

トキソプラズマ-ラテックス凝集反応 (トキソテスト-MT) の検討

小林 昭夫 平井 徳幸* 鈴木 康弘
西川 洋昭 渡辺 直熙

東京慈恵会医科大学寄生虫学教室

*東京慈恵会医科大学中央検査部寄生虫科

(昭和52年5月30日 受領)

トキソプラズマ (Tp) 凝集反応における抗原の担体として、赤血球以外の粒子を応用する試みについては、既に諸家によるいくつかの報告がある。

Siim and Lind (1960), Denis (1967) は、アクリール樹脂粒子を用いた凝集反応を報告し、Bozděch and Jira (1961) はラテックス粒子を用いる方法を、Roussel (1964) はベントナイトおよびカオリン粒子を用いる方法をそれぞれ報告した。

Lunde and Jacobs (1967) は、スライドグラス法による間接ラテックス凝集反応 (以下LA) を間接赤血球凝集反応 (以下HA) との比較により検討し、LA では感度が低く、かつ非特異抗体の存在により反応が攪乱されたことから、これを患者の診断に応用することは推奨しえないとした。この方法はさらにKwantos *et al.* (1972) によっても追試され、LA は特異性はあるが、色素試験 (以下DT) とくらべて感度の面で難点があるとされた。さらにBeverley *et al.* (1973) は、市販の感作ラテックスキット (Italdiagnostic 製品) を用いたスライドグラス法につき、これとDTとの比較試験の結果から、LAには特異性はあるが感度がやはり低いということを指摘している。

LAについては、最近わが国においても坪田ら(1977)により、その反応条件についての検討がおこなわれ、その結果にもとづき、マイクロタイター法によるLAキット (トキソテスト-MT) が栄研化学によって試作された。本キット品は、抗原感作粒子の安定性が高く、反応の感度も高いという。そこで吾々は、本キット品につき、これをDT、HAとの比較により検討してみた。

材料および方法

1. 被検血清

DT、HAとの比較試験には、慈恵医大一般外来患者血清368例と東京都芝浦食肉衛生検査所職員の血清44例の計412例を用い、また抗核抗体によるLA反応攪乱の有無についての検討にはSLE患者血清 (順天大塩川優一教授より分与) 中DT陰性のもの86例を用いた。さらに急性TP感染にともなうLA抗体価の変動を検討する目的には、ブタ由来の弱毒TP株を接種した5羽のウサギにつき、経日的に採取して得られた血清 (栄研化学平岡謙一氏より分与) をもちいた。

2. LAの術式

LAには栄研化学により試作されたTP抗原感作ラテックス懸濁液と血清希釈用緩衝液をもちい、以下の術式にしたがっておこなった。

すなわち 1) ハードV型マイクロタイター用トレーを用い、第1～第12の各穴に緩衝液0.025mlずつをドロップパーを用いて分注する。2) ダイリューターを用いて被検血清の0.025mlをとり、これを第1穴に加えて攪拌し1:2希釈液をつくる。以後2倍希釈法により1:2,048までの各希釈倍を作る。最終穴は緩衝液のみとし陰性対照とした。なお1:2,048以上の高抗体価をしめたものについては、さらに高希釈倍液をつくりテストした。3) 感作ラテックス懸濁液を充分振盪したのち、ドロップパーを用いてその0.025mlずつを各穴に滴下する。4) トレーをマイクロミキサーを用いて数分間振盪し反応液を充分混和する。5) 室温に一夜静置したのち、使用指示書に準拠して凝集パターンを読み抗体価をもとめた。抗体価は所定の凝集像をしめす希釈倍数 (感作ラテックス懸濁液を加える前の血清希釈倍) のうち最大希釈倍をもつてあらわした。

3. DTおよびHAの術式

DTについてはFrenkel and Jacobs (1958) の変法

(小林ら, 1968) によりおこなった, HA については, Jacobs and Lunde (1957) の原法に準拠したが, 抗原濃度については最大の抗体価を与える濃度とする変法 (Kobayashi *et al*, 1971) を採用した.

