

トキソプラズマ感染に関する研究

トキソプラズマ IgM 抗体の検出法に関する研究

帝京大学医学部寄生虫学教室

常松之典 亀井喜世子

佐藤律子

帝京大学医学部小児科教室

中村健

目 的

トキソプラズマ(以下T)は慢性不顕性感染をおこすことが多いため、妊婦の初感染と出生児感染を診断するには、IgM 抗体の証明が必要であると考えられる。しかし、T症では感染経過に伴う IgM 抗体の消長はなお明らかではなく、また原理的に多くの証明法が考えられるとしても、臨床的に容易に実施しうる IgM 抗体検査法が確立されているわけではない。したがって、現状では先天T症の実態があいまいであり、初感染妊婦や先天症児の治療においても適確な処置が行えない憾みがある。我々は今回診断上の問題を解決するため、(1)ウサギを実験モデルとして、感染に伴う IgM 抗体の消長を IgM 分画および 2-mercaptoethanol 処理の二方法によって追求する。(2)人T症の診断を容易に実施しうる見込みのある IgM 抗体証明のための免疫酵素法の開発という二つの研究を行った。

方 法

実験1 ウサギの実験的感染における IgM 抗体の消長:

強毒RH株の感染ではウサギは2週間前に死亡するため、弱毒Beverley株感染4週間後、強毒株感染を行なう二重感染方法をとった。弱毒株感染後5日間経時的に採血、全血清、および Sephadex G-200 で分離した IgM 分画と IgM 分画ならびにそれらを 2-mercaptoethanol (2-ME) 処置して IgM を不活化した分画の各種について色素試験(DT)、間接

赤血球凝集試験(IHA)および補体結合試験(CF)を行なうことにより、IgM 抗体の消長と検査法としての IgM 分画、2-ME 処理の意義を検討した。

実験2 抗人 IgM 酵素標識抗体の作成と応用:

ウサギに注射する免疫原としては、Waldenstrom型 macroglobulinemia 患者の血清より純化した、IgM 分画を用いた。純化は蒸留水による沈澱洗浄法による。ウサギには初回蛋白量として 10mg を Freund's adjuvant と共に皮下注射、1ヶ月後 5mg を静注し、10日目に採血した。分離した血清はヒト臍帯血で吸収し、これを抗ヒト IgM 血清から硫酸ソーダによる塩析、洗浄をくりかえして Ig G 分画をつくり、PBS に溶解し、蛋白量 2mg に対し 5mg の Alkaline phosphatase を加え、PBS に対し透析後 25% glutaraldehyde を終濃度 0.2% になる様に加えて conjugate をつくり、conjugate は PBS、ついで Tris buffer (0.05M, pH 8.0) で透析し、10% 牛血清アルブミンと 0.02% azide の入った Tris buffer を加え 4ml とし、酵素標識抗ヒト IgM 血清として保存した。反応はトキソプラズマ HA 抗原で内面を感作したポリエチレン管に被検血清の稀釈を加えて2時間おき、洗浄、乾燥。標識抗体を加え3時間放置、未反応の標識抗体を洗浄して除き、乾燥。基質となる p-nitrophenylphosphate を加えて30分間反応後、カセイソーダを加えて反応をとめ水解された基質量を

分光光度計(400nm)で測定する。

結 果

実験1：全血清の血清試験ではHA抗体価は感染後2週目より上昇し始め3週目1,024倍5週目4,096倍7週目24,000倍と上昇し、以後長期にわたって48,000倍程度の高抗体価を持続した。DTではHAより早く抗体価が上昇し4~9週で32,000倍またはそれ以上の高抗体価を維持、以後漸減した。CFでは2週後抗体価上昇、6週目120倍のピークに達し以後急速に減少した。

全血清の2-ME処理による抗体価の低下はHA試験によってもっとも明瞭な結果がえられ、それによると3週目では1,024→128倍、4週目では1,024→256倍の如く明らかな低下が示されたが、5週目では4,096→4,096倍と低下はなく、以後も同様であった。Sephadex G-200の第一ピークにはIgM分画がふくまれるが、2-ME処理前と処理後のHA価の低下は3週目256→0倍、4週目125→4倍、5週目256→4倍の如く、全血清にくらべ一層顕著な差が認められる。IgGをふくむ第2ピークについては同様に4週目256→128倍、5週目512→256倍と若干の低下を認めるのみであった。

以上の成績からT感染におけるIgM抗体消長は、感染後2週後に出現し、3週目をピークとし、5週以降は検出困難の程度にまで低下すること、IgM抗体の検定にはHA試験がよく、全血清の2-ME処理、あるいは一層敏感であり正確な方法としてSephadex G-200によるIgM分画についての2-ME処理により行ない得る事が判明した。

