

血球凝集反応による豚の *Toxoplasma* 症汚染度の測定

岡 好 万 山 川 敬 止 草 浦 勉
尾 崎 文 雄 稻 臣 成 一

岡山大学医学部寄生虫学教室

長 尾 寛

岡山県衛生研究所

(1965 年 11 月 24 日受領)

緒 言

Toxoplasma 症(T症)は人獣共通の疾病として最近特に注目されるようになり、これの診断は各分野から検討されているが、中でも血清学的手段に大いなる期待がかけられている。Sabin & Feldman(1948)により開発された dye test (DT) はその手技、反応条件を均一にすることが困難であり、多数例を同時に消化するには不適である。また *Toxoplasmin* 皮内反応 (ST) は技術的には安易であるが、本反応による陽性検出の領域は DT とは異なっている。すなわち DT は delayed hypersensitivity に基づくものであるから関与する抗体は体液性ではなく細胞性であると考えられる。

最近、hemagglutination test (HA) が急速に診断的価値を高め、多数の記録をみるに至った (Eyles, 1954; Fulton *et al.*, 1959; Jacobs *et al.*, 1957, 1963)。これは新鮮な感染症に対し比較的信頼性の高いことと、多数例の消化が可能であるという長所をもつたためと思われる。しかしこれらの記録の内容、特に方法論に多少の相違があり、実際に著者らが HA を実施するにあたり選択に苦慮することが多い。このような相違は被検対象となる動物の種類、抗原の精製法が主なる原因のようである。

著者らは *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) による豚の汚染状態の系統的調査が岡山県では欠けていることに着目し、1) 汚染度を広域にわたって調査すること、2) これを T 症研究の足がかりにすること……の意図のもとに HA を実施した。上に述べたごとく HA 実施にあたり具体的にどのような手段を選ぶかという問題に遭遇したが、結論的には佐藤ら(1962)、常松(1963, 1965)の方法を基準とし、著者らの実験条件に即応すべく多少の変法を施した。

実験材料および実験方法

1) 抗原の作製

T. gondii RH 株を継代、発症しているマウスの腹水を、体重 20-25 g の CF₁ 系マウス約 120 匹の腹腔内に接種し、数日後 20-30 匹の感染死のおこる頃を見はからい、発症中のマウス腹腔に 0.85% NaCl 液 (滅菌済み) 2 ml を注入し、直ちに洗滌腹腔液を採取した。1 匹より可能な採取量は 2-3 ml である。採取時赤血球の混入したものは除外した。各マウスからの採取腹腔液は冷却フラスコ(氷水中で)にプールし、2,500 rpm で 5 分間遠心し、その sediment に 10 倍量の distilled water を加え時々振盪しながら 4°C に一夜放置し、可溶性抗原の抽出を行なった。次いで 1.7% NaCl 液を等量に加え生理食塩濃度に戻し、十分振盪後 900×g で 10 分間遠心し上清を得た。これを 1-2 日 4°C に放置後 25,800×g 30 分遠心し、その上清を抗原原液(1:20)とした。著者らはこれを凍結乾燥し、用に臨み distilled water で元に戻した。

