

トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究

(第1報) マイクロタイター用試薬の調製条件と安定性

坪 田 宣 之

栄研化学株式会社研究部

小 澤 光

東北大学薬学部薬理学教室

(昭和52年9月5日 受領)

トキソプラズマ症の血清学的検査法として、色素試験 (Sabin and Feldman, 1948 ; 小林ら, 1968 ; Kobayashi *et al.*, 1968) は信頼度が高いが、アクセサリー・ファクターが必要なこと、生きたトキソプラズマ虫体を使うこと、さらに可成りの熟練を要することなどいくつかの難点がある。これにかわる血球凝集反応試験法で、長期安定化するため固定羊血球を使った試薬 (Park, 1961 ; Jennis, 1966 ; 花木ら, 1964 ; Hiraoka and Ohshima, 1972 ; Thorburn and Williams, 1972) においても煩わしい吸収操作を免れることは出来ない。吸収操作が不要な凝集反応として、ラテックス凝集反応がある。この反応はリユーマチ因子測定の目的で使われて以来 (Singer and Plotz, 1956), 汎発性紅斑性狼瘡 (Christian *et al.*, 1958), レプトスピラ症 (Muraschi, 1958), 旋毛虫症 (Innela and Redner, 1959), ヒストプラズマ症 (Carlisle and Saslaw, 1959), 肝炎 (Fritz and Rivers, 1972) などの診断に応用する試みが報告されている。トキソプラズマ感染の診断にも, Bozděch and Jira (1961) は試験管法で, また Lunde and Jacobs (1967), Kwantes *et al.* (1972) および Beverley *et al.* (1973) はスライド凝集法でラテックス凝集反応を検討したが, いずれも補体結合反応試験, 血球凝集反応試験あるいは色素試験にくらべて感度や精度が劣るとされ, 広く実用化されるに到らなかった。

著者らは, 同一抗原抗体反応系においては一般にマイクロタイター法の方がスライド凝集法よりも感度が高いことに着目し, 種々検討の結果, 色素試験あるいは血球凝集反応試験にかわる方法として充分満足出来るトキソプラズマラテックス凝集反応マイクロタイター用試薬を作ることが出来た。

本報では, この試薬の調製に関する諸条件の検討結果

と調製した試薬の安定性について述べる。

材料および方法

1. ラテックス粒子

マイクロタイター法による沈降時間および沈降像を予め検討したところ径0.8~1.0 μ m の粒子が良好な結果を示したので, 径0.9 μ m のラテックス粒子 (武田薬品工業) を用いた。

2. 抗原の製法

Jacobs and Lunde (1957) の方法に準じて抗原液を調製した。すなわち, RH 株感染マウスの腹水からトキソプラズマ虫体を分離し, リン酸緩衝生理食塩液で遠心洗滌した後, 沈殿した虫体に10倍量の蒸留水を加えて, 低温で一晩抽出した。抽出の後, 60,000 \times g, 30分間遠心し, 上清を採取して等量のトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0, I = 0.02) を加え, 抗原液とした。

