

## 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

小林 昭夫 熊田 三由

国立予防衛生研究所寄生虫部

常松 之典

東京大学医科学研究所細菌感染研究部

(1967年10月31日 受領：特別掲載)

色素試験がトキソプラズマ症診断の最も基本的な血清反応として、世界の各国においてひろく利用されていることは衆知のとおりである。

本試験は Sabin & Feldman (1948) の創案になるが、その後 Sabin *et al.* (1952) は、更にその方法に改良を加え、いわば米国標準法ともいべき術式を発表し、これを推奨した。

しかし色素試験は、この標準法に準拠して行われた場合にあっては、安定した成績をつねに得ることは必ずしも容易でないことが諸家により指摘されるようになった。Beverley & Beattie (1952) は、トキソプラズマ感染マウスの腹水中における抗体の出現を指摘し、また Jacobs & Cook (1954) は、同腹水中における可溶性抗原の存在と、これによる反応阻害の事実を証明したことから、抗原としては、腹水部分を遠心除去してえられる虫体を用いるべきであるとした。

一方 Goldman (1956) は、抗原として洗滌虫体を用いた場合、非洗滌虫体を用いた場合に比して虫体の色素に対する被染性にいちじるしい低下がみられ、そのためかえって反応自体の成立を困難にいたらしめることを報告した。

Goldman によってしめされたこの現象は、色素試験の基準化の面で意外に重要な問題を内包するものであろうと考えられるが、著者らはその原因として、腹水の凝固防止の目的で混入されたヘパリンが、洗滌操作の結果、腹水部分とともに反応系から除外されたためではなかろうかと推定した。そこで以下、ヘパリンを含め一連の抗凝固剤につき、それらの色素試験に及ぼす影響について

検討してみた。

#### 材料および方法

本研究で採用された色素試験の術式は、抗凝固剤の検出部分を除き、原則として Frenkel & Jacobs (1952) のそれに準拠した。

##### 1. 陽性対照血清

RH 株接種により人為的に感染させたブタより得られた血清で、農林省動物医薬品検査所、信藤博士の好意により分与されたものを陽性対照血清として用いた。56°C、30分間の非働化処理を施したものを実験に供した。この血清の色素試験抗体価は、通常 1 : 4,096 として示されるものである。

##### 2. Accessory factor

Accessory factor (以下 AF と略す) としては3種類の人血清を用いた。ここではそれぞれ KY, SM, TY と呼称することにする。これらの AF 血清供血者は、血液銀行を訪れた職業的供血者 100 名以上から厳選されたものであり、採取血清はいずれも AF としての適格性をきめる予備試験においては、抗凝固剤を加えることなしに虫体の 90% 以上を染めさせ、かつ陽性対照血清につき所定の抗体価を与えさせるものであった。

血清は採血後ただちに低温 (5°C) で分離し、厚手の中試験管に 5 ml ずつ分注し、これをゴム栓で密封した後、フリーザー中 (-20°C) に収めて保存した。実験には採取後 3 か月までの間に使用した。

##### 3. トキソプラズマおよびトキソプラズマ-AF 浮游液

試験に用いたトキソプラズマ（以下 Tp と略）RH 株は、1952 年に Sabin 博士から分与されたもので、以後 ddD 系および gpc 系マウスによって継代されたものである。

試験に用いる腹水材料は、約 20 倍に稀釈した感染マウス腹水の 0.2 ml ずつを数匹の新鮮マウス（gpc 系）の腹腔内に接種し、3 日後に採取してえられる腹水のうちから最適と思われるものを選んで使用した。腹水は、これをシリコン処理を施した遠心管にとり、これに生食水<sup>(註1)</sup>を加えて腹水中の虫体密度を調整<sup>(註2)</sup>したのち、これを 1,500 rpm, 2 分間遠心する。ついで沈渣に 80% AF-生食水<sup>(註3)</sup>を加えて虫体の浮游液を作製した。これを Tp-AF 浮游液と呼ぶことにする。

#### 4. 抗凝固剤

抗凝固剤としては、ヘパリン（1%水溶液、武田薬工）、Alsever 液（後述）、クエン酸塩（岩井化学薬品）、ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, 第一化学薬品) の 4 種をとりあげた。

#### 5. 色素

アルカリ性メチレン青としては、メチレン青のエチルアルコール飽和溶液 1 容に硼砂・炭酸ナトリウムによる pH 10.8 の緩衝液 9 容を加えたものを用いた<sup>(註4)</sup>。

#### 6. 方法

Tp-AF 浮游液の 0.1 ml ずつを陽性対照血清の各種稀釈倍率ならびに生食水（陰性対照）の 0.1 ml に加えたのち、これを 37°C, 1 時間加温。ついで室温にとり出し、各管にアルカリ性メチレン青溶液 0.1 ml ずつを加え、室温に約 10 分間放置したのち、各管からその 1 滴ずつを毛細ガラス管を用いてスライドガラス上にとり、カバーガラスでおおってからこれを鏡検（400 倍拡大）し、不染虫体の比率を各管につきそれぞれもとめる。

血清の抗体価は、50%以上の虫体が不染をします血清稀釈倍のうち、最高の稀釈倍数をもってあらわした。試験は先述の 3 種の AF 血清を用いて同時におこなった。ただし個々の実験においては、その目的にしたがい方法

