 社によって開発された酵素抗体法キットを用いて蛍光抗体 IgM 法と比較検討を行った。

その結果 TOXOSTAT M と蛍光抗体 IgM 法 (IFA-IgM 法) との間には被検血清 50 例中 45 例 (90%) に一致が見られた。また蛍光抗体 IgG 法で陽性の 23 例を用いて特異性を調べたところ 22 例 (96%) が IgM 抗体陰性となり優れた特異性のあることが判った。

また TOXOSTAT M と IFA-IgM 抗体価の間には、相関性が認められた。

このことより TOXOSTAT M はトキソプラズマ症患者の感染初期の診断、胎児における移行抗体の種類決定あるいはスクリーニングの目的などに使用し得るものと考えられる。

**Key words :** Toxoplasmosis, IgM antibody

トキソプラズマ感染初期抗体である IgM 抗体の測定には一般に蛍光抗体法 (IFA)<sup>1) 2)</sup> あるいは酵素抗体法 (ELISA)<sup>3) 4)</sup> が行われている。現在わが国で行われている IgM 抗体測定法のひとつは市販の蛍光抗体-IgG 測定用キットを代用する方法で、これは Protein A で IgG を取り除き、残りの抗体すなわち IgM を測定するものである。

今回、我々は、ELISA を応用する、新しく開発されたキット TOXOSTAT M を用いて、トキソプラズマ IgM 抗体を測定し、蛍光抗体 IgM 法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、蛍光抗体法でトキソプラズマに対する IgM 抗体価が 10 倍以上を示した血清と研究室感染あるいは食肉を摂取して感染し感染時期が明らかな患者血清 32 検体を用いた。コントロールとして蛍光抗体法で IgG のみ陽性と判定されたもの 23 検体および IgM、IgG のいずれも陰性の 18 検体を用いた。

#### 2. 方法

米国、Whittaker Bioproducts 社で開発された *Toxoplasma gondii* ELISA キット (商品名 TOXOSTAT M) を用い、以下の術式に従って行った。まず最初に、反応の障害となる IgG を除去するために、被検血清 10  $\mu$ l にキットに添付

されている前処理液を 150  $\mu$ l 加え、20~25°C で 30 分間放置後 1,000G で 10 分間遠心し、その上清を被検体とした。前処理の終わった基準血清 1 (陰性, OD550=0.09), 基準血清 2 (陽性 2, OD550=0.34), 基準血清 3 (陽性 3, OD550=0.45), リウマチ因子コントロール血清 (OD550=0.07), および患者血清のそれぞれ 50  $\mu$ l を希釈用プレートに入れる。ついで血清用希釈液 200  $\mu$ l を加え、良く混合した後、あらかじめトキソプラズマ抗原とコントロール抗原を交互に吸着させてあるウエルに各 100  $\mu$ l を分注する。このプレートを温室で 30 分間振盪した後、洗浄液 (PBS-Tween) で 2 回洗い、さらに同液を加えて 5 分間浸した後、洗浄液を捨て、酵素標識抗体 (抗ヒト IgM 結合アルカリフォスファターゼ) 100  $\mu$ l を加えて、温室で 30 分間振盪反応させる。これを PBS-Tween で 2 回洗浄し、同液に 5 分間浸した後、洗浄液を捨て、ついで酵素基質 (フェノールフタレン・モノフォスフェート, PMP) を各ウエルに 100  $\mu$ l づつ加えて温室で 30 分間振盪反応させる。最後に停止液 (リン酸三ナトリウム) 200  $\mu$ l を全てのウエルに加え良く混合して反応を停止させ、波長 550nm 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、トキソプラズマ抗原ウエルとコントロールウエルとの吸光度差から求めた。上記 4 種コントロール血清の ELISA 値が、定められた価を示した時はそのまま、価が一致しない時は基準血清 1, 2, 3 の OD 値から標準曲線を描き、これより各被検血清の ELISA 値を求めた。

結果の判定は、本キットマニュアルに従い ELISA 値  $\geq 0.36$  を陽性、 $0.25 \sim 0.35$  を疑陽性、 $\leq 0.24$  を陰性とした。

