

## トキソプラズマ IgG抗体価測定における酵素抗体法 (Toxo ELISA Test Kit) に関する検討

鈴木 寛, 土橋 賢治, 宮崎 昭行,  
中島 ひとみ, 松本 慶蔵

長崎大学熱帯医学研究所・内科

Evaluation of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Toxo ELISA Test Kit) for the Diagnosis of Toxoplasmosis

Hiroshi SUZUKI, Kenji TSUCHIHASHI, Teruyuki MIYAZAKI, Hitomi NAKASHIMA and Keizo MATSUMOTO

Department of Internal medicine, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

**Abstract:** A commercial ELISA-KIT newly developed for the diagnosis of Toxoplasmosis was evaluated by comparing with Dye test and Indirect hemagglutination test (IHA test). A qualitative agreement rate of 93% (65/70) was observed between Dye test and ELISA. But only 76% (53/70) was observed between Dye test and IHA test. So Sensitivity and Speciality of ELISA were almost equal to Dye test, but superior to IHA test especially in low antibody titer.

ELISA value showed plateau in high antibody titer. So we had to dilute the serum of which titer was more than 1280× of IHA test in order to measure the transition of Toxoplasma antibody titer exactly. And that the tecnic of ELISA was very complicated. In general clinical examination IHA test was more convenient than ELISA. So we use ELISA only in special case. And usually use for another purpose to measure specific IgM antibody which appearance in acute Toxoplasmosis.

*Key words:* Toxoplasmosis, Serological Diagnosis, IgG ELISA, IHA test, Dye test.

Tropical Medicine, 25(2), 91-97, June, 1983

### はじめに

今日トキソプラズマ (Tp) 症の血清学的診断法として Dye test, 蛍光抗体法, 補体結合反応, ラテックス凝集反応, 間接赤血球凝集反応 (IHA 法) が行われている。しかし各検査法で種々の問題点が指摘されており, 決して充分なものとは言いがたい。近年酵素抗体法 (ELISA 法) が, その高い感度・施行場所を選ばぬこと・危険がないこと・比較的安価

であること・クラス別抗体識別が可能であるなどの理由から, 次第に臨床検査に用いられるようになっていく。すでに我が国においても Tp-IgG ELISA 法の製品がキットとして市販されている。これを用いて Tp 抗体価測定の基準法とされる Dye test 及び, 現在最も我が国で臨床検査法として広く用いられている IHA 法との比較検討を行った。又実際の臨床応用での ELISA 法の意義についても検討を加えることとした。

## 検査対象

先に我々が報告した(鈴木・1983) Dye test にて Tp 抗体価を測定した190検体の中から各抗体価の検体数の分布が均等になるように70検体を無作為に選出し、IgG 酵素抗体法 (IgG-ELISA 法) と Dye test・間接赤血球凝集反応 (IHA 法) の相関を見た。症例の検討として Tp 症によるリンパ節炎患者の1症例を昭和52年より今日に至るまで約7年間の長期にわたって追跡調査を行い、その間に経時的に採血し-20°C にて凍結保存している血清23検体を用いて IHA 法及び IgG ELISA 法にて、Tp 抗体価の推移を調べた。

## 検査方法

### 1. 間接赤血球凝集反応 (IHA 法)

日本凍結乾燥研究社にて製造され協和薬品工業より市販されているトキソ HA-KW を、その使用方法に従って用いた。

### 2. Dye test

小林の変法 (小林・1969) にて行った。

### 3. IgG 酵素抗体法 (IgG ELISA 法)

M. A. BIOPRODUCTS にて製造され旭メディカル社にて輸入市販されているトキソエライザ・テスト・キットを使用した。すなわち血清希釈液250  $\mu$ l を Tp 抗原とコントロール抗原を交互に吸着させてあるキュベットのウェルに分注し、これに被検血清5  $\mu$ l ずつを Tp 抗原ウェルとコントロール抗原ウェルに加え、また本 kit 付属の陽性コントロール (高力価, 低力価) と陰性コントロールの三種血清を別々にウェルに添加し、20~25°C で2時間静置する。ついでリン酸緩衝液 (PBS Tween) でウェルを洗浄したのち、酵素標識抗体 (抗ヒト IgG 結合アルカリフォスファターゼ) 液250  $\mu$ l を各ウェルに分注し、20~25°C に2時間静置する。再び PBS-Tween で洗浄し、酵素基質 (P-ニトロフェニルリン酸) 液250  $\mu$ l ずつを各ウェルに分注する。20~25°C に45分間静置したのち、各ウェルに3N・NaOH 液50  $\mu$ l 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。被検血清の ELISA 値は、Tp 抗原ウェルとコントロール抗原ウェルとの吸光度差により求める。ただし、その場合、上記三種コントロール血清による

