

トキソプラズマ死虫ワクチン注射動物における感作血球凝集反応抗体値の持続性と強毒株攻撃に対する抵抗性

中山 一郎

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(1969年8月14日 受領)

トキソプラズマ (以下 Tp と略記す) 感染の有無は宿主から原虫を検出することが最も確実な方法であるが、宿主からの虫体検出は急性症を除いて頗る困難である。しかも宿主がヒトのとき多くの場合慢性症である。そこで、虫体検出と平行して血清学的診断が実施されている。これには現在色素試験、Tp 感作血球凝集反応 (以下 HA と略記す) 及び補体結合反応が実用されているが、既に古く Sabin *et al.* (1952), Cutchins *et al.* (1956) は補体結合反応は Tp 感染後の出現の時期の遅れることと比較的早期に消退するため、診断の目的のため本法のみで決定することはできないといっている。随つて前二者が多く実用されている。併しこれらの成績が陽性に出現しても、必ずしも宿主体内に虫体が生存しているとは限らないであろう。それは宿主に虫体が侵入しても必ずしも充分に馴化しないために、侵入虫体は一時増殖した後に比較的短期間に死滅することもあるであろう。即ち中山 (1967) の Tp 分離試験中初代マウスに少数の虫体を認めながら継代 2, 3 代後消失することが屢々認められることから類推出来る。しかもこの場合初代マウスに HA 値の陽転は認められる。この事実から同一宿主で 1~2 回の検査による陽性成績は果して生虫体が寄生しているものか、或いは単に既往において Tp の感染があり現在既に虫体は死滅していることも想定できるのでその何れであるか決定出来ない。そこで死虫体ワクチンを注射された動物の抗体値陽性の持続時間について観察を試みることは意義あるものと考える。

材料および方法

実験動物はマウス及びウサギを使用した。マウスは当教室にて飼育、繁殖せしめた ICR マウスで体重 20g 前後のものを使用し、ウサギは体重 2.5 kg の市販のもので実験前 Tp, HA 値を検し、陰性のものを使用した。

Tp の使用株は強毒株として RH 株、弱毒株として

Beverley 及び S-273 両株を使用した。S-273株はわが国で信藤らによつて豚から分離され分与をうけたもので、マウスに対する病原性の頗る弱い株で慢性感染期には脳にシストを形成する。

死虫ワクチンは RH 株増殖型虫体を腹腹腔内接種後 3 日のマウス腹腔より採取し数匹からのものを一括して生食水にて 2 回洗浄した後、沈渣を生食水にて再浮遊せしめ 56°C 30 分加温殺虫して得られた。この浮游液を正常マウスに接種、4 週後も元気に生存を続け腹腔内に虫体が検出されない点から浮游液中の虫体が死滅していることは確実である。この死虫ワクチン 1 ml 中の虫数を算定して、その 0.5~2.0 ml をそれぞれマウス及びウサギの腹腔内に所定の回数注射した。生虫体免疫形成の目的には Beverley 及び S-273 株のシストを用いた。それぞれ両株感染 5 週以上経過のマウスの脳を摘出して生食水にて乳濁液を作り 1 ml 中のシスト数を算定して 0.2 ml をマウス皮下に接種感染せしめた。ウサギの場合は乳濁液 0.5~1.0 ml を腹腔内に接種した。

抗体値の測定はマウスの場合には眼球より採血用ピペットにて採血、ウサギの場合は耳静脈より採血し、これをそのまま特定の濾紙に滴下し充分吸着させ室温にて乾燥せしめた。吸着濾紙は非動化の目的で 3 日以上室温に日光を避けて放置し検体とした。検査は化学及血清療法研究所製 Tp 感作血球を使用し花木・信藤・佐藤法 (1963) によつて HA 値を測定した。本反応は感作血球浮游液に所定稀釈液抽出液を注入設定後室温に 1 晩放置して成績を判定するが、これで判定困難のことが殊に冬期に認められる。そこで設定後 26°C の孵卵器中に 1 晩入れ翌朝判定する方法をとつたが、これでも判定困難の場合は、更に 37°C 孵卵器中に 2~3 時間入れれば判定は確実になつた。このようにして得られた HA 値 1:64 は非特異反応含むものがあると考へて 1:256 以上を陽性値と認めた。

成績

1. 死虫ワクチン 頻回接種後の HA 値の動きと RH 株攻撃に対する耐過性

マウスの場合：RH 株死虫体160万～1,200万コを含む 0.5ml の生食水浮游液を 3 日間隔にて 10 回腹腔内に接種して、初回接種から 14 週迄は 2 週間隔、以後は 5 週間隔にて最高稀釈 1 : 4,096 を限度として HA 値を検した (第 1 表)。初回接種から 2 週経過のマウスはこの間に 5 回の死虫接種を受けたもので 72 匹中 50 匹 (69.4%) において HA 値が陽転した。初回接種から 4 週を経過したマウスは 10 回の最終接種から 1 日経過したもので 131 匹中

112 匹 (85.5%) が陽性値を示した。以後 19 週までに検した HA 値陽性率は 86.3～100.0% を示し以後陽性率減少して 34 週では 32.1% と低下した。陽性値の変動については後章に記載する。

34 週を経過した 27 匹のマウス (うち 32.1% が HA 陽性) に 400 万コの RH 死虫体を含む生食虫体浮游液を各 0.5ml 腹腔内に注射したところ、3 日後に 70.4% のマウスが HA 陽性値を示し 1～7 週後は凡て 100% の陽性率を示した (第 1 表)。しかし 9 週後には 93.7% の陽性率を示し、以後陽性率は週数の経過と共に漸次低下し、29 週には最低 20.0% の陽性率を示した。実験開始当初より長期に亘つたのでこの時の生存マウスは僅か 9 匹

