

# 肝蛭症の凝集反応 (Rapid Flocculation Test) に関する研究

## (1) 抗原及び反応術式に関する考察

進 貞 夫 藏元 虎藏 市原 強 市原 鶴雄

化学及血清療法研究所 (所長 竹屋綱男博士)

(昭和33年7月11日受領)

### 緒 言

肝蛭症の血清学的反応に関しては、補体結合反応、あるいは沈降反応について、古くから研究が行われてきた。最近、肝蛭症以外の他の寄生虫症において若干試みられ始めた反応に、Rapid flocculation test がある。これは一種の沈降反応であつて、著者等がこの反応に注目し、肝蛭症に対して検討を試みたのは、従前より研究を行つてきた肝蛭症の沈降反応(市原ら、1956 a, b, c)と、何らかの関連性をもつた結果が得られるかも知れないと考えたからである。

表題に凝集反応と記したが、これは正式の呼称ではなく、一部の人が仮称しているものを、本稿でも用いることにした。この反応は、最初、梅毒において研究されたものである。梅毒の血清学的診断法を簡易化し、鋭敏化し、更に迅速な判定を可能にしようとした、Kline (1932) の顕微鏡を用いた載せガラス沈降反応がそのはじまりである。その後、梅毒の新しい診断法を確立する目的で、これに対し多くの研究者によつて種々の改良が加えられ、現在、Microflocculation test あるいはガラス板法等と総称されている。これらの反応術式はいずれも共通して、ガラス板の上で少量の血清と抗原とを混ぜて、短時間内に沈降反応を起させ、その成績判定は顕微鏡下で行い、正確な判定を期するものである。

本反応が寄生虫症に応用されたのは、比較的新しいこととして、1944年 Suessenguth 及び Kline が、人及び豚の旋毛虫症に応用したのが初期の報告である。彼等は、旋

毛虫々体のアルカリ抽出液でコレステリンを感作したものを抗原として、反応を行つた。次に、1951年 Bozicevich 等が豚の旋毛虫症に対して、虫体の生理的食塩水抽出液でベントナイトを感作した抗原を用いて反応を試み、それぞれ、特異的な成績を得たと報告した。我国では、1956年横川が肺吸虫々体のペロナール抽出液でベントナイトを感作した抗原を用いて、人の肺吸虫症に実施し、該反応はある程度虫体の生存と関係が認められ、その補体結合反応と極めてよく一致する成績が得られたと述べている。

著者等は、これを肝蛭症に試みるに際し、まず、脂質抗原をとりあげ、本抗原による反応の基礎的な条件について考察を加えた。本報告では、山羊肝蛭症についての知見を述べる。

### 材料及び方法

#### 1. 供試血清

実験には、当研究所で購入した生後1年以上の成熟山羊を用い、更に、血清対照として離乳前の幼若山羊材料を用いた。

#### 2. 抗原液の製法

抗原材料となる肝蛭虫体は、屠殺牛より採取した。まず、新鮮な成熟肝蛭虫体を、生理的食塩水で、次に蒸留水でよく洗滌した。この磨砕材料を凍結乾燥して、30倍量の純アルコールで30°C、7日間抽出し、抽出液について、2°C、2日間放置後生ずる沈澱を除去して、上清をとつた。この脂質分画(抗原L)に精製コレステリン(C)を加えたものを、Stock antigen とした。磷酸緩衝液にこの Stock antigen を10%になるように懸濁して、抗原L感作コレステリン粒子の均質な浮遊液を作り、これを Test antigen (以下簡単に抗原液と記す)として反応に用いた。抗原液は調製後4時間以内に使用することとし、それ以上経過したものは用いなかつた。

SADAO SUSUMI, TORAZO KURAMOTO, TSUYOSHI ICHIHARA & TSURUO ICHIHARA: Studies on the rapid flocculation test for fascioliasis. (1) Investigation on the antigens and technique for the rapid flocculation test (The Chemo-Sero Therapeutic Research Institute, Kumamoto)