3. 抗体稀釈に用いた緩衝液

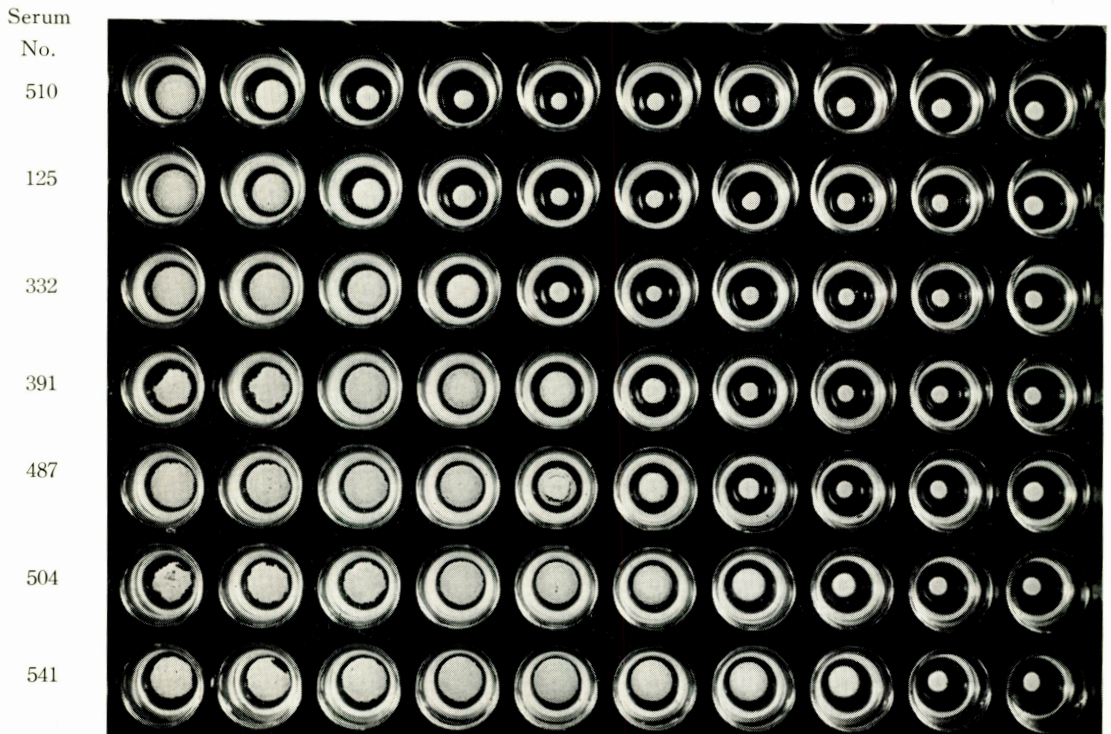
調べたい pH に応じて, 0.1M 蟻酸-水酸化カリウム (pH 3.2), 0.1M コハク酸-水酸化カリウム (pH 4.0~6.0), 0.1M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 6.2~7.5), 0.1M トリス-塩酸または0.2M アミノメチルプロパノール-塩酸 (pH 8.0~8.5), 0.1M Na₂B₄O₇-H₃BO₄ (pH 9.0) および 0.1M NaHCO₃-Na₂CO₃ (pH 10.0) を用いた。

4. 抗原感作に用いた緩衝液

調べたい pH に応じて, 上記の抗体稀釈用緩衝液をそれぞれ I=0.01 になるように稀釈して用いた。イオン強度だけを変える場合には塩化ナトリウムを加えて調整した。

5. 抗原感作ラテックス懸濁液の作製

購入したラテックス粒子懸濁液を 4,000rpm, 20 分間



Reciprocal serum dilution

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
510	2*	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0
125	2	2	1	0.5	0	0	0	0	0	0
332	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
391	3	3	2	2	1	0.5	0	0	0	0
487	3	3	3	2	1	1	0.5	0	0	0
504	3	3	3	2	2	2	1	0.5	0	0
541	3	3	3	2	2	2	2	1	0	0

Fig. 1 Criteria for reading *Toxoplasma* latex agglutination test.

* : Score of agglutination pattern

ずつ抗原感作用緩衝液で2回遠心洗滌して、同じ緩衝液に2% (w/v) になるよう懸濁した。これに等量の抗原液を加え、温度は37°Cと一定にし、時間、pH、イオン強度および抗原濃度を変えて、感作した。次いで、感作に用いたと同じ緩衝液で2回遠心洗滌して余剰のトキソプラズマ抗原を除去し、同じ緩衝液(0.5% w/v 牛血清アルブミン添加)にラテックス粒子が0.1% (w/v) になるよう懸濁した。

6. 抗原蛋白の定量

牛血清アルブミンを標準にした Webster (1970) の方法により、280nm における吸光度から算出した。

7. 抗トキソプラズマ血清

感作条件などの検定には Lewis and Kessel (1961) 法による血球凝集反応の抗体価がそれぞれ < 1 : 32 (No. 260), 1 : 128 (Nos. 125, 332, 510), 1 : 512 (Nos. 391, 487), 1 : 2048 (Nos. 458, 504), 1 : 8192 (No. 541) のヒト血清9ロットを用いた。

8. マイクロタイター法の術式

Sever (1962) の方法に準じて実施した。ダイリューターおよびドロップパーは0.025ml 用を、反応板はディスプレイザブルU字型トレイ(栄研器材)を使用した。トレイの穴に抗体稀釈用緩衝液0.025 mlずつを入れ、ダイリ