成績

1. LA による各抗体価別頻度分布と陽性判定基準被検血清412例についてDT および HA を, またその

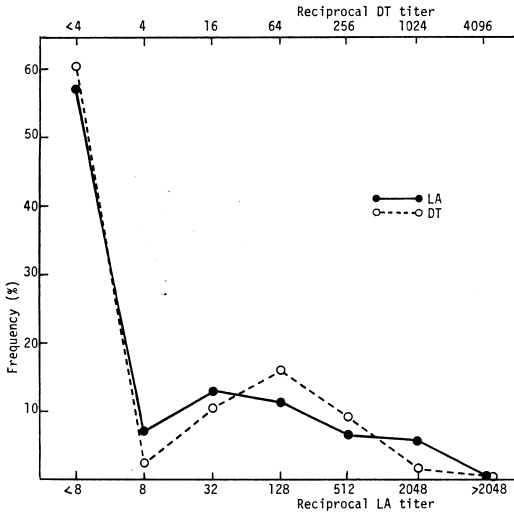


Fig. 1 Frequency distribution curves of LA and DT titers in 412 sera.

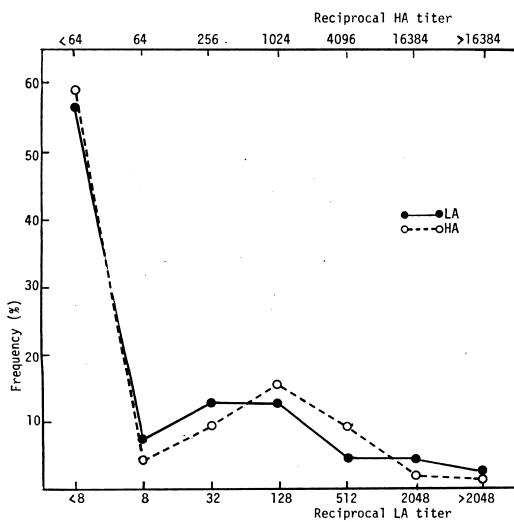


Fig. 2 Frequency distribution curves of LA and HA titers in 336 sera.

1部336例について HA と LA を実施し, 得られたそれぞれの抗体価につき, その出現頻度を図示すれば Fig. 1, 2のごとくである. この図では, 各テストによるパターンの比較を容易にするため, LA 抗体価については4倍希釈段階によるそれとしてあらわしてある.

これらの図によれば, LA, DT, HA いずれの場合とも明瞭な二峯性の分布曲線をしめし, 全体として三者ともそのパターンが, よく一致していることがわかる. 二峯間の谷間は, LA については 1 : 8 に, DT では 1 : 4 に, HA では 1 : 64 にそれぞれしめされている. したがって陽性判定基準は LA では 1 : 32 以上とするのが妥当であると考えられる. なお, これらの分布パターンより, DT および HA については, それぞれ 1 : 16 以上, 1 : 256 以上を陽性とみなすことができるが, これは著者らによる従来の報告 (小林ら, 1968 ; Kobayashi *et al*, 1971) と完全に一致する.

2. LA と DT, HA との定性的一致率

上記の陽性判定基準に照らし, LA と DT, LA と HA の各定性的一致率について検討してみた. その結果は Table 1 にしめされるごとく, LA と DT については 412 例中 389 例に陽性・陰性についての定性的一致がみられ, 一致率は 94.4% となった. 不一致をしめした 23 例の

Table 1 Qualitative agreement between DT and LA with 412 sera

| Agreement | | | Disagreement | | | Grand total (%) |
|-------------|-------------|------------|--------------|-------------|-----------|-----------------|
| DT+ LA+ (%) | DT- LA- (%) | Total (%) | DT+ LA- (%) | DT- LA+ (%) | Total (%) | |
| 139 (33.7) | 250 (60.7) | 389 (94.4) | 13 (3.2) | 10 (2.4) | 23 (5.6) | 412 (100) |

Table 2 Qualitative agreement between HA and LA with 336 sera

| Agreement | | | Disagreement | | | Grand total (%) |
|-------------|-------------|------------|--------------|-------------|-----------|-----------------|
| HA+ LA+ (%) | HA- LA- (%) | Total (%) | HA+ LA- (%) | HA- LA+ (%) | Total (%) | |
| 116 (34.5) | 205 (61.0) | 321 (95.5) | 8 (2.4) | 7 (2.1) | 15 (4.5) | 336 (100) |

内訳をみると, 13 例が DT(+) LA(-), 逆に 10 例が DT(-), LA(+) で, それぞれの反応に対してほぼ等分に分布し, それらの血清の抗体価は低いものが多かった.