3. 反応術式

直径20mm, 深さ3mm の丸い凹みをもったガラス板に被検血清をそれぞれ0.05cc宛のせ, それに1ccが $\frac{1}{60}$ 滴になるように作った注射器で抗原液を滴下した。これを1分間に約120回転の割合で5分間水平回転した。そして弱拡大の光学顕微鏡下(50~80倍)で, 抗原粒子の凝集程度を観察した。成績判定は, 大体緒方氏梅毒検査法(1954)の判定基準に従った。すなわち, その成績は抗原粒子の凝集程度により, 卅, 卅, 卅, 卅, 卅の5段階に分けて記載した。

実験成績

実験成績は, 抗原粒子形成及び反応実施の基礎的な条件に関する考察を主として述べる。

1. 抗原粒子形成の基礎的条件

a. 脂質抗原濃度とコレステリン濃度の比(L:Cの比)

反応に最も適した抗原液をつくるためには, 感作原と

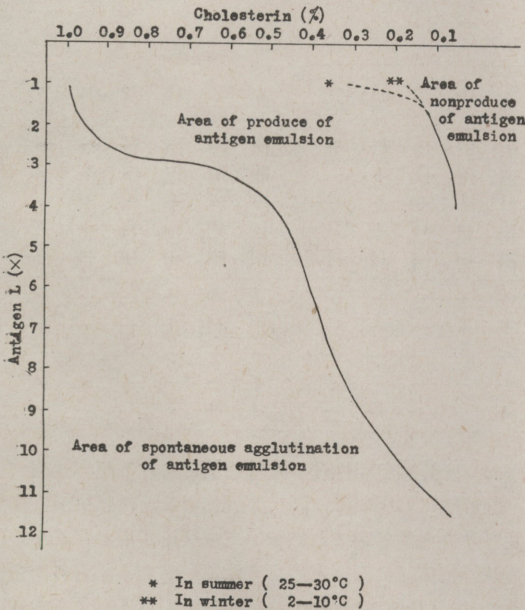


Fig. 1. Influence of the ratios of lipid antigen (antigen L) and cholesterol to produce antigen emulsion

感作物質との濃度比が大きき因子となる。著者等は感作原に脂質分画, 感作物質としてコレステリンを用いたので, このL:C比の関係を検討してみた。すなわち, Fig. 1のように, 抗原粒子形成域(L=C)と不形成域

(L>C)の他に自然凝集域(L<C)がみられるが, 形成域は不形成域の間に存在し, 実線で囲んだ範囲となった。粒子形成の最適比は, 抗原Lの原液について, C濃度の0.4~0.9%の間にあることが解った。

b. 緩衝液の pH の影響

Fig. 2 に抗原Lを原液とした場合の, 粒子形成に及び

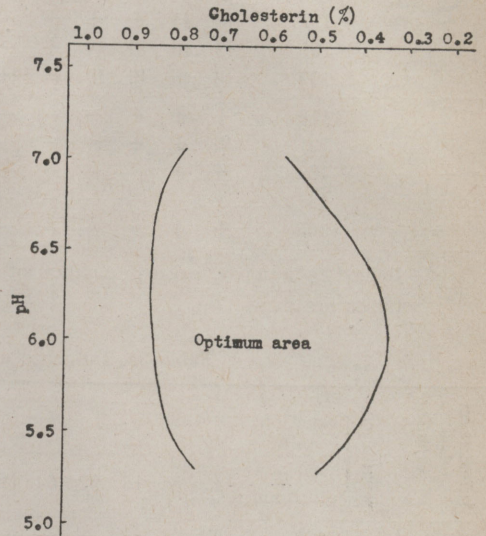


Fig. 2. Influence of pH to produce antigen emulsion

す pH の影響を示すと, pH 5.5~7.0の間に, 実線で示したような最適域が存在することが解った。以下の実験はすべて抗原Lを原液, Cを0.6%, pHを6.0として行つた。