ELISA 値が、定められた許容範囲内になければならない。判定は使用法に従い、ELISA 値0.21以上を陽性とした。

## 成績

### 1. IgG ELISA 価と Dye test 価の相関

先に述べた血清70検体の Tp 抗体価を IgG ELISA 法を用いて測定した。(Fig. 1) IgG ELISA 値0.21以上・Dye test 16倍以上を陽性とした場合、Dye test と ELISA 法の陽性及び陰性の一致率は70検体中65検体・93%と高率であった。残りの5検体の内容を見ると、Dye test 陽性・ELISA 法陰性3検体、Dye test 陰性・ELISA 法陽性2検体の結果であった。

各 Dye test 抗体価の ELISA 値をみると、Dye test 16倍では、 $0.36 \pm 0.13$ 、64倍では $0.59 \pm 0.18$ 、256倍では $0.82 \pm 0.18$ 、1024倍では $1.63 \pm 0.16$ であり、一方 Dye test 4倍以下の陰性血清では $0.16 \pm 0.06$ と低値を示し、Dye test 抗体価が高くなるにつれて、ELISA 値もより高値となった。

### 2. IHA 価と Dye test 価の相関

先の70検体に対して IHA 抗体価を測定し、IHA 法と Dye test の相関を検討した。(Fig. 2) IHA 法160倍以上・Dye test 16倍以上を陽性とした場合、その一致率は70検体中53検体・76%であった。残りの17検体は、Dye test 陽性・IHA 法陰性16検体、Dye test 陰性・IHA 法陽性1検体で、IHA 抗体陰性群の中に多数の Dye test 抗体陽性検体が存在していた。今日まで Dye test が感度・特異性において最も秀れており、Tp 抗体価測定の基準法とされているが、以上の成績からも IHA 法は Dye test に比して、かなりその感度・特異性の点で劣るものと推測される。

### 3. IgG ELISA 価と IHA 価の相関

先の70検体に高い IHA 抗体価を示す23検体を加え、93検体についてその相関を調べた。(Fig. 3) 各 IHA 抗体価検体における ELISA 値は、IHA 80倍以下 $0.20 \pm 0.10$ 、80倍 $0.58 \pm 0.11$ 、160倍 $0.67 \pm 0.21$ 、320倍 $0.73 \pm 0.21$ 、640倍 $0.91 \pm 0.14$ 、5120倍 $1.53 \pm 0.19$ 、10240倍 $1.60 \pm 0.12$ 、327680倍 $1.51 \pm 0.16$ の値を示した。ELISA 値0.21、IHA 160倍以上を抗体陽性とした場合、IHA 抗体陰性36検体の

