

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

坪田 宣之 平岡 謙一 沢田 良信

栄研化学株式会社研究部

渡辺 俊子

東京女子医科大学中央検査部寄生虫科

大島 慧

田辺製薬株式会社総合研究所微生物研究部

(昭和52年9月5日 受領)

前報(坪田・小沢, 1977)に述べた条件によって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が, ヒトのトキソプラズマ感染の診断に使えるかどうかを, ヒト血清の抗体価頻度分布ならびに2種, トキソテスト“栄研”および Lewis and Kessel (1961)法, の血球凝集反応試験との比較によって検討し, 良好な成績を得たので報告する. なお, 動物の診断剤としての有用性は第3報(坪田ら, 1977)に述べる.

材料および方法

1. 試薬の作製

前報(坪田・小沢, 1977)に示した好適条件に従って, 以下の如く調製した. すなわち, 蛋白濃度1.8mg/mlに調整した抗原液とラテックス粒子を2% (w/v)に懸濁した0.2M塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液(pH 8.0)とを1:1に混ぜ, 37°C, 60分間感作した. 次いで, 同じ緩衝液を用いて遠心洗滌を2回行なつて余剰の抗原を除去した後, 感作ラテックス粒子を終濃度が0.1% (w/v)になるように同緩衝液(0.5% w/v牛血清アルブミン添加)に懸濁し, 試薬とした.

2. トキソプラズマラテックス凝集反応およびトキソプラズマ血球凝集反応の術式

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の術式は前報(坪田・小沢, 1977)に示した. 血球凝集反応の試験の内, トキソテスト(栄研化学製)(Lot No. N0017Tを使用)については, 添付の使用説明書通りに実施し, 陽性限界を $\geq 1:512$ とした, Lewis and Kessel法は常松(1966)に準じて, 実施し, 陽性限界を $\geq 1:512$ (常松ら, 1970)とした.

3. ヒト血清

トキソプラズマラテックス凝集反応による抗体価頻度分布を調べるために, ヒト血清741例を非働化することなく, そのまま使用した. トキソテストとの比較には, ヒト血清541例を使い, ラテックス凝集反応は無処理のまま, 血球凝集反応は非働化と吸収を行なつてから, それぞれ試験した. Lewis and Kessel法との比較には, 東京女子医科大学病院中央検査部にトキソプラズマの血清検査を目的として持ち込まれた血清461例を使い, ラテックス凝集反応はそのまま, 血球凝集反応は非働化の後, それぞれ実施した.

成績

1. トキソプラズマラテックス凝集反応の抗体価頻度分布

ヒト血清741例のラテックス凝集反応抗体価頻度分布を求めたところ, Fig. 1に示す如く, 1:16を谷とし, $< 1:16$ および1:256をそれぞれ峰とする明らかな二峰性が認められた. この結果から, ヒト血清については, $< 1:16$ は陰性, 1:16は中間値として疑陽性, $\geq 1:32$ は陽性と見なすことが出来ると判定した.

2. トキソプラズマラテックス凝集反応とトキソプラズマ血球凝集反応との比較

1) トキソテストとの比較,

ヒト血清521例について比較した結果, Table 1に示す如く, ラテックス凝集反応の陽性限界を1:32とした場合, 両法の定性的一致率は90.8% (473/521)であった. 不一致の48例について見ると, その71% (34例)は血球凝集反応陽性, ラテックス凝集反応陰性であり, 残

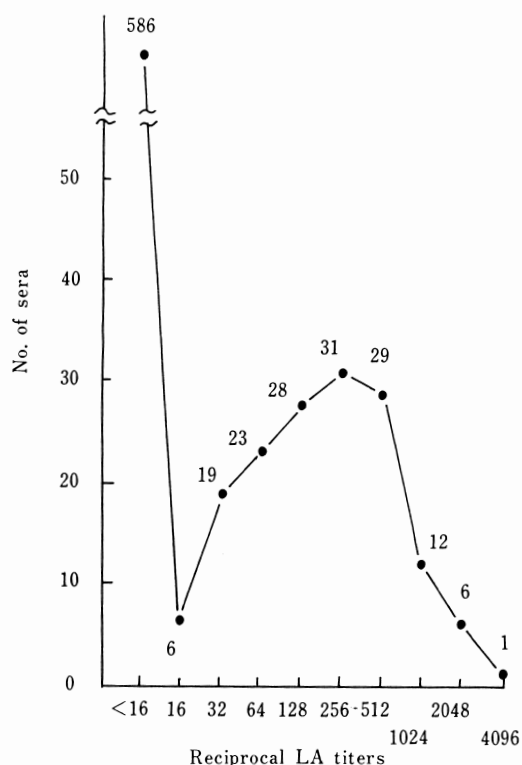


Fig. 1 Frequency distribution of the LA titers of 741 human sera.