Table 1 Effect of pH of diluent buffer on sensitivity of LA reaction

pH of diluent buffer	Serum No.	Reciprocal serum dilution									Reciprocal titer	Comments
		2	4	8	16	32	64	128	256	512		
3.2	260	3	3	3	3	3	3	3	3	3	>512	non-specific
	541	3	3	3	3	3	3	3	3	3	>512	
4.0	260	3	3	3	3	3	3	3	3	3	>512	non-specific
	541	3	3	3	3	3	3	3	3	3	>512	
5.0	260	3	3	3	3	3	3	3	3	3	>512	non-specific
	541	3	3	3	3	3	3	3	3	3	>512	
6.2	260	0	0	0	0.5	2	3	3	3	3	n. d.*	non-specific
	541	3	3	3	3	3	3	3	3	3	>512	
6.6	260	0	0	0	0	0	0	1	1	1	n. d.*	non-specific
	541	3	3	3	3	2	2	2	1	1	≥512	
7.0	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	specific
	541	3	3	3	2	2	2	1	1	0	256	
8.0	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	specific
	541	3	3	3	2	2	2	1	1	0	256	
9.0	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	specific
	541	3	3	3	2	2	2	1	1	0	256	
10.0	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	non-specific
	541	0	0	0.5	1	1	1	0.5	0	0	n. d.*	

n. d.* : not determined

Incubation buffer : Tris-HCl buffer, pH 8.0, I=0.01

Toxoplasma antigen on sensitized latex : 40 µg/mg

ューターで血清を2倍から2048倍まで2倍系列で稀釈の後、トキソプラズマ抗原感作ラテックス懸濁液を0.025mlずつドロップで加え、トレイを軽く振盪の後、一夜静置して反応像を判定した。抗体価はFig. 1に示す判定規準によって、1以上の凝集を示した最高稀釈倍数とした。

成 績

1. 抗体稀釈液の pH

感作条件などの検討の指標とする抗原抗体反応による凝集が正しく行なわれる条件を見付けるために、抗体稀釈液の好適 pH を調べた。すなわち、pH 3.2から pH 10まで9段階に変えた緩衝液で血清を稀釈し、pH 8.0, I=0.01の条件でラテックス1mg当り40µgの抗原蛋白を結合させたラテックス粒子懸濁液によりラテックス凝集反応を行なった。その結果、Table 1に示す如く、pH 3.2から pH 6.6の間では非特異凝集が見られ、また pH 10では凝集の抑制が認められた。pH 7.0から pH 9.0の範囲においては、免疫学的に正常な凝集反応が認められ、抗体価も同一であった。この結果にもとづき、以後の実験は pH 8.0の0.1M トリス-塩酸緩衝液または、0.2M アミノメチルプロパノール-塩酸緩衝液で血清を稀釈することとした。

2. 感作条件

1) 感作時間

抗原感作用緩衝液の pH を8.0 (I=0.01) に一定して、好適感作時間を検討した。感作時間を5分から120分まで5段階にして感作したところ、ラテックス1mg当りの抗原蛋白結合量は5分間で30.9µg、20分以上では約40µgとなり平衡に達した。抗体価について見ると5分感作で血清 No. 541は1:256を示し、感作時間を延長しても変化はなく、また、血清 No. 260は全く陰性のみであった (Table 2)。

2) 感作時の pH

抗原液の抗原蛋白濃度を1.78mg/mlとし、感作時間を40分として、感作用緩衝液の pH を3.2から10まで変えて感作を行なったところ、Table 3に示す如く、ラテックス1mg当りの結合抗原蛋白量は pH 3.2においては23.3µgと少なかったが、pH 4.0から pH 10の範囲では35-40µgとほぼ一定の値であった。一方、各 pH で感作したラテックス懸濁液によって血清 No. 541の抗体価を求めたところ、pH 7.0から pH 10の範囲で感作したラテックスでは1:256と一定であったが、pH 6.3以下で感作したラテックスでは感作 pH の下降とともに抗体価が下降した。この抗体価の下降がトキソプラズマ抗原の失活による可能性があるため、次にそれを調べ

Table 2 Relations between sensitizing time, amount of antigen bound to latex particles and LA titer

Sensitization time (min)	Bound <i>Toxoplasma</i> antigen per unit latex particle weight ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Reciprocal LA titers	
		Serum No.	Titer
5	30.9	260	0
		541	256
20	40.3	260	0
		541	256
40	38.1	260	0
		541	256
60	40.3	260	0
		541	256
120	39.5	260	0
		541	256