Table 1 HA titer and protection against challenge of mice which were vaccinated repeatedly with heat-killed RH-toxoplasmas

Times of vacc.	Weeks after the 1st. vacc.	No. of mice exam.	HA titer					% of posi. mice*	No. of mice survived/ challenged	
			<64	64	256	1024	4096			
5	2	72	8	14	30	15	5	69.4	14/25**	
	4	131	6	13	43	49	20	85.5	8/30	
	6	124	3	6	27	42	46	92.7	8/28	
	8	51	3	4	3	9	32	86.3	1/29	
	10	40	0	1	6	21	12	97.5	0/11	
	12	29	0	1	10	9	9	96.6	0/16	
	14	52	0	2	9	19	22	96.2	1/13	
	19	38	0	0	1	9	28	100.0	—	
	24	36	0	8	9	10	9	77.8	—	
10	29	29	4	14	7	2	2	37.9	—	
	34	28	12	7	7	2	0	32.1	—	
Revaccination with 4×10^6 killed RH-trophozoites.....									
	Periods after revaccination									
		3days	27	4	4	10	4	5	70.4	—
		1wk.	26	0	0	0	1	25	100.0	—
		2	23	0	0	0	1	22	100.0	—
		3	23	0	0	0	3	20	100.0	—
		5	21	0	0	1	4	16	100.0	—
	7	19	0	0	1	3	15	100.0	—	
	9	16	0	1	1	7	7	93.7	—	
	14	12	3	3	5	1	0	50.0	—	
	19	10	1	3	2	4	0	60.0	—	
	24	10	6	2	2	0	0	20.0	—	
	29	10	4	4	2	0	0	20.0	—	
.....Revaccination with 5×10^6 killed RH-trophozoites.....										
	3days	9	1	4	1	3	0	44.4	—	
	1wk	9	1	0	0	1	7	88.9	—	
	2	8	0	0	0	2	6	100.0	—	
	3	5	0	0	0	1	1	100.0	—	

* HA titer $\geq 1 : 256$ was determined to be positive.

** These 25 mice were challenged 26 days after the first vaccination.

Table 2 Relationship between HA titer and resistance to the challenge in vaccinated mice

HA titer	Number of mice							
	3.5wks.	4	6	challenged/survived				total (%)
				4	10	12	14	
<1:64	5/0	2/1	6/2	11/0	0	0	0	24/3 (21.5)
1:64	4/1	5/2	2/1	9/0	0	0	2/0	22/4 (17.3)
1:256	11/8	11/2	11/2	5/1	0	6/0	4/1	48/14 (29.2)
1:1,024	4/4	11/2	7/2	1/0	7/0	5/0	5/0	40/8 (20.0)
1:4,096	1/1	1/1	2/1	3/0	4/0	5/0	2/0	18/3 (16.7)
Total	25/14	30/8	28/8	29/1	11/0	16/0	13/1	152/32 (21.1)

Mice challenged 3.5 weeks after the first vaccination were vaccinated 5 times previously, and the other mice received vaccination 10 times before challenge.

であつた。これら生残マウスに更に 0.5 ml 500 万コの RH 死虫体を腹腔内に注射したところ、前記した成績と同様に陽性率は急激に上昇した。

注射した死虫ワクチン中には Tp 虫体のほかにマウス腹腔内細胞を多数含むので、これらの HA 値への影響の如何を検するため、健康マウスをグリコゲン処理して得られた大喰細胞50万~90万コを含む腹水 0.5 ml を3日間隔にて10回20匹のマウス腹腔内に接種した。初回接種から4,6及び8週後の3回検したそれらマウスの HA 値は凡て<1:64 であつたので上記の陽性値は死虫体に起因するものと考え。

次に頻回死虫ワクチン注射マウスの RH 株攻撃に対する耐過性を検した。初回注射から 3.5 週経過したマウスはこの間に 3 日間隔で 5 回の死虫ワクチン注射をうけ最終注射から 1.5 週経過したもので、これら 25 匹に RH 株 3,000 コを腹腔内に接種したところ 14 匹が 5 週間元気に生存した(第 1,2 表)。其後初回注射から 4 週及び 6 週経過のマウスは 10 回の最終注射からそれぞれ 1 日及び 15 日経過したものでそれぞれ 30 匹中 8 匹及び 28 匹中 8 匹が RH 株 3,000 コの攻撃接種後 5 週間元気に生存した。以後初回注射の後 8 週より 14 週、即ち 10 回の最終注射から 4 週より 10 週経過しマウス 69 匹に RH 株を同数攻撃接種したものは大部分対照と同様に死亡し僅か 2 匹が攻撃後 5 週間元気に生存した。上記各例の凡てに対照として健康無処置マウスと同じ RH 接種液を同量接種したが全部のマウスは 1 週間後で死亡した。上記の耐過生存マウスの総数は 32 匹で脳から直接シストの検出を試みたが、検出されたものは僅か 3 匹であつた。併しこれらの脳を正常マウス腹腔に接種したところ凡て 10 日前後に死亡し、腹腔内に多数の Tp 虫体を検出したので、耐過生存マウスは凡て Tp 生虫体を潜有することが証明された。なお、こ

