

新しいトキソプラズマ IgM 抗体検出法による妊婦の Tp 急性感染と先天性 Tp 障害児の出生状況に関する研究

長崎大学熱帯医学研究所内科

松本 慶蔵 土橋 賢治
鈴木 寛 中島ひとみ

はじめに

トキソプラズマ (Tp) 特異 IgM 抗体を保有する急性感染妊婦より、先天性 Tp 障害児出産の可能性があるとされるが、我が国においては、その実態は十分に解明されているとはいえない。その大きな原因として、今日まで十分に信頼しうる Tg IgM 抗体検出法が確立されていないことがあげられる。そこで我々は、感度・特異性が極めて秀れ、しかも簡便な Tp IgM 酵素抗体法を新たに確立し、本法を用いて長崎市における妊婦の Tp 急性感染と、先天性 Tp 障害児の出生状況に関して研究を行った。

1. トキソプラズマ IgM 酵素抗体法の確立

今日まで我々は Tp IgM 抗体検出法として、Protein A 処理血清検体を、IHA 法・LA 法にて検索してきたが、感度・特異性の面で問題があった。そこで酵素抗体法 (ELISA 法) に着目し、従来の Tp IgM 検出法に比べ、感度・特異性が極めて秀れた Tp IgM ELISA 法を確立した。具体的には蔗糖密度勾配遠心法並びに Tp 虫体による吸収試験で、確実に Tp IgM 抗体の存在が確認されたリンパ節炎患者血清を用い、抗原として現在市販されている IgG ELISA 製品を使用した。種々の予備実験を行い下記の方法にて、Tp IgM 抗体が容易に検出されることが判明した。抗原プレートとしてトキソエライザ・テスト・キットのキューベット (M. A. Bioproducts・旭メディカル) を使用した。まず被検血清は、偽陽性・偽陰性反応の出現を防止する目的で、Protein A 処理 (アブソープ G・化血研) を行い IgG 成分を除去した。次に血清希釈液 250 ml を Tp 抗原とコントロール抗原が交互に吸着されているウエルに分注し、これに先の Protein A 処理血清検体 20 μ l ずつを加える。又、Tp IgM 抗体陽性の 1 \times 、2 \times 、5 \times 、10 \times 、20 \times の 5 段階希釈標準血清検体も個々にウエル

に添加し、37 $^{\circ}$ C の 卵器の中で 1 時間静置する。ついでリン酸緩衝液 (PBS Tween) でウエルを洗浄したのち、抗ヒト IgM アルカリフォスファターゼ標識抗体 (SIGMA) を PBS にて 500 倍に希釈した上、250 μ l ずつ各ウエルに分注する。37 $^{\circ}$ C に 1 時間静置し、その後再び PBS Tween で洗浄し、酵素基質液 (P-ニトロフェニルリン酸) 250 μ l ずつを各ウエルに分注する。20 $^{\circ}$ C に 45 分間静置したのち各ウエルに IN \cdot NaOH 液 250 ml を加えて反応を停止させ、波長 405 nm における吸光度を分光光度計で測定する。被検検体の Tp IgM ELISA 値は Tp 抗原ウエルとコントロール抗原ウエルとの吸光度差により求める。その ELISA 値は、標準検体より得られた回帰直線によって抗体価に換算すると同時に、実験条件の差によって異なる ELISA 値の補正操作を行う。

本法における血清希釈液、リン酸緩衝液、酵素基質液は、すべて本製品に備っており、洗浄等の具体的操作も、Tp IgG ELISA 値測定時の本キット操作法と同一である。新たに購入するものとしては、Protein A および抗ヒト IgM アルカリフォスファターゼ標識抗体のみである。本法で測定した場合、かなりの率で Tp IgM 抗体陽性検体が発見されるため、各施設で容易に標準検体は入手することができる。標準検体の各希釈段階の ELISA 値は、対数グラフに 2 相性の回帰直線を示し、これを用いて各検体の ELISA 値を抗体価に換算することができる。標準直線は各実験ごとに求めることが必要で、この操作によって実験条件によって多少異なる ELISA 値の補正がなされ、実験誤差を小さくすることができる。