り29% (14例) は血球凝集反応陰性、ラテックス凝集反応陽性であった。

2) Lewis and Kessel 法との比較

ヒト血清 461例について比較したところ、Table 2 に

示す如く、ラテックス凝集反応の陽性限界を1:32とすれば、90.7% (418/461) が定性的に一致した。不一致の43例の内訳は、28% (12例) が血球凝集反応陽性、ラテックス凝集反応陰性であり、72% (31例) が血球凝集反応陰性、ラテックス凝集反応陽性であった。

考 察

トキソプラズマ感染の血清診断法としてもつとも信頼されているのは色素試験 (Sabin and Feldman, 1948; 小林ら, 1968; Kobayashi *et al.*, 1968) であるが、アクセサリー・ファクターおよび生きたトキソプラズマが必要で、しかも可成り熟練を要し、多数の検体検査には適さない。色素試験にかわる方法として我国で頻用されて来た血球凝集反応試験すなわち人O型血球を使う Lewis and Kessel (1961) 法および羊生血球を使う Jacobs and Lunde (1957) 法ならびに羊固定血球を使う方法 (Park, 1961; Jennis, 1966; 花木ら, 1964; Hiraoka and Ohshima, 1972; Thorburn and Williams, 1972) には、血清の非働化と Lewis and Kessel 法を除けば非特異抗体の吸収が必要である。このような煩わしい処理のいらない凝集反応としてラテックス粒子が抗原の担体として使用されたが、これまでのトキソプラズマラテックス凝集反応 (Bozdéch and Jira, 1961; Lunde and Jacobs, 1967; Kwantes *et al.*, 1972; Beverley *et al.*, 1973) は感度および特異性において他法に劣るとされていた。しかし、それを抗原感作量の選択とマイクロタイター法を使うことによつて改善し、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製した。この試薬の調製諸条件および安定性につ

Table 1 Comparison between HA ('Toxo-Test') and LA tests with 521 human sera

Reciprocal HA titers	Reciprocal LA titers									Total	% positive by LA test
	<16	16	32	64	128	256	512	1024	≥2048		
<256	370	1	1	4		1				377	1.6
256	18		2	2	3	1				26	30.8
512	21	1	4	7	6	3	4	1		47	53.2
1024	9		1	1	2	2	2			17	47.1
2048	3		3	4	8	7	3			28	89.3
4096				1	1	3	2	2		9	100
8192			1	1		4	5	1	1	13	100
≥16384								3	1	4	100
Total	421	2	12	20	20	21	16	7	2	521	
% positive by HA test	7.8	50	75	70	85	90.5	100	100	100		

Table 2 Comparison between HA test by the method of Lewis and Kessel and LA test with 461 human sera

Reciprocal HA titers	Reciprocal LA titers								Total	% positive by LA test
	<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048		
<256	100	15	9	2					126	20.6
256	1	1	2	2					6	83.3
512	5	12	9	9	4	1			40	87.5
1024	2	22	24	9	2				59	96.6
2048	5	20	37	37	12	5	1		117	95.7
4096			5	14	6	3	2		30	100
≥8192		4	21	25	12	14	6	1	83	100
Total	113	74	107	98	36	23	9	1	461	
% positive by HA test	10.6	78.4	89.7	95.9	100	100	100	100		

いては前報（坪田・小沢，1977）に述べたごとく，ロット差がほとんど無く，5Cで20カ月以上にわたって安定であり，キット製品として不可欠の条件を満足させるものであった。

このトキソプラズマラテックス凝集反応試薬がヒトの診断に使えるか，また，その場合の陽性限界をどこに置くかにつき検討した結果，本報で報告した如く，抗体価頻度分布曲線から1:32以上を陽性とみなすべきであると考えられ，これを基準とすれば，トキシテストおよびLewis and Kessel法による血球凝集反応試験との定性的一致率はそれぞれ90.8%および90.7%と高い値を示した。

小林ら（1977）もこの試薬と色素試験およびJacobs and Lunde法による血球凝集反応試験との定性的一致率がそれぞれ94.4%および95.5%という高い値であり，また陽性限界を1:32にするのが適当であると報告している。