Toxoplasma antigen concentration in incubation buffer: 1.86 mg/ml

Incubation buffer: Tris-HCl buffer, pH 8.0, I=0.01

Incubation temperature: 37 C

Diluent buffer: 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0

Table 3 Relations between sensitizing pH, amount of antigen bound to latex particles and LA reactions

pH	Bound <i>Toxoplasma</i> antigen per unit latex particle weight ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Serum No.	Reciprocal serum dilution										Reciprocal titer	
			2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		
3.2	23.3	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
4.0	35.3	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	32
4.7	35.9	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	2	2	2	1	1	0.5	0	0	0	0	0	32
5.5	39.6	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	3	2	2	1	1	1	0.5	0	0	0	0	64
6.3	40.8	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	3	3	3	2	2	1	1	0.5	0	0	0	128
7.0	39.9	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	3	3	3	2	2	2	1	1	0	0	0	256
7.5	40.3	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	3	3	3	2	2	2	1	1	0.5	0	0	256
8.0	40.3	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	3	3	3	2	2	2	1	1	0.5	0	0	256
9.0	37.6	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	3	3	3	2	2	2	1	1	0.5	0	0	256
10.0	40.0	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	3	3	3	2	2	2	1	1	0.5	0	0	256

Toxoplasma antigen concentration in incubation buffer: 1.78 mg/ml

Incubation: 37 C, 40 min

Diluent buffer: 0.2 M aminomethylpropanol-HCl buffer, pH 8.0.

Table 4 Effect of pH of incubation buffer on stability of free *Toxoplasma* antigen

pH of incubation buffer	Free <i>Toxoplasma</i> antigen for inhibition (μg per 0.025 ml)					Comments
	2.19	1.09	0.55	0.27	0.14	
	Reciprocal LA titers					
3.2	>512	>512	>512	>512	>512	non-specific
4.0	>512	>512	>512	>512	>512	non-specific
4.8	256	256	256	256	256	specific
5.5	128	256	256	256	256	specific
6.3	16	32	64	128	256	specific
7.0	8	16	64	128	256	specific
8.0	8	16	64	128	256	specific
9.0	8	16	64	128	256	specific
10.0	8	16	64	128	256	specific
Control (0 time)	8	16	64	128	256	

Incubation of free *Toxoplasma* antigen: 37 C, 40 min

Toxoplasma antigen sensitized latex: 37.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$

Diluent buffer: 0.2 M aminomethylpropanol-HCl buffer, pH 8.0

Anti-*Toxoplasma* serum: No. 541

た。

3) 各種 pH におけるトキソプラズマ抗原の安定性
各種 pH の感作用緩衝液中に 0.14~2.19 $\mu\text{g}/0.025\text{ml}$ のトキソプラズマ抗原を加え、37 C に 40 分間静置した後に凝集阻止反応を行ない、凝集阻止の程度によって抗原の安定性を比較した。

pH 3.2および4.0では非特異凝集のために比較が出来なかつたが、Table 4 に示す如く、pH 4.8で処理した抗原は、2.19 $\mu\text{g}/0.025\text{ml}$ でも阻害反応を全く示さず、抗原は完全に失活していた。pH 5.5および pH 6.3で処理した抗原にも明らかな阻害活性の低下が認められた。pH 7.0から pH 10の範囲で処理した抗原は対照と同等の阻害活性を示し、トキソプラズマ抗原はこの範囲で可成り安定なことが認められた (Table 4)。

4) 感作時のイオン強度

抗原感作用緩衝液 (pH 8.0) のイオン強度 (I) だけを0.01から0.5の範囲で4段階に変えて感作したところ、感作抗原蛋白量は一定であり、また、それによってラテックス凝集反応試験を行なったところ抗体価にも差がなかつた (Table 5)。

5) 感作時の抗原濃度

感作時に緩衝液中の抗原濃度を変えると、結合した抗原蛋白量は Table 6 に示す如く変化した。抗原蛋白結合量と抗体価の関係を見ると、ラテックス 1 mg 当り 22.4 μg から 37.6 μg で至適抗体価が得られたが、49.3 μg

では抗原過剰による抗体価の下降、一方、10 μg 以下では抗体過剰現象が認められ、2.2 μg 以下では凝集が起きなかつた。

3. ラテックス凝集反応試薬の安定性

上述の検討結果から、抗原液の抗原蛋白濃度 1.8 mg/ml、感作用緩衝液 0.2M 塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液 (pH 8.0)、感作時間60分を好適感作条件として選び、これによって作製したラテックス凝集反応試薬マイクロタイター用のロット差、保存性および被検血清の非働化処理の影響を調べた。