2. Tp IgM ELISA 法による Tp 急性感染妊婦の検索

1976 年 12 月より 1983 年 9 月までに得られた血清 3728 検体を対象に以下の研究を行

った。本 IgM ELISA 法における Tp IgM 抗体陽性限界値の設定として、IHA、Dyetest、IgG ELISA 法で、いずれも Tp 抗体陰性であった血清 18 検体を本法にて測定し、Tp IgM 抗体価 9.1 倍以上を Tp IgM 抗体陽性検体とした。

今回の対象血清 3728 検体からの Tp IgM 陽性検体の検出法として、まず全検体を間接赤血球凝集 (IHA) 法 (トキソ HA-KW・協和) にて Tp 全抗体価を測定した。その IHA 抗体価分布を Fig.1 に示した。次に、Tp 急性感染においては、Tp IgM 抗体の出現とともに高い IHA 抗体価を示すであろうとの考えのもとに Fig.1 の () 内に示した、主に高い IHA 抗体価を示す 286 血清検体を取り出し、本法にて Tp IgM 抗体価を測定した。その結果 Tp IgM 陽性検体は 66 検体発見され、その分布は Fig.1 に示すごとく、IHA 抗体価 $80 \times \cdot 1$ 検体、 $160 \times \cdot 2$ 検体、 $320 \times \cdot 8$ 検体、 $640 \times \cdot 6$ 検体、 $1280 \times \cdot 17$ 検体、 $22560 \times \cdot 32$ 検体であった。この Tp IgM 抗体陽性の 66 検体の中には、同一症例より経時的に採血した検体もあり、最終的には 35 症例から Tp IgM 抗体が検出された。この 35 症例の中で妊婦は 31 症例であり、その中で妊娠および出産後の経過を知り得た者は 23 症例であった。Table 1 にその概要を示している。人工中絶、自然流産が 1 症例ずつ見られたが、残りの 21 症例においては、妊娠および出産後の経過は順調で、母児共に異常は認められていない。この中で、すでに出産後 1 年以上を経た 8 症例の母児 (Table 1 に *印で示す) を対象として、さらに詳細な検索を行った。結果は母親においては現在も $640 \times$ から $20480 \times$ の高い IHA 抗体価を示したが、子供においては 8 症例全員が IHA 抗体陰性であり、Tp 原虫の先天感染を否定するものであった。さらに現時点における母児血清中の Tp IgM 抗体価を、この 8 症例で測定した。その結果、子供では全例 Tp IgM 抗体は検出されなかったが、母親においては出産後 1 年以上を経ても高い Tp IgM 抗体価を示す症例が存在していた。その特異性に関しては蔗糖密度勾配遠心法にて確認している。

以上の結果より、我々の確立した Tp IgM EL

ISA 法にて Tp IgM 抗体を検出した 21 症例の妊婦においては、まだ検索の途中であるが、一例も顕性の先天性 Tp 障害児の出生を見ていない。又、問題点として、検索過程で明らかになったごとく、本法にて検出される Tp IgM 抗体は、今日までの Tp IgM 抗体の経過と異り、極めて長期間患者血清中に残存することが判明した。従って、今後本 IgM ELISA 法を臨床的に用うるには、本法によって検出される Tp IgM 抗体の意義に関する検討が必要であり、現在さらに研究をすすめている。

Fig 1 : Distribution of Specimens in each IHA titer and Protein A treatment Serum.

