

トキソプラズマ色素試験に関する研究

—Accessory factor としてのウマ血清の使用について—

小林 昭 夫 遠藤 卓 郎 渡 辺 直 昭

東京慈恵会医科大学寄生虫学教室

平 井 徳 幸

東京慈恵会医科大学中央検査部寄生虫科

石 井 俊 雄 熊 田 三 由

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和51年7月16日 受領)

先きに著者らの1人, 小林ら (Kobayashi *et al.*, 1969)は, *Toxoplasma* 色素試験 (Sabin and Feldman, 1948; 以下 DT) に用いる Accessory factor (以下 AF) として, モルモット血清が, Alsever 液添加という条件のもとで十分使用しえられることを報告した。

今回はウマ, ウシ, ブタ, ヒツジ血清につき, それらの AF 源としての応用の可否について検討したので, その成績について報告する。

材料および方法

1. 被検動物血清

1) 動物

ウシ: 東京都江戸川区の某牧場で飼育中の3~5歳齢ホルスタイン種19頭ならびに東京芝浦屠場に搬入された2歳齢ホルスタイン種7頭の計26頭。

ブタ: 長野県南安曇郡産の豚コレラワクチン製造ならびに同検定用の目的で飼育されている6~7ヶ月齢の中ヨークシャ種25頭。

ヒツジ: 芝浦屠場に屠殺のため搬入されたヒツジ13頭。

ウマ: 芝浦屠場に屠殺のため搬入された中間種および軽種計16頭で, 平均年齢は7歳前後。大多数は岩手, 福島県産のものであるが, そのほか栃木, 群馬, 茨城県産のものも若干ふくまれていた。

2) 血清採取

本研究は文部省科学研究費の補助によって行われた。記して謝す(小林)。

血液を容器にとり, これを室温に約1時間, さらに低温(5C)下に1~2時間静置し, ついで遠沈(2,500rpm, 7分, 4C)し, 分離する血清を採取した。血清は試験に供するまでの間フリーザー(-20C)中に凍結保存した。なおウマ血清の一部(ウマ No. 16)を凍結乾燥し, 生血清との比較試験をおこなった。なお対照 AF としてはヒトの既知 AF 血漿を用いた。

2. 各種動物血清の AF 適格試験

各種動物血清の AF としての適格試験は, 陰性対照試験と陽性対照試験とに分けておこなった。

前者は, 生食水対照試験において, 虫体の90%以上にメチレン青に対する染性を与えうるか否かを, Alsever 液添加の有無との関係においてテストするものであり, 後者は, 前者のテストに合格した動物血清を AF として用いて既知陽性血清について DT をおこなった場合, 所定の抗体価を与えうるか否かをテストするものである。

1) 陰性対照試験

RH 株感染3日目のマウスの腹腔より採取したトキソプラズマ(Tp)を生食水中に浮遊し, 虫体密度を調整(400倍鏡検で1視野中約30個)後, これを2等分する。それぞれを1,500rpm, 2分間遠沈する。一方の沈渣には10% Alsever-saline を, 他の沈渣には生食水を, それぞれ遠沈前の液量を加え Tp を浮遊させる。これらを小試験管に各0.15ml ずつ分注。これに被検 AF 用血清を0.1ml ずつ加える。攪拌後37C 1時間静置, ついでアルカリ性メチレン青液0.12ml ずつを加える。鏡

検により90%以上の虫体が青染をしめしたものをもちつて陰性対照試験合格とみなした。

2) 陽性対照試験 (AF 能試験)

本試験は、陰性対照試験において合格としてみとめられたウマ血清 8 例をふくむ全馬血清について実施した。したがって陰性対照試験において不合格とされたウシ、ブタ、ヒツジの血清についてはテストしなかつた。

試験方法としては、これらのウマ血清をかりに AF とみたとて、反応系中 40% となるように加え、これに Alsever 液を終末 6%、4%、2% の各濃度に添加して DT をおこなつた。すなわち、抗体価既知の陽性血清 (1:256) を生食水を用いて 1:16 から 4 倍稀釈法により 1:1,024 までの各稀釈系列をつくり、これに適量の Tp を加えて攪拌後、その 0.1ml ずつを小試験管にとる。陰性対照としては生食水に Tp を加えたものを以てした。