Table 3 Anti-toxoplasma antibody titers observed by DT and LA in 412 sera

| Reciprocal of DT titers | Reciprocal of LA titers | | | | | | | | | | | | | | Total | % Posi. by LA |
|-------------------------|-------------------------|-------|-----|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|------|-------|--------|---------------|
| | <2 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | 4096 | 16484 | | |
| <4 | 166 | 43 | 23 | 11 | 2 | 2 | 2 | | | | | | 1 | | 250 | (2.0) |
| 4 | 1 | | | 2 | 2 | 1 | 2 | | 1 | 1 | | | | | 10 | (50.0) |
| 16 | | 1 | | 1 | 9 | 16 | 7 | 2 | 2 | 2 | | | 2 | | 42 | (73.8) |
| 64 | | | | | 2 | 7 | 12 | 16 | 15 | 9 | 1 | 3 | | | 65 | (96.9) |
| 256 | | | | | | 1 | 2 | 8 | 2 | 7 | 6 | 12 | | | 38 | (100) |
| 1,024 | | | | | | | | | | | 1 | 5 | | 1 | 7 | (100) |
| Total | 167 | 44 | 23 | 14 | 15 | 27 | 25 | 26 | 20 | 19 | 8 | 23 | | 1 | 412 | (36.2) |
| (% Posi. by DT) | (0) | (2.3) | (0) | (7.1) | (73.3) | (88.9) | (84.0) | (100) | (95.0) | (94.7) | (100) | (95.7) | | (100) | (36.9) | |
| | (0.8) | | | | | | | | | | | | | | | |

Table 4 Anti-toxoplasma antibody titers observed by HA and LA in 336 sera

| Reciprocal of HA titers | Reciprocal of LA titers | | | | | | | | | | | | | | Total | % Posi. by LA |
|-------------------------|-------------------------|-----|-----|-----|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------------|
| | <2 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | >2048 | | | |
| <16 | 130 | 24 | 10 | 5 | 1 | | | | | | | | | | 170 | (0) |
| 16 | 13 | 5 | 4 | 3 | 2 | | 1 | 1 | | | | | | | 29 | (6.9) |
| 64 | 2 | 1 | | 1 | 4 | 3 | | 2 | | | | | | | 13 | (38.5) |
| 256 | 1 | | | | 3 | 15 | 4 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 31 | (87.1) |
| 1,024 | | | | | 4 | 5 | 10 | 15 | 8 | 4 | 1 | 3 | 1 | 51 | (92.2) | |
| 4,096 | | | | | | 1 | 4 | 8 | 2 | 6 | | 4 | 6 | 31 | (100) | |
| 16,384 | | | | | | | | | 2 | | | 3 | 1 | 6 | (100) | |
| >16,384 | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 1 | 5 | (100) | |
| Total | 146 | 30 | 14 | 9 | 14 | 24 | 19 | 30 | 13 | 11 | 3 | 14 | 9 | 336 | (36.6) | |
| (% Posi. by HA) | (0.7) | (0) | (0) | (0) | (50.0) | (87.5) | (94.7) | (90.0) | (100) | (100) | (100) | (100) | (100) | (36.9) | | |
| | (0.5) | | | | | | | | | | | | | | | |

一方 LA と HA については Table 2 にみるように、336例中321例 (95.5%) に一致がみられ、不一致をみた15例の内訳については、8例が、HA(+) LA(-)、7例が HA(-) LA(+) と等分され、不一致をみた血清は、いずれも低抗体価をしめすものに限られていた。

