

## トキソプラズマ色素試験 Accessory Factor の研究

マウス細胞溶解因子の意義

鈴木 守

千葉大学医学部衛生学教室 (主任: 田波潤一郎教授)

(1968年12月24日 受領)

### 緒 言

色素試験(Sabin & Feldman, 1948)は、トキソプラズマ (TP) 症の標準試験法として、重要な意義をもっている。マウス腹腔内で増殖させた栄養型の TP 虫体を、抗 TP 抗体をもたない正常人血清中に浮遊させ、これを段階稀釈してある被検血清に加えて、1時間37°Cに保つ。最後にアルカリ性メチレンブルーを加えると、被検血清中に抗体があれば、免疫溶解現象がおきて、TPの細胞質は色素に染まらなくなる。抗体の作用をうけなかつた虫体は、青染する。

色素試験の機作で興味深いのは、虫体が抗体と新鮮正常人血清中に含まれる accessory factor(s) (AF) との協力作同によつてはじめて免疫溶解をおこすことである。人以外の動物血清は現在のところ、いわゆる非特異反応が強いため (Jettmar, 1954, 1962), あるいは、AF 因子が不充分のため、AF 血清として使用できない。

Sabin & Feldman (1948) は、AF 血清を56°Cに30分間加熱すると、AF の機能が失われ、これに易熱性補体成分である C'1 と C'2 を加えて補体価の回復をはかっても、AF 能力は発現しなかつたことを記載したが、AF の本態は、補体あるいは補体プロペルジン系であるとも報告されている。(Grönroos, 1955; Lycke *et al.*, 1965; Strannegård & Lycke, 1966)

本研究はさきに Iwasaki & Yanagawa (1966) が TP 中和試験にさいして発見した、新鮮人血清中に含まれるマウス腹腔細胞溶解因子が AF 血清中に含まれる1因子として、色素試験において副次的な役割を演じていることを、吟味実証し、かつその本態を追求したものである。

### 実験方法および材料

マウス: 生後5週をすぎ、22~26g の DDD または DDY 系統のマウスを TP の感染あるいは血球および腹腔細胞採取のために使用した。

トキソプラズマ: 東大医科学研究所細菌感染研究部が1960年、Kessel より供与され、以来 DDD マウスの腹腔内接種により継代されている、RH 株を使用した。

Accessory factor 血清: 間接赤血球凝集反応試験 (Lewis & Kessel, 1961; 常松, 1966) で選んだ抗トキソプラズマ抗体陰性血清22検体の中より、陰性コントロールの非染性虫体数が、くえん酸存在下で15%以下であり、標準陽性血清段階稀釈において、不染-染反転がもつとも急峻におこる血清 (M.K.) を選んだ。毎回供与者より200ml を採血し、これを50ml ずつ、なす型フラスコに分注し、30分間室温に静置したのち、4°Cに2時間保ち、4°Cの低温遠心操作によつて血餅を取除いたのち、5ml に分注して、-20°Cに保存した。使用期限は3カ月とした。

抗 TP 血清: 国立予防衛生研究所寄生虫学部の小林らが日常使用している標準血清 Rabbit No. 4 (力価1: 8,000) の供与をうけ、全実験を通じてこれを使用した。

色素試験の方法: Kobayashi *et al.* (1968) の方法にしたがって反応系中に6%の割合で Alsever 液 (dextrose, 2.45g+citric acid 0.8g+trisodium citrate 2.2g+脱イオン水1,000ml) を加えた。

溶血試験の方法: マウスに浅くエーテル麻酔をほどこして、上腕動脈を切断し、血液を毛細管ピペットで採取して約5倍量の ACD 液中に注入し、生理食塩水を用い、2,500回転3分間の遠心操作を3回くりかえして洗滌した。血球生食水浮遊液は、その一部0.5ml を7ml の脱イオン水で溶血させた液が、139型日立分光光度計に