れら 32 匹の HA 値については <1:64, 1:64, 1:256, 1:1,024 及び 1:4,096 を示したものがそれぞれ 3, 4, 14, 8 及び 3 匹であり、耐過と HA 値とは完全に直結した成績は得られなかつた。第 2 表に攻撃接種施行時の HA 値と耐過生存したマウスとの関係を表示した。HA 値陰性のマウスでも 12.5% のものが RH 3,000 虫数の攻撃に耐過し、反対に 1:4,096 を示したものでも 16.7% の耐過率を示したに過ぎない。

ウサギの場合：先づ死虫体ワクチン注射による HA 値陽転の時期を知るため死虫体 6,000~2 万虫数を含むワクチンを 1 匹のウサギ (No. 4) の腹腔内に 3 日間隔にて連続注射した。初回接種から 4 及び 7 日後の HA 値はそれぞれ <1:64 及び 1:64 を示し、10 日後には 1:4,096 と陽転し、2 週後には 1:16,384 の高い値を示した(第 3 表)。

Table 3 HA titer in the earlier stage of vaccination in rabbit (No. 4) which was injected repeatedly with heat-killed RH-trophozoites

Periods after the 1st. vacc.	HA titer
4days	<64 (2)
7	64 (3)
10	4,096 (4)
14	16,384 (5)
18	16,384 (5)

Figures in parenthesis indicate the times of vaccination.

其後の HA 値の変動については他の 1 匹のウサギ (No. 5) を使用し、前記マウスと同様に追跡検査をした(第 4 表)。死虫体 18,360 万~44,720 万コを含むワクチン 2 ml を腹腔内に注射した。初回注射から 2~8 週

Table 4 HA titer in rabbit (No. 5) vaccinated repeatedly with heat-killed toxoplasmas, and fluctuations of the titer after the revaccinations

Period after the first injection	HA titer
2wks	4,096 (5)
3	16,384 (7)
4	16,384 (10)
6	4,096 "
8	4,096 "
10	1,024 "
12	1,024 "
14	256 "
19	64 "
...Revaccination with 200×10^6 killed toxoplasmas...	
Periods after revaccination	
3days	65,536
1wk.	65,536
2	65,536
3	65,536
4	16,384
6	16,384
8	16,384
10	256
12	256
14	256
16	256
18	256
20	64
22	64
24	<64
...Revaccination with 180×10^6 killed toxoplasmas...	
3days	16,384
1wk.	65,536
2	65,536
3	65,536
14	64
...Revaccination with 400×10^6 killed toxoplasmas...	
10days	65,536

Figures in parenthesis indicate the times of vaccination.

間は 1:4,096~16,384 の高い値を示し、10~12週となり 1:1,024 と下降し、14週及び19週には更に低下し、それぞれ 1:256及び 1:64となつた。このとき2億コの死虫体ワクチン注射を行い3日後に検したところ急上昇し 1:65,536を示し、以後3週迄同一値を保持したが、4~8週は 1:16,384を示し、10~18週は 1:256と低下し、20週以後の検査ではHA値凡て $\leq 1:64$ を示した。低下後再び1億8,000万コの死虫体ワクチンを注射したとき

HA値は急上昇し、これが低下後更に4億コの死虫体ワクチンを注射した場合も同様HA値は急激に上昇した。

2. 死虫ワクチン唯1回注射後のHA値

マウスに1,800万コの死虫体を含む0.5mlのワクチンを腹腔内に注射し、注射2週後から15週に亘りHA値を測定した(第5表)。其結果は凡て $\leq 1:64$ であつた。この2週後の被検マウス数は62匹であつたが、其後多数のマウスは死亡し15週の後被検マウス数は17匹に減少した。更に1週後、生存マウス数は15匹でこれらに400万コの死虫体ワクチンを1回腹腔内に注射した。注射3日後のHA値は14匹 $< 1:64$ 、1匹 $1:64$ であり前述した頻回注射例と異なるが、1週後には3分の2のマウスは陽性値を示し、注射後2~3週にて大部分のマウスが陽性値を示した。以後HA値は漸次低下し19週で殆んど陰転し、24及び29週では凡て陰転した。29週後の生存マウスは僅か9匹に減少したが、この時第2回の追加免疫として700万コの死虫体ワクチンを腹腔内に注射したところ、第1回の追加免疫注射後と同様なHA値の上昇を認めた。

3. 弱毒株接種後のHA値

前述の死虫体ワクチン注射例と比較する目的で弱毒株シストをマウス及びウサギに接種して其後のHA値の変動を検した。

マウスの場合：先づ26匹のHA値陰性のマウスにBeverley株14シストを含む0.2mlの生食水浮游液を皮下に接種して、其後2週より59週に亘りHA値の変動を検した(第6表)。接種2週後のHA値は1:1,024が17匹、1:4,096が9匹であつた。其後の検査で1:256を示したものは8、10、12及び14週に同一マウスで各1匹に認められただけで、上記検査期間中他は凡て1:1,024以上の高い値を示した。

Beverley株より遙かに毒性の弱いS-273株の12シストを22匹の腹腔内に注射し其後2週より49週に亘つてHA値を検した。この期間中HA値 $\leq 1:64$ を示した例数は11で他は凡て1:256以上の陽性値を示したが、陽性率及び陽性値ともにBeverley株感染マウスより明らかに低い値を示した。

ウサギの場合：No. 1、2及び3のウサギにそれぞれBeverley株シスト100、290及び240個を腹腔内に接種した(第7表)。接種4日後のHA値は凡て $< 1:64$ で7日後に凡て1:64となつた。10日以後は凡て陽転し1:256、1:1,024、1:4,096となり個体差が認められた。其後凡てHA値の上昇を認め、14、18日に3匹とも全採血して後述の実験にそれらの血清を使用した。