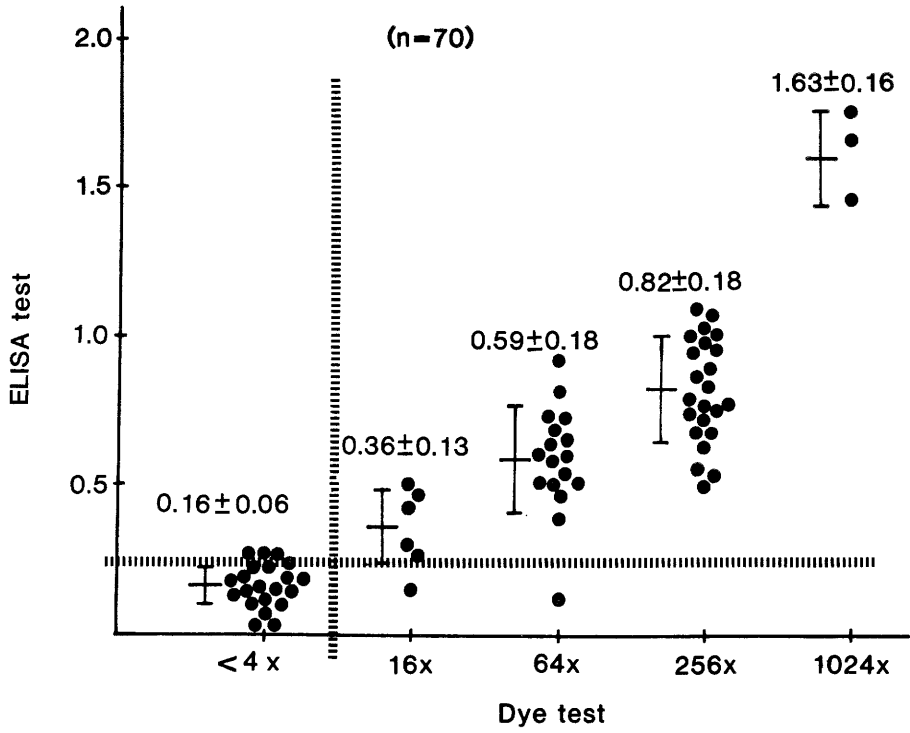


Fig. 1 Correlation between Dye test and ELISA test

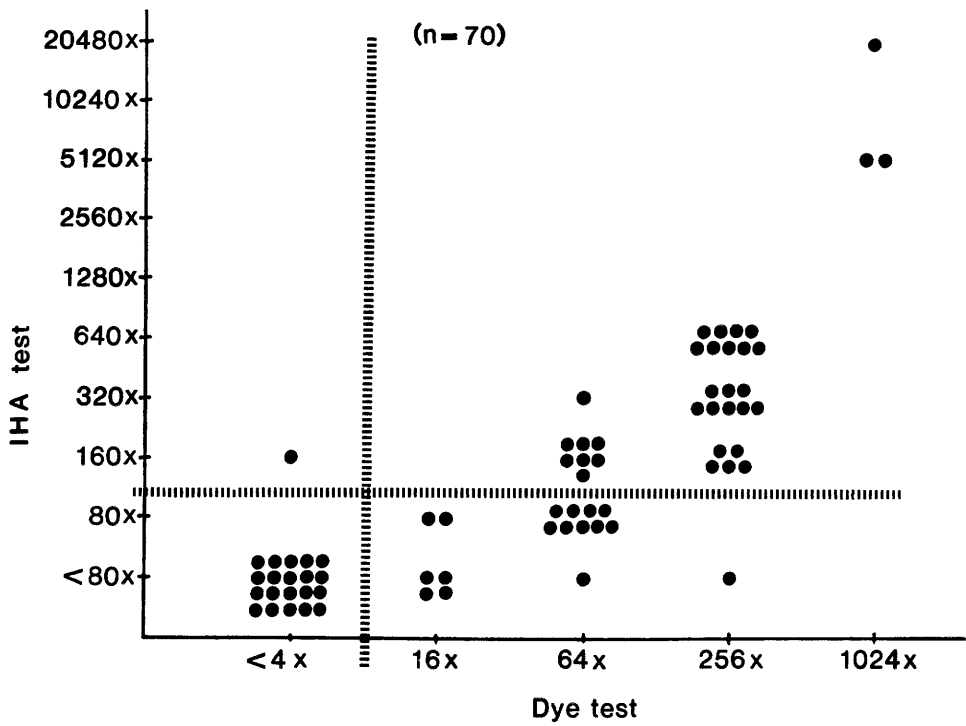


Fig. 2 Correlation between Dye test and IHA test

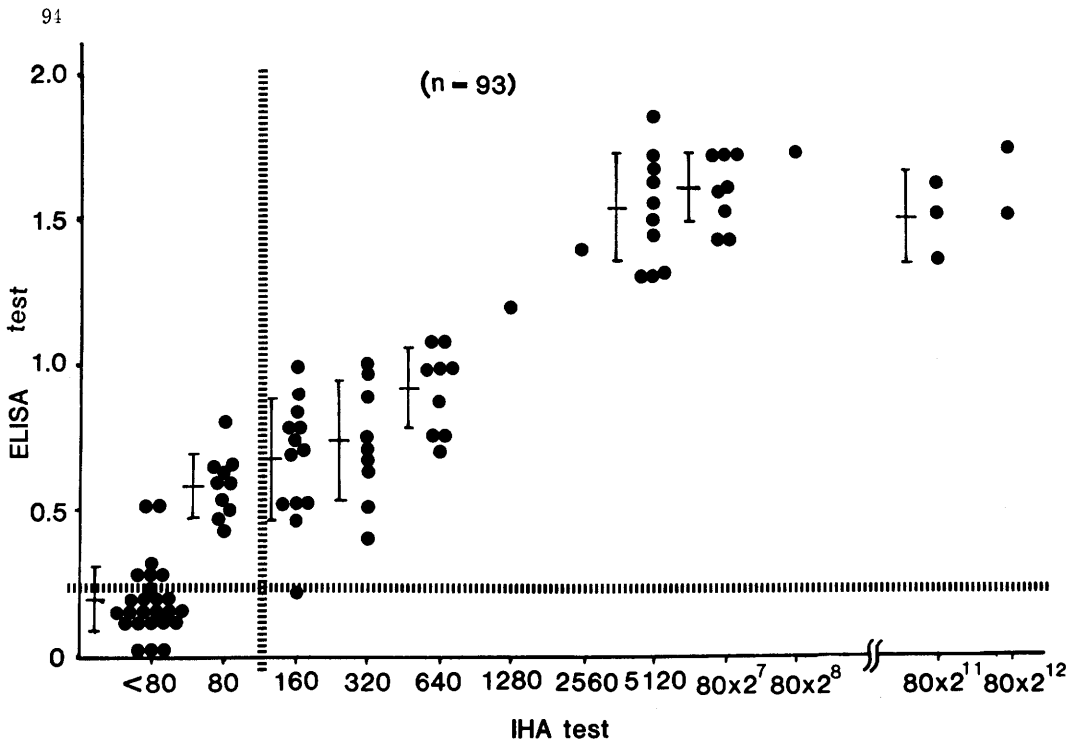