3. LA と DT, HA 各法抗体価の相互関係

LA と DT および HA についての抗体価の比較については Table 3, 4 にみるとおりである。

LA と DT の各抗体価間には明瞭な相関関係がみとめられ、LA による血清抗体価は DT のそれに比して高く、平均的には約2倍程度となっていることがわかる (Table 3)。LA については1:8以下を陰性とみなすことができるが、LA 陰性のものにつき DT で陽性 ($\geq 1:16$) をしめすものは僅かに0.8%に過ぎず、LA 疑陽性 (1:16) については DT で73.3%が陽性、LA 陽性 ($\geq 1:32$) のものについては84~100% (平均93.3%) が DT 陽性をしめしている。

%) が DT 陽性をしめしている。

一方、DT の各抗体価ごとに血清の LA 陽性率をみると、DT 陰性 (<1:4) のものについて LA で陽性をしめしたものは2.0%、DT 疑陽性 (1:4) の血清については LA で50%が陽性、DT 1:16以上では LA で73~100% (平均91.4%) が陽性をしめした。

LA と HA との関係については Table 4 にみるごとく、LA による血清抗体価は HA によるその大略1/8程度となつている。LA 陰性の血清につき、HA で陽性 ($\geq 1:256$) をしめしたものの比率は、わずか0.5%に過ぎず、また LA 疑陽性を HA で陽性とするものの比率は50%、LA 陽性 ($\geq 1:32$) を HA で陽性とするものの比率は87.5~100% (平均94.3%) となつている。

また HA 陰性 (<1:64) につき LA で陽性であったものは1%、HA 疑陽性 (1:64) を LA で陽性とするものの比率は38.5%、HA 陽性 ($\geq 1:256$) については、

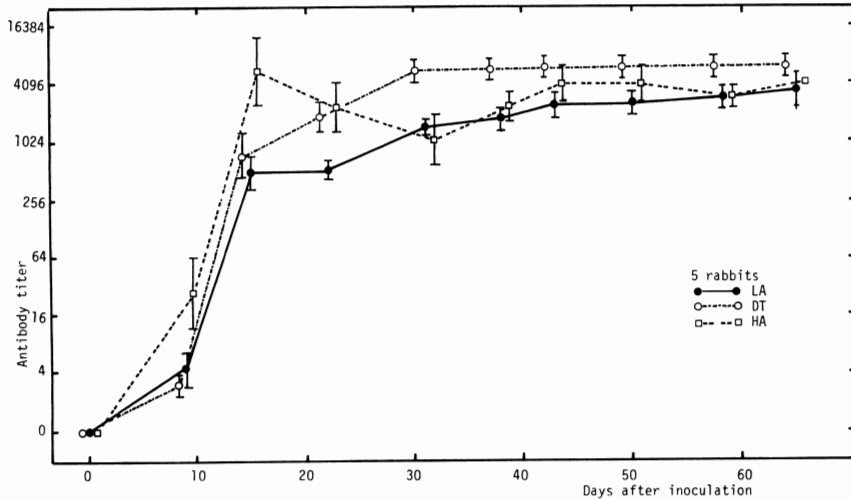


Fig. 3 LA, DT and HA titers in rabbits inoculated with *Toxoplasma porcine* strain.

LA で87.1~100% (平均93.5%) が陽性となっている。

4. 急性 Tp 感染ウサギにおける LA, DT, HA 各抗体価の消長

Tp 弱毒株を腹腔内に接種し、感染後65日までの間におけるウサギ血清中 LA 抗体価の消長を DT, HA のそれとともに図示すれば Fig. 3のごとくである。

LA 抗体価の消長は、Tp 接種後9日では1:4ときわめて低いが、15日後には1:500と急激に上昇し、以後漸増しつつ40日後にはほぼ1:2,000に達し、60日後には1:3,000となった。

DT 抗体価は、接種後9日ではLAと同様きわめて低い値をしめしたが、以後急上昇し、15日後では1:500以上、1ヶ月後には最高値(ほぼ1:4,000)に達し、以後65日まで同一の抗体価を持続した。

HA 抗体価はLA, DTのそれに比して変動が大きく、感染15日後に既に1:4,000以上の高い値がしめされたが、その後やや低下し1ヶ月後には1:1,000前後となり、その後は再び上昇して1:4,096となった。

5. 非特異抗体を含む血清についての LA

抗核抗体保有(SLE)患者血清中 DT 反応が陰性のもの86例につき LA をおこなった結果はすべて陰性であった。同時におこなった間接蛍光抗体法では、10例(11.6%)が陽性をしめた。