Table 5 HA titer of mice after single vaccination with 18×10^8 heat-killed toxoplasmas

Period after vaccination	No. of mice exam.	No. of mice showing HA titer of					% of posi. mice
		<64	64	256	1,024	4,096	
2wks.	62	53	9	0	0	0	0
4	58	51	7	0	0	0	0
6	23	18	5	0	0	0	0
8	22	21	1	0	0	0	0
10	19	13	6	0	0	0	0
12	19	15	4	0	0	0	0
14	18	16	2	0	0	0	0
15	17	15	2	0	0	0	0
.....Revaccination with 4×10^6 killed toxoplasmas.....							
3days	15	14	1	0	0	0	0
1wk.	15	5	0	4	2	4	66.7
2	15	0	2	0	7	6	86.7
3	15	1	0	3	4	7	93.3
5	15	2	2	2	7	2	73.3
7	15	4	2	4	4	1	60.0
9	14	3	2	6	2	1	64.2
14	14	2	8	4	0	0	28.6
19	14	6	7	1	0	0	7.1
24	12	12	0	0	0	0	0
29	9	9	0	0	0	0	0
.....Revaccination with 7×10^6 killed toxoplasmas.....							
3days	9	9	0	0	0	0	0
1wk.	9	0	0	3	2	4	100.0
2	8	0	0	0	1	7	100.0
3	8	0	0	0	3	5	100.0

HA titer $\geq 1:256$ was determined to be positive.

Table 6 HA titer of mice inoculated with the cysts of low virulent strains

Weeks after inocul.	No. of mice exam.	Inoculated with										
		Beverley strain*					S-273 Strain**					
		HA titer					HA titer					
		<64	64	256	1,024	4,096	exam.	<64	64	256	1,024	4,096
2	26	0	0	0	17	9	22	0	1	3	8	10
4	26	0	0	0	4	22	21	0	0	1	8	12
6	26	0	0	0	2	24	21	0	0	0	10	11
8	25	0	0	1	0	24	18	0	0	1	8	9
10	25	0	0	1	0	24	17	0	2	4	3	8
12	24	0	0	1	0	23	17	0	2	3	5	7
14	23	0	0	1	0	22	17	1	2	2	6	6
19	23	0	0	0	1	22	13	0	1	2	4	6
24	22	0	0	0	3	19	9	0	0	0	5	4
29	20	0	0	0	8	12	6	0	1	2	2	1
34	13	0	0	0	2	11	4	0	0	1	2	1
39	11	0	0	0	3	8	3	1	0	0	0	2
44	9	0	0	0	0	9	2	0	0	2	0	0
49	5	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	1
54	1	0	0	0	0	1	—	—	—	—	—	—
59	1	0	0	0	0	1	—	—	—	—	—	—

* Fourteen cysts were inoculated subcutaneously.

** Twelve cysts were inoculated intraperitoneally.

Table 7 HA titer in the earlier stage of infection in rabbits which were inoculated with Beverley strain

Days after inoculation	HA titer of rabbit		
	No. 1	No. 2	No. 3
4	<64	<64	<64
7	64	64	64
10	256	1,024	4,096
14	256	4,006	16,384
18	1,024	—	—

他の1匹のウサギ(No. 6)に Beverley 株シスト1,300 コの多数を腹腔内に接種して、2週より64週に亘り HA 値の変動を追跡検査した(第8表)。マウスの場合には最高稀釈倍数を1:4,096としたが、この場合は更に稀釈倍数を増して検査した。上記期間中接種29週後の1:4,096を除いて17回の検査成績は1:16,384~1:262,144の高い HA 値を示した。1:262,144を示したときが4回認められた。これら最高値を示した直後3ml採血し生食水にて倍量に稀釈しマウス腹腔内に接種して Tp 検出を試みたが、3代マウス継代によっても何れも虫体の証明は出来なかつた。なお接種を受けたマウスの HA 値も凡て陰性であつたので、4回の HA 最高値を示した時期に血虫

Table 8 HA titer of a rabbit (no. 6) inoculated with Beverley cysts

Weeks after inoculation	HA titer
2wks	16,384
3	16,384
4	65,536
6	16,384
8	16,384
10	65,536
12	65,536
14	65,536
19	65,536
*24	262,144
29	4,096
34	65,536
39	65,536
*44	262,144
49	16,384
*54	262,144
59	65,536
*64	262,144

* Parasitemia in the rabbit was not found by subinoculation of the blood into mice.

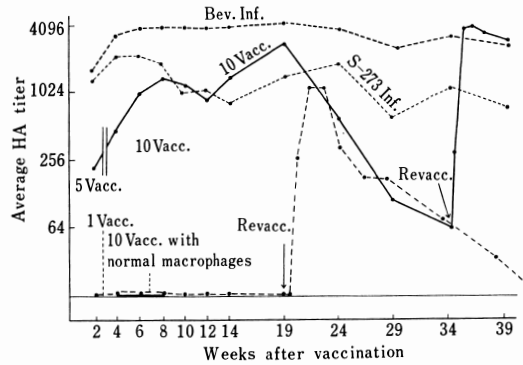


Fig. 1 Comparison of average HA titer in mice inoculated with heat-killed and living toxoplasms.