2. 反応条件の基礎的検討

反応のための血清には感染陽性血清5例, 陰性血清5例をそれぞれ用いた。

a. 抗原の量

第1表に, 血清の一定量に対して抗原量を種々変化させて行つた反応成績を示した。血清量はすべて0.05ccで, 抗原量は $\frac{1}{60}$ ,  $\frac{2}{60}$ ,  $\frac{3}{60}$ ccの3つを組合せて比較した。抗原量 $\frac{1}{60}$ ccの場合が,  $\frac{2}{60}$ ,  $\frac{3}{60}$ ccに比較して反応が若干強度であるように思われた。

b. 反応時間

血清: 抗原液=0.05cc: $\frac{1}{60}$ cc, 回転速度を120r. p. m. として行つた。第2表のように, 反応時間を2分とした場合には, 5分, 8分比べて明らかに弱い反応が得られた。

Table 1. Influence of antigen doses to reaction

Infestation with <i>F. hepatica</i> *	Serum no.	Antigen doses (cc)		1/60						2/60						3/60											
		Serum dilutions		4		8		16		32		64		128		4		8		16		32		64		128	
		+	137	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	++	++	++	+	+	+++	++	++	+	-	-	+++	++	++	+	-
	163	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	
	177	+++	++	+	+	+	-	+++	++	+	+	-	-	+++	++	+	+	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	
	191	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++	+++	+	+	-	
	199	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	+	
-	116	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	121	+++	+	+	-	-	-	+++	+	+	-	-	-	+++	+	+	-	-	-	-	+++	+	+	-	-	-	
	139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	141	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	168	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	

\* Judged by autopsy, egg examination of the feces and gall bladder contents, and the following tables are same

Table 2. Influence of the time of rotation to reaction

Infestation with <i>F. hepatica</i> *	Serum no.	Time of reaction (min)		2						5						8											
		Serum dilutions		4		8		16		32		64		128		4		8		16		32		64		128	
		+	137	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	++
	163	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	+	-	
	177	+	+	+	+	-	-	++	++	+	+	+	-	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	+	-	
	191	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	+	-	
	199	++	++	++	++	+	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	
-	116	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
	121	++	+	+	-	-	-	+++	+	+	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	-	
	139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	141	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	168	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	

c. 回転速度

血清：抗原液=0.05cc：1/60 cc, 回転時間を5分間として行つた。30 r.p.m. の場合は60 r.p.m. 及び120 r.p.m. の場合に比べて若干弱い反応を示す傾向が認められた。

3. 反応に及ぼす血清不活化の影響

前述の基礎的検討は、すべて働性血清について行つたものである。そこで、本反応における血清加温の影響を検討してみた。第4表に働性血清の場合と56°C30分間加温による非働性血清の両者の反応を示した。血清の非働性化による抗体価の変化には、感染陽性血清、感染陰性血清のいずれにおいても殆んど影響が認められなかつた。

4. 肝蛭感染陽性及び陰性血清における反応様相

肝蛭症においては、該抗原液によると、感染陽性血清及び陰性血清のいずれにおいても反応が現われるが、両血清の抗体価には、どのような違いがあるかどうかを知るため、Box titrationを行つてその反応様相を検討した。術式は前述したように、働性血清：抗原液=0.05cc：1/60ccに混ぜて120 r.p.m. 5分間回転して反応を行つた。血清の稀釈度を抗体価とし、抗原の粒子数を決定するC濃度(%)をもつて抗原価として表わした。

感染陽性血清23例、陰性血清30例についての反応様相をFig. 3に示した。陰性血清における抗体価は、大体において最高の場合16倍迄存続し、32倍では消失する傾向

Table 3. Influence of the rotating speed to reaction

Infestation with <i>F. hepatica</i> *	Serum no	Speed of rotation (r.p.m.)																	
		30						60						120					
		Serum dilutions						Serum dilutions						Serum dilutions					
		4	8	16	32	64	128	4	8	16	32	64	128	4	8	16	32	64	428
+	137	+++	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	++	++	+
	163	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	++	+	-
	177	++	++	+	+	-	-	++	++	+	+	+	-	++	++	+	+	+	-
	191	+++	+++	++	+	+	-	+++	+++	++	++	+	-	+++	+++	++	++	+	-
	199	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++
-	116	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	121	+++	++	+	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	+++	+	+	-	-	-
	139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	141	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Table 4. Influence of serum inactivation to reaction