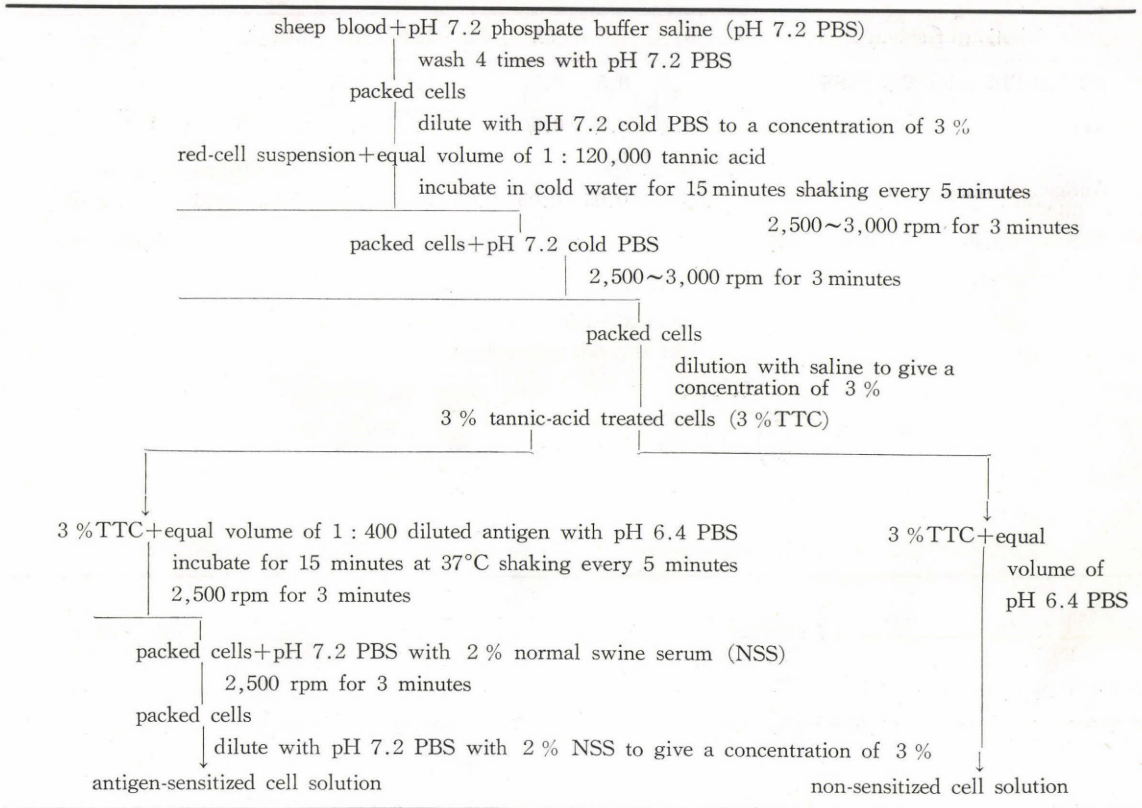
2) 使用血球

物理的に脱線維した羊血液に pH 7.2 PBS (組成は後述) を加え 900×g 5 分間の遠心を 4 回繰り返すことにより洗滌された血球を得た。

3) 被検血清

対象はすべて豚であり、と殺時に採血し、規定のごとく血清分離を行ない 56°C 30 分 inactivation 後、各血清 0.5 ml に羊洗滌血球 (Table 1 における packed cells) を 0.05 ml ずつ添加し、4°C に一夜放置(時々振盪)、被検血清中の heterophile antibodies の吸収を行ない、次いで 900×g 5 分遠心した上清を血清原液とした。HA 実施までに数日を要するさいは -20°C に凍結

Table 1 Preparation of sensitized antigen



保存した。

4) 0.85% NaCl 液および phosphate buffered saline の調製

イオン交換樹脂純水装置を通した常水をガラス蒸溜器で再蒸溜した後 solvent として用いた。試薬はすべて特級品(片山化学)を採用した。

pH 6.4 PBS = M/15 Na_2HPO_4 , 26.7 ml; M/15 KH_2PO_4 , 73.3 ml; NaCl, 8.5 g; H_2O 900 ml; pH 7.2 PBS = M/15 Na_2HPO_4 , 72.0 ml; M/15 KH_2PO_4 , 28.0 ml; NaCl, 8.5 g; H_2O , 900 ml; pH 7.2 PBS-2%NSS = pH 7.2 PBS, 98 ml; normal swine serum, 2.0 ml

5) 1:120,000 tannic acid の調製

Merck 製品を用い 83 mg を再蒸溜水 100 ml に溶かし、その 1 ml に pH 7.2 PBS 99 ml を加えて 1:120,000 とし、氷水中で冷却しているものを用いた。

6) Antigen-sensitized (non-sensitized) cell solution の調製

詳細は Table 1 に示した。

Table 1 で、抗原原液を pH 6.4 PBS を用いて 1:400 にした理由は、抗原の 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600 および 1:3,200 で box titration を実施した結果 1:400 が所定の抗体価を与えたことに基づく。

実験成績

被検血清は pH 7.2 PBS-2% NSS を用いて 1:8 から 1:2,048 まで 9 段階に倍数希釈した。各試験管内の希釈血清の容量は 0.5 ml である。次いでこれら血清のすべてに antigen-sensitized cell solution を 0.05 ml 添加し、また対照として各被検血清の系列毎に 1:8 血清に non-sensitized cell solution を 0.05 ml 添加し、さらに pH 7.2 PBS-2% NSS の良否を検討するため、この 0.5 ml に antigen-sensitized cell solution 0.05 ml を添加したものを一本用意した。最後に十分振盪して 37°C に 3 時間保ち、次いで一夜室温に放置してから判定した。以上の操作と判定の基準の詳細は Table 2 に