Fig. 3 Correlation between ELISA test and IHA test

Case: C.N., 37y.o., F., Toxoplasmosis

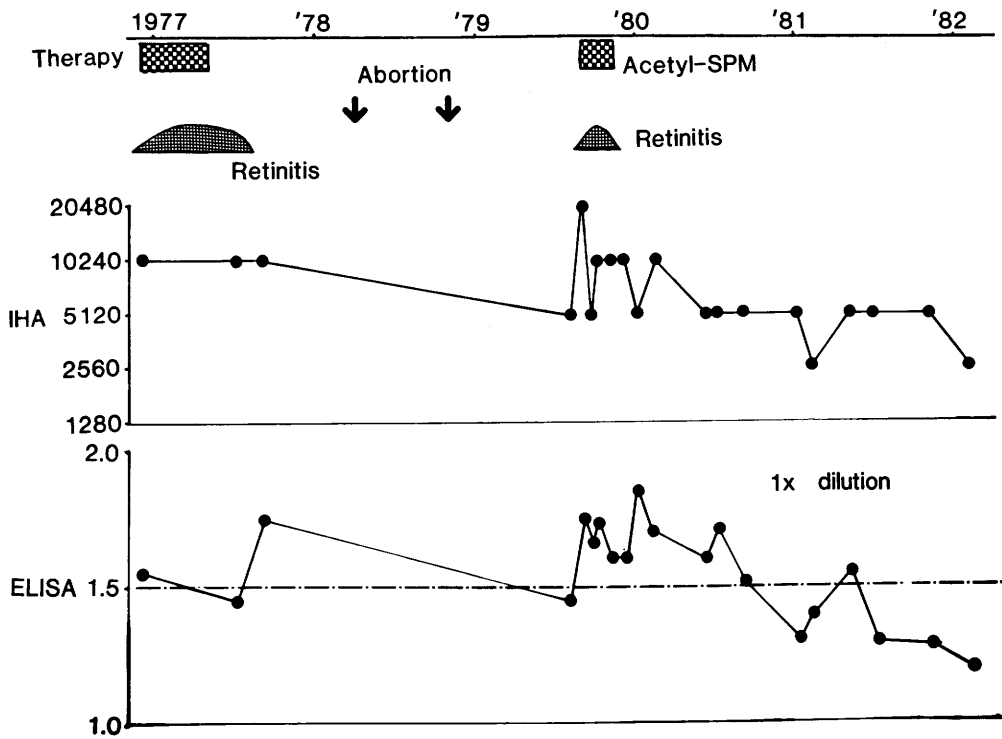


Fig. 4 Transition of IHA titer and ELISA value (Serum dilution 1x)