本研究は東京大学医科学研究所細菌感染研究部において一部文部省科学研究費によつてなされた。

より、波長541m $\mu$ で、吸光度0.680~0.700を示すように濃度を調整した。調整された血球浮遊液0.1mlを80% AF血清0.1mlに加えて所定時間反応させ、氷冷生食水9.8mlを加えて、2,500回転7分間の遠心操作により、赤血球を除去し、上清について、波長414m $\mu$ で、吸光度を測定し100%溶血にたいする百分率をだした。

溶腹腔細胞試験：0.5%グリコーゲン水溶液0.2mlをマウスに腹腔内注射して、5日後に腹腔細胞を洗いだし、生理食塩水を用い、1,500回転2分間の遠心操作を3回くりかえして洗滌し、最後に約 $5 \times 10^6$ 細胞数/mlになるように0.6%家兔血清生理食塩水に浮遊させた。80% AF血清0.1mlに上記の腹腔細胞浮遊液の0.1mlを加えた試験管を多数用意し、37°Cに保つて、経時的に腹腔細胞のこわれ方を定量した。所定の反応時間に達した試験管をただちに氷冷し、10%ホルマリン生理食塩水0.1mlを加えたのち、0.05mlの5%トリパンブルーハンクス液を加え、染細胞（死—溶解）と不染細胞（生—非溶解）を合せて400倍顕微鏡下で200数え両者の比を百分率であらわした。

補体価の定量：マイクロタイター法により定量した。マイクロプレート（IS-MVC-96型：Gateway International, Los Angeles）にマイクロドロPPER（富永製作所、東京）でゼラチン・ベロナール緩衝液を各穴に2滴（0.05ml）ずつ滴下し、血清試料をループ（0.025ml）（富永製作所、東京）でとり、3段階階稀釈を行った。これに、至適濃度のヘモリン（東芝、東京）で感作させた羊赤血球浮遊液（西岡・岡田、1966）（ $1 \times 10^8$ /ml）を1滴ずつ滴下し、マイクロミキサー（太陽物産、東京）で振動させつつ、37°Cに1時間保つて溶血を、肉眼的に判定した。補体価は3段階階稀釈された血清の入っているマイクロプレートの穴に入った感作血球がはじめからかぞえて何管目まで完全溶血をおこしているかによって表現した。

### 実験成績

#### 実験 1. TP 浮遊液中の混在マウス腹腔細胞数と色素試験との関係

通例色素試験に用いられるマウスの腹腔液は、TP接種後3日目に採取され、多数の浮遊TPと少数の腹腔細胞が混入した材料が使用される。感染後、日数の経すぎた腹腔液では、TPが増え、かつ細胞の比率が減少しているが、色素試験を行ったさい、非特異的に不染となる虫体が増えて、判定が不可能となる。

マウスの腹腔液中の細胞数が、色素試験に与える影響

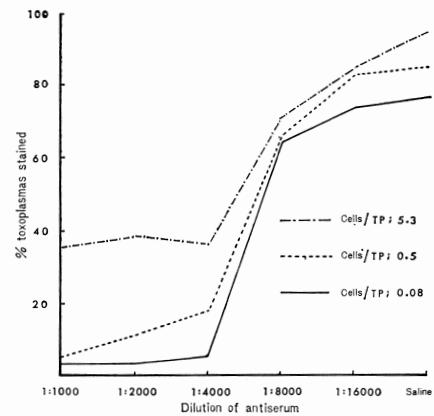


Fig. 1 Influence of the presence of parasitized peritoneal cells in the reaction mixture on the dye test reaction.