上若干の相違があるので、それらについては各項で記載する。

## 成 績

### 1. 色素試験に及ぼすヘパリンの影響

原法あるいは米国標準法にしたがえば、感染マウスの腹水を採取する際、その凝固防止の目的で 1%ヘパリン水溶液を腹水の 1/10 量加える。この腹水は、洗滌操作を経ずに直接 AF 血清と 1:4 の割合に混合され、この混合液はさらに被検血清と 1:1 に混合される。したがってヘパリンの Tp-AF 浮游液中での濃度は 1:5,000、反応系中でのそれは 1:10,000 となる。

そこで本実験においては、腹水を除去した所謂洗滌虫体を抗原として用い、反応系中にヘパリンを上記濃度を中心に各種の濃度となるように加え、これらの色素試験に及ぼす影響について検討した。

採取腹水は、まず生食水を用いて虫体密度を調整したのち、その 1 ml ずつを小試験管にとる。これに 2 倍量の生食水を加えて遠心し、沈渣のそれぞれにあらかじめ各種量のヘパリンを加えて作製しておいた 80% AF-生食水のそれぞれを一定量ずつ加えてヘパリンを各種濃度にふくむ Tp-AF 浮游液を作製した。

かくして反応系中におけるヘパリンの最終濃度を 1:2,500, 1:5,000, 1:10,000, 1:20,000, 1:40,000 とした。陽性血清の稀釈は、生食水により 1:1,024, 1:4,096, 1:16,384 とした。以後の操作は方法の項で記載したとおりである。結果は第 1 表に示される。

この表から、陰性 (AF) 対照における被染虫体の百分比は、ヘパリン添加量の増加と平行して増大していることがわかる。すなわち、ヘパリンを全く加えない場合の染虫体百分比は、いずれの AF 血清使用時ともいちじるしく低く、それぞれ 43%, 75%, 53% に過ぎなかった。したがってこのような場合においては、陽性対照血清につき、その抗体価をもとめることはできない。

しかるにヘパリンを終末 1:10,000 の割合に混じた

(註 1) 予備実験の結果から、腹水の洗滌液としては、生食水と 10% AF-生食水との間にとくに優劣がみとめられなかったため、ここでは生食水を用いた。

(註 2) 虫体浮游液の 1 滴をスライドガラス上にとり、カバーガラスで覆ってから、これを 400 倍拡大で鏡検した場合、1 視野あたりの虫体数が 30~35 個となるようにした。

(註 3) 80% AF-生食水の液量は虫体密度調整時のそれと等量とする。

(註 4) 原法 (Sabin & Feldman, 1948) および米国標準法 (Sabin *et al.* 1952) では、メチレン青のアルコール飽和溶液 3 容に対して緩衝液 7 容を混じたものを反応系中に 0.02 ml 加えるが、これよりも上記処方ものの 0.1 ml を加えるやり方の方が染まりがより明瞭となるので、ここではこの方法を採用した。



第1表 各種濃度のヘパリンの色素試験に及ぼす影響

A F 供血者	反応系中における ヘパリン濃度	陽性血清の各稀釈倍における被染虫体の百分比				Tp-AF 浮 游液の pH	備 考
		1,024	4,096	16,384	生食水		
K Y	1: 2,500	24	96	98	100	8.2	微細沈澱物 微細沈澱物 微細沈澱物
	1: 5,000	4	77	92	95	8.2	
	1: 10,000*	1	28	81	80	8.1	
	1: 20,000	1	21	69	73	8.1	
	1: 40,000	0	8	54	55	8.2	
	—	0	2	35	43	8.1	
T Y	1: 2,500	25	96	98	98	8.4	微細沈澱物 微細沈澱物 微細沈澱物
	1: 5,000	5	85	96	96	8.4	
	1: 10,000*	2	59	89	90	8.5	
	1: 20,000	4	25	84	88	8.5	
	1: 40,000	2	7	72	77	8.5	
	—	1	7	67	75	8.5	
S M	1: 2,500	20	97	99	98	8.4	微細沈澱物 微細沈澱物 微細沈澱物
	1: 5,000	4	85	90	96	8.4	
	1: 10,000*	0	38	85	87	8.5	
	1: 20,000	0	10	78	76	8.4	
	1: 40,000	2	12	67	69	8.5	
	—	1	5	46	53	8.4	

\* 腹水の凝固防止の目的で用いられたヘパリンが直接反応系中にもち込まれた場合のヘパリン濃度に相当

場合の陰性対照の染虫体比率をみると、それぞれ80%、90%、87%といずれも著明に増大し、さらに1:5,000では95~96%となっている。

一方、陽性対照血清の抗体価は、陰性対照における染虫体の比率が80~89%の間にしめされた場合のそれは1:4,096、また染虫体比率が90%以上となった場合は1:1,024と1管低くなっている。

ここで注目すべきは、反応系中に一定量以上のヘパリンが存在した場合においては、反応液中に無数の微細沈澱物の形成をみ、これが虫体の鏡検をいちじるしく妨げることである。この沈澱物の形成は、ヘパリン濃度1:10,000以上の場合に著明であった。

また過剰のヘパリン量を添加した場合、反応系中一定濃度以上の抗体の存在のもとで虫体は高度の細胞質融解をおこし、虫体のghost化がみられた。具体的には、抗血清の稀釈1:5,000以上の高濃度、ヘパリン1:5,000以上の組みあわせのもとでこれがみられたが、高度のghost化がおこると、鏡検時不染虫体の存在が見逃がされる怖れがある。