論 議

Tp 症の血清学的診断法のうち、感度、特異性の点からDTが最も基本的な方法であるとされているが、この

反応では抗原として生きた虫体と Accessory factor を必要とするので一般には応用され難い。

DT に代るべき方法として開発された HA もその原法については操作が煩雑であるので一般臨床検査所等では行なわれ難く、またその簡易化をめざして開発された HA キットについても、なお予じめ被検血清の非働化、赤血球による吸収操作を必要とするほか、反応の安定性を確保することは必ずしも容易ではないことが指摘されている。

Tp 凝集反応において、赤血球に代るべき担体としてラテックスを用いる試みはBozděch and Jira(1961)によつてはじめて行なわれて以来、Lunde and Jacobs(1967), Kwantos *et al.* (1972), Beverley *et al.* (1973)によつて検討されてきた。それらの報告によれば、LA は反応の感度がいちじるしく低く、患者の診断に用いることは困難であるという。

今回われわれが試験に供した LA キットは、ウサギでの急性 Tp 感染によつてみるかぎり、LA によつて証明される抗体は、感染後10日から15日までの間に DT, HA 抗体とほぼ同調的に急上昇し、以後1:2,000~3,000程度の抗体価をしめたことから、急性 Tp 症に対して充分高い感度をしめすものと考えられる。またヒトでの慢性不顕性感染例についても、LA 抗体価はDTの2倍程度としてしめされているので感度の点で問題はなさそうに思われる。

一方 LA の特異性に関しては、DT あるいは HA との定性的一致率が95%と、きわめて高率であつたことや

抗核抗体による反応の攪乱がみとめられなかつたということから判断すると、少なくともヒトの血清については抗 Tp 抗体検出に関して特異性を有するものと考えることができる。ただし動物、たとえばイヌ、ラット、マウスなどの血清についても LA の特異性が示されるか否かについては未詳であり今後の検討を要する。

抗核抗体およびリユーマチ様因子等による反応攪乱の問題に関しては、Lunde and Jacobs (1967) は、彼等の用いた LA では、DT 陰性で上記の非特異抗体を有する患者血清51例につき、その25.5%に陽性をみとめているが、この結果は今回著者らが用いた LA キットでのそれと異なる。しかしわれわれは間接蛍光抗体法においては SLE 患者86例中 11.6%に陽性をみとめ、この点については、その程度の差はあれ Araujo *et al.* (1971) の成績と一致する。

以上により、LA (トキソテスト-MT) は、その感度、特異性、簡易性などの諸点に鑑み、これを Tp 症患者のスクリーニングならびに診断の目的に充分利用しうるものと考えられる。

要 約

トキソプラズマラテックス凝集反応 (LA) のキット (トキソテスト-MT) について検討し、以下の結果をえた。

1) 被検人血清412例について LA を実施し、得られた各抗体価ごとの出現度数分布をみると、1 : 8 を谷間とする二峯性の分布曲線となり、これより陽性判定基準を求めると $\geq 1 : 32$ となつた。

2) LA と色素試験 (DT) との定性的一致率は94.4% (389/412)、LA と赤血球凝集反応 (HA) とのそれは95.5% (321/336) と、いずれも高い一致率がしめされた。

3) LA と DT あるいは HA 間の抗体価による定量的関係は、ウサギにおける急性 Tp 症については、LA は DT, HA より僅かに低く、慢性不顕性 Tp 感染者については、LA 抗体価は DT のその約2倍、HA のほぼ1/8としてしめされた。

4) SLE 患者血清中、DT 陰性のも86例につき間接蛍光抗体法では10例に陽性がしめされたが、LA ではすべて陰性であつた。

以上により、LA (トキソテスト-MT) は、その感度、特異性、簡易性などの点に鑑み、これを Tp 症患者のスクリーニングもしくは診断の目的に十分応用しうるものと結論された。

謝 辞

貴重な血清材料を御分与くださった順天堂大学医学部塩川優一教授ならびに栄研化学平岡謙一氏に深謝する。また種々御協力いただいた本学寄生虫学教室内田雅子、本田元子、永井佳子の諸君に感謝する。