これらの知見から判断すれば，このラテックス凝集反応試薬は，各種の血球凝集反応と同様に色素試験に代る血清試験として使うことが可能であり，しかも血清の非働化や非特異抗体の吸収を必要としない点で血球凝集反応より簡便であり，また，マイクロタイター法であるから多数の検体を短時間に処理出来る利点もある。

要 約

前報（坪田・小沢，1977）に述べた条件に従って作製したトキソプラスマラテックス凝集反応マイクロタイター用試薬がヒトのトキソプラズマ感染の診断に使用しうるか否かを検討した。

1. ヒト血清741例の抗体価頻度分布を求めたところ，1:16を谷とし，<1:16および1:256をそれぞれ峰とする二峰性が認められ，≥1:32を陽性限界と推定した。

2. ヒト血清251例について，トキシテストによる血球凝集反応と比較したところ，定性的一致率は90.8%であった。

3. ヒト血清461例について，Lewis and Kessel法による血球凝集反応試験と比較したところ，定性的一致率は90.7%であった。

以上の成績から，この試薬によるラテックス凝集反応はトキソプラズマ感染症の診断の目的に十分応用しうるものと結論された。

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 森脇久貴氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) 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.
- 2) Bozděch, V. and Jira, J. (1961): Latex-agglutination test mit dem *Toxoplasma* antigen. *Deut. Gesundh.*, 16, 2398-2400.
- 3) 花木琢磨・信藤謙蔵・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.
- 4) Hiraoka, K. and Ohshima, S. (1972) : Simplified hemagglutination test as a serologic test for toxoplasmosis. *Jap. J. Parasit.*, 21, 247-251.
 - 5) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 43, 308-314.
 - 6) Jennis, F. (1966) : A simplified haemagglutination test for toxoplasmosis using pyruvic aldehyde treated cells. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 44, 317-322.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 小林昭夫・平井徳幸・鈴木康弘・西川洋昭・渡辺直熙 (1977) : 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. *寄生虫誌*, 26, 175-180.
 - 10) 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.
 - 11) Lewis, W. P. and Kessel, J. F. (1961) : Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis. *Arch. Ophth.*, 66, 471-476.
 - 12) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1967) : Evaluation of a latex agglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 53, 933-936.
 - 13) Park, H. K. (1961) : Toxoplasma hemagglutination test. Using alcohol-formalin fixed sensitized lyophilized erythrocytes. *Arch. Ophth.*, 65, 184-191.
 - 14) 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.
 - 15) Throburn, H. and Williams, H. (1972) : A stable haemagglutinating antigen for detecting toxoplasma antibodies. *J. Clin. Path.*, 25, 762-767.
 - 16) 坪田宣之・小沢光 (1977) : 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. *寄生虫誌*, 26, 276-285.
 - 17) 坪田宣之・平岡謙一・沢田良信・大島慧・星野光夫 (1977) : 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の診断法. *寄生虫誌*, 26, 291-298.
 - 18) 常松之典 (1966) : 現代診断検査法大系, 感染症 (1), 155頁, 中山書店, 東京.
 - 19) 常松之典・中野康平・亀井喜代子・鈴木守 (1970) : トキソプラズマ症における赤血球凝集試験の諸問題について. *眼科*, 12, 564-568.

Abstract

STUDIES ON LATEX AGGLUTINATION TEST FOR TOXOPLASMOSIS
(2) EVALUATION OF THE MICROTITER TEST AS A SEROLOGIC
TEST FOR TOXOPLASMOSIS IN MAN

NOBUYUKI TSUBOTA, KEN-ICHI HIRAOKA, YOSHINOBU SAWADA

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

TOSHIKO WATANABE

(Clinical Laboratory, Tokyo Woman's Medical College, Shinjuku, Tokyo 162, Japan)

AND

SATOSHI OHSHIMA

*(Microbiological Department, Biological and Chemical Research Laboratories,
Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Toda-shi, Saitama 335, Japan)*

It was demonstrated that the sensitized latex reagent for microtiter agglutination test prepared by the procedure described in the previous paper (Tsubota and Ozawa, 1977) was useful for serologic diagnosis of *Toxoplasma* infection in man.

1) The frequency distribution of latex agglutination titers of 741 human sera showed two peaks at $1:16$ and $1:256$ with a trough at $1:16$ (Fig. 1). The borderline titer for positive test in human sera is considered to be $1:32$.

2) Agreement of reactions by the latex agglutination test and the hemagglutination test using the 'Toxo-Test' kit (Eiken) was 90.8% of 251 human sera (Table 1).

3) When compared with the hemagglutination test by the method of Lewis and Kessel (1961), the result of latex agglutination test showed 90.7% agreement with the former in 461 human sera.