さらにまたヘパリンの存在下では、被染虫体においてメタクロマジーがみられることがあり、このような虫体は緑色調をおびた青色に染まった。

各Tp-AF浮游液のpH値は8.1~8.5までの間にしめされ、ヘパリンの添加の有無によるpH値の変化はみとめられなかった。

## 2. 色素試験に及ぼす Alsever 液の影響

Alsever 液は血液の凝固防止の目的で普通に用いられる抗凝固剤の1つであり、全血87容に対して13容の割に混じられる。本実験では、Alsever 液として、ブドウ糖 2.45g、クエン酸 0.8g、クエン酸ナトリウム 2.2g、蒸留水 100mlを加えたものを用いた。

腹水を採取し、虫体密度を調整したのち、その1mlずつを小試験管に分注し、これを遠心。次いで沈澱にあらかじめ各種の割合に Alsever 液を混じておいた80%AF-生食水1mlをそれぞれ加え、反応液中の Alsever 液の終末濃度を12%、9%、6%、3%となるようにした。ただし終末12%とする場合には、他の濃度系列とはその作製方法を若干変える必要があった。即ち、中間稀釈段階としてのTp-AF浮游液を作製するためには、洗滌虫体にAF 0.8mlと Alsever 液 0.24mlとを混ざる必要があるため、AFの濃度を終末40%とし、抗血清の終末濃度を他の系列と一致させるため、この混合液の0.104mlを抗血清の1:983、1:3,932、1:15,729稀釈の各0.096mlに加えた。結果は第2表にしめされる。

第2表にみるように、各AF血清使用事例において、Alsever 液を欠如する場合の陰性対照における染虫体の百分比は、この場合においてもいずれも低く、それぞれ58%、84%、58%にしか過ぎない。

Alsever 液添加時における染虫体比率は、添加 Alsever 液量と平行して増大し、最大濃度12%の例では97

第2表 各種濃度の Alsever 液の色素試験に及ぼす影響

AF 供血者	反応系中における Alsever の濃度 (%)	陽性血清の各種稀釈倍における被染虫体の百分比				Tp-AF 浮游液の pH
		1,024	4,096	16,384	生食水	
KY	12	97	97	97	98	6.2
	9	87	96	97	97	6.6
	6	1	70	83	88	7.4
	3	0	31	79	81	7.8
	—	0	8	51	58	8.3
TY	12	94	99	97	97	6.2
	9	87	93	96	98	6.6
	6	13	49	87	91	7.4
	3	2	11	78	87	7.9
	—	3	2	62	84	8.3
SM	12	90	93	94	98	6.2
	9	82	87	92	93	6.7
	6	3	39	79	80	7.3
	3	0	6	61	70	7.8
	—	0	4	52	58	8.4

～98%に達している。しかしこのように、陰性対照における虫体の被染率がいちじるしく高い場合は、抗原・抗体反応系においても殆んど虫体が染まっておる反応のほぼ完全な阻止がみられている。したがって Alsever 液の最適濃度は、それよりやや低いところにもとめられるべきで、表にしめされた成績から、陰性、陽性両対照につき、その条件を最も満足させる Alsever 液の濃度を求めてみると終末6%ということになる。

Alsever 液添加時には、ヘパリン添加によってみられたような微細沈澱物の形成は全く認められず、被染虫体はその細胞質内の顆粒の明確な染色によって全体として濃紺色を呈する。

Tp-AF 浮游液の pH 値は、各 AF 血清使用事例につき、6.2～8.4 までの範囲にしめされ、添加 Alsever 液量の多いものほど低い値となっている。

以上の実験結果から、Alsever 液を反応系中6%の比率に加えることによって好結果がえられることが判ったが、このような方法を種々の腹水について応用した場合にも果して同様のよい結果がつけに得られるものであるのか否かについて検討しておく必要がある。

そこで多数の腹水バッチを用い、各 AF 血清につき、それぞれ Alsever 液の添加、同液欠如の場合の成績を比較してみた。結果は第3、4表にしめすとおりである。

これらの表には、各陰性対照における染虫体比率と陽性対照血清の抗体価とが示してあるが、とくに Alsever 欠如時の陰性対照における虫体の被染率により、その小さなものより大きなものの順に配列されている。