Cell/TP=Number of cells mixed with parasites/number of toxoplasmas.  
Antibody titer; 1:8,000

をしらべるため、種々量のTPを接種し、感染後、52時間経たマウス6匹のうちより、細胞数/遊離虫体数がおおの5.3, 0.5, 0.08の割合に細胞を含んだ腹腔液を選び、それぞれ同時に色素試験を行った。その結果、細胞の比率の大きな試料を使つたさいには、高濃度の陽性血清稀釈においても、約40%のTPは染色され、その結果、不染—染反転がなだらかとなること、一方細胞の率が小さな試料では、陽性血清の濃い稀釈部分で、大部分の虫体が不染性となり、不染—染の反転が急峻化し、血清力価の判定上好都合であることがわかつた（Fig. 1）。

以上の結果はマウス細胞の破壊によるTPの放出が、色素試験の不染—染反転に影響を与えている可能性を示唆している。

#### 2. 混在マウス腹腔細胞の機械的破壊の色素試験におよぼす影響

腹腔液に含まれる感染細胞をあらかじめ機械的に破壊した虫体浮遊液を使用して色素試験を試みた。細胞の破壊は注射器（2mlのツベルクリン用注射器に $1/1$ 静脈針をとりつけたもの）によりマウス腹腔液を試験管中で、注入、注出を反復して行った。マウスより採取した直後の細胞数/遊離虫体数の比は0.41であり、TPのぎつしりつまつた大型細胞がみとめられた。これに注射器操作を10回、30回、50回加えたところ細胞数/遊離虫体数の比はいずれも0.15となり、はじめにみとめられた、TPを多数とりこんだ大型細胞は、ほとんどなくな

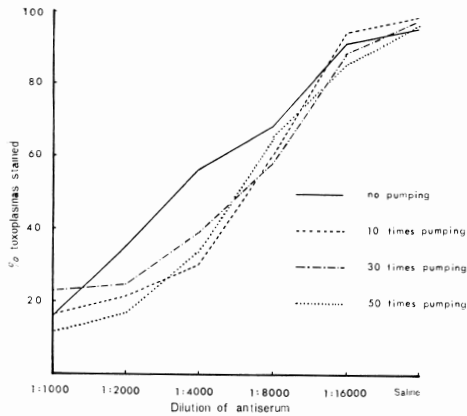


Fig. 2 Effect of the preliminary destruction of parasitized peritoneal cells by pumping on the dye test reaction.

つた。それぞれの腹腔液を使つて同時に色素試験を行ったところ、注射器の操作を加えた例では、陽性血清力価は、1管高くなり、かつ不染一染反転が急峻化した。10回操作を与えた例と50回の例との間には、有意の差はみられず、陰性対照がすべて90%以上の染虫体率を示していることは、50回以内であれば、注射器操作自体による色素試験への影響はきわめて少ないことを意味すると考えられた (Fig. 2)。

3. 色素試験とマウス腹腔細胞の溶解の時間的推移

色素試験の進行していく過程と、マウス細胞の破壊されていく過程とが、時間的にみていかなる関係にあるかを追求した。色素試験については、所定時間後、ただちに氷冷し、アルカリ性メチレンブルー0.1mlを加えて全反応終了後、室温に10分間放置したのち検鏡した。

色素試験の系の中のマウス細胞の破壊を経時的に追求したが、時間を経るにしたがつて細胞の凝集がおり、算定が困難であつて満足な結果はえられなかつた。そこで、色素試験と並行して、方法および材料の項で記載した溶血試験および溶腹腔細胞試験を行い、マウス細胞破壊の時間的経過を追求したところ、Fig. 3に示すように色素試験の進行経過と、赤血球および腹腔細胞の溶解の進行経過とはよく一致して、反応はおおむね三者とも15分間で定常化した。

4. 細胞を人工的に破壊したさいの色素試験の時間的推移の変化

実験3では、腹腔細胞の溶解過程と、色素試験の進行過程が偶然に一致している可能性が否定できない。そこ

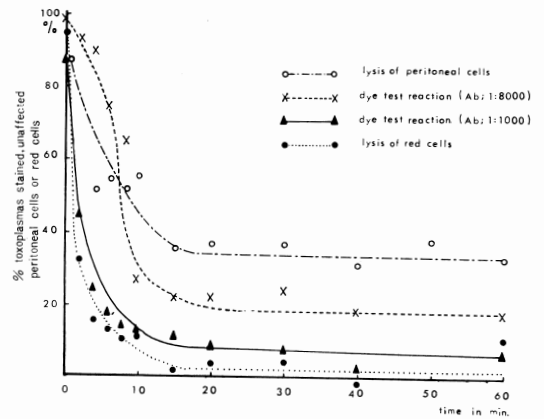


Fig. 3 Time course of dye test reaction and of lyses of mouse peritoneal cells and red cells by accessory factor serum.