### 3. 蛍光抗体法

蛍光抗体法は間接法を用いた。トキソプラズマ感染3日目のマウス腹水を採取し、生理食塩水で3回遠心洗浄して上清を除き、トキソプラズマ虫体を含む沈渣を蛍光抗体用スライドに塗抹して乾燥後、抗原スライドとして $-80^{\circ}\text{C}$ に保存し随時使用に供した。抗原スライドは必要枚数だけ $-80^{\circ}\text{C}$ から取り出して室温になじませた後、5, 10, 20, 40, 80, 160倍と2倍段階にPBSで希釈した患者血清を $10\mu\text{l}$ づつ抗原スライド上に載せ、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。PBSで1, 3, 11分づつ計3回振盪洗浄後、蛍光色素標識抗ヒトIgM (Cappel社, 使用濃度20倍)を $10\mu\text{l}$ 載せ、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ、再びPBSで、1, 3, 11分間振盪洗浄した。グリセリン緩衝液を載せて、カバーガラスで覆い、蛍光顕微鏡で観察して、血清希釈10倍以上で蛍光を認めたものを陽性とした。

## 結 果

### 1. TOXOSTAT M と IFA-IgM の比較

TOXOSTAT M と IFA-IgM の結果を比較すると、表1にみられるように、定性的には50例中45例に一致がみられた。不一致とされた IFA で陽性、TOXOSTAT M で陰性の2例はそれぞれ IFA 値20倍、40倍 TOXOSTAT M による値は0.21, 0.11であった。また、IFA で陽性、TOXOSTAT M で疑陽性の3例の TOXOSTAT M の値はそれぞれ0.26, 0.32, 0.32であった。また ELISA 値と IFA による抗体価との間には図1に見られるように明らかな相関が認められた。

### 2. TOXOSTAT M の特異性

TOXOSTAT M の特異性を調べるために IFA-IgG のみが陽性の患者23例の検査を行った結果、22例 (95.6%) が TOXOSTAT M の値が陰性で1例は偽陽性を示した。このことは本試験が非常に特異性に優れていることを示している。

### 3. 感染時期が明らかな患者における TOXOSTAT M による IgM 抗体価の推移。

1978年5月30日トキソプラズマ抗体陰性であった患者が8月中旬に西独で生焼けのステーキを食し、トキソプラズマの初感染を受けたと思われる症例から経時的に採血した血清について抗体価の推移を色素試験 (DT), ラテックス凝集試験 (LA), IFA-IgG, ELISA-IgG, TOXOSTAT M で測定した結果を図2に示した。IgM 抗体は感染後約4週間目にピークに達し、以後徐々に減少し約2ヶ月後には完全に陰転している。ELISA-IgG, 色素試験に比べると TOXOSTAT M による IgM 値のピークは約3週間前に