Table 2 Hemagglutination technique*

Bilution of serum	8	16	32	64	128	256	512	1,024	Control	
									A	B
pH 7.2 PBS with 2 % NSS	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	⊗	0.5
Test serum	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Antigen-sensitized cell solution (3 %)	0.1 discard	⊗						0.5 discard		
Non-sensitized cell solution (3 %)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

* incubate at 37°C for 3 hours
 * overnight at room temperature
 * reading

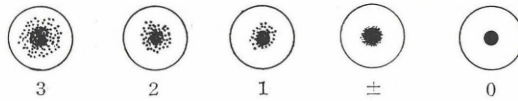


Table 3 Distribution of hemagglutination titers in Southern and Northern Okayama Prefecture

area	dilution of serum								not inter- pretable
	1 : 8 (-)	1 : 8~32 (+)	1 : 64 (+)	1 : 128 (+)	1 : 256 (+)	1 : 512 (+)	1 : 1,024 (+)	1 : 2,048 (+)	
Okayama	48.0%	32.0%	6.0%	2.0%	6.0%	2.0%	%	%	4.0
Kurashiki	62.5	22.5	5.0	2.5					7.5
Saidaiji	57.0	25.0	7.0			2.2			9.0
Sōja	55.2	31.0	10.3	3.4					
Kojima-Tamano	40.0	43.3		6.6	3.3				6.6
Mitsu	70.0	10.0	10.0	10.0					
Akaiwa	56.2	25.0		6.3	6.3	6.3			
Wake	62.5	25.0	6.3						
Oku	62.5	31.2	6.3				3.1		
Tsuyama	56.6	26.4	5.7	1.9	3.8				5.7
Kume	40.0	32.6	6.6		6.6	6.6			13.3
Tomada-Aida- Kawakami	41.6	41.6	8.3		8.3				
Jobo	70.6	23.5							6.0
Maniwa	70.0	17.4	8.7					4.3	

示した。

調査の便宜上、岡山県を南部、北部に二分した。南部グループにおける豚生産地は岡山、倉敷、西大寺、総社、児島、御津、赤磐、和気、邑久および玉野で、それぞれ50、40、44、29、28、10、16、32、16および2例の豚血清を得た。また北部グループは津山、久米、英田、上房、川上、苫田および真庭で、それぞれ53、15、7、17、3、2および23例の血清を獲得した。これら総計387例についてHAの検討を試みた。

Table 3で見られるごとく1:8で陰性例の多いのは上房、真庭および御津の3カ所でいずれも約70%であった。またこの希釈で最も陰性例の少ないのは久米、玉野および苫田-英田-川上の3カ所で共に約40%である。

しかしながら陽性領域が1:32までの血清を診断学的に一応陰性と推定すると、これに該当するものは久米地区を除き、80%あるいはそれ以上を示し、特に邑久、上房では93.7および93.5%を示した。また疑陽性あるいは陽性例の1例も得られなかったのも上房が1カ所である。

1:64まで凝集を呈するものを疑陽性、1:128以上でなお凝集反応を示すものを陽性と推定した場合に、疑陽性の最も高い地区は総社、御津でそれぞれ10.3および10%を現わした。陽性例のうち1:128にとどまるものは御津の10%が最高であり児島-玉野、赤磐がこれに続いた。1:256陽性例は苫田-英田-川上の8.3%、これに次いで久米の6.6%、赤磐、岡山の6.3および6.0%で

ある。1:512 陽性はさらに少なくなり久米, 赤磐の 6.6 および 6.3%, 西大寺, 岡山の 2.2 および 2.0% が存在するのみであった。1:1,024 および 1:2,048 陽性例は前者で和気の 3.1%, 後者で真庭の 4.3% を認めたにすぎない。

そこで岡山県全域の HA の結末を総合すると Table 4 のごとくなる。

凝集が 1:32 以下にとどまる陰性豚は 324 例すなわち 83.7% であり, 疑陽性, 陽性はそれぞれ 5.7 および 6.0% であり, 後 2 者の合計は 11.7% で 45 例を示している。