1) ロット差

同じ方法で作製した9ロットの試薬から無作為に3ロット (Nos. 005, 008, 010) を選びヒト血清 121例についてそれぞれラテックス凝集反応を行ない抗体価を比較した結果、Fig. 2 に示す如く、各ロット間の一致率は高かつた。すなわち、Lot No. 005と008との比較においては、一致例が81 (66.9%)、不一致の内 ± 1 穴 (2倍稀釈) 差が38例 (31.4%) で、 ± 2 穴差は2例 (1.7%) のみであつた。No. 005と010の場合には、一致98例 (81.0%)、 ± 1 穴差が22例 (18.2%)、 ± 2 穴差は1例 (0.8%) のみであつた。

2) 保存性

試薬を製造直後から20カ月後まで、5 C に保存し、ヒト血清9ロットに対する抗体価を経日的に調べたところ、Table 7に示す如く、抗体価の変動は認められな

Table 5 Relations between sensitizing ionic strength, binding of antigen to latex particles and LA test results

Ionic strength	Bound <i>Toxoplasma</i> antigen per unit latex particle weight ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Reciprocal LA titers	
		Serum No.	Titer
0.01	37.5	260	0
		541	256
0.05	37.0	260	0
		541	256
0.10	37.7	260	0
		541	256
0.50	37.7	260	0
		541	256

Toxoplasma antigen concentration in incubation buffer : 1.92 mg/ml
 Diluent buffer : 0.2 M aminomethylpropanol-HCl buffer, pH 8.0
 Incubation : 37 C, 40 min
 Incubation buffer : Tris-Hcl buffer, pH 8.0

Table 6 Results of LA patterns and titers using latex particles sensitized with various amounts of *Toxoplasma* antigen

<i>Toxoplasma</i> antigen conc. (mg/ml)	Sensitized <i>Toxoplasma</i> antigen per unit latex particle weight ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Serum No.	Reciprocal serum dilution											Reciprocal titer	
			2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048		
3.56	49.3	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		458	3	3	2	2	1	0.5	0	0	0	0	0	0	32
		541	3	3	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	128
1.78	37.6	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		458	3	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	64
		541	3	3	3	2	2	2	1	1	0.5	0	0	0	256
0.89	22.4	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		458	3	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	64
		541	3	3	3	2	2	2	1	1	0	0	0	0	256
0.45	10.3	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		458	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	64
		541	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	0.5	1024	
0.22	4.5	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		458	1	1	1	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	16
		541	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0.5	0	512	
0.11	2.2	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		458	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0
0.06	1.3	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		458	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		541	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Incubation buffer : Tris-HCl buffer, pH 8.0, I=0.01
 Incubation : 37 C, 40 min
 Diluent buffer : 0.2 M aminomethylpropanol-HCl buffer, pH 8.0

Table 7 Effects of storage at 5 C of the reagent on serum titers

Serum No.	Reciprocal LA titers of sera						
	Periods (months) of storage of the reagent						
	0	2	5	10	13	16	20
260	0	0	0	0	0	0	0
125	8	8	16	16	16	16	8
332	16	16	16	32	16	32	16
391	32	32	64	32	32	64	32
487	64	64	64	128	64	128	64
504	128	128	128	256	128	256	256
541	256	256	512	512	256	256	256
816	512	512	512	1024	512	512	512
937	1024	1024	1024	2048	1024	1024	2048