症はなかつたものと考える。

4. 死虫体ワクチン接種マウスと弱毒株感染マウスとの HA 値持続性の比較

前記成績から HA 値 < 1:64 を 0 とし、1:64, 1:256, 1:1,024 及び 1:4,096 をそれぞれ、1, 2, 3 及び 4 として、各検査時期における平均値を求めて HA 値の変動を比較検討した(Fig. 1)。死虫ワクチンの注射は3日間隔で10回行つた。随つて初回注射より2週経過したマウスは5回注射を受けたものであり、4週以後のものは凡て10回の注射を受けている。2週では1:256に近い値を示し、4, 6週と HA 値は漸次上昇し、以後24週、即ち注射完了から20週まで略1:1,024の値を保ち、注射開始から29週以後は1:64と低下した。

他方 Beverley 株シストの接種を受けたマウスは2週後既に1:1,024を超え、4週後 HA 値測定限度の1:4,096に近い値を示し、以後の観察期間59週後まで同一値を持続保持した(第6表, Fig. 1)。Beverley 株より遙かに毒性の弱い、即ち増殖速度の遅い S-273株シストを Beverley 株シストの場合と略同数接種したマウスは2週後1:1,024を超え Beverley 株接種マウスと略同一の値を示したが観察期間の49週まで1:1,024前後の値を保持した(第6表, Fig. 1)。これらの値は Beverley 株接種マウスのそれに比して1段階低い値である。

Beverley 及び S-273 株接種マウスの感染如何を検するため、期間中死亡マウス及び観察終了時生存マウスは凡て脳におけるシストの検出を試みられた。其結果凡てのマウスにシストを直接証明し得たのでこれらマウスは感染していたことは確実である。

5. ウサギにおける死虫ワクチン頻回注射例と弱毒株感染例の血清中の γ -グロブリンについて

Table 9 HA titer of rabbit sera before and after 2-ME treatment
(Earlier stage of vaccination)

Rabbit No.	Vaccine	2-ME treatment	HA titer on days after the 1st vaccination		
			10days	14	18
4	Killed Tp.	Before	* (4) 256	(5) 256	(5) 256
		After	<64	<64	<64
1		Before	64	64	256
		After	<64	<64	64
2	Living Tp. (Bev. cyst)	Before	64	256	—
		After	<64	<64	—
3		Before	1,024	1,024	—
		After	<64	<64	—

* Figures in parenthesis indicate the times of vaccinations.

Table 10 HA titer of rabbit sera before and after 2-ME treatment
(Later stage of vaccination)

Rabbit No.	Vaccine	2-ME treat.	2wks.	HA titer on weeks after the 1st vaccination				
				3	4	6	8	10
5	Killed Tp	Before	* (5) 64	(7) 256	(10) 256	(10) 256	(10) 256	(10) 64
		After	<64	<64	<64	64	64	64
6	Living Tp (Bev. cysts)	Before	4,096	1,024	1,024	4,096	1,024	16,384
		After	<64	64	256	1,024	1,024	16,384

* Figures in parenthesis indicate the times of vaccinations.

第3, 4表に記載したウサギより採血, 血清分離56°C 30分加温し非動化した後, 血清を PBS pH 7.2にて2.5倍に稀釈した. これを型の如く 2-Mercapto-ethanol (2-ME)にて処理した. 2-ME 処理前後の HA 値を検して 19S 出現, 消失の状況を観察した (第9表). No. 4のウサギは3日間隔にて4~5回の死虫ワクチンの注射を受けたもので, 初回ワクチン注射後10~18日に検した2-ME 処理前の値は凡て 1:256 であつたが, 処理後は凡て <1:64 となつた. No. 1~3 のウサギは Beverley シストの接種を受けたもので接種後10及び14日に検したものは処理前陽性値を示したものが処理後凡て HA 値 <1:64 となつた. 18日後 No. 1 については処理前 1:256 を示し処理後 1:64 を示した. 依つてこれらの検査期間は HA 陽性値が 19S に起因するものと考えられる. この点で生虫体感染と死虫体ワクチン注射の間に差が認められない.

更に日時の経過した場合, 生虫体及び死虫体免疫との間に 19S 消失に差があるかどうかを検するため, 第4表記載のウサギより所定期間に採血し血清分離後非動化して直ちに -20°C 冷凍器に保存し, 後日一括して 2-ME 処理前後の HA 値を検した (第10表). 死虫ワクチン注射の血清は3日間隔10回の注射直後の4週まで 2-ME 処理

によつてすべて明らかに陰転したが, 其後6, 8, 10週の検査では処理前後に有意義の差は認められない. 他方生虫体接種ウサギより得られた血清は接種後2週で2-ME 処理によつて明らかに陰転が認めれ, 3週時の検査でも処理前 1:1024 が処理によつて 1:64 となつている. 4及び6週の検査では処理前後に有意義の差は認められず, 8及び10週では処理前後全く同一値を示した. 依つて感染2週迄の HA 値陽性は 19S に起因するものであろう.

考 察

ヒトからの Tp 分離については, Tp 急性症を除いてその被検材料中に虫体の含まれる頻度は少なく, 分離は頗る困難であるために Tp 症の診断は通常免疫血清的方法に依存している. これには Sabin *et al.* (1948) の色素試験 (DT) とその変法, Jacobs *et al.* (1957) 及び Lewis *et al.* (1964) の感作血球凝集反応 (HAT) とその変法及び補体結合反応 (CFT) があげられるが, DT 及び HAT が主として実用に供されている. DT によつて得られた成績と HAT の成績は陽性, 陰性については本質的に略一致することが Jacos *et al.* (1957), Lewis *et al.* (1964) 及び他の研究者によつて示されている. DT を実施す

るためには Tp 血清反応陰性の健康人から得られるアクセツソリー・ファクターが必要であるが、これの入手が困難であり、而もきまつた供血者を得ることが望ましいが、これは更に困難である。依つて本実験では HAT によつて実験動物の HA 値を追跡した。