Table 4 Classification of hemagglutination titers of 387 sera examined

Judgment	Number	Per cent
Negative	324	83.7
Doubtfully positive	22	5.7
Positive	23	6.0
Spontaneous	18	4.6

る。なお heterophile antibodies の吸収不完全のため対照に凝集がおこり判定不能となったものが 4.6% (18 例) 認められた。

Table 5 は 1:128 以上で陽性を呈した 23 例の凝集状態である。

著者らは判定基準を 3, 2, 1, ± および 0 の 5 段階としたが, これにはやや不合理の点を認めた。すなわちこの基準によると 3 の幅が非常に拡大されることである。常松 (1963) が記載したごとく 3 の上に 4 を設定すると判読に好都合であった。たとえば B75 においては 1:256 まで, B25 は 1:32 まで, B43 および A179 では 1:16 まで 4 に判読すべきであった。

Table 6 は heterophile antibodies の吸収不全のため対照試験管に凝集を生じ, 判定不能になった 18 例を取り上げた。

彼等の多くは 1:64 まで自然凝集を現わしたが, A259 のごとく 1:256 でなお凝集を認めるものもあった。

Table 5 Positive serum on Toxoplasma hemagglutination test

Number of test serum	Dilution of test serum									control		
	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048			
B	24	3	3	3	3	3	2				0	0
	25	3	3	3	3	3	3	1			0	0
	40	3	3	3	3	2	2	±			0	0
	43	3	3	3	3	3	3	3	2	±	0	0
	67	3	3	3	3	3	1				0	0
	75	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0
131	2	2	2	2	1	1				0	0	
A	21	2	3	3	3	3	2	1			0	0
	27	2	2	2	2	1					0	0
	93	3	3	2	2	2	2	1			0	0
	104	2	2	2	2	2	±				0	0
	150	1.5	1.5	1	2	2	1				0	0
	161	2.5	2.5	2.5	2	2	2	2	±		0	0
	162	2.5	2	2	2	1	1				0	0
	163	2	2	1.5	1.5	1					0	0
	176	2	3	3	3	2	1				0	0
	179	3	3	3	3	2	1				0	0
	190	3	3	2	1	1	±				0	0
	203	2	2	3	3	3	2	1	1		0	0
	207	3	2.5	2.5	2	1	1				0	0
	208	3	2	2	1	1	1	±			0	0
253	2	2	2	1	1					0	0	
262	3	3	3	3	1	±				0	0	

Table 6 Testsera of which titers are not interpretable due to incomplete absorption of heterophile antibodies

	Number of test serum	Dilution of test serum							Control
		8	16	32	64	128	256	512	
A	276	3	2						3
	97	2	1						2
	289	3	2	2	1				3
	288	3	2	1					2
	291	3	3	2	1				1.5
	84	3	2	2	2	1.5			2
	80	2	1.5	±					1.5
	64	2	2	2	1.5				1.5
	148	3	3	2	1				2
	259	2	2	2	2	2	1		2
	98	2	2	2	1				1
	34	2	1	1					1
B	91	2.5	2.5	2.5	2	±			2
	68	3	2	2	2	1			2
	59	3	2	±					3
	125	3	2	2	2	1			2
	106	2	2	2	1				2
	97	1	1	1					1

総括および考案

佐藤ら(1962)は豚で HA の出現は DT に数日遅れると述べ、常松(1963)は人の場合 ST 出現は感染後 1-2 月が必要と記している。もちろん動物の種別がこれらの反応に影響することは考えられる。常松(1963)と同様著者らも ST が他の 2 者反応と一致する必要はないと考えている。DT, HA においては体液性抗体(血清)が主役を演ずるが、ST では細胞性抗体が責任を持つと考えられる。ゆえに血清抗体が低下あるいは消失したふり感染の宿主にも ST 陽性の可能性は十分に存在するだろう。DT と HA は血清抗体のレベルで同一物が反応に関与すると思われるのに、動物が感染後反応の出現時、あるいは消失時に相違があるのは興味深い。これに説得性を与える一つとして Chordy *et al.* (1964) は HA が 1:800 よりも低い人血清では Ouchterlony 反応で沈降帯を作らない。これは沈降帯を作るに十分な抗体を持たないためであるが、HA に感受性を示す力価のためには十分量であると説明している。