一方、ウマ血清に各種濃度に Alsever 液を加えたものを作成しておき、これの 0.1ml ずつを上記の陽性血清 (対照は生食水)・Tp 浮遊液に加え、37°C、1 時間反応させる。ついで型どおりアルカリ性メチレン青溶液 0.1 ml を加えたのち虫体を鏡検し、青染虫体の百分比を求めた。

生食水対照において青染虫体百分比が、90% 以上をしめし、かつ陽性血清につき所定の抗体価をしめしたものをもちつて AF 適格血清とした。

3. ヒトおよびウマ AF 使用による DT 比較

一般人血清 100 例につき、AF としてヒト血漿およびウマ血清を用いて DT をおこなつた。ウマ AF としては、ウマ No. 16 血清およびその凍結乾燥血清を用いた。凍結乾燥血清は、使用直前に蒸留水を所定量加えて溶解し使用した。添加 Alsever 液の反応系中の濃度は、ウマ No. 16 AF 血清使用時の予備試験の結果から、生血清使用の場合は 2%、凍結乾燥血清溶解液使用の場合は 3% とした。

DT の術式については小林 (1969) の記載にしたがつた。

成 績

1. 各種動物血清の AF 適格試験

1) 陰性対照試験

各種動物血清につき、Alsever 液添加の有無との関係において陰性対照試験をおこない Table 1 のごとき結果を得た。

表にみるように、Alsever 液欠如条件下では、いずれの血清とも 90% 以上の青染虫体を与えることはできずすべて不合格となつた。これに対して Alsever 液添加 (終末 6%) 条件下では、ウシ、ブタ、ヒツジ血清については、いずれも不合格に終つたが、ウマ血清については 16 例中 10 例 (62.5%) は 90% 以上の染性をしめし合格とみなされた。

2) ウマ血清の AF 能試験

新鮮なウマ血清 16 例につき、これを AF とみたとて、各種 Alsever 濃度条件下におこなつた DT の結果は Table 2 にしめしたとおりである。

いま、生食水陰性対照における染虫体比率が、90% 以上をしめし、陽性血清につき、所定の抗体価 (1:256) あるいはそれ以上の値をしめしたものであるという条件に照らしてみると、そのあるものは AF としての資格を十分に有することが判明した。

すなわち Alsever 液の終末濃度 6% という条件で使用可能のものは 2 例、同 4% では 2 例、同 2% では 3 例となつている。ウマ血清 No. 1~3 は、そのプール血清についての検討の結果、合格と判定されたもので、個々の血清についてはテストしていないが、いまかりにその個々血清についても、すべて合格とみなすと、全体として 16 例中 8 例 (50%) が合格ということになる。陰性対照試験で合格とされた 10 例のうち 8 例が AF 能を有することが証明されたわけである。

Table 1 Results of screening test on cattle, swine, sheep and horse sera for possible absence of anti-Toxoplasma factors

Animal species	No. sera examined	No. (%) sera qualified	
		Without Alsever	With Alsever*
Cattle	26	0	0
Swine	25	0	0
Sheep	13	0	0
Horse	16	0	10(62.5)

* Concentration of Alsever solution in the reaction mixture is 6%.

Table 2 Results of the dye test using horse sera as accessory factor

Horse serum No.	% organisms stained in saline control and DT titer of a known positive serum* at the presence of Alsever solution in							
	6 %		4 %		2 %		None	
	% Tp stained	DT titer	% Tp stained	DT titer	% Tp stained	DT titer	% Tp stained	DT titer
1-3(Pool)	94	1 : 64	94	1 : 64	95	1 : 256	70	—
4	99	1 : 64	95	1 : 64	92	1 : 256	32	—
5	60	—	23	—	4	—	ND**	
6	3	—	0	—	0	—	ND	
7	95	1 : 256	85	—	53	—	ND	
8	75	—	43	—	10	—	ND	
9	93	1 : 256	95	1 : 1,024	78	—	ND	
10	53	—	13	—	4	—	ND	
11	98	1 : 64	95	1 : 256	46	—	ND	
12	98	1 : 64	87	—	36	—	ND	
13	56	—	4	—	0	—	ND	
14	92	1 : 64	93	1 : 64	78	—	ND	
15	89	—	87	—	87	—	ND	
16	97	1 : 64	95	1 : 64	92	1 : 256	64	—

* 1 : 256 as determined by the ordinary DT method using a human AF.