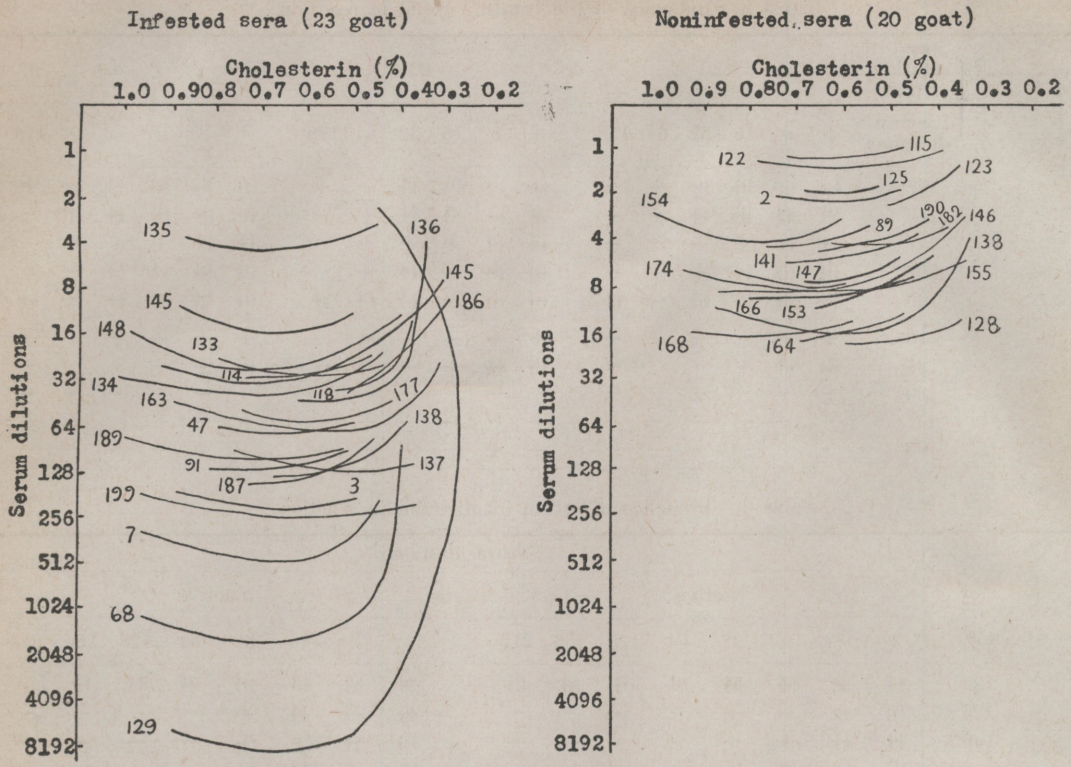
Infestation with <i>F. hepatica</i> *	Serum no.	Serum dilutions																
		Active								Inactive								
		4	8	16	32	64	128	256	512	4	8	16	32	64	128	256	512	
+	129	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
	136	+++	++	++	+	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-
	148	++	++	+	+	-	-	-	-	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
	163	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
	189	+++	++	++	+	+	+	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-
-	122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	146	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	166	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	169	++	++	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	182	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

が認められた。大部分の感染陽性血清は32倍乃至 128倍の抗体価を示したが、若干の感染陽性血清はそれ以上の高い抗体価を示した。例えば、No. 129血清の抗体価は8192倍であった。No.135, No. 145血清は4倍乃至16倍という低い抗体価を示し、本反応における陽性反応の基準を抗体価32倍とするならばこれらの血清は陰性反応を示したことになるが、一応の陽性反応の基準を抗体価32倍以上とした。以上2より4迄の実験において、血清対照として用いた幼若山羊血清に対する反応は、いずれも全く認められなかった。