で前記の方法により、腹腔液中の細胞を破壊した場合と破壊操作を加えない場合における色素試験反応の進行状況を比較した。操作により、細胞数は $5.24 \times 10^6/\text{ml}$ より $3.94 \times 10^6/\text{ml}$ に減少した。また AF 血清は、なるべく反応をゆるやかに進行させるために最終濃度を25%とした。細胞を破壊した試料で色素試験の経過を追求すると、破壊しない場合に比べて明白に進行が早く、45分で定常に達した。細胞をこわさないものは、通例の反応

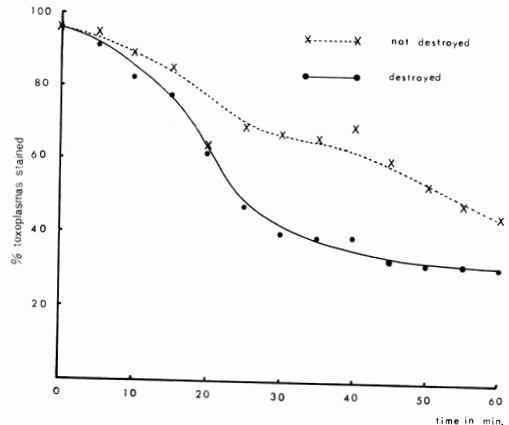


Fig. 4 Effect of the preliminary destruction of parasitized peritoneal cells by pumping on the time course of dye test reaction.

A represents the reaction curve obtained by the use of nontreated toxoplasma suspension.

B represents the reaction curve obtained by the use of treated toxoplasma suspension, many parasitized mouse cells were found destroyed by pumping.

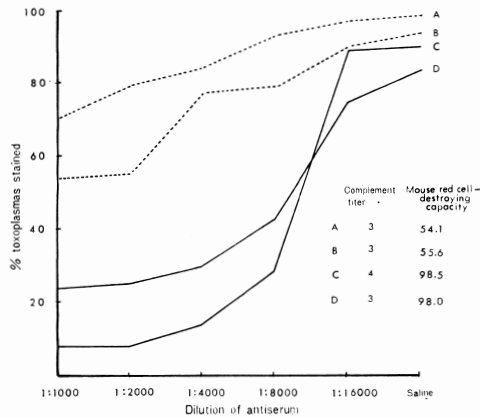


Fig. 5 Dye test reactions obtained by the use of accessory factor sera of different capacities to destroy mouse red cells.

\* Numbers of microplate holes showing complete hemolysis

終了時である。60分が経過しても、なお定常化がみられなかった。また AF 濃度を40%とした場合には、反応はすみやかに、また強く進行し、両者の間の差はわずかであった。

5. 新鮮人血清のマウス細胞溶解力と AF 血清としての能力との関係

抗 TP 抗体をもたない(間接赤血球凝集試験, 色素試験いずれも陰性)新鮮人血清19例のうちより, マウス赤血球浮遊液(実験方法および材料の項参照)にたいする溶解力が血清濃度を最終的に40%としたさいに, 特に高い2例, 特に低い2例を選んで AF 血清として使い, その反応曲線より AF 血清としての能力の差をしらべた。結果は図5に示したように, 細胞溶解力の劣った例はどれも AF 血清としての能力がいちじるしく悪いが, すぐれた例はいずれも, AF 血清としてもすぐれていた。使用した血清の補体価は3と4とにばらついたが, 補体価が低くても, 細胞溶解力のすぐれた血清の方が, AF 血清としてすぐれている場合もあることが判明した。