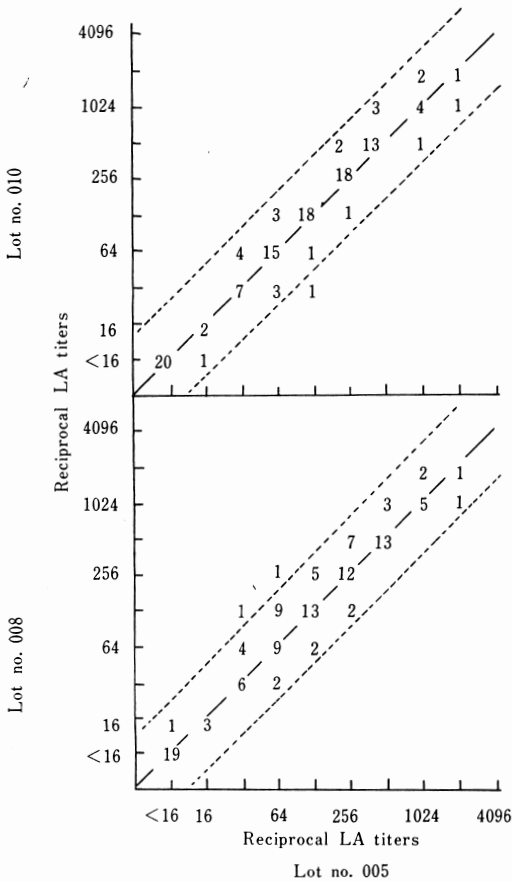


Fig. 2 Titers obtained by three different lots of LA test with 121 sera.

つた.

3) 被検血清非働化の影響

ヒト血清 220 例について、非働化 (56 C, 30分) の前と後とのラテックス凝集反応抗体価を比較した。Fig. 3 に示す如く、処理前後の抗体価は198例 (90.0%) において一致し、±1 穴差は21例 (9.5%)、±2 穴差は1例 (0.5%) のみであり、本法には非働化の必要はないと判断された。

考 察

リウマチ因子測定用のヒト γ -グロブリン感作ラテックスの調製および抗体稀釈には γ -グロブリンの等電点

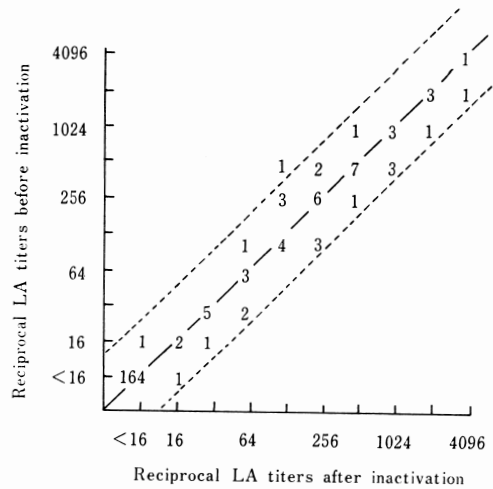


Fig. 3 Effect of inactivation treatment (56 C, 30 min) of 220 sera on their titers.

やラテックス粒子の安定性から、pH 8以上、主として pH 8.2 の緩衝液が使われている (Singer and Plotz, 1956; Oreskes and Singer, 1964). Bozděch and Jira (1961) はトキソプラズマラテックス凝集反応にも pH 8.2の緩衝液を使用した。Lunde and Jacobs (1967) は血清の稀釈に生理食塩液を用い、緩衝液の必要はないとした。著者らが作製したトキソプラズマラテックス凝集反応マイクロタイター用試薬は、抗体稀釈に用いる緩衝液の pH が7.0から9.0の範囲が好適であり、抗原感作には抗原を失活させないために pH 7.0から pH 10.0の範囲が望ましい条件であった。

ラテックス粒子にトキソプラズマ抗原を感作する際の至適温度と至適時間を、Bozděch and Jira (1961) は 37 C, 2時間とし、Lunde and Jacobs (1967) は 4 ~ 5 C, 72時間としている。反応液中のトキソプラズマ抗原濃度やラテックス粒子の径が違ふと、抗原感作の至適条件が異なると考えられるが、径0.9 μ m の粒子を用い、抗原液の抗原蛋白濃度を0.89 から 1.78mg/ml 近辺にした今回の場合は、pH 8.0の緩衝液中で 37C, 40ないし 120分間を好適条件として選ぶことにした。

ラテックス粒子への好適抗原感作量は、赤血球凝集反応におけるグラム陰性菌リポポリサッカライド感作 (Lüderitz *et al*, 1958) あるいはヒトの γ -グロブリンやアルブミン感作 (Shioiri, 1964) の場合にくらべて、可成り狭い範囲 (ラテックス 1 mg 当り 10.3~49.3 μ g) に限局された。

抗原液の抗原蛋白濃度 1.8mg/ml, 感作用緩衝液の pH を 8.0とし、37 C, 60分感作という条件で作製したラテックス凝集反応試薬は、ロット差がほとんど認められず、冷蔵庫保存で少なくとも20カ月間は活性の低下を示さず、キット製品として必要な安定性にすぐれていることが認められ、また、ラテックス粒子を抗原の担体とした本法は、非特異抗体の吸収が不要なだけでなく、血清の非働化も必要なく、色素試験あるいは血球凝集反応試験にくらべて、煩雑な操作を省略出来る利点があるといえよう。第2報 (坪田ら, 1977 a) および第3報 (坪田ら, 1977 b) に述べるが、この試薬によるトキソプラズマラテックス凝集反応と既存の診断法との間に高い一致率が得られている。