第3表 Alsever 液添加の有無による各種腹水バッチ別陰性対照虫体の被染率および既知陽性血清抗体価の変動

AF 供血者	腹水バッチ No.	Alsever 液欠如		Alsever 液添加	
		陰性対照における虫体の被染率 (%)	*陽性血清の抗体価	陰性対照における虫体の被染率 (%)	*陽性血清の抗体価
KY	1	11	—	93	1 : 4,096
	2	14	—	79	—
	3	15	—	94	1 : 4,096
	4	17	—	88	1 : 4,096
	5	18	—	82	1 : 4,096
	6	18	—	91	1 : 4,096
	7	19	—	91	1 : 4,096
	8	21	—	76	—
	9	21	—	81	1 : 4,096
	10	28	—	86	1 : 4,096
	11	28	—	86	1 : 4,096
	12	29	—	80	1 : 4,096
	13	29	—	92	1 : 4,096
	14	31	—	91	1 : 4,096
	15	32	—	81	1 : 4,096
	16	32	—	87	1 : 4,096
	17	33	—	73	—
	18	33	—	89	1 : 4,096
	19	34	—	94	1 : 4,096
	20	34	—	86	1 : 16,384
	21	36	—	84	1 : 4,096
	22	38	—	87	1 : 4,096
	23	38	—	91	1 : 4,096
	24	40	—	91	1 : 4,096
	25	40	—	94	1 : 4,096
	26	41	—	95	1 : 4,096
	27	43	—	97	1 : 4,096
	28	44	—	91	1 : 4,096
	29	45	—	86	1 : 4,096
	30	45	—	90	1 : 4,096
	31	47	—	89	1 : 4,096
	32	50	—	88	1 : 256
33	52	—	92	1 : 4,096	
34	53	—	91	1 : 1,024	
35	54	—	96	1 : 4,096	
36	54	—	91	1 : 4,096	
37	56	—	94	1 : 4,096	
38	58	—	94	1 : 4,096	
39	58	—	88	1 : 1,024	
40	58	—	80	1 : 4,096	
41	59	—	92	1 : 4,096	
42	62	—	83	1 : 4,096	
43	63	—	87	1 : 4,096	
44	65	—	82	1 : 4,096	
45	67	—	94	1 : 4,096	
46	68	—	81	1 : 4,096	
47	68	—	90	1 : 4,096	
48	68	—	86	1 : 4,096	
49	70	—	96	1 : 4,096	
50	73	—	93	1 : 4,096	
51	74	—	95	1 : 4,096	
52	74	—	93	1 : 4,096	
53	76	—	80	1 : 4,096	
54	79	—	93	1 : 4,096	
55	80	≥ 1 : 16,384	91	1 : 4,096	
56	84	1 : 4,096	91	1 : 4,096	
57	84	1 : 4,096	96	1 : 4,096	
58	84	1 : 4,096	90	1 : 4,096	

\* 第3表では便宜上陰性対照における被染虫体の比率が80%以上をしめす場合、抗体価をもとめうるものとした。



第4表 **Alsever** 添加の有無による各種腹水バッチ別陰性対照虫体の被染率および既知陽性血清抗体価の変動

AF 供血者	腹水バッチ No.	Alsever 液欠如		Alsever 液添加	
		陰性対照における虫体の被染率(%)	陽性血清の抗体価*	陰性対照における虫体の被染率(%)	陽性血清の抗体価*
TY	1	44	—	91	1:4,096
	2	68	—	90	1:4,096
	3	69	—	93	1:4,096
	4	73	—	93	1:4,096
	5	74	—	82	1:4,096
	6	82	1:4,096	93	1:4,096
	7	84	1:4,096	91	1:4,096
	8	84	1:4,096	96	1:4,096
SM	9	21	—	81	1:4,096
	10	28	—	94	1:4,096
	11	36	—	84	1:4,096
	12	41	—	88	1:4,096
	13	58	—	80	1:4,096
	14	62	—	83	1:4,096
	15	63	—	87	1:4,096
	16	65	—	82	1:4,096
	17	84	1:4,096	90	1:4,096

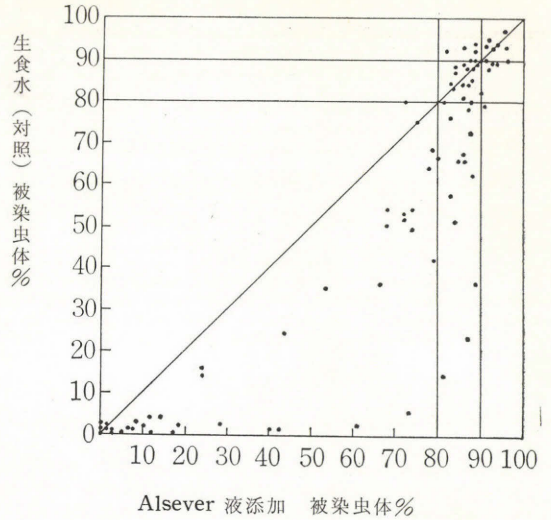
\* 抗体価のもともめ方については第3表の脚註を参照のこと

第3表はAFとしてKY血清を用いた場合の成績であるが、これには過去2年間に58種類の腹水バッチ(通常2~3匹の好適なマウス腹水をプールしたものを1バッチとする)が用いられた。

表より **Alsever** 液欠如時における染虫体比率をみると、それが最低11%から最高84%までいちじるしい変動をしめしていることがわかる。このうち、被染率80%以上をしめたものは58件中わずか4件(7%)にしか過ぎない。

一方 **Alsever** 液を添加した場合は、いずれの腹水バッチについても高い被染率をしめしており、被染率80%以上の事例は58件中55件(95%)の多きに達している。ここで被染率80%以上をしめたものにつき、さらに反応系において所定の抗体価をしめた事例を比較すると、**Alsever** 液欠如時には3件(5%)であったのに対して **Alsever** 液添加事例では51件(88%)となっている。

同様の傾向は他の2種類のAF血清(TY, SM)を用いた場合についてもみとめられ、第4表にしめた成績から、**Alsever** 液欠如事例においては、先述の条件を満足させたもの、それぞれ3/8(38%)、1/9(11%)にしかなかったのに対して、**Alsever** 液添加事例では全



第1図 人血清87件における **Alsever** 液添加の有無と虫体の被染率との関係

例において満足な結果が与えられた。

以上、本実験に用いられた3種AF血清に関するかぎり、そのいずれにおいても一定量の **Alsever** 液の添加によりAF血清自体の有する抗Tp作用の発現を抑制しうることが判明したわけであるが、次にこのような現象が普通一般の成人血清についてもみられるものであるのか否かを検討してみた。

対象として東京大学附属病院輸血部を訪れた供血者のうちから87名を無差別に選び、それらの血清をかりにAFとみだてて抗Tp作用と **Alsever** 液添加との関係をしらべてみた。**Alsever** 液使用に対する対照としては **Alsever** 液のかわりに生食水を用いた。結果は第1図にしめた如くである。

