

トキソプラズマ感染に関する研究

帝京大学医学部寄生虫学教室

亀井喜也子

トキソプラズマ(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。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、証明法も原理的には多くの方法が考えられるが、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。従って現状では先天性T症の実態があいまいであり、初感染妊婦や先天性T症児の治療においても適切な処置を行ない得ない憾があった。われわれはこの診断上の問題を解決するためIgM抗体の簡便な証明法として、(1)酵素抗体法によるもの、(2)ブドウ球菌プロテインAを用いてIgG抗体を吸収し残存抗体を測定する方法を開発し、実際に用いて良い結果を得ていく。

しかしながら、ここにいたり、T症診断に関し、種々検査法の乱用、検査結果の判断、結果の意義づけ等、検査法そのものにまつわる混乱が生じつつある。その混乱はわが国における検査制度に源を求める事が出来るのだが、現行でこの混乱を最少にくいとめるには検査法の標準化あるいは一本化、標準陽性血清の設定等いくつかの方法が考えられる。そこで検査法の標準化に近づくために、最近最も多く利用されていると思われる方法を、T症診断上、最も信頼のおける検査法である色素試験との相関性を求めることにより、さらに標準陽性血清はトキソプラズマ膜特異モノクロナル抗体を作成することにより解決出来ないかと考え、いくつかの研究を行ったので報告する。

実験 1

色素試験と間接ラテックス凝集反応、間接赤血球凝集反応、酵素抗体法の相関性に関して

【方 法】

色素試験：小林らの方法に準じたが、Accessory factor節約のため、すべてマイクロ化した。すなわち、1) 被検血清は生食水で1:4から4倍希釈法で希釈その0.01mlを96穴のマイクロプレートに分注、2) Accessory factor.008ml Alser液0.0012ml、生食水に所定数のトキソプラズマを浮遊させた液0.0008mlを、

1)に加え37℃1時間おく。1時間反応後、3) アルカリ性メチレンブルー液0.01mlを加え振とう混和する、4) 約10分室温に放置しプレート内容の1滴をスライドグラス上にとり、カバーグラスをかけ、400倍拡大で鏡検する。遊離虫体100個につき青染虫体(反応のおこっていない)不染虫体(反応のおこったもの)の比率を求め、不染虫体の比率が50%以上のもので、血清希釈の最高の希釈倍率をその血清の抗体価とした。このマイクロ化方法を用いることにより、従来、使用濃度80%、自然抗体すらもたないAFの入手困難が、本法を行う上での最大の難関であったが、使用量を1/10に減らすことが可能となり、同量のAF量で、今までの10倍の被検体を扱い得るようになった。

間接ラテックス凝集反応：わが国で最も普及しているT症診断用キット製品で栄研化学が製造販売している。添付の使用説明書に従っておこなった。1) 被検血清50μlを小試にとり、緩衝液栄研350μlを加えて8倍希釈液を作る。2) U字型マイクロトレイの1~9穴に緩衝液栄研をドロッパーで25μlずつ分注する(第9穴はコントロール)。3) あらかじめ8倍に希釈した被検血清を25μlのダイリューターにとり、2倍希釈系列で希釈する。4) ラテックス浮遊液“栄研”をよく振とうし、均一な懸濁液としたのちドロッパーを用いて1~9穴に一滴ずつ(25μl)滴下する。5) トレイをよく振とうして混和する。6) 室温に一夜放置後判定する。

間接赤血球凝集反応：わが国ではLewis and Kessel法とJacobs and Lunde法の改良法が主におこなわれているが、民間の検査センターで採用しているのはLewis and Kessel法を改良した医科研法である。1) ヒトO型(Rh+)赤血球をPBS(pH7.2)で3回洗浄後目盛つきスピッツ管に移し、血球量を求めその35倍のPBS(pH7.2)を加え3%血球浮遊液をつくる。2) 等量の10万倍希釈タンニン酸溶液を加え氷水中で15分反応させる。3) 2500回転3分遠心し上清をすて、沈渣をPBS(pH7.2)で2回洗浄後、生食水を加えてタンニン酸を加える前の量に戻す。4) 所定の濃度に希釈した抗原を等量加え、37℃15分反応させる。5) 2500回転3分遠心し上清をすて、6% NRSで抗原を

加える前の量に戻し感作赤血球とする。6) 被検血清は初濃度を32倍とし、4倍段階希釈で8,192倍までつくり、最後の1管は初濃度と同じ32倍の抗体のみの対照をおく。対照試験管には0.05mlの非感作赤血球を、その他の試験管には0.05mlの感作赤血球を入れる。7) 判定は室温に約2~3時間放置後におこない凝集の程度により判定する。