表1 TOXOSTAT M と IFA の比較

		ELISA			合計
		+	±	-	
I F	+	27	3	2	32
	-	0	0	18	18
合計		27	3	20	50

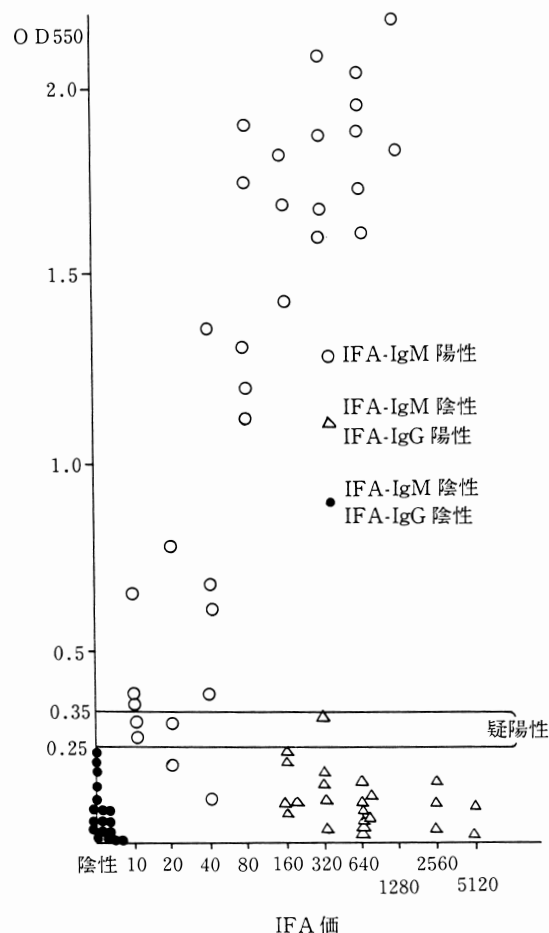
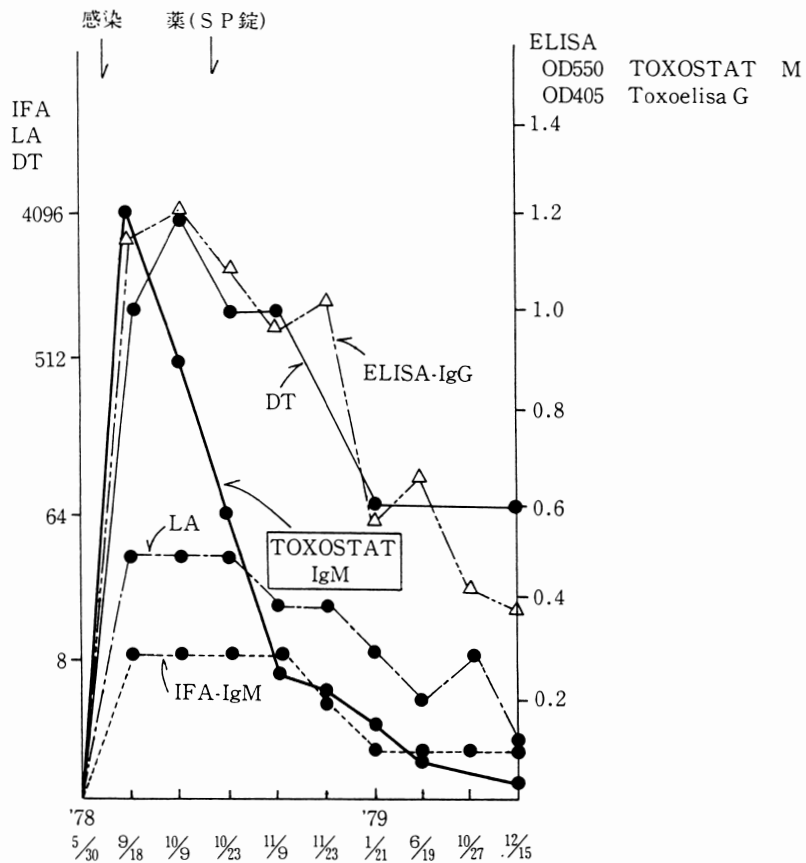


図1. TOXOSTAT M と IFA の比較



ELISA-IgG : Toxoelisa(米Microbiological Associates)  
で測定。OD405  $\geq 0.21$ 陽性, 0.19~0.20疑陽性  
LA : 栄研 LA  $\geq 32$ 倍 陽性

図2. 感染時期が明らかな患者におけるトキソプラズマ抗体価の推移

認められ、その後抗体価の減少が見られた。

### 考 察

従来、トキソプラズマ症の免疫学的診断法として色素試験が感度、特異性、再現性などの面で優れているところから、血清学的にトキソプラズマ症を診断せざるを得ない場合の標準とされて来た。しかしこの方法は操作そのものは簡単であるが、試験のつど生きた虫体を必要とするし、IgG、IgMなどのクラス別抗体の区別ができないなどの短所がある。

この他に赤血球凝集試験、ラテックス凝集試験、補体結合反応等も行われているが色素試験同様、抗体のクラス別けができないし、試験に要する時間が長く、結果判定まで

に長時間を要するものが多い。

蛍光抗体法は抗体のクラス別測定ができ、検査者が感染する危険性がないため比較的一般的に行われている方法であるが、結果判定の際に術者の主観が入る。蛍光顕微鏡が必要である。検体が多数である場合に一人の術者が1日に行い得る検体数に限界があるなどの難点が指摘されている。

今回われわれが検討した TOXOSTAT M キットは感度、術者に感染の危険がないこと、操作が簡単でキットに含まれている試薬、器具で試験ができるので施行する場所を選ばないこと、結果が分光光度計による吸光度(ちなみに分光光度計のない場所でも肉眼で判定できるほど結果は鮮明である)で示されるため、判定の際に、術者の主観が入らないこと、抗体のクラス別けが可能であること等の長所