本図には87件の被検血清について、**Alsever** 液の存否と染虫体百分比との関係がしめされている。いまこの図をみるに、**Alsever** 液を加えることなしに85%以上の被染率をしめた血清では、これを添加した場合でもとくに被染率が高まるという傾向はみられないようである。

しかるに対照における虫体被染率が80%以下をしめすような血清では、**Alsever** 液の添加によって被染率が増大する傾向があることが明瞭に看取される。

### 3. 色素試験に及ぼすクエン酸基の影響

AF血清に一定量の **Alsever** 液を加えることによって陰性(AF)対照における虫体の被染性をいちじるしく高

第5表 各種 pH のクエン酸塩溶液の色素試験に及ぼす影響

実験	AF 供血者	クエン酸・クエン酸ナトリウム混合液		陽性血清の各種積倍における被染虫体の百分比				Tp-AF 浮遊液の pH
		クエン酸* + トリウム*	クエン酸ナトリウム* : pH	1,024	4,096	16,384	生食水	
I	KY	3.8 ml + 6.2 ml	4.8	76	87	91	92	6.8
		2.4 + 7.6	5.3	22	46	84	87	7.5
		1.2 + 8.8	5.8	4	8	66	82	7.9
		0 + 10.0	7.9	0	0	48	68	8.6
		Alsever (対照)	5.0	21	32	81	82	7.5
		生食水 (対照)	5.4	1	1	3	18	8.3
		6.0 + 4.0	4.0	96	100	100	99	6.1
		3.8 + 6.2	4.8	5	63	93	97	7.3
		2.4 + 7.6	5.3	5	30	94	92	7.8
		1.2 + 8.8	5.8	4	26	92	93	8.1
II	TY	0 + 10.0	7.9	8	35	87	85	8.4
		Alsever (対照)	5.0	16	39	91	93	7.5
		生食水 (対照)	5.4	1	7	58	69	8.5
		6.0 + 4.0	4.0	98	99	98	98	6.1
		3.8 + 6.2	4.8	11	46	92	93	7.2
		2.4 + 7.6	5.3	1	9	85	86	7.7
		1.2 + 8.8	5.8	2	6	81	80	8.1
		0 + 10.0	7.9	0	12	66	72	8.4
		Alsever (対照)	5.0	0	13	85	88	7.4
		生食水 (対照)	5.4	0	3	21	41	8.4
	SM	6.0 + 4.0	4.0	98	99	98	98	6.1
		3.8 + 6.2	4.8	11	46	92	93	7.2
		2.4 + 7.6	5.3	1	9	85	86	7.7
		1.2 + 8.8	5.8	2	6	81	80	8.1
		0 + 10.0	7.9	0	12	66	72	8.4
		Alsever (対照)	5.0	0	13	85	88	7.4
		生食水 (対照)	5.4	0	3	21	41	8.4

\* 0.15M水溶液

めうることが判ったので、次に Alsever 液の主要成分であるクエン酸基の色素試験に及ぼす影響について検討した。実際には第5表にしめたように、0.15Mクエン酸と0.15Mクエン酸ナトリウムとを種々の比率に混合して各種 pH (4.0, 4.8, 5.3, 5.8, 7.9) の溶液を作り使用した。各混合液は終末6%の割合になるように反応系中に混入した。クエン酸基添加に対する対照としては生食水および Alsever 液を以てした。

第5表にしめされた結果から、いずれの AF 使用事例においても、クエン酸基の添加は陰性対照における染虫体の百分比を高める方向に作用していることがわかる。すなわち、抗凝固剤の全く存在しない場合の虫体の被染率は、各 AF 使用の場合につき、それぞれ 18%, 69%, 41%に過ぎなかったのに対して、0.15M (3.8%) クエン酸ナトリウム (pH 7.9) を加えた場合のそれは、各 68%, 85%, 72%となっている。

クエン酸ナトリウム単独の場合よりも、これにクエン酸を加えて、より酸性としたものではさらに染性を増し、pH 4.0 としたものをを用いた場合の被染率は 98~99%であった。

一方それらの事例において、反応系における成績をみると、上記 pH 4.0 混合液添加の場合には抗原・抗体反

応自体はほぼ完全に阻止されている。これに比して混合液の pH がアルカリ側に傾くにしたがって反応の阻止は少なくなっている。

かくして陰性、陽性両対照における条件を共に最もよく満足させるものを表の結果について求めてみると、pH 5.3 混合液 (クエン酸 : クエン酸ナトリウム = 1 : 3) となる。

一方、対照として用いた Alsever 液 (pH 5.0) 使用事例においてもこれとほぼ同等の好結果がしめされた。

上記 pH 5.3 のクエン酸・クエン酸ナトリウム混合液と Alsever 液における酸と塩との配合比率、pH が両者ほぼ同一となっている点から考えると、Alsever 液の効果は、これをクエン酸とクエン酸ナトリウムの効果に帰せしめるとともに、Alsever 液は色素試験に応用する目的のためには、最も適切な両者の配合比によって処方されたものであると考えることができる。

#### 4. 色素試験に及ぼす EDTA の影響

Frenkel (1956) は 4% disodium ethylene diamine tetraacetate dihydrate を抗凝固剤としてヘパリンの代りに使用すると好結果がえられることを発表した。