5. 山羊における肝蛭感染と反応成績の比較

上述の実験の結果により、一応の術式並びに判定基準が解つたので、該反応を成熟山羊 161例について試みた。すなわち、採血して遠心分離直後の働性血清につい

て、凝集反応と沈降反応を実施し、“反応のきめて”として、屠殺後、剖検し、胆嚢内肝蛭卵検査(1956)及び糞便内肝蛭卵検査を行つた。尚、反応実施に際しては、毎回必ず血清対照を供試した。累計 161例について、凝集反応においては、“きめて”が陽性であったもの29例中反応陽性26例、反応陰性3例、“きめて”が陰性であったもの 132例中反応陽性4例、反応陰性 128例で、反応適中率の信頼区間を求めると(信頼区間は以下すべて危険率5%とする)、72.9~97.8%であり、“きめて”と反応の一致しなかつたものについて、反応による見逃し及び見誤りの率を求めると、それぞれ 2.3~27.1%、0.8~7.4%となる。生存虫体と反応の関係は、虫体陽性23例中反応陽性21例で、反応適中率は71.8~98.9%、反応陰性2例で、反応による見逃し率は虫体陰性 138例中



The figures indicate the serum no.

Fig. 3. Reaction areas for goat sera infested and noninfested with *F. hepatica*

Tabel 5. Comparative results of infestation with *F. hepatica*, precipitation test and rapid flocculation test (R F test) in 161 goats

No. of goat	16	5	5	2	2	1	1	1	1	128
Flukes	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Eggs	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Visceral change	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Precipitation test	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
R F test	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

反応陽性 9 例で、反応不一致率、3.1~11.7%となった。

凝集反応と沈降反応の関係については、実験例がまだ少数例であるので明言することは出来ないが、大体において相関性がみられる。又、供試した肝蛭陽性例がまだ少数であるが、肝蛭感染の程度は、凝集反応の程度と関連があるように思われた。

6. 他疾患血清に対する反応

人及び家兎血清若干例について、本凝集反応を実施し

たので、第6表に示した。

人血清は、十二指腸虫陽性 5 例、梅毒陽性 5 例を用い、家兎血清は、寄生虫卵陰性 5 例を用いた。人の十二指腸虫陽性血清は、全例とも全く反応発現をみず、人梅毒陽性血清及び家兎血清は可成りの強さの反応発現が見られたが、いずれも抗体価 8 ≧ であつた。

考察

Rapid flocculation test すなわち“所謂凝集反応”は

Table 6. Reactions with other diseases  
by R F test

Kinds of diseases	Serum no.	Serum dilutions						
		1	2	4	8	16	32	64
Human ( <i>ancylostoma</i> )	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—
Human (syphilis)	1	+++	+++	+++	+	—	—	—
	2	+++	+++	+++	+	—	—	—
	3	+++	+++	++	+	—	—	—
	4	+++	+++	+++	+	—	—	—
	5	+	+	+	—	—	—	—
Healthy rabbit	1	++	++	+	+	—	—	—
	2	+	+	—	—	—	—	—
	3	+	+	—	—	—	—	—
	4	+++	+++	+++	+	—	—	—
	5	+	+	—	—	—	—	—

術式が簡単であること、反応が鋭敏であること及び判定が迅速に行えることの 3 者を特長とする反応であるが、これが肝蛭症に対する応用は未だ行われていない。寄生虫症では、人、豚の旋毛虫症に対する応用が最も初期の報告であり、最近に至つて、人の肺吸虫症に試みられている。

本反応で先ず重要な事柄は、均等な抗原粒子を含む抗原懸濁液を如何にしてつくるかということである。旋毛虫症にみられる二つの方法も本質は同一で、如何なる形態をもつた抗原液を用いたかという点が異なるにすぎない。しかしながら、本反応はその抗原液の性状によつて、反応の鋭敏度、特異度が著しく左右されるものである。今回の実験成績を検討してみると、著者等の、虫体のアルコール可溶性脂質感作コレステリン液を用いた場合、問題とすべき点は、肝蛭陽性血清のみならず、陰性血清にも若干反応が現われ、しかも、この場合、陽性及び陰性血清の示す抗体価の差は、最少 1 段階しか認められないという点である。この感染陽性血清と陰性血清におけるそれぞれの反応の本態は何であるが、多くの検討を要するものがある。該抗原液による反応が、人血清の十二指腸虫陽性例では抗体価 0 で、梅毒陽性血清には抗

体価は最高 8 を示し、家兔血清 (寄生虫卵陰性) に対しても最高 8 の抗体価を示したことと考えあわせると、少くともこの形式の反応においては、脂質抗原は寄生虫症以外の何かある抗体と、互いに関連性を有するのではないかと思われる。