** Not done

Table 3 Results of dye test using lyophilized horse AF serum

AF source (conc. %)	Alsever conc. (%)	% Tp stained seen in positive serum dilution of					DT titer
		64	256	1,024	4,096	Saline	
Horse* serum (40)	0	5	4	47	78	80	—
	1	7	7	65	92	90	1 : 256
	2	13	18	84	93	94	1 : 256
	3	17	55	91	92	95	1 : 64
	4	24	85	95	96	96	1 : 64
Horse* lyophilized serum (40)	0	14	10	11	14	15	—
	1	10	8	14	23	31	—
	2	4	5	26	70	83	—
	3	3	20	85	92	95	1 : 256
	4	10	50	92	94	97	1 : 256
Human plasma (40)	(6)	3	2	66	94	93	1 : 256

* Horse No. 16

2. 凍結乾燥ウマ血清の AF 能試験

前記 AF 適格試験により, その使用の可能性が証明されたウマ No. 16血清を凍結乾燥し, これの AF としての使用の可否と, その使用条件を, 同じウマから得た

生血清使用の場合と比較, 検討してみた. その結果は Table 3 にしめされる.

表にみるごとく, 凍結乾燥ウマ血清を AF として用いた場合にも DT 反応が十分成立することが証明され

た。但し血清を用いた場合の添加 Alsever 濃度は、終末1~2%が最適であつたのに対して、凍結乾燥血清の場合には Alsever 液の濃度は3%がよく、両者間に若干の相違がみられた。

3. AF の最少必要濃度について

ウマ No. 16血清につき、その生血清、凍結乾燥血清とも、これを AF とし、添加 Alsever 液濃度を、それぞれ2%、3%とした場合の反応系中最少必要 AF 濃度を求めてみた。その結果は Table 4 にしめしたとおりである。

すなわち生血清では、所定の抗体価をうるための最少必要濃度は40%で、30%では抗体価にして1管の低下をしめた。

一方、凍結乾燥血清使用の場合についても、その AF

としての最少必要濃度は40%であり、30%濃度では反応の成立をみなかつた。

4. ヒト血漿とウマ血清を AF として用いた DT 比較

血清100件につき、ヒトの AF 血漿とウマ AF 血清を、それぞれ用いた場合における DT 成績は Table 5 にしめしたとおりである。

この表より、陰性 (<1:4) をしめたものの件数は、ヒト AF 使用では52件、ウマ生血清使用時53件、同凍結乾燥血清使用時53件であり、抗体価1:16以上(陽性)をしめたものの件数は、それぞれ40件、37件、39件と、三者とも定性的に高い一致をしめた。また各抗体価ごとの出現頻度もほぼ同等で、定量的にも高い一致をみた。

Table 4 Minimum effective dose of horse AF serum

AF source	AF conc. (%)	Alsever conc. (%)	% Tp stained seen in positive serum dilution of					DT titer
			64	256	1024	4096	saline	
Horse* serum	10	2	93	92	96	92	99	≦1:64
	20	2	78	96	95	98	94	≦1:64
	30	2	18	91	99	99	98	1:64
	40	2	2	47	90	94	96	1:256
Horse* lyophilized serum	20	3	95	95	96	98	98	≦1:64
	30	3	77	96	97	97	99	≦1:64
	40	3	31	41	75	95	95	1:256
	50	3	21	21	58	84	91	1:256
Human plasma	40	(6)	14	41	95	96	95	1:256

* Horse No. 16

Table 5 Results of the dye test on 100 sera using human plasma and horse serum as source of the accessory factor

Dye test titer	No. sera showing DT titer as determined by method using AF of		
	Human plasma	horse*	
		serum	lyophilized serum
<1:4	52	53	53
1:4	8	10	8
1:16	23	24	24
1:64	15	10	13
1:256	1	1	1
1:1,024	1	2	1

* Horse No. 16

考 察

Sabin and Feldman (1948)は、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、サル、ウサギ、ラット、モルモットの新鮮血清について検討し、これらの動物の血清はいずれも非特異的抗 Tp 因子の存在により AF 源として、その使用は不可能であつたと述べている。