著者らは、先ず予備実験により disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA-Na<sub>2</sub>) のほか disodium



monocalcium ethylene diamine tetraacetate, tetrasodium ethylene diamine tetraacetate 等 3 種類の EDTA 製品について、それらの色素試験に及ぼす効果をしらべ、その結果吾々の目的のためには EDTA-Na<sub>2</sub> のみが有望であることを知った。

そこで EDTA-Na<sub>2</sub> のみを取りあげ、これの反応系中における濃度を 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02% とした場合の効果について検討してみた。結果は第 6 表に示したように、3 種の AF 血清使用事例につき、EDTA-Na<sub>2</sub> 0.05% においては抗原・抗体反応の完全阻止がみられ、0.04% では反応の阻止なく対照とほとんど同一の結果となった。

こうした結果から、EDTA-Na<sub>2</sub> の色素試験に使用する場合の適切な濃度は 0.05% と 0.04% の間に求められるものと考え、さらに終末濃度を 0.050%, 0.048%, 0.046%, 0.044%, 0.042%, 0.040% とした場合につい

第 6 表 各種濃度の EDTA-Na<sub>2</sub> の色素試験に及ぼす影響

AF 供血清者	反応系中における EDTA-Na <sub>2</sub> の濃度	陽性血清の各種釈倍における被染虫体の百分比				Tp-AF 浮游液の pH
		1,024	4,096	16,384	生食水	
KY	0.05%	90	89	88	90	8.7
	0.04	0	1	46	53	8.7
	0.03	0	0	1	7	8.7
	0.02	0	0	2	11	8.8
	—	0	0	32	49	8.9
TY	0.05	90	94	92	92	8.7
	0.04	0	0	43	69	8.7
	0.03	0	0	9	43	8.8
	0.02	0	2	18	58	8.8
	—	1	1	33	85	8.9
SM	0.05	87	87	90	90	8.7
	0.04	0	2	29	56	8.7
	0.03	0	1	2	17	8.7
	0.02	0	0	3	21	8.8
	—	0	0	19	58	8.9

第 7 表 EDTA-Na<sub>2</sub> の最適濃度の決定

AF 供血清者	反応系中における EDTA-Na <sub>2</sub> の濃度 (%)	陽性血清の各種釈倍における被染虫体の百分比			
		1,024	4,096	16,384	生食水
KY	0.050	91	98	96	98
	0.048	94	99	98	97
	0.046	94	95	92	98
	0.044	10	87	95	98
	0.042	1	8	79	80
	0.040	7	4	35	46
	Alsever (6%, 対照)	8	5	92	95
	生食水 (対照)	3	1	26	55

て検討した。この実験では AF としては KY 血清のみを用いた。成績は第 7 表に示したとおりである。

EDTA-Na<sub>2</sub> の終末 0.046% 以上の濃度では反応のほぼ完全な阻止がみられたのに対して、0.040% では生食水対照とほとんど同一の結果となった。しかしこれらの中間濃度 0.042% および 0.044% では、陰性、陽性両対照とも比較的良好な結果がえられている。すなわち 0.042% 濃度では陰性対照における虫体の被染率は 80%、抗体価 1:4,096 であり、EDTA-Na<sub>2</sub> 濃度 0.044% ではそれぞれ 98%, 1:1,024 となった。これらの成績から推定すれば、[EDTA-Na<sub>2</sub>] の最適濃度は恐らく両濃度の中間 0.043% にあるものと思われる。

## 論 議

色素試験の不安定性を左右する因子としては、腹水と accessory factor の二者がその最も主要なものであることは、既に諸家により指摘されてきたところである (Beverley & Beattie, 1952; Jacobs & Cook, 1954; 直江, 1958; 藤田, 1959; 染矢, 1959)。

感染マウスの腹水中に出現する虫体の可溶性抗原 (Jacobs & Cook, 1954) やマウス由来の抗体 (Beverley & Beattie, 1952) は、反応を攪乱する因子として、これを洗滌除去さるべきことが示唆された。

Goldman (1956) は、10% 血清-生食水を用いて腹水を遠心、除去し、洗滌虫体を抗原として使用することによって、より高い安定性を確保しようと試みた。しかし、その結果は、AF 対照 (陰性対照) における虫体の被染性のいちじるしい低下として示され、初期の目的を達することができなかった。彼の実験においては、8 種類のいわゆる AF 血清が activator として用いられたが、そのうち成人血清 5 種は、米国 CDC その他の研究機関において、それまで AF として常用されてきたものであった。

Goldman によって示されたこの事実は、色素試験遂行上における一つのデレンマを提起したものと見える。というのは、反応攪乱因子を排除するため洗滌虫体を用いることによって AF 血清自体に含まれる非特異的な抗 Tp 作用の顕現化という新しい難問題が生じるからであり、しかもこのような現象が多くある所謂 AF 血清なるものについて普通にみとめられた点に問題がある。

同様の現象は、その後 Palm *et al.* (1957) や著者らによっても経験されるにいたった。したがって実際の見地から、こうした矛盾を解決することは、いわば吾々と

って緊急課題でもあったわけである。

10%血清-生食水による洗滌虫体における被染性低下の原因として、【Goldman はこれを AF 血清中の抗 Tp 作用に対する虫体の感受性の増加によるものと推定した。しかしこの点に関して著者らがおこなった実験結果からは、洗滌虫体と非洗滌虫体との間でとくに差はなく、洗滌そのものによって虫体が AF の抗 Tp 作用に対してとくに感受性を増すという証拠は得られなかった。その原因としては、著者らはむしろ腹水採取時に用いられたヘパリンの排除にあるのではなからうかと考え、実験によりこれを証明した。