実験2：ウサギの免疫に用いたWaldenströma型血清のIgM分画は、免疫電気泳動により抗人全血清ウサギ血清との間にIgMの沈降線の他に2本の線を認めた。このようなIgM分画でウサギを免疫して得た抗血清を臍帯血で吸収した後、硫酸ソーダでrG分画をとり人全血清に対して免疫電気泳動を行なうと、IgM一抗IgMの沈降線のみが認められた。酵素標識抗IgM抗

体の免疫電気泳動による解析は実施していないが、上記によりヒトIgMに対し特異性の高い標識抗体を作成しえたものと考える。

標識抗体の応用的価値の検討は適当な症例にめぐまれないために未実施にとどまっている。現在まで初感染例を見出しやすい群として2才未満の幼児104例について、スクリーニングとして血清についてHA試験を行なったところ、抗体価32倍以上が14例(13.5%)においてみられたが、32倍8例、64倍5例、256倍1例であり免疫酵素法の検査対象としては1例を除いては不適と考えられた。幼年陽性者についての先天感染か後天感染の区別およびこれらの症例の今後の運命については、内外共研究が少ないので、今後例数をふやしてフォローアップする計画である。

考 察

実験1。T感染に伴う抗体の消長は、ウサギの感染実験の成績からみると、一般の感染症の場合の如く、IgM抗体が感染初期2~5週間にかけて一過性に現われ、IgM抗体はこれに若干遅れて出現するが、以後急速に増加して高いレベルに達し、かつ長く存続することがうかがわれる。したがって、人の初期感染もIgM抗体の検出により診断しうる可能性があるものと考えられる。IgM抗体の証明法として実験1に述べた全血清よりIgMを分画し、その2-ME処理によるHA抗体価の低下をみる方法は、一つの代表的方法と考えられるが、今回のウサギの感染実験の如く比較的強い感染ならば、明瞭な結果がえられるものと期待されるとしても、その再現性、敏感性、繁雑性などについては、なお再考の余地が残されていよう。

実験2。免疫酵素法は免疫蛍光法、免疫放射線法と同じく、抗原に結合したIgM抗体を標識抗IgM抗体によって証明する原理にもとづくものであり、標識抗IgM抗体さえ作成すれば、各種の感染症におけるIgM抗体の検出に共通に適用しうる利点がある。今回は蛍光顕微鏡、放射線測定装置など特殊な機械装置を必要としない方法として免疫酵素法の有用性を検討すべく、アルカリフォスファターゼ標識の抗ヒトIgMを試作した。

物理化学的には抗ヒト IgM ウサギ γ G の段階において免疫電気泳動法で IgM に対して強い特異性があり、高層法によっても高い力価をもつことが認められた。試作品の実地への応用的価値の検討は、適当な症例にめぐまれないため未実施であるが、免疫酵素法が敏感性 (IgM の ng を検定しうる)、定量性 (酵素活性と IgM 抗体量の比例関係にある) にすぐれているので、その将来性が期待出来よう。

要 約

トキソプラズマによる妊婦の初感染、出生児感染の診断を的確に行なうには IgM 抗体の検出をすることが必要である。そこで感染に伴う IgM 抗体の出現状況および血清の 2-mercapto-ethanol (2-ME) 処理による抗体価の低

下を目標としての IgM 抗体価検出法の価値をウサギの感染実験をモデルとして追求し、また患者診断に現今もっとも有力と考えられる免疫酵素法のための酵素標識抗ヒト IgM ウサギ抗体を試作する実験を行なった。その結果ウサギのモデル実験においては、IgM 抗体は上記の方法によって赤血球凝集試験を行なえば感染後 3~5 週間の間は検出しうること、また酵素標識抗体は IgM myeloma 患者血清を抗原の出発材料とすれば、比較的簡単な方法で品質のすぐれた製品をつくりえる見込みを得た。2-ME 処理法、酵素免疫法の実際の価値は、今後実際の症例を集めて、比較検討する計画である。

↓ **検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

目的

トキソプラズマ(以下 T)は慢性不顕性感染をおこすことが多いため、妊婦の初感染と出生児感染を診断するには、IgM 抗体の証明が必要であると考えられる。しかし、T 症では感染経過に伴う IgM 抗体の消長はなお明らかではなく、また原理的に多くの証明法が考えられるとしても、臨床的に容易に実施しうる IgM 抗体検査法が確立されているわけではない。