が多い。

本実験では TOXOSTAT M の有用性を検討するにあたり、蛍光抗体 IgM 法との比較において検討した。現在わが国で市販されている蛍光抗体法のキットは全て IgG 抗体を測定するものであり、IgM 抗体を測定する場合は、Protein A で IgG をあらかじめ吸着して取り除き、残存抗体を測定するものである。その他、抗原塗抹スライドを作り間接蛍光抗体法を行う方法もあるが、この場合、生きたトキソプラズマ虫体を常時保持している研究施設でないと行い得ない。従って現在までのところわが国では血中トキソプラズマ IgM 抗体を測定することは不可能であった。TOXOSTAT M を導入することにより、これが可能になれば、感染初期抗体である IgM 抗体の有無をみることがトキソプラズマ症の初期診断に必要欠くべからざるものであることから、有意義と考える。

TOXOSTAT M は最初の IgG 吸収操作を入れて全行程約 2 時間半で結果が得られる。IgG の吸収操作は前日に行ってその遠心上清を  $-4^{\circ}\text{C}$  で保存が可能であるところから、検体多数の場合には吸収操作を前日に行い、以後の操作を翌日に行えば午前中に結果を得ることが可能である。更に従来の ELISA は反応温度が  $37^{\circ}\text{C}$  で恒温器が必要であったが、TOXOSTAT M は全行程室温での操作であるのでキットとマイクロピペット、振盪器などがそろっていればどのような所でも実施可能である。

更に、本試験を行うにあたり、要求されるテクニックはマイクロピペットによる試料の分注のみで高度に熟練し

た技術者を必要としない点も長所の一つと考えられる。

以上、TOXOSTAT M は、感度、特異性が高く、手技が簡単などの点からトキソプラズマ感染初期抗体である IgM 抗体価測定に充分利用できると考えられる。

最後に本研究で使用した TOXOSTAT M キットの提供を得た旭化成工業株式会社に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) Hermentin, K., Hassl, A., Picher, O. and Aspöck, H. (1989): Comparison of different serotests for toxoplasma IgM-antibodies (ISAGA, SPIHA, IFAT) and detection of circulating antigen in two cases of laboratory acquired toxoplasma infection. Zbl. Bakt. Hyg., A270, 534-541.
- 2) Filice, G.A., Yeager, A.S. and Remington, J.S. (1980): Diagnostic significance of Immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of Immunoglobulin M from Immunoglobulin G antibodies. J. Clin. Microbiol., 12(3), 336-342.
- 3) Joynson, D.H.M., Payne, R.A., Balfour, A.H., Prestage, E.S. and Fleck, D.G. (1989): Five commercial enzyme linked immunosorbent assay kits for toxoplasma specific IgM antibody. J. Clin. Pathol., 42, 653-657.
- 4) Santoro, F., Afchain, R., Pierce, R., Cesbron, Y., Ovlaque, G. and Capron, A. (1985): Serodiagnosis of toxoplasma infection using a purified parasite protein (P30). Clin. Exp. Immunol., 62, 262-269.

Abstract

EXAMINATION OF TOXOSTAT M AS NEW TOXOPLASMA DIAGNOSTIC KIT

KISEKO KAMEI AND TOSHIRO SHIBUYA

*Teikyo University School of Medicine, Department of Parasitology*

IgM detection Kit for toxoplasmosis using ELISA method developed by Whittaker Bioproducts U.S.A. (TOXOSTAT M) was compared for its efficacy with immunofluorescent IgM technique.

90% coincidence (45/50) was found between the results obtained by both IgM techniques.

Among 23 samples known as positive only for IgG by immunofluorescent technique, 22 (96%) were negative for IgM antibody by TOXOSTAT M suggesting superior specificity of this method.

Correlation was found between the values obtained by TOXOSTAT M and IFA-IgM antibody.

It could be concluded from the results that TOXOSTAT M is valuable for diagnosis of toxoplasmosis at initial stage of infection, for class determination of antibody in fetus transferred through placenta or for the screening of toxoplasmosis.