文 献

- 1) Araujo, F.G., Barnett, E. V., Gentry, L. O. and Remington, J. S. (1971) : False-positive anti-*Toxoplasma* fluorescent-antibody test in patients with antinuclear antibodies. *Appl. Microbiol.*, 22, 270-275.
- 2) Beverley, J. K. A., Freeman, A. P. and Watson, W.A. (1973) : Comparison of a commercial toxoplasmosis latex slide agglutination test with the dye test. *Vet. Rec.*, 93, 216-218.
- 3) Bozděch, V. and Jira, J. (1961) : Latex-Agglutinations test mit dem *Toxoplasma* antigen. *Deut. Gesundh.*, 16, 2398-2400.
- 4) Denis, C. (1967) : Emploi de particules d'acryl dans le sérodiagnostic de la toxoplasmosis. *Path. Microbiol.*, 30, 981-988.
- 5) Frenkel, J. K. and Jacobs, L. (1958) : Ocular toxoplasmosis-Pathogenesis, diagnosis and treatment. *A. M. A. Arch. Ophthal.*, 59, 260-279.
- 6) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 43, 308-314.
- 7) 小林昭夫・熊田三由・常松之典 (1968) : トキソプラズマ色素試験の基準化に関する研究 (2) Accessory factor としての血漿の使用について。 *寄生虫誌*, 17, 81-85.
- 8) Kobayashi, A., Kumada, M., Tsunematsu, Y., Kamei, K., Nobuto, K. and Hanaki, T. (1971) : Comparison of the dye test and hemagglutination tests by three different techniques in the serologic diagnosis of toxoplasmosis. Results on sera from humans, dogs and cats. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 24, 115-124.
- 9) Kwantos, W., Payne, R.A., Ludlam, G.B., Bridges, J. B. and Fleck, D. G. (1972) : An assessment of a latex agglutination slide test for toxoplasma antibody. *J. Clin. Pathol.*, 25, 359-360.
- 10) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1967) : Evaluation of a latex agglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 53, 933-936.
- 11) Remington, J. S., Miller, M. J. and Brownlee,

- I. (1968) : IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II Prevalence and significance in acquired cases. *J. Lab. Clin. Med.*, 71, 855-866.
- 12) Roussel, J. L. (1964) : Agglutination de particules sensibilisées dans le serodiagnostic de la toxoplasmose. Thesis Lyon.
- 13) Siim, J. C. and Lind, K. (1960) : A *Toxoplasma* flocculation test. *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 50, 445-446.
- 14) 坪田宣之・平岡謙一・大島 慧・渡辺俊子(1977) : トキソプラズマラテックス凝集反応 マイクロタイター法について. *寄生虫誌*, 26, (増), 31.

Abstract

EVALUATION OF A COMMERCIAL *TOXOPLASMA*
LATEX AGGLUTINATION TEST

AKIO KOBAYASHI, NORIYUKI HIRAI, YASUHIRO SUZUKI,
HIROAKI NISHIKAWA AND NAOHIRO WATANABE

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

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

A *Toxoplasma* latex agglutination test using a commercial kit (Eiken Chemical CO., Tokyo) was evaluated by comparing it with the dye (DT) and indirect hemagglutination (HA) tests.

The frequencies of respective titers of the microtiter latex agglutination test (LA) on 412 human sera revealed a bimodal distribution curve, thereby titers above 1:32 were regarded as positive (Figs. 1, 2). High agreements were shown, in regard to positivity and negativity, between LA and DT (94.4%) and LA and HA (95.5%), respectively (Tables 1, 2). The LA titers obtained by testing sera from a general human population were twice as high as DT titers but lower than HA (Tables 3, 4). In acute rabbit toxoplasmosis, LA titers attained to 1:521 on day 15 and up to 1:2,048 or more on days 40 to 60 following infection (Fig. 3). The LA gave negative result to all sera from 86 cases with antinuclear antibody but without DT antibody.

From these results, it is likely that LA using the kit is specific and sensitive enough to detect anti-*Toxoplasma* antibody and its easier procedure may provide useful facilities for the screening of toxoplasmosis.