要 約

トキソプラズマ感染の診断剤として、特異性と感度にすぐれ、安定で、操作が簡便なマイクロタイター用ラテックス凝集反応試薬を作製した。本報では調製に関わ

わる諸条件と作製した試薬の安定性について述べた。

1. 予め検討して径 0.9 μ m のラテックス粒子を使用し、RH 株虫体の蒸留水抽出抗原を感作した、凝集反応はU字型トレイを用い、抗体稀釈液 0.025ml に抗原感作ラテックス懸濁液 0.025ml を加え、一夜静置後判定した。

2. 感作条件検討の指標とする抗原抗体反応による凝集が正しく行なわれる抗体稀釈用緩衝液の pH を調べたところ、pH 7.0から9.0の範囲が好適であった。

3. pH 8.0, 37 C における好適感作時間は 20 分以上であった。

4. 感作時間を 40分にし、37 C における抗原感作用緩衝液の好適 pH は pH 7.0から10.0の範囲であった。低い pH では抗原が失活した。

5. イオン強度は $I = 0.01$ から 0.5の間では抗原感作に影響しなかった。

6. 感作抗原量はラテックス 1 mg 当り 22ないし 40 μ g 前後が好適であった。

7. 抗原蛋白濃度 1.8mg/ml の抗原液を使用し、感作用緩衝液の pH を 8.0, 感作時間 60分, 感作温度 37 C を好適条件として作製した試薬について調べたところ、ロット差はほとんどなく、5 C で少なくとも20カ月は安定であった。

8. 人血清 220例につき 56 C, 30分の非働化を行ない、その前後の抗体価を比較したところ、ほとんど一致し、本法では非働化の必要がないことを示した。

謝 辞

稿を終るにあたり、御校閲を賜った東京慈恵会医科大学寄生虫学教室 小林昭夫教授ならびに田辺製薬総合研究所微生物研究部 大島慧氏に深謝するとともに、本実験の一部を担当した栄研化学株式会社研究部 平岡謙一、森脇久貴の諸氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) Beverly, 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.
- 2) Bozděch, V. and Jira, J. (1961): Latex-agglutination test mit dem Toxoplasma antigen. *Deut. Gesundh.*, 16, 2398-2400.
- 3) Carlisle, H. N. and Saslaw, S. (1958): A histoplasmin-latex agglutination test. I. Results with animal sera. *J. Lab. Clin. Med.*,