しかし著者ら (Kobayashi *et al.*, 1969) は、さきに、適切な濃度の Alsever 液の存在下でモルモット血清が、AF として十分使用しえられることについて報告した。さらにまた、今回の実験によつてウマ血清も AF 源として使用に堪えうる事が明らかとなつた。

ヒトあるいはモルモット血清と比較して、ウマ血清については AF として以下に述べるような特色がみられた。

その1つは、添加すべき Alsever 液の濃度が個々血清によつていちじるしく変動する点である。ヒトおよびモルモット血清の場合には、個々の AF 血清による変動はそれほどいちじるしくはなく、Alsever 液の好適添加濃度はひとしく終末6%であつたのに対して、ウマの AF 血清では個々の血清の性状により2~6%の範囲内のごく限定された濃度となつている。

第2に、DT 反応の生起に必要なウマ AF 血清の必要最少濃度が、ヒトやモルモット血清の場合より高いことがあげられる。それぞれ適切な濃度の Alsever 液存在下において、ヒト AF 血清については30% (Kobayashi *et al.*, 1968)、モルモット血清では20% (Kobayashi *et al.*, 1969) であつたのに対して、ウマ血清では40%となつている。この濃度は DT 術式での AF 血清の最大濃度が終末40%であることを考えると、ウマ血清使用の場合、必要とされる限度ぎりぎりの濃度で反応をおこなつていることになる。したがつて、ウマ血清のあるものについては、恐らくその補体価のいちじるしく低いものにあつては、40%以上の高い濃度を必要とする場合もありうる事が想定されうる。このようなことが、ウマ No. 14血清の場合にみるごとく、陽性対照試験 (AF 能試験) において、十分な抗体価を与えなかつたという結果を説明するのかもしれない。

DT 反応の成立に必要な AF 濃度が、その供給源である動物の種類によつて異なるのは当然のことと考えられる。DT が Tp の免疫溶解反応にもとづくものである (Kobayashi *et al.*, 1969; Endo and Kobayashi, 1976; Suzuki *et al.*, 1971) 以上、本反応の成立には補体の全成分のそれぞれ一定量以上を必要とする。

AF 源として、ウマ血清がモルモットやヒト血清より多量を必要とされる理由は、DT 反応の生起に必要な補体量あるいは特定の補体成分が、ウマ血清ではとくに少いからではないかと想定される。

そこで、いまモルモット、ヒト、ウマの血清中の補体量を免疫溶血系を指標として測定した場合について比較してみるに、ヒツジ血球とウサギ溶血素という組み合わせでの比較では、モルモット血清では1 ml 中625単位、ヒト血清100単位に対してウマ血清では10単位以下 (Rice and Crowson, 1950)、またはモルモット血清1,786単位に対してウマ血清0 (Rice and Boulanger, 1953) であり、またウサギ血球とヒツジ溶血素の組み合わせの比較では、1 ml 中モルモット血清では91単位に対してウマ血清25単位という。いずれにもせよ、ウマ血清中の補体価は、免疫溶血系で測定しえたかぎりでは、モルモット血清中のそれに比していちじるしく低いことは確かなようである。この事実は DT における先の想定をある程度裏づけるものであると考えられる。

ウマ AF 血清の特色の第3は、再現性の問題である。ウマ血清使用の場合、ヒトやモルモット血清のそれに較べて成績の再現性に乏しいという傾向があるようである。こうした不安定性の原因については現在のところ必ずしも明らかでない。

ウマ AF 血清について、これを凍結乾燥して保存後にも、その使用が可能であることが証明されたことは、モルモットの凍結乾燥血清の AF としての有効性 (小林ら, 1972) とともに、AF の実用化の面で注目される。

要 約

Toxoplasma 色素試験に用いる Accessory factor 源として、ウマ (16頭)、ウシ (26頭)、ブタ (25頭)、ヒツジ (13頭) の血清の利用の可能性について検討し、以下の結果をえた。

1. 陰性対照試験として、抗体のない状態のもとに、これらの動物血清と Tp とを直接作用させた場合の虫体のメチレン青に対する染性について検討した場合、Alsever 液の添加のない条件下では、上記の全動物血清とも、虫体の90%以上に染性を与えることができず不合格となつた。しかし Alsever 液の添加 (終末6%) により、ウマ血清についてのみ16例中10例 (62.5%) が合格と判定された。