ToxoplasmaTM Toxoplasma gondii EIA test kit : M. A. Bioproducts (U. S. A)が製造、販売は旭メディカルMB開発部、1) キュベットをPBS/Tweenで洗浄、この際キュベットに空気が入らないよう注意、PBS/Tweenを入れて3分間放置後すてる。これを2回くりかえす。最後はティッシュの上においてキュベット内のPBS/Tweenをきれいに吸いとる。2) 250 μ lの血清希釈液をキュベットに入れる。3) 10 μ lの患者血清を抗原入りキュベットとコントロール用キュベットに入れる。3つの添付 calibraton sera (1.2.3) と control sera (A. B) も夫々10 μ l づつキュベットに入れる。3) 振とう器で1~2分攪拌後室温で45分放置、45分反応後内容をすて、PBS/Tweenで2回洗浄。4) 250 μ lの Alkaline phosphatase conjugated (Rabbit) anti-Human IgGをそれぞれのキュベットに入れる。室温で45分反応後内容をすてPBS/Tweenで2回洗浄。5) 250 μ lの para-Nitrophenyl phosphate (pNPP) を加え室温で45分反応させる。6) 0.4Nの NaOH 250 μ lをそれぞれのキュベットに加え反応を止め、1~1.5時間以内に波長405nmの比色計で吸光度を測定する。

〔結 果〕

患者血清約200名、正常人血清約50名につき色素試験を標準として相関関係を調べたところ、色素試験と間接ラテックス凝集試験、色素試験と間接赤血球凝集試験、色素試験とToxoplasmaTM Toxoplasma EIA testの相関係数はそれぞれ $\gamma=0.78$, $\gamma=0.57$, $\gamma=0.63$ という結果を得た。色素試験と比較して3法間に有意の差はなかった。

〔考 察〕

色素試験に比べて、他の3法は方法、材料の調製その他、安全かつ容易に行い得るが、恐らく使用抗原の精製度、あるいは使用するmedium等に起因するfalse positive, false negativeの問題があり、より確実にT症の診断を行うには、色素試験に優るものはな

いという成績を得た。今回採用したマイクロ色素試験を用いると最もネックとされていたAFの使用量も従来の1/10で済み、再現性の優れた特異反応を行うことが出来るが、もう一つの短所である生きた原虫が検査の都度必要でその維持がむずかしい。術者がたえず感染の危険性にさらされるという点に関しては依然として解決策はない。

実 験 2

標準陽性血清としてのトキソプラズマ膜特異モノクロナル抗体作成の試み

わが国ではトキソプラズマ診断に際し、その抗体測定法は種々行われていて、各自、独自の標準陽性血清を用いて検査をおこなっているのが実情である。検査法を一つにしぼる事が不可能な現在、陽性血清を標準化し、その供給ができれば、一步標準化に近づくと考え、色素試験の反応の場であると考えられるトキソプラズマ膜に着目し膜特異抗体を作成した。

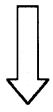
〔方 法〕

Balb/c マウスに加熱不活化原虫107をFreunds adj.と共に免疫1ヶ月後同量のadjなしの原虫でboosterを行い、3日後の脾細胞をハイブリドーマ作成に用いた。細胞融合に用いたマウス腫瘍細胞は国立予防血清研究所、腸内ウイルス、加藤先生より分与されたSp-2株を用いた。細胞融合は、1) マウスの脾リンパ球液を作成、赤血球は塩化アンモン緩衝液処理で除去後、mediumで3回洗浄、2) 1×10^7 腫瘍細胞に対して2倍量の脾細胞を加えよく混和遠心、培養上清をよく吸引除去する。3) ペレットをよく解きほぐし塊のないようにする。4) 37℃にあたためておいた50%PEG4000 (Sigma)と1ml dropwiseに加える。時々試験管をふる。5) 37℃1分放置後mediumを加え反応を止める。6) 96穴のウエルに脾細胞が 2×10^5 /ウエルとなるよう分注する。7) 翌日HAT mediumを0.2ml/ウエルずつ加える。8) 2~3日目mediumの半分をHATmediumに交換する。9) 約2週間後に半分をHTmediumに交換し、2~3日後から通常mediumにおきかえる。10) 蛍光抗体法、間接ラテックス凝集反応等により抗体産性ハイブリドーマを検索する。

〔結 果〕

現在までのところ、膜の反応を見ていると思われる蛍光抗体法のみで反応し、いわゆるsomatic抗原を使用している間接ラテックス凝集反応には反応しない抗

体産生細胞のクローン化に成功した。この抗体を用いて実用化可能であるかどうかについて更に検討をすすめていきたい。



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



トキソプラズマ(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。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、証明法も原理的には多くの方法が考えられるが、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。従って現状では先天性T症の実態があいまいであり、初感染妊婦や先天性T症児の治療においても適切な処置を行ない得ない憾があった。われわれはこの診断上の問題を解決するためIgM抗体の簡便な証明法として、(1)酵素抗体法によるもの、(2)ブドウ球菌プロテインAを用いてIgG抗体を吸収し残存抗体を測定する方法を開発し、実際に用いて良い結果を得ていく。

しかしながら、ここにいたり、T症診断に関し、種々検査法の乱用、検査結果の判断、結果の意義づけ等、検査法そのものにまつわる混乱が生じつつある。その混乱はわが国における検査制度に源を求める事が出来るのだが、現行でこの混乱を最少にいくとめるには検査法の標準化あるいは一本化、標準陽性血清の設定等いくつかの方法が考えられる。そこで検査法の標準化に近づくために、最近最も多く利用されていると思われる方法を、T症診断上、最も信頼のおける検査法である色素試験との相関性を求めることにより、さらに標準陽性血清はトキソプラズマ膜特異モノクロナル抗体を作成することにより解決出来ないかと考え、いくつかの研究を行ったので報告する。