Saram *et al.* (1962) は DT, HAT, CFT 及び間接蛍光抗体染色法によつてヒトについて抗体値を検討した結果、これらの免疫血清学的方法によつて Tp 症と決定することに危険を感じている。これに反して Lewis *et al.* (1964) は 24 名のヒト血清について第 1 回採血後 12~30 カ月に亘り DT, HAT を行なつた結果、更に検討の余地はあるが臨床診断に役立つものと考へている。ヒトは後天感染の場合、多く不顕性感染を呈するので Tp に感受性が強いとは考へ難い。即ち感受性が強いならば、感染直後虫体は宿主に適合して急速に増殖し抗体形成の完了迄に各臓器を侵害して重篤な症状を呈するであろうと考へられる。Tp がヒトに侵入した場合、或る期間虫体が生存増殖した後に宿主に馴化せず虫体が死滅し、この間抗体値の陽転することは当然考へられる。依つて短期間の抗体値の検索で Tp 寄生の有無を判断することは危険と考へる。

本実験に於てマウス及びウサギを実験動物として使用した限りに於ては弱毒生虫体感染例で年余に亘り高い HA 値を保持した。この際、使用した弱毒株中無毒に近い Tp 株による感染マウスはより毒力の強い株の感染マウスより HA 値が明らかに 1 段階低かつた。両株の毒性の差異は主として増殖力の強弱に起因するもので虫体の数による抗原性の相違から考へて当然のことと思われる。Lunde *et al.* (1963) もラットを使用した実験で異つた Tp 株で感染した場合、両者の HA 値及び DT 値に差異を認めている。また Sabin *et al.* (1952) はヒト、動物が Tp に感染すると原則として 10~20 日以内に DT 値は上昇して高い値を示し少くも 5 年永続するといつている。Lainson (1959) はモルモットで 5 年間も Tp が生存したことを報告している。他方、死虫ワクチン頻回注射例に於ては注射終了後 10~20 週に亘り HA 値陽性を示し、期間中ある期間は生虫体感染例と同様に高い値を示したが、以後陰転したことが本実験によつて明らかにされた。これら陰転後のマウスに唯 1 回の死虫ワクチン注射を行つた場合、3 日後既に 70% のマウスの HA 値陽転し、1 週以後 7 週迄全部のマウスが陽性値を示した。これらマウスの HA 値陰転後更に 1 回の死虫ワクチン注射例も略前述したと同様に HA 値の上昇が認められた。これらの成績は前処置として死虫ワクチンの頻回注射をうけた

例であるが、マウスに唯 1 回の 1,800 万コ之死虫体を含む死虫ワクチンの注射後は HA 値毎時陰性を示した。注射 19 週後 1 回の死虫ワクチンを注射した場合、細菌感染にみられるよう之亦急激な HA 値の上昇を認めた。併しこの上昇曲線は頻回注射例に比すると少々緩徐の傾向を示し、その頂点も平均的にみたとき低かつた。いずれにしても唯 1 回の死虫ワクチン注射によつて宿主体内の免疫記憶を生じ、これが再度の抗原刺激によつて HA 値上昇の結果を起すものとする。

Tp 感染動物に強毒株が再感染した場合、延命、生残等の何等かの耐過性が示されることは Wolf *et al.* (1940), Weinman (1943), Ruchman *et al.* (1948), Frenkel (1952, 1956), Jacobs *et al.* (1955), Vollbrechtshausen (1955), 上田春人 (1960), Beattie (1963), Stahl *et al.* (1964) 及び Nakayama (1964, 1967) らの報告によつて明らかである。之に反して新里 (1968) はこの耐過性を否定している。ここで死虫ワクチン頻回注射後のマウスの強毒株感染に対する耐過性と HA 値の関係について検討を加える。佐藤 (1963) は Tp のフォルモール、ワクチンを 4 日間隔で 2 回マウスに注射して耐過性を検したが、殆んどワクチン効果を認めなかつたが、アジュバント・ワクチンにするとマウスの生残数を増し斃死日数の延長を認めている。Cutchins *et al.* (1956) もフォルマリン処置の Tp 死虫のアジュバンド・ワクチンを用いて DT 及び CFT による抗体値の上昇を認め攻撃接種に対する可成りの免疫効果を認めている。之に反して Beattie (1963) は結核症のように Tp 死虫ワクチンの注射は動物の感染に対する耐過性に殆んど役立たないといつている。本実験に於ては頻回死虫ワクチンを注射した場合、初回注射から 6 週、即ち最終注射終了後 2 週までに強毒株の攻撃接種をした結果は 1/3~1/2 のマウスに耐過生存が認められた。併し、それ以後注射終了後 10 週までに検した成績は 69 匹中僅か 2 匹に耐過生存が認められたに過ぎなかつた。またこの耐過生存と HA 値との関連を検したところ、両者間に全く相互関連は認められなかつた。これらの耐過生存したマウスはすべて攻撃虫体を潜在して、而も元気に生存を続けていたことが証明された。随つて死虫ワクチン注射は注射後早い期間はそのあるものは攻撃株の増殖を抑圧するためにマウスの生存が認められるのであつて、決して攻撃虫体を根絶するほど強力に作用するものではないことが確認された。

Remington *et al.* (1966) はヒト Tp 症の急性期に 19S, Tp 抗体が出現するかどうかを濃度勾配遠心沈澱法とゲル濾過法で検して、19S 抗体は先天性及び後天性の急性