著者らの検討は専ら HA であり他と比較しえなかつたのは残念である。作製した抗原の使用領域は 1:400

であつたことは抗原として良質とは思わない。しかし反応を進める上で不便を感じるほどのものではなかつた。ただ HA の判定を 3-0 の 5 段階に規定したが、判読を確実にするためには 4-0 の 6 段階にすべきであつた。凝集が 1:32 以下のものを陰性、1:64 を凝陽性、1:128 以上を陽性と仮定した場合の判定を総括すると下記のごとくである。

387 例のうち陰性 324 (83.7%)、凝陽性 22 (5.7%)、陽性 23 (6.0%)、判定不能 18 (4.6%) であつた。判定不能の 4.6% は heterophile antibodies の吸収不全に基づくものであり、これを防ぐには吸収に使用した血球量を佐藤ら(1962)のごとく一層多量にするか、被検血清をある程度希釈して吸収を実施するか考案すべきである。

なお岡山県を南北の各地区別に調査したが HA の成績の上に地域的な環境はあまり影響を与えなかつた。

結 論

感染マウス腹腔から集めた *T. gondii* の可溶成分を蒸留水で抽出したものを抗原とし、これで 1:120,000 tannic acid 処理羊血球を感作し、豚血清 387 例との間に hemagglutination test を実施した。判定基準として凝集が 1:32 以下を陰性、1:64 を凝陽性、1:128 以上

を陽性と仮定した。

1) 陰性 324 (83.7%), 疑陽性 22 (5.7%), 陽性 23 (6.0%), 判定不能 18 (4.6%) の結果を得た。

2) 岡山県の地理的条件は反応結果に影響を与えなかつた。

稿を終るに臨み、御助言を賜わつた東京大学伝染病研究所常松之典教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Chordi, A., K. W. Walls & I. G. Kagan (1964) : Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by agar diffusion methods. J. Immunol., 93, 1034-1044.
- 2) Eyles, D. E. (1954) : Serologic response of white rats to *toxoplasma* infection. J. Parasitol., 40, 77-83.
- 3) Fulton, J. D. & J. L. Turk (1959) : Direct

- agglutination test for *Toxoplasma gondii*. Lancet, 2, 1068-1069.
- 4) Jacobs, L. & M. N. Lunde, (1957) : A hemagglutination test for Toxoplasmosis. J. Parasitol., 43, 308-314.
- 5) Lunde, M. N. & L. Jacobs (1963) : Toxoplasma hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. J. Parasitol., 49, 932-936.
- 6) Sabin, A. B. & H. A. Feldman (1948) : Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science, 108, 660-663.
- 7) 佐藤卯三郎・花木琢磨・信藤謙蔵 (1962) : 皮内反応抗原 (TSC 抗原) を用いたトキソプラズマ病の血球凝集反応について. 日獣会誌, 15, 273-278.
- 8) 常松之典 (1963) : *Toxoplasma* 症の診断について. モダンメデイア, 9, 443-449.
- 9) 常松之典 (1965) : 私信.

Abstract

PERCENTILE INCIDENCE OF POSITIVE HEMAGGLUTINATION TEST FOR *TOXOPLASMA* INFECTION IN SWINE

YOSHIKAZU OKA, KEISHI YAMAKAWA, TSUTOMU KUSAURA,
HUMIO OSAKI, SEIITI INATOMI

(Department of Parasitology, Okayama University Medical
School, Okayama, Japan)

&

HIROSHI NAGAO

(Hygienic Laboratory of Okayama Prefecture, Okayama, Japan)

The antigen was prepared by extracting the soluble components of toxoplasmas in the peritoneal exudate of infected mice by distilled water. Red cells derived from sheep were sensitized with the antigen after being treated with 1:120,000 tannic acid. As the criterion for reading, the hemagglutination titer of 1:32 or less, 1:64, and 1:128 or higher was regarded as negative, doubtfully positive, and positive respectively.

Of 387 swine test sera collected from various areas in Okayama Prefecture, 324 (83.7%), 22 (5.7%), 23 (6.0%), and 18 (4.6%) was negative, doubtfully positive, positive and not interpretable respectively.

No geographic characteristics were observed in the reaction.