他寄生虫症との類属反応については、これまた重要なことであつて必然的に吸収試験等の方法が考えられる。未だ少数例ではあるが人血清の例によつて、十二指腸虫症との間には類属反応は認められない成績が得られた。その他の例については現在追求中である。さきに述べたように、肝蛭感染の“きめて”が陰性であつた 132 例中 4 例が陽性反応を示したが、これを見誤りの確率とすると、それは、0.8~7.4%となる。この 4 例における他寄生虫の出現状況は、鉤虫、胃虫混合感染例 3 例、胃虫感染例 1 例であり、反応共に陰性であつた 128 例における他寄生虫の出現頻度は、鉤虫、胃虫混合感染例 68 例、鉤虫感染例 15 例、双口吸虫、鉤虫混合感染例 4 例、胃虫感染例 2 例、いずれも検出されなかつたもの 39 例であつた。本反応の類属反応の問題に関しては、まだ考慮すべきことが多く、綿密な検討を要するものと考えられる。

以上著者等が用いた抗原は、アルコール可溶性脂質分画であつて、更にこの分画を化学的に精製することによつて、特異的反應の抗体価を高め、類属反応性を押えることが可能となるかも知れない。その他、若干の報告においてみられる色素による抗原粒子の着色法をとりあげること、反応の判定を更に容易且つ正確にすることが期待される。又、抗原の感作物質に、他の微粒子、例えば、カオリン、ベントナイト等を取りあげることも、一つの試みとなるであろう。これらの抗原液に関するところのまだ検討の余地のある諸問題、及び牛肝蛭症における問題とのそれぞれの成績は、別報したい。

要 約

肝蛭症における Rapid flocculation test 所謂凝集反応の可能性を検討した。上述の成績を要約すると、次のようである。

1. 本反応を実施するには、抗原性物質で感作された適当な性状及び数の微粒子を含む抗原懸濁液を得ることが必要である。著者等は肝蛭虫体の脂質分画 (L) でコレステリン (C) を感作して、抗原懸濁液をつくつた。L と C の濃度比及び緩衝液の pH は、この懸濁液の性状に可成りの影響を示した。
2. 抗原と血清の割合、回転速度及び反応時間等の反

応条件により、反応は若干の影響をうけた。

3. 血清の働性及び非働性による抗体価の変動は認められなかった。

4. 陽性反応の限界を抗体価 $32 \leq$ として、山羊肝蛭症血清について反応を実施したところ、可成りの成績が得られた。

5. 他疾患血清との反応を検討したところ、人梅毒陽性血清及び寄生虫陰性の家兎血清にも、抗体価 $8 \geq$ の反応が認められた。人十二指腸虫陽性血清には、反応は全く認められなかった。

おわりに、所長竹屋男綱先生に敬意を表し、御指導、御校閲をいたゞいた熊本大学教授六反田藤吉、岡村一郎両先生に厚く御礼申し上げます。なお、本研究に御援助下さった所員各位に感謝いたします。