- 51, 793-801.
- 4) Christian, C. L., Bryan, R. M. and Larson, D. L. (1958) : Latex agglutination test for disseminated lupus erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 820-823.
 - 5) Fritz R. B. and Rivers, S. L. (1972) : Hepatitis-associated antigen : Detection by antibody-sensitized latex particles. J. Immunol., 108, 108-111.
 - 6) 花木琢磨・信藤謙藏・佐藤卯三郎 (1964) : トキソプラズマ血球凝集反応に関する研究. 日獣医誌, 26, 378.
 - 7) Hiraoka, K. and Ohshima, S. (1972) : Simplified hemagglutination test as a serologic test for toxoplasmosis. Jap. J. Parasit., 21, 247-251.
 - 8) Innella, F. and Redner, W. J. (1959) : Latex-agglutination serologic test for trichinosis. J. A. M. A., 171, 885-887.
 - 9) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit., 43, 308-314.
 - 10) Jennis, F. (1966) : A simplified haemagglutination test for toxoplasmosis using pyruvic aldehyde treated cells. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 44, 317-322.
 - 11) 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.
 - 12) Kobayashi, A., Kumada, M. and Tsunematsu, Y. (1968) : Effects of anticoagulants on the dye test for toxoplasmosis. Jap. J. Med. Sci. Biol., 22, 71-89.
 - 13) Kwantes, 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. Path., 25, 359-360.
 - 14) Lewis, W. P. and Kessel, J. F. (1961) : Hemegglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis. Arch. Ophth., 66, 471-476.
 - 15) Lüderitz, O., Westphal, O., Sievers, K., Kröger, E., Neter, E. and Braun, O. H. (1958) : Über die fixation von P³²-markiertem lipopolysaccharid (Endotoxin) aus *Escherichia coli* an menschlichen erythrocyten. Biochem. Z., 330, 34-46.
 - 16) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1967) : Evaluation of a latex agglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit., 53, 933-936.
 - 17) Murashi, T. F., (1958) : Latex-leptospiral agglutination test. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99, 235-238.
 - 18) Oreskes, I. and Singer, J. M. (1961) : The mechanism of particulate carrier reactions I. Adoption of human- γ -globulin to polystyrene latex particles. J. Immunol., 86, 338-343.
 - 19) Park, H. K. (1961) : Toxoplasma hemagglutination test. Using alcohol-formalin fixed sensitized lyophilized erythrocytes. Arch. Ophth., 65, 184-191.
 - 20) 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.
 - 21) Sever, J. L. (1962) : Application of a microtechnique to viral serological investigations. J. Immunol., 88, 320-359.
 - 22) Shioiri, K. (1964) : The observation of proteins adsorbed on erythrocytes treated with tannic acid in passive hemagglutination testes (Boyden's method). Jap. J. Exp. Med., 34, 345-359.
 - 23) Singer, J. M. and Plotz, C. M. (1956) : The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Am. J. Med., 21, 888-892.
 - 24) Thorburn, H. and Williams, H. (1972) : A stable haemagglutinating antigen for detecting toxoplasma antibodies. J. Clin. Path., 25, 762-767.
 - 25) 坪田宣之・平岡謙一・沢田良信・渡辺俊子・大島 慧 (1977 a) : トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究 (第2報) マイクロタイター用試薬によるヒトの診断法. 寄生虫誌, 26, 286-290.
 - 26) 坪田宣之・平岡謙一・沢田良信・大島 慧・星野光夫 (1977 b) : トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究 (第3報) マイクロタイター用試薬による動物診断法. 寄生虫誌, 26, 291-298.
 - 27) Webster, G. C. (1970) : Comparison of direct spectrophotometric methods for the measurement of protein concentration. Biochim. Biophys. Acta, 270, 371-373.

Abstract

STUDIES ON LATEX AGGLUTINATION TEST FOR TOXOPLASMOSIS
(1) PREPARATIVE CONDITIONS AND STABILITY OF THE REAGENT

NOBUYUKI TSUBOTA

*(Research Laboratory, Eiken Chemical Co., Ltd., Higashi-shinkoiwa,
Katsushika, Tokyo 124, Japan)*

AND

HIKARU OZAWA

*(Department of Chemical Pharmacology, Pharmaceutical Institute,
Tohoku University, Sendai 980, Japan)*

In order to develop a reagent for serological diagnosis of toxoplasmosis a sensitized latex for the microtiter agglutination test was prepared, which was proved to be useful as a highly specific, sensitive and stable immunotitration reagent. Studies on the preparative conditions and stability of the reagent are described in this paper.

1) Onto polystyrene latex particles of $0.9\ \mu\text{m}$ in diameter was adsorbed the antigen consisting of a water-lysate of *Toxoplasma* (RH strain) by adding a latex suspension to an equal volume of diluted antigen solution and by incubating the mixture at 37 C under various conditions.

2) The optimum pH range of the buffer solution used for serum dilution for the assay of sensitized latex preparations was between 7.0 and 9.0 (Table 1).

3) The time required for antigen sensitization was 20 min or more in a buffer solution at pH 8.0 at 37 C (Table 2).

4) The optimum pH range for antigen sensitization by incubation at 37 C for 40 min was 7.0-10.0 (Table 3). The antigen was inactivated at low pH (Table 4).

5) Ionic strength of the buffer solution had no influence on antigen sensitization from $I=0.01$ to 0.5 (Table 5).

6) The optimum quantity of antigen adsorbed on latex particles for proper agglutination was approximately 20 to 40 μg per mg of latex (Table 6).

7) Comparison of three different preparations prepared under the identical conditions (pH 8.0, 37 C, 60 min, 1.8 mg antigen/ml) showed minimal lot-to-lot variations as judged by the agglutination titers of 121 human sera (Fig. 2).

8) The reagent was stable for at least 20 months at 5 C (Table 7).

9) With this reagent the inactivation pretreatment of sera was not required as shown by the well matched agglutination titers of 220 human sera before and after inactivation at 56 C for 30 min (Fig. 3).