中で ELISA 法では抗体陽性を示す検体が17検体存在しており、IHA 法80倍の10検体は ELISA 法では、すべて陽性値を示している。Fig. 1 において ELISA 法の感度・特異性が Dye test との比較において、ほぼ同等であることが実証されたが、本成績より IHA 法は ELISA 法に比してかなり劣っていると言える。

次に ELISA 法の問題点として、IHA 抗体価 2560 倍以上の高い抗体価を示す検体では、ELISA 価はほぼプラトーの状態を示した。つまり IHA 抗体価 1280 倍以上の高い抗体価血清では、ELISA 値に差が見られず正確な抗体価の推移を知ることができない。従って高い IHA 抗体価を示す検体には、あらかじめ希釈操作を加えた上で ELISA 法を行う必要があると考えられる。

#### 4. 症 例

39才・女性・1977年より Tp 症によると思われる網脈絡膜炎・流産を繰り返し、今日まで約7年間にわたって、急性増悪の早期発見・治療を目的として追跡調査を施行している。本患者より経時的に採取した血清23検体について、IHA 抗体価及び IgG ELISA 値を測定した。(Fig. 4) 本症例の IHA 抗体価は2560倍以上の高値を示すために、IgG ELISA 値測定にあたって血清希釈操作を行い測定した。

Fig. 5 には16倍の血清希釈操作を施行して得られた成績を示した。1979年の網膜炎の再増悪に一致して IHA 及び ELISA 値の上昇が見られ、IHA 法に比して ELISA 値・特に希釈操作を加えることにより臨床症状に極めて一致した抗体価の推移が示された。