Tp 症の患者の血清中に証明しているが、慢性期の患者には認め難いといっている。19S 検索の方法として 2-メルカプト・エタノール (2-ME) で処理すると 19S 抗体が著明に減少するが、ヒトを検索する場合、大部分の患者が慢性期であるため、7S 抗体が高い単位に含まれているので 19S 抗体活性を求めることは不可能であると付言している。本実験に於ては抗原注射の時期が明瞭であるので 7S 出現の少ない急性期における 19S 出現の状況を主としてウサギについて 2-ME によつて検討した。死虫ワクチン頻回注射例では注射中及び注射終了時の 4 週までは明らかに 19S が HA 値陽性の主因をなすものであつた。生虫体による感染の場合は感染後 3 週までは 19S が HA 値陽性の主因をなすものであることを知つた。両者の成績からみて、HAT に関する限り死虫ワクチン注射及び生虫体感染により産生される体液性免疫抗体に本質的差異はないものと考えられる。

Chordi *et al.* (1964) は HAT は羊赤血球と Tp 抗原に含まれている種々なマウス血清蛋白をもつ異種抗原のために偽陽性に出現するが、その値は低く 1:200 又はそれ以下であつて 1:200 以上の凡ての血清反応は特異的で Tp 抗原だけに反応するといっている。著者の経験でも HA 値陰性の健母から生まれた幼若マウスに HA 値 1:64 を示すものが時折あるので、1:64 は非特異凝集と考え、本実験に於ては HA 値 1:256 又はそれ以上を陽性とした。ウサギに弱毒 Beverley 株シストを接種した場合、接種 64 週後までに 4 回 HA 値 1:262, 144 の高い値を示した。この時期に血虫症の有無を検したが、凡て陰性であつた。これはこの時期以前に血虫症があり、その結果このような高い値を示したもので、採血時即ち高い陽性を示した時期には既に血虫症の時期を過ぎて了つたものと考えたい。

上述の成績及び思考過程から短期間の HAT 陽性値によつて Tp 症と診断することは危険であると考えられる。即ち、短期間の陽性値は宿主に Tp の侵入による一時的増殖の既往は考えられるが、必ずしも生虫体の寄生を意味しない。併し長期に亘る陽性値は Tp 生虫体寄生の濃厚な疑がもたれ、其間陽性域値の著明な上昇は宿主体内シストの破裂による虫体の一時的増殖又は再感染の結果と考える。

結 語

Tp 症の診断上花木・信藤・佐藤法 (1963) による HA 値についての適正な判断を下すことを目的としてマウス、ウサギを使用して実験を行い以下の成績が得られた。

1) 弱毒 Tp 株の感染をうけたマウス及びウサギは感染 2 週後より観察期間の年余に亘り高い HA 値を保持した。死虫ワクチンを 3 日間隔で 10 回注射した場合、マウス、ウサギの HA 値陽転し、前記感染動物と略同じ HA 値に達し、マウスでは注射終了後 20 週、ウサギでは 10 週保持され、以後漸次 HA 値低下し、それぞれ最終注射後 25 週及び 15 週に殆んど陰転した。これらの時期に死虫ワクチン 1 回の注射をしたところ HA 値は急激に上昇し高い値を示した。前処置せずにマウスに唯 1 回の死虫ワクチン注射を行つた場合は観察期間の 19 週後まで毎回 HA 値陰性であつたが、之亦 1 回の死虫ワクチン注射後急激な HA 値の上昇をみた。

2) 死虫ワクチン頻回注射マウスの強毒 RH 株攻撃に対する耐過性を検したところ、最終注射終了後 2 週までに 1/3~1/2 マウスに耐過生存が認められた。其後も注射終了後 10 週までの検査では 69 匹中僅か 2 匹に耐過生存が認められたに過ぎなかつた。これらの耐過生存したマウスは凡て攻撃株虫体を潜在し元氣にも生存を続けたことが証明された。耐過生存と HA 値について両者間に全く相互関係は認められなかつた。

3) ウサギを用い 2-ME によつて急性期における 19S 抗体出現の状況を主として観察し、死虫ワクチン頻回注射例と弱毒株感染例について比較検討した。前者では注射終了時の 4 週まで、後者では接種 3 週後まで 19S が HA 値陽性の主因であることを知つた。依つて感作血球凝集反応に関する限り産生される体液性免疫抗体の両者間における本質的差異は認められないと考える。

終りに適切な御助言と御校閲を賜つた慶応義塾大学医学部、松林久吉教授に深謝します。なお、本研究の要旨は昭和 43 年 4 月 3 日の第 37 回日本寄生虫学会総会にて発表した。

引用文献

- 1) Beattie, C. P. (1963): Immunity to *Toxoplasma*. A symposium of the British Society for Immunology. Blackwell Scientific Publications Oxford, 253-258.
- 2) Chordi, A., Walls, K. W. and Kagan, I. G. (1964): Studies on the specificity of the hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Imm. 93, 1024-1053.
- 3) Cutchins, E. C. and Warren, J. (1956): Immunity patterns in the guinea pig following *Toxoplasma* infection and vaccination with killed *Toxoplasma*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5, 197-209.
- 4) Frenkel, J. K. (1952): Effect of vaccination