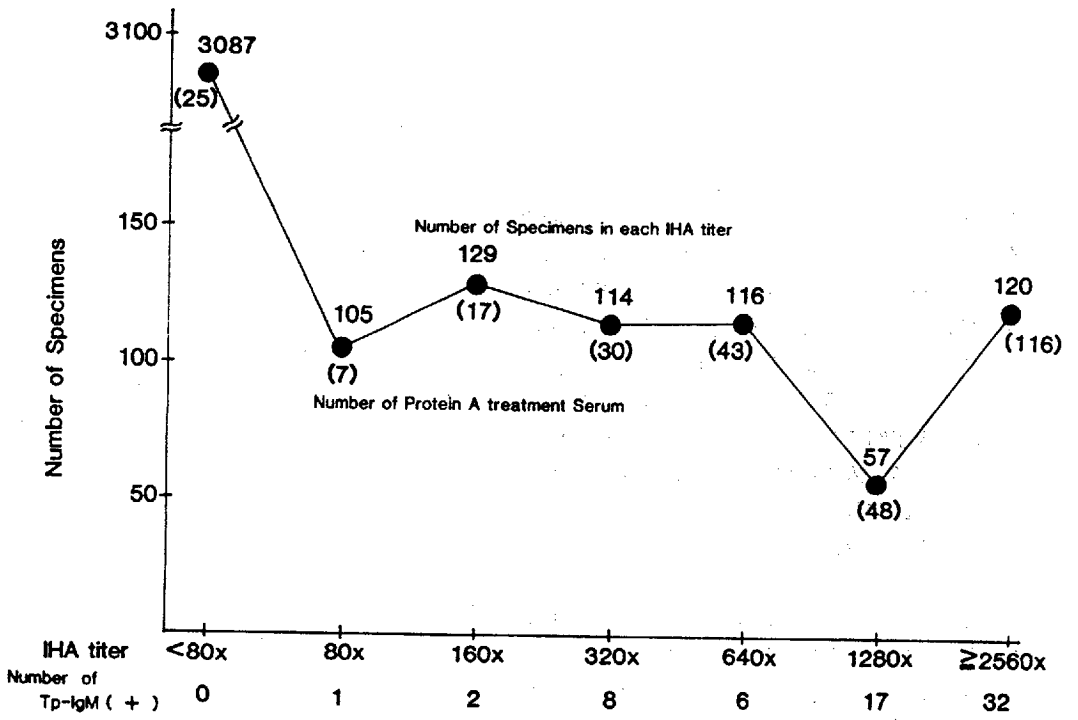


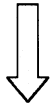
Table 1. Progress of mother and child (I)

Name	Age	IHA titer	IgM ELISA titer	Progress
M.K.*	35	2560x	62.2x	Healthy
E.N.*	27	10240x	42.7x	
M.K.	26	640x	36.0x	
E.Y.*	28	5120x	27.0x	
Y.M.	27	320x	23.0x	
Y.K.	22	320x	20.9x	
M.T.	30	2560x	20.3x	
S.I.*	37	1280x	19.7x	
K.I.	32	160x	17.8x	
T.Y.*	28	1280x	15.8x	
T.U.	31	2560x	14.4x	
R.I.*	27	2560x	14.3x	

Table 1. Progress of mother and child (II).

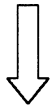
Name	Age	IHA titer	IgM ELISA titer	Progress
T.K.*	25	640x	13.5x	Healthy
T.Y.	28	640x	12.8x	
T.Y.	28	1280x	11.4x	
K.S.*	26	1280x	10.5x	
S.H.	36	320x	10.4x	
N.K.	29	1280x	10.2x	
M.I.	26	1280x	10.0x	
A.K.	24	2560x	10.0x	
N.I.	34	640x	9.1x	
K.Y.	38	2560x	15.4x	
C.N.	34	10240x	23.1x	Abortion

* : put into detailed examination



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



はじめに

トキソプラズマ(Tp)特異 IgM 抗体を保有する急性感染妊婦より、先天性 Tp 障害児出産め可能性があるとされるが、我が国においては、その実態は十分に解明されているとはいえない。その大きな原因として、今日まで十分に信頼しうる Tg IgM 抗体検出法が確立されていないことがあげられる。そこで我々は、感度・特異性が極めて秀れ、しかも簡便な Tp IgM 酵素抗体法を新たに確立し、本法を用いて長崎市における妊婦の Tp 急性感染と、先天性 Tp 障害児の出生状況に関して研究を行った。