本報告の要旨は第42回日本獣医学会（昭和31年10月）において発表した。

## 文 献

- 1) Bozicevich, J., Tobie, J.E., Thomas, E.H., Høyen, H. M. & Ward, S. B. (1951): A rapid flocculation test for the diagnosis of trichinosis. *Pub. Health Rep.*, 66(25), 806-814. —2) Craig, C.F. & Faust, E.C. (1951): *Clinical parasitology*, Ed 5, Henry Kimpton, London. —3) Hutyra, F., Marek, J. & Manning, R. (1949): *Special pathology and therapeutics of the diseases of domestic animals II*, Ed 5, Alexander Eger Inc., Chicago. —4) 市原鶴雄・進貞夫・蔵元虎蔵 (1956a): 肝蛭症の診断に関する研究, I, 沈降反応抗原, *日本獣医学雑誌*, 18(4), 119-129. —5) 市原鶴雄・進貞夫・蔵元虎蔵 (1956b): 肝蛭症の診断に関する研究, II, 牛肝蛭症における沈降反応, *日本獣医学雑誌*, 18(4), 131-135. —6) 市原鶴雄・進貞夫・蔵元虎蔵 (1956c): 肝蛭症の診断に関する研究, III, 山羊肝蛭症における沈降反応, *日本獣医学雑誌*, 18(4), 137-140. —7) Kline, B. S. (1932): *Microscopic slide precipitation test for the diagnosis & exclusion of syphilis*, Williams & Wilkins Co., Baltimore. —8) 蔵元虎蔵・進貞夫・市原強・市原鶴雄 (1956): 肝蛭症における凝集反応の試み (予報), 第4回九州家畜衛生技術研究会講演. —9) 蔵元虎蔵・進貞夫・市原鶴雄 (1956): 肝蛭症の Rapid Flocculation Test について (予報), 第41回日本獣医学会講演. —10) 蔵元虎蔵・進貞夫・市原鶴雄 (1956): 肝蛭症の凝集反応について I, 第42回日本獣医学会講演. —11) 緒方富雄 (1954): 梅毒の新しい血清学的検査法, 改訂第2版, 南江堂. —12) Suessenguth, H. & Kline, B. S. (1944): A simple rapid flocculation slide test for trichinosis in man and in swine. *Am. J.*

*Clin. Path.*, 14(5), 471-484. —13) 進貞夫・蔵元虎蔵・荻原雄典・松村彦七郎 (1956): 肝蛭症の診断における虫卵検査の意義, *日本獣医師会雑誌*, 9(9), 411-414. —14) 横川宗雄 (1956a): 肺吸虫症の“Rapid Flocculation Test”について, *国立公衆衛生院研究報告*, 5(2), 7-10. —15) 横川宗雄 (1956b): 肺吸虫症の皮内反応, 補体結合反応及び凝集反応 (Rapid Flocculation Test) について, *臨床病理*, 4(3), 224-230.

## Summary

The rapid flocculation test (R F test) is the most widely used for the laboratory serodiagnosis of syphilis in man, and some bacterial diseases in man and animals. Moreover, the test has been investigated in the field of parasitology of late years. We (1954-1956) had studied preciously on the precipitation test for fascioliasis in recent years. The present experiments were put in practice for the purpose to investigate if the R F test should be able to apply for the laboratory diagnosis of fascioliasis.

Generally speaking, the acquirement of antigen emulsion which consist to a suitable number of the uniform micro-particles sensitized with the antigen material may bring the satisfactory results for this test. A satisfactory antigen emulsion was obtained by employing the cholesterin crystal which was sensitized with lipid antigen. The lipid antigen was extracted with absolute ethanol from the lyophilized mature *Fasciola hepatica*. However, the preparation of antigen emulsion was influenced considerably by the ratios and concentrations of lipid antigen and cholesterin, and the pH of buffered solution.

The test was carried out according to the technique adopted in the Ogata's glass plate method (1954) for syphilis, i. e. 0.05ml of serum or diluted serum were pipetted into the circular basin of glass slide (20mm, in diameter, 3mm, in depth), and 1 drop (1/60 cc) of antigen emulsion was added to each serum. And then the slide was rotated for 5 min, at a speed of 60-120 rpm on a mechanical rotator or on a flat plate rotated by hand. The results were observed immediately on the degree of clumping of the sensitized microparticles at a magnification of 80× or 100×. The reaction was weakly affected by the ratio of antigen and serum, the rotating speed, and the time of rotation. However, it was scarcely influenced by the inactivation of serum at 56°C for 30min.

The reactions for goat sera infested with *F.*

*hepatica* were as follows: the endpoints of positive reaction covered the dilutions of serum in saline ranging from 1:32 to 1:8192 for 23 sera infested with *F. hepatica*. On the other hand, for 20 noninfested sera the endpoint of positive reaction between 1:1 and 1:16. These goat sera were not all inactivated. The same test was carried out to 5 human sera

infested with *Ancylostoma*, 5 human syphilis sera, and 5 normal rabbit sera. As a result, all *Ancylostoma* positive sera showed the negative reaction, but all human syphilis sera and 2 rabbit normal sera showed positive at the titer of antibody (1:8).

It was considered that the reaction with the titer of antibody 1:32 or above is a specific one.