- and sulfamide therapy on experimental toxoplasmosis. Fed. Proc. 11, 468-469.
- 5) Frenkel, J. K. (1956) : Pathogenesis of toxoplasmosis and of infections with organisms resembling *Toxoplasma*. Ann. New York Acad. Sci., 64, 215-251.
 - 6) 花木琢磨・信藤謙蔵・佐藤卯三郎(1963) : トキソプラズマ血球凝集反応の BDB 結合, 凍結乾燥感作血球 (B 抗原) の創製について. 第23回日本寄生虫東日本支部大会記事, 10.
 - 7) Jacobs, L. and Melton, M. L. (1955) : Immunity in murine toxoplasmosis, J. Parasit., 41, Supp. 20.
 - 8) Jacobs, L. and Lunde, M.N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit., 43, 308-314.
 - 9) Lainson, R. (1959) : A note on the duration of *Toxoplasma* infection in the guinea pig. Ann. Trop. Med. Parasit., 53, 120-121.
 - 10) Lewis, W. P. and Kessel, J. F. (1964) : Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis. Arch. Ophth., 66, 471-476.
 - 11) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1963) : *Toxoplasma* hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. J. Parasit., 49, 932-936.
 - 12) Nakayama, I. (1964) : Persistence of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* in brain of immune mice. Keio J. Med., 13, 7-12.
 - 13) Nakayama, I. (1967) : A method of detection of *Toxoplasma* infection in man. Japanese J. Parasit., 16, 381-388.
 - 14) 中山一郎(1967) : トキソプラズマ症の疑のある200名よりの虫体検出と検出方法について. 寄生虫誌, 16, 464-469.
 - 15) Remington, J. S. and Miller, M. J. (1966) : 19S and 7S antitoxoplasma antibodies in diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121, 357-363.
 - 16) Ruchman, I. and Johansman, R. J. (1948) : Biological properties of a strain of *Toxoplasma* recovered from a fatal case of congenital toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med., 28, 687-695.
 - 17) Sabin, A. B. and Feldman, H. A. (1948) : Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoa parasite (*Toxoplasma*). Science, 108, 660-663.
 - 18) Sabin, A. B., Eichenwald, H., Feldman, H. A. and Jacobs, L. (1952) : Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man. Indications and provision for routine serologic diagnosis. J. Am. Med. Ass., 150, 1063-1069.
 - 19) Saram, W., Kelen, A. E. and Labzoffsky, N. A. (1962) : Comparison of serological tests in toxoplasmosis. Canadian Med. Ass. J., 87, 604-607.
 - 20) 佐藤平二(1963) : *Toxoplasma* 症の免疫について. 動物と微生物(越智勇一博士還暦記念出版), 南江堂, 124-130.
 - 21) 新里仁達(1968) : *Toxoplasma gondii* の免疫に関する研究. 数種マウスに対する Beverley(弱毒)株の病原性と防禦抗原性について. 寄生虫誌, 17, 429-435.
 - 22) Stahl, W. and Akao, S. (1964) : Immunity in experimental toxoplasmosis. Keio. J. Med., 13 1-6.
 - 23) 上田春人(1960) : *Toxoplasma* (チステ形成株) の毒力及び免疫について. 慶応医学, 37, 1631-1638.
 - 24) Vollbrechtshausen, R. (1955) : Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der aktiven immunisierung bei Toxoplasmosen. Zeitsch. Trop. Parasit., 6, 159-165.
 - 25) Weinman, D. (1943) : Chronic toxoplasmosis. J. Inf. Dif., 73, 85-92.
 - 26) Wolf, A., Cowen, D. and Paige, B. H. (1940) : Toxoplasmic encephalomyelitis. IV. Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. J. Exp. Med., 71, 184-214.

AbstractPERSISTENCE OF POSITIVE HEMAGGULUTINATION TITER IN ANIMALS
VACCINATED WITH KILLED TOXOPLASMAS AND THEIR RESISTANCE
TO CHALLENGE WITH VIRULENT STRAIN

ICHIRO NAKAYAMA

(Department of Parasitology School of Medicine Keio University, Tokyo)

For a critical evaluation of positive titer of hemagglutination (HA) test of toxoplasmosis, the following experiment was carried out using mice and rabbits. The mice inoculated with the low virulent strains were examined for the persistence of positive HA test. These mice maintained high titer level during the periods from 2 weeks to more than one year after the infection, having viable organisms in their brains. When mice were injected with heat-killed *Toxoplasma* vaccine 10 times with intervals of 3 days, they usually became positive for HA test, attaining almost as high as in cases of the infection with low virulent strains. The positive titers obtained by the vaccination usually lasted for the period from 2 to 24 weeks after the first injection of vaccine and gradually dropped thereafter to attain almost negative during the period from 24 to 34 weeks after the first vaccination. When these nearly negative mice received a booster vaccination, the titer rose suddenly to attain a very high level, almost as high as in cases of the low virulent strain infections. In cases of rabbits, almost the same results were obtained. On the other hand, one injection of the vaccine into mice did not give a positive titer. But, when these negative mice were revaccinated 19 weeks later, they also showed very high titer.

Mice which received repeated vaccination and showed positive titers were challenged with highly virulent strains 2 to 6 weeks after the first vaccination. Approximately 1/3 to 1/2 mice could survive the challenge. By the challenge performed 8 to 14 weeks after the first vaccination, however, only 2 out of 69 mice could survive the challenge, although all these mice had still high titers. When these mice survived were sacrificed later, however, viable *toxoplasmas* used for challenge were detected from their brains, as evidenced by subinoculation into clean mice. Antibody produced in these cases, therefore, was able to suppress the multiplication, but was unable to eradicate the parasite.

By 2-Mercapto-ethanol treatment, 19S antitoxoplasmic antibodies in rabbit sera were mainly observed in the earlier stage after inoculation with Beverley cysts or repeated vaccination with killed toxoplasmas. In the latter, positive HA titer produced mainly by 19S was recognized during the period of vaccinations and in the former during 3 weeks after the inoculation. Therefore, there was no essential difference between rabbits vaccinated by the killed organisms and those with the living organisms so far as the HA antibody production is concerned.