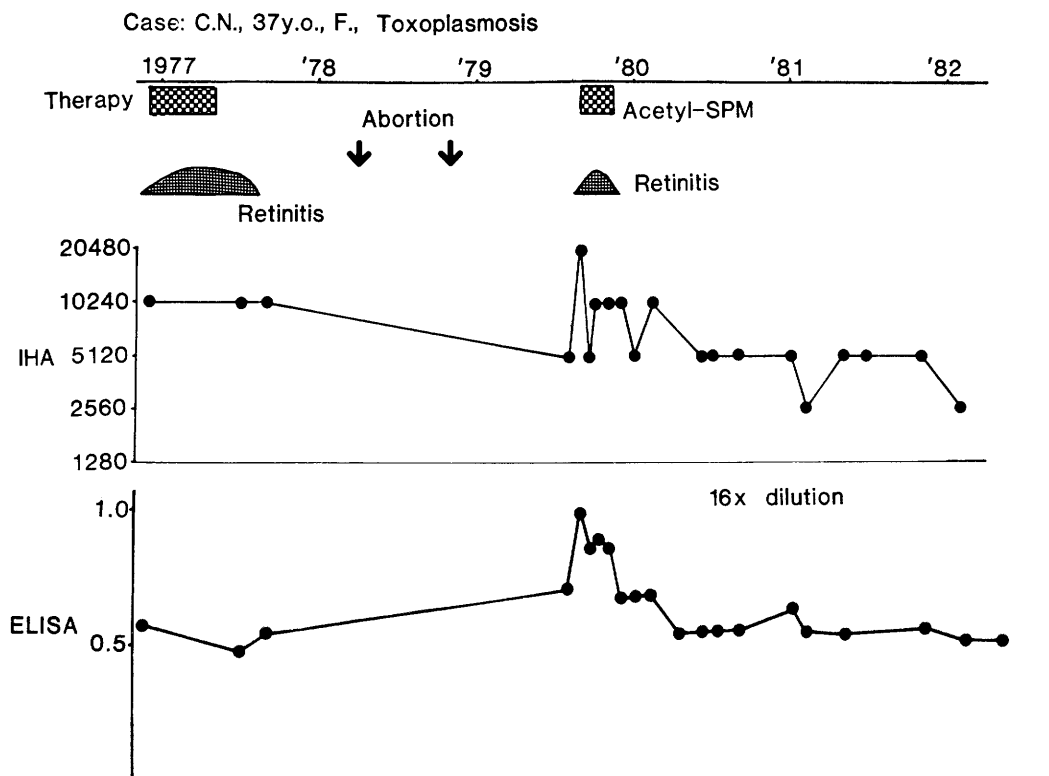


Fig. 5 Transition of IHA titer and ELISA value (Serum dilution 16x)

## 考 察

小早川 (1981) は本 IgG ELISA 法に関して、先に検討を行い Dye test との間で46検体中44例に、IHA 法との間では100検体中92例に完全な定性的一致を見、推計学的にも有意の相関が見られたとしている。我々の成績では IgG ELISA 値と Dye test 値の一致率は70検体中65検体・93%、IHA 値との一致率は93検体中75検体・81%で前者よりやや低い値であった。IHA 抗体価80倍以下の陰性36検体中17検体が Ig G ELISA 法では陽性域に入り、IHA 法と Dye test との比較においても、IHA 法で陰性36検体中16検体が Dye test で陽性域に属していた。つまり IHA 法は Dye test 及び ELISA 法に比して感度が悪く、そのため Tp 抗体価の低い検体を見おとす可能性が推定される。次に本 Ig G ELISA 法の問題点として、Fig. 3 に示すごとく IHA 抗体価1280倍以上の高い抗体価を示す検体では、ELISA 値はプラトーを呈し正確な抗体価の推移を知ることができないことがあげられる。従って当初の目的を達するためには、検体の適正な希釈操作を必要とする。我々は IHA 法にてあらかじめ抗体価を測定し、1280倍以上の高値を示した検体については、その度、適正な希釈操作を行っているが操作は極めて繁雑となる。これに関して五十嵐 (1981)・森田 (1982) らは日本脳炎ウイルス抗体価測定に ELISA を用い、100倍・1000倍希釈の1点測定法にて End point を理論的に算出し、実測値と極めて良い相関を得ている。さらにコンピュータープログラムを作製し抗体価を求めており、この方法を用いれば IHA 法による前測定も個々の IHA 抗体価における希釈操作も不要となり、検策時間も短縮できるものと思われる。

次に実際の臨床応用における Ig G ELISA 法と IHA 法の有用性を比較検討すると、Tp 抗体価低値群では IHA 法に比して Ig G ELISA 法が確かに感度・特異性において秀れているが、実際臨床で問題となる急性感染・急性増悪時には高い Tp 抗体上昇を示すことが知られており IHA 法でも充分検出可能である。従って IHA 法がその簡便性の点で臨床応用には、むしろ優れていると言える。我々は一一般のルーチン検策には IHA 法を用いており、Ig G ELISA 法は特殊な場合にのみ用いることに

している。Ig G ELISA 法は判定に分光光度計を使用するため肉眼判定による IHA 法よりも客観的に、しかも正確に判定できる。又、IHA 法は2段階希釈であるために、抗体価の推移は大まかとなり Fig. 5 に示すごとく正確で微妙な抗体価の推移を知るためには、Ig G ELISA 法は IHA 法よりはるかに有用である。Ig G ELISA 法は IHA 法より感度が秀れているため、微量の抗体を測定する必要のある場合、IHA 法で抗体陰性を示すものの Tp 抗体の存在を完全に否定し得ない特殊な場合に Ig G ELISA 法を主に使用している。