2. ウマ血清について、さらに AF 能保有の有無、すなわちこれを AF とみだてて既知陽性血清について

色素試験をおこなつた場合、所定の抗体価を与えうるか否かをテストした結果、全16例中8例(50%)において合格となつた。これらのウマ血清のAFとしての活性を十分に発揮させるために必要な Alsever 液の濃度は、個々のウマ血清によつて少しずつ異なり、2~6%の範囲内のきわめて狭い濃度幅を選択する。なおウマAF血清の使用は、再現性の点でヒトやモルモットAF血清より劣るものと判断された。

3. ウマAF血清は凍結乾燥保存に堪える。凍結乾燥血清を水で溶解してAFとして使用する場合、生血清にくらべてAF活性、好適なAlsever添加濃度等に若干の変動がみられた。

4. 一般人血清100例について、ヒトおよびウマの血清(生血清および凍結乾燥血清)をAF源として用いて色素試験をおこない、定性的にも定量的にも三者間に高い一致をみとめた。

文 献

- 1) Endo, T. and Kobayashi, A. (1976) : *Toxoplasma gondii*: Electron microscopic study on the dye test reaction. *Exp. Parasit.*, 40, 170-178.
- 2) Kobayashi, A., Kumada, M. and Tsunematsu, Y. (1968) : Effects of anticoagulants on the dye test for toxoplasmosis. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 21, 71-89.
- 3) Kobayashi, A., Kumada, M., Suzuki, M. and Tsunematsu, Y. (1969) : Studies on the accessory factor for *Toxoplasma* dye test. Guinea pig serum as a source of the accessory factor. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 22, 327-336.
- 4) 小林昭夫(1969) : トキソプラズマ症の臨床検査. 臨床検査, 13, 282-283, 299-304.
- 5) 小林昭夫・平井徳幸・遠藤卓郎・渡辺直熙・秋間礼子・熊田三由・石井俊雄(1972) : トキソプラズマ色素試験に関する研究(1) Accessory factorとしての各種動物血清の検討. 寄生虫誌, 21(増), 39.
- 6) Rice, C. E. and Crowson, C. N. (1950) : The interchangeability of the complement components of different animal species. II. In the hemolysis of sheep erythrocytes sensitized with rabbit amboceptor. *J. Immunol.*, 65, 201-210.
- 7) Rice, C. E. and Boulanger, P. (1953) : The interchangeability of the complement components of different animal species. IV. In the hemolysis of rabbit erythrocytes sensitized with sheep antibody. *J. Immunol.*, 68, 197-205.
- 8) Sabin, A. B. and Feldman, H. A. (1948) : Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.
- 9) Suzuki, M., Tsunematsu, Y. and Torisu, M. (1971) : Studies on the accessory factor for the *Toxoplasma* dye test: Essential role of complement. *J. Parasit.*, 57, 924-925.

Abstract

STUDIES ON TOXOPLASMA DYE TEST, WITH SPECIAL REFERENCE
TO THE USE OF HORSE SERUM AS A SOURCE
OF THE ACCESSORY FACTOR

AKIO KOBAYASHI, TAKURO ENDO, NAOHIRO WATANABE

*(Department of Parasitology, The Jikei University
School of Medicine, Tokyo, Japan)*

NORIYUKI HIRAI

*(Clinical Laboratory, The Jikei University
School of Medicine, Tokyo, Japan)*

TOSHIO ISHII AND MITSUYOSHI KUMADA

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

Serum samples from 16 horses, 26 cows, 25 pigs and 13 sheep were tested for their possible usefulness as source of the accessory factor for *Toxoplasma* dye test. Results obtained were as follows ;

1. All the sera from cows, pigs and sheep failed to pass the qualifying test for the accessory factor.
2. Eight (50%) of 16 horse sera were proved to be useful as source of the accessory factor provided that Alsever solution was added to the reaction mixture at 2, 4 or 6%.
3. Lyophilized horse serum was also proved to be useful as the accessory factor when used together with Alsever solution.
4. Dye tests on 100 sera using human and horse sera as sources of the accessory factor gave almost the same results.