6. マウス腹腔細胞溶解因子の本態

Sephadex G-20(Pharmacia, Uppsala Sweden) 12g を 1/100M 磷酸緩衝生理食塩水(PBS pH 7.2)により, 充分膨潤させた。これをカラム管につめて, PBS を20ml/時間の速さで1夜洗滌した。ゲル層は, 径30mm 高さ380mm であった。

AF 血清 5 ml をコロジオンバックに入れ, 2,000ml の

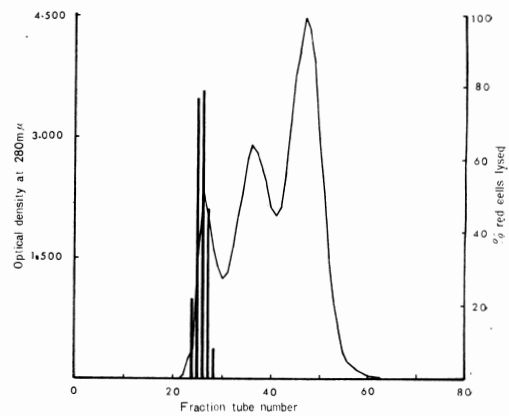


Fig. 6 Gel-filtration pattern of accessory factor serum through sephadex G-200 column and localization of mouse red cell destroying activities.

PBS を外液として24時間透析した。この間外液を4回交換した。透析後血清に蔗糖1.25g を溶解させた。これをカラム管に流しこみ, PBS を20ml/時間の流速で滴下し, 濾液を4 ml ずつ100本の分画にわけた。以上の操作はすべて10°C の低温実験室で行われた。各分画の蛋白量を分光光度計(前記)により, 波長280mμ の吸光度を測定して定量した。各分画を PBS でうすめて2倍とし, その0.2ml に前記マウス赤血球浮遊液を 1/10 に稀釈したものを0.1ml, さらに新鮮モルモット血清0.1ml を加えたのち, 1時間, 37°C に保ち, 氷冷したのち, 2500回転, 3分間の遠心操作で血球を除いた上清0.15ml に PBS 0.85ml を加えて稀釈し, 波長414mμ における吸光度を測定して溶血力を定量した。図6に示すようにマウス赤血球を溶解さす能力は, IgM 抗体を含む分画である第1の山に一致してみとめられた。

## 考 案

Yanagawa & Hirato(1963)によれば, TP は補体の関与なしに抗体だけで培養細胞(豚の白血球)に対する感染力をうしなうという。また, Iwasaki & Yanagawa(1966)はマウスを使つての *in vivo* の中和実験が抗体を含む新鮮人血清においてのみ成立し, 他の動物血清では成立しがたいことをみとめ, その理由として, 1) TP を増殖させたマウス腹腔液中には, 感染細胞が多数浮遊している。2) マウス腹腔細胞中の TP には抗体の作用はおよばない。3) 人の新鮮血清中にはマウス腹腔細胞を溶解させる因子があり, この因子の作用によつて腹腔

細胞内の TP が細胞外に放出させられて、その結果中和抗体の作用をうけることになる。4) 他の動物の血清中には、マウス腹腔細胞を溶解させる因子がないので、細胞内にある TP は、抗体の作用をうけずに残り、抗体を与えたにもかかわらず、TP はその作用を受けなかったかのようにみえる結果となるのではなからうか、と推論している。

この岩崎・柳川による実験は、色素試験との対比において興味深い。

色素試験で被検血清の力価判定を容易にするためには、陽性血清の稀釈に応じて、不染虫体率、染虫体率の反転が顕著であることが必要である。そのためには、虫体自身の生理的条件が均一であること、また各虫体が、抗体、AF の作用を均等にうけるような条件にあることが望まれる。TP 材料を感染3日目の腹水にもとめるのは(直江, 1958)、主として前者のためであるが、その時期には、遊離 TP 虫体とともに、比較的多数の感染腹腔細胞も腹水中に含まれている。細胞内の原虫には抗体の作用はおよび難いので、一定の反応時間内に感染細胞の自然崩壊がおきて、虫体が放出されるとすると、反応後期に細胞外に放出された虫体は、抗体、AF の作用を十分にうけることなく、染性にとどまり、反応を鈍感にするばかりではなく、反応曲線の傾斜もゆるやかとなつて、判定上困難をきたすことにならう。