臨床的立場から ELISA 法をみた時、感度・特異性が極めて良いため、微量の抗体検出が可能であり、Tp Ig G 抗体の測定よりもむしろ、Tp Ig M 抗体の検出にその有用性を発揮すると考えられる。Tp Ig G 抗体を測定している限り Tp 急性感染症の診断に役立つとは言えず、既往感染を証明するにすぎない。妊婦が急性 Tp 症に罹患した場合、先天性 Tp 障害児出産の可能性がある (松本・1982) として、臨床 Tp Ig M 抗体の検出は重要である。今日まで我々は Tp Ig M 抗体を protein A 処理にて Ig G 成分を除去 (亀井・1979) した後、IHA 法にて検出していたが、先に示したごとく IHA 法は微量抗体の検出には感度が低く、判定に幾分主観が加わる事から満足な成績を得ることができない。その点 ELISA 法は感度が IHA 法に比して極めて秀れており、微量の Tp Ig M 抗体の検出法として適している。すでに ELISA 法による Tp Ig M 抗体の検出法として数多くの成績が報告されている (Naot・1981, Franco・1981, 石郷岡・1979) が、広く臨床の場で応用されるまでには至っていない。主要な原因として Tp Ig M 抗体陽性血清が充分に入手できないために、その製品化が困難とされているが、個々の検査施設で Tp IgM 抗体を測定するには、本 IgG ELISA 法を用いて検策可能である。そのため現在我々は本キットを Tp IgM 抗体測定用に転用しており、検討を進めている。

## ま と め

トキソプラズマ症の血清診断法として Tp IgG ELISA 法 (Toxo ELISA Test Kit) に関して、Dye test・IHA 法との比較検討を行った。ELISA

法は Dye test と同じく感度・特異性の点で IHA 法より秀れていた。しかし IHA 1280倍以上の高い抗体価では ELISA 値はプラトーを呈するために、正確な抗体価の推移を知るには検体の希釈操作を必要とした。実際の臨床応用の点では、その簡便性で

IHA が有用であるが、正確で微妙な抗体価の推移を知る上で、又微量の抗体検出には ELISA 法が秀れている。ELISA 法は今後むしろ急性 Tp 症の診断における Tp IgM 抗体の検出に広く用いられるものと考えられる。

## 謝 辞

本研究は昭和57年度厚生省心身障害研究・妊婦管理研究班国庫補助金によるところが多大である。又、種々の便宜をはかっていただいた旭メディカル株式会社に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Franco, E. L., Walls, K. W. & Sulzer, A. J. (1981): Reverse Enzyme Immunoassay for Detection of Specific Anti-Toxoplasma Immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 13 (5), 859-864.
- 2) Igarashi, A., Bundo, K., Matsuo, S., Makino, Y. & Lin, W. J. (1981): Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) on Japanese Encephalitis Virus. I. Basic Conditions of the Assay on Human Immunoglobulin. *Trop. Med.*, 23 (1), 49-59.
- 3) 石郷岡清基, 金田英子 (1979) : 酵素抗体法 (ELISA) によるトキソプラズマ抗体の検出. *衛生検査*, 28 (7), 862-866.
- 4) 小林昭夫 (1969) : トキソプラズマ症の臨床検査. *臨床検査*, 13 (4), 299-304.
- 5) 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 (5), 453-461.
- 6) 小早川隆敏, 保坂幸男, 川端真人, 熊田三由, 林 滋生, 片倉 賢, 鈴木康弘, 小林昭夫 (1981) : トキソプラズマ酵素標識抗体法 (Toxo-EIA) の検討. *寄生虫誌*, 30 (5), 471-476.
- 7) 松本慶蔵, 鈴木 寛, 土橋賢治, 宮崎昭行 (1980) : トキソプラズマ感染に関する研究. 厚生省心身障害研究・妊婦管理研究班, 昭和55年度研究報告書, 152-154.
- 8) 松本慶蔵, 鈴木 寛, 土橋賢治, 山本真志, 中島ひとみ (1982) : 妊婦および新生児におけるトキソプラズマ症. *産婦人科の世界*, 34 (7), 705-709.
- 9) Morita, K., Bundo, K., & Igarashi, A., (1982): Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) on Japanese Encephalitis Virus. IV. A computer system to calculate ELISA endpoint titer from ELISA-OD at a single dilution of test sera. *Tropical Medicine*, 24 (3), 131-137.
- 10) Naot, Y., Desmots, G., & Remington, J. S., (1981): IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital Toxoplasma infection. *J. Pediatrics*, 98 (1), 32-36.
- 11) 鈴木 寛, 土橋賢治, 宮崎昭行, 中島ひとみ, 松本慶蔵 (1983) : トキソプラズマ症の血清学的診断法及び長崎市における疫学的検討. *熱帯医学*, 25(2), 83-89.