先述のごとく、腹水の凝固防止に用いられたヘパリン量がそのまま反応系中にもち越された場合、その濃度は 1:10,000 となる。これだけの量のヘパリンが添加された場合における陰性対照の虫体の被染率は、43~75%から一挙に 80~90% までに増大する。ヘパリンの添加量が、かりにその倍量 (1:5,000) であった場合は、被染率はさらに高まり 95% 以上となる。

このような事実からすれば、腹水の遠心による除去操作は、ヘパリンの喪失をきたす結果として、虫体の被染率の著減を招くであろうことは想像に難くない。

一方、腹水原液に不用意にヘパリンを加え、洗滌をおこなわないやり方の場合には、ややもすれば規定量以上のヘパリンの混入をみる恐れもありうるわけで、そうした場合は被検血清の抗体価をより低目に決定する可能性も充分考えられうる。このようなことが、従来本邦あるいはその他の諸国において呈示された不当に低い抗体価もしくは一般感染率の一端を説明するものであるのかもしれない。

腹水中の攪乱因子の介在とヘパリン喪失にもとづく虫体の被染性低下を防止するためには、腹水を洗滌、除去したのち、改めて一定量のヘパリンを添加してやればよい理屈になる。しかしこの点については問題がある。

それは既記のごとくヘパリンの一定濃度 (1:10,000) 以上の存在においてみられる沈澱物の形成と虫体の ghost 化の現象である。これらが不染虫体を見逃がす方向に働かし、ひいては抗体価あるいは感染率を不当に低く評価させる可能性をも内包するからである。これらの現象は腹水を洗滌しない原法等を踏襲した場合にも当然その発現が推測されうるが、これらが一部の研究機関における異常に低い色素試験抗体価の副因をなしていることも考えられる。

AF 血清内の抗 Tp 作用を抑制する作用は、ヘパリン

以外の抗凝固剤についてもみとめられ、とりわけクエン酸基をふくむ Asever 液は、その一定量 (反応系中 6%) を添加することにより優れた効果を發揮することが判明した。Asever 液添加時においては、反応液中に微細沈澱物の形成をみとめず、メチレン青による虫体の染・不染の識別も明瞭である。

0.15M (3.8%) クエン酸ナトリウムを加えることによる虫体の染性増加については、既に Palm *et al.* (1957) の報告があるが、著者らの実験結果からもこれが確かめられた。ただし吾々の実験条件では、クエン酸ナトリウム単独よりも、これにクエン酸を加え、より酸性 (pH 5.3) としたもの、あるいは Asever 液の方がよい結果がえられた。

EDTA-Na<sub>2</sub> も反応系中 0.043% の割合に加えるとはほぼ満足すべき結果が与えられるが、これを色素試験に應用するための有効濃度範囲はいちじるしく狭いため、実際にこれを日常の試験に應用することは困難であろうと考えられる。

AF として用いられる血清は、その適格性をきめる予備試験において、虫体の 90% 以上を染めさせ、かつ陽性対照血清につき所定の抗体価を与えさせることが条件とされている。先にも述べたように、本研究において用いられた 3 種類の AF 血清は、いずれも当初の予備試験の段階では、抗凝固剤の使用なしに虫体の 90% 以上をそめさせた優秀な血清であったわけである。しかるにその後同一の供血者から採血してえられた血清は、そのいずれもが、やがて当初のような高い染性を虫体と与えることができなくなってしまった。同様のことは Frenkel (1962), Lunde (私信) 等によっても指摘されている。

しかしこうした血清でも Asever 液などの抗凝固剤の添加により、高い染性が恢復されえたことは十分留意すべきことであろう。この虫体の被染性を低下させる作用は、その血清を非働化することによって喪失する点から、固有の色素試験抗体とは異なるある種の抗体様物質によるものであると予想される。

このような事実からすれば、ある供血者が抗凝固剤の添加なしにその血清をしらべた場合、それが AF としての適格条件を満足させるものであったとしても比較的すみやかにいわゆる非特異的抗 Tp 作用の出現によって、同一の条件を満足させえなくなる可能性は高いと考えてよい。しかしそのような血清でも、これに Asever 液などの抗凝固剤を添加することによって十分使用にたえうる可能性を有することは上記の成績から十分推測しう



る。抗凝固剤使用によるそうした非特異的抗 Tp 作用抑制の機序について後報にゆずる。

## 要 約

色素試験において、抗原として感染マウスの腹水の液状部分を除去したいわゆる洗滌虫体を用いると、非洗滌虫体を用いる原法 (Sabin & Feldman, 1948) 施行時に比して虫体のアルカリ性メチレン青に対する被染性はいちじるしく低下する。

その原因として、腹水採取時にその腹水凝固防止の目的に用いられたヘパリンが虫体の遠心洗滌によって腹水とともに除去され、反応系から排除される結果、AF 血清中の非特異的抗 Tp 作用がそれだけ顕著に現われたためであろうと推定した。そこで3種類の AF 血清を用いた場合において、ヘパリンをふくめクエン酸基、Alsever 液、EDTA-Na<sub>2</sub> 等一連の抗凝固剤の色素試験に及ぼす影響について検討した。その結果を要約すれば以下のとおりである。

1. ヘパリンの添加は、その添加量と平行的に陰性対照 (AF 対照) における虫体の被染率を増大させるが、原法施行時にその混入が推定されるヘパリン濃度 1 : 1,000 あるいはそれ以上の高濃度では、反応メジウム中に微細な沈澱物の形成をみ、そのため虫体の鏡検はいちじるしく妨げられる。また 1 : 5,000 以上の濃度では陽性血清の抗体価を低下させる。