新鮮人血清中の必須因子としての AF の問題はなお将来の解決をまたなければならないが本論文で扱っているマウス細胞破壊因子に関しては、実験1より、実験5までを通じすべての事実が、この因子が反応液中にあつて、上記の感染マウス腹腔細胞を短時間のうちに、積極的に融解せしめて、内部の原虫を放出させ、反応の早い時期から、虫体を、抗体と AF の作用下にさらさせることにより、色素試験にとつて副次的な要素ではあろうが、意義のある役割を演じていることを指示していると思われる。この意味において、本研究は、岩崎・柳川による実験とも良く合致しているといえよう。

本研究のために集めた22例の抗 TP 抗体陰性血清のうち、極端に補体価の低いめづらしい1例をのぞく、21例にマウス赤血球溶解活性がみとめられ、反応液中40%の血清濃度における各血清の溶血度は、もつとも活性の高い例は98.5%、もつとも低い例では54.1%であり、他の血清の溶解度は、ほぼ均等にこの間にばらついていた。またこの実験において AF 血清として使われた血清を2倍、4倍、6倍、8倍、12倍、16倍に稀釈をかえ

て溶血力をみたところ、6倍稀釈において、急激に溶血力が減弱した。極端に補体価の低い1例にも、補体をおぎなう(非常に補体価の高い人血清を稀釈して、補体としての力はあるが、マウス細胞の溶解力がもはやほとんどないまでにしたものを加えた。)と活性がでてくることがみとめられた。したがつて実験6とあわせ考えると、マウス腹腔細胞溶解因子の本態は、おそらく IgM に属する自然抗体であり、補体との共同作用によつて、マウス細胞を溶解させるのであらうと考えられる。

この自然抗体を、AF 血清中よりマウス赤血球またはマウス肝粉末による吸収操作により取除いて色素試験への影響をしらべる実験を行ったが、吸収により補体、とくに C'3 が激減し、色素試験の反応も全く消失し、補体が減らない程度の吸収では、非吸収の対照とくらべて色素試験の反応において顕著な変化はみとめられなかつたことを附記する。

## 総 括

(1) AF 血清はマウス腹腔細胞を溶解する因子をもつている。

(2) AF 血清を Sephadex G-200 でゲルろ過したところ、第1の蛋白量の山に一致して、マウス細胞溶解活性をみとめた。

(3) 色素試験にさいして、トキソプラズマ浮遊液に、トキソプラズマ感染腹腔細胞が多く混在すると、反応は鈍感になつた。

(4) 色素試験の進行過程は、AF 血清中に浮遊させたマウス腹腔細胞の破壊過程と時間的によく一致していた。

(5) トキソプラズマ感染マウス腹腔細胞をあらかじめ機械的に破壊しておく、と、色素試験の反応は敏感になり、また被検血清の力価がきれいにきまつた。

(6) マウス細胞溶解力の大きな血清は、小さな血清よりも accessory factor 血清としてすぐれた能力を示した。

(7) 以上の(3)から(6)までの実験は、新鮮人血清中に存在するマウス細胞溶解因子が、色素試験にとつてひとつの意義をもつことを示唆している。

本研究は、主任教授、田波潤一郎先生の御理解と御鞭撻を得て東京大学医学研究所細菌感染研究部において、常松之典教授の御指導によつておこなわれた。また論文作製にあつて同教授に再三にわたる御校閲をいただいた。色素試験については、国立予防衛生研究所寄生

虫部の小林昭夫室長，熊田三由技官に細部にわたり御教示をいただいた。血清の件に関して東京大学医学研究所寄生虫学研究部の神谷正男学士に一方ならぬ御骨折をいただいた。

#### 文 献

- 1) Grönroos, P. (1955) : The action of properdin on *Toxoplasma gondii*. Ann. Med. Exper. et Biol. Fenniae, 33, 310-315.
- 2) Iwasaki, N. and Yanagawa, R. (1966) : Neutralization of toxoplasmas with special reference to their intra- and extra cellular localization. Jap. Vet. Res., 14, 91-102.
- 3) Jettmar, H. M. (1954) : Zum Nachweis toxoplasma feindlicher Qualitäten im Menschen-serum. Wien. Klin. Wschr., 66, 276-277.
- 4) Jettmar, H. M. (1962) : Cytolyse der Toxoplasmen durch Frisch-sera. Arch. Hyg., 146, 511-529.
- 5) 小林昭夫・熊田三由・常松之典(1967) : トキソプラズマ色素試験の基準化に関する研究(1) 反応に及ぼす抗凝固剤の影響. 寄生虫誌, 16, 494-503.
- 6) 小林昭夫・熊田三由・常松之典(1968) : トキソプラズマ色素試験の基準化に関する研究(2). Accessory factor としての血漿の使用について. 寄生虫誌, 17, 81-85.
- 7) Kobayashi, A., Kumada, M. and Tsunematsu, Y. (1968) : Effects of anticoagulants on the dye test for toxoplasmosis. Japan. J. Med. Sci. & Biol., 21, 71-89.
- 8) Lewis, W. P. and Kessel, J. F. (1961) : Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis. Arch. Ophthal., 66, 471-476.
- 9) Lycke, E., Lund, E., Strannegård, Ö and Falsen, E. (1965) : The effect of immune serum and activator on the infectivity of *Toxoplasma gondii* for cell culture. Acta Path. Microbiol. Scandinav., 63, 206-220.
- 10) 直江敏郎(1958) : トキソプラズマの研究IV. 色素試験の反応条件について. 東京医事新誌, 75, 199-207.
- 11) 西岡久寿弥・岡田英親(1966) : 実験講座, 補体結合反応. 蛋白質核酸酵素, 11, 1509-1513.
- 12) Sabin, A. B. and Feldman H. A. (1948) : Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasites (*toxoplasma.*). Science, 108, 660-663.
- 13) Strannegård, Ö and Lycke, E. (1966) : Properdin and the antibody effect on toxoplasma *gondii*. Acta Path. & Micarobiol. Scandinav., 66, 227-238.
- 14) 常松之典(1966) : 現代診断検査法大系. 感染症(1) 155頁, 中山書店, 東京.
- 15) Yanagawa, R. and Hirato, K. (1963) : Antitoxoplasmic effect of immune serum revealed in the culture of swine leukocytes. Jap. J. Vet. Res., 11, 135-142.

**Abstract**THE MOUSE CELL DESTROYING FACTOR IN ACCESSORY FACTOR SERUM  
AND ITS ROLE IN SABIN-FELDMAN TEST

MAMORU SUZUKI

*(Department of Hygiene, Chiba University, Chiba, Japan)*

(1) Human sera used as the accessory factor contain a factor which destroys mouse erythrocytes and leukocytes with the aid of complement in the sera.

(2) The fractionation study of accessory factor sera revealed the presence of mouse cell-destroying factor in the first peak of elution pattern from Sephadex G-200 column. This fraction consists chiefly of IgM.

(3) The fact that the mouse cell destroying factor plays a role, if not so important, in the dye test was indicated by the following experimental results.

(a) The excess of parasitized mouse cells in the reaction mixture gave a sluggish transition of reaction in the titration of anti-toxoplasmic antibody.

(b) The dye test reaction proceeded almost parallel with the destruction of toxoplasma-containing mouse cells in the reaction mixture.

(c) Preliminary destruction of mouse cells by pumping with syringe, shortened the course of reaction and made the results clearer.

(d) The sera of higher capacity to destroy mouse cell were better for accessory factor sera than lower ones.

---

This study was carried out at the Department of Bacterial Infection (Chief, Prof. Yukinori Tsunematsu) Institute of Medical Science, University of Tokyo, and was supported in part by the Scientific Research Grant from Ministry of Education.