2. Alsever 液を反応系中 6% の割合に加えると陰性対照における虫体の被染率はいちじるしく増し、かつ陽性対照血清につき所定の抗体価を与える。ただしそれ以上の量の添加では陰性対照の虫体被染率はさらに高まるが、反応を抑制する方向に作用する。Alsever 液添加時には反応系中に微細沈澱物の形成をみず、虫体の染まりは明瞭である。

3. 0.15M クエン酸ナトリウムと 0.15M クエン酸の 3 : 1 混合液 (pH 5.3) の反応系中への添加 (6%) も Alsever 液とほぼ同様の好結果を与える。

4. EDTA-Na<sub>2</sub> も上記の抗凝固剤と同様、陰性対照における虫体の被染性を増すが、その適量範囲が甚だせまく (最適濃度 0.043%) 実用に供することは困難であると判断された。

5. 以上の結果から、洗滌虫体を用いることによって起る不染虫体比率の増加の主な原因の 1 つは腹水中のヘパリンの除去によるものであり、かかる洗滌虫体を使用する場合にみられやすい AF 血清中の非特異的抗作用の

発現を抑制するためには、Alsever 液の一定量の添加が有効であると結論された。

終りに本研究をすすめる上において、種々有益な示唆を頂いた予研共生虫部長石崎達博士に深謝する。また、多数の健康人血清を御分与下さった東京大学医学部附属病院輸血部大河内一雄博士に深謝する。

本研究は第34, 35回日本寄生虫学会総会(1965, 1966)において発表した。

## 参 考 文 献

- 1) Beverley, K. A. A. and Beattie, C. P. (1952): Standardization of the dye test for toxoplasmosis. *J. Clin. Path.*, 5, 350-353.
- 2) Frenkel, J. K. (1956): Eichenwald との論議. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 64, 207-214.
- 3) Frenkel, J. K. and Jacobs, L. (1958): Ocular toxoplasmosis—Pathogenesis, diagnosis and treatment. *A. M. A. Arch. Ophthalmology*, 5, 9 260-279.
- 4) Frenkel, J. K. (1962): Siim との論議. *Toxoplasmosis—with special reference to uveitis*, 1st ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 972 pp.
- 5) 藤田光一郎 (1959): *Toxoplasma* の色素試験 (Sabin-Feldman 反応) に関与する accessory factor の発現機序に関する研究. *お茶の水医誌*, 7, 379-389.
- 6) Goldman, M. (1956): Observations on some problems encountered in the routine performance of the dye test for toxoplasmosis. *J. Clin. Path.*, 9, 55-58.
- 7) Jacobs, L. and Cook, M. K. (1954): Variations in the dye test for toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 3, 860-867.
- 8) 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.
- 9) Palm, G., Westphal, A. and Bimmer, E. (1957): Zur Technik der Titereinstellung beim Toxoplasma-Serofarbstest. *Zentralblatt f. Bak., Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hyg.*, 170, 202-214.
- 10) Sabin, A. B. and Feldman, H. A. (1948): Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.
- 11) Sabin, A. B., Eichenwald, H., Feldman, H. A. and Jacobs, L. (1952): Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man. *J. A. M. A.* 150, 1063-1069.

12) 染矢博(1959) : トキソプラズマのアルカリ性メチレン青による染色性の判定に関する基礎的研究.

お茶の水医誌, 7, 1677-1687.

## Abstract

### STANDARDIZATION OF THE DYE TEST FOR TOXOPLASMOSIS (I) EFFECTS OF ANTICOAGULANTS ON THE TEST

AKIO KOBAYASHI, MITSUYOSHI KUMADA

(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo, Japan*)

AND

YUKINORI TSUNEMATSU

(*Department of Bacterial Infection, Institute of Medical Science,  
University of Tokyo, Japan*)

When the washed toxoplasmas are used for the dye test, high percentages of modified organisms are often produced in the accessory factor-saline controls. The cause of such increased modification of the washed organisms by an accessory factor serum was conjectured to be primarily due to loss of heparin in the reaction mixture as a result of removal of peritoneal exudate in which the anticoagulant was involved to prevent possible coagulation of the exudate.

Through the cases of applying 3-different-accessory-factor sera, addition of heparin to the reaction mixture, after washing the organisms out of exsudate fluid, resulted in percent increase of stained organisms in the negative controls in accordance with the dosage. The presence of heparin in the reaction mixture at a concentration of 1:10,000 or more produced numerous fine floccules that rendered the microscopic reading of the parasites so difficult.

The use of modified Alsever's solution (composition: dextrose 2.45 g, citric acid 0.8 g, trisodium citrate 2.2 g and distilled water 100 ml) gave clear-cut dye test results in both negative and positive control tubes when it was added to the reaction mixture at a proportion of 6%.

Similar good dye test results were obtained when a mixture of 1 part of 0.15M citric acid and 3 parts of trisodium citrate (pH 5.3) was applied at the same proportion as in the case of Alsever's solution.

Disodium ethylene diamine tetraacetate was also proved to be effective at 0.043% in the reaction mixture, the optimal dose range, however, being extremely narrow.

It is our conclusion that the addition of Alsever's solution or a 1:3 mixture of 0.15M citric acid and 0.15M trisodium citrate to the reaction mixture is highly promising for enhancing the reproducibility of the dye test, thus minimizing the day-to-day variations of the test results.