

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

坪田 宣之 平岡 謙一 沢田 良信

栄研化学株式会社研究部

大島 慧 星野 光夫

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)

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、被検血清の非働化および非特異抗体の吸収を必要とせず、安定かつロット差がほとんどないことを特徴とする(坪田・小沢, 1977) 診断用試薬であり、ヒト血清については色素試験にかわる方法として満足すべきものであることがすでに明らかにされている。(坪田ら, 1977; 小林ら, 1977).

本報ではブタ、ネコおよびマウスについてこの試薬がトキソプラズマ感染の診断剤として使用しうるか否かを検討した成績と、マウスおよびウサギにトキソプラズマを実験的に感染させて、トキソプラズマラテックス凝集反応抗体価の推移を追跡した結果について報告する。

材料および方法

1. トキソプラズマラテックス凝集反応試薬

前報(坪田ら, 1977) に述べた方法で作製した。

2. トキソプラズマラテックス凝集反応および血球凝集試験の術式

ラテックス凝集反応マイクロタイター法の術式は第1報(坪田・小沢, 1977) に述べたごとく行った。血球凝集反応は血清についてはトキシテスト(栄研化学製)を、採血濾紙についてはトキシチェック(栄研化学製)を使用し、それぞれ使用説明書に従って実施し、ブタでの血球凝集反応の陽性限界を $\geq 1:1024$ とし、ネコでのそれを $\geq 1:256$ とした。

3. ブタの血清および採血濾紙

と場で採取したブタ血清736例および各地で採取された採血濾紙545例についてラテックス凝集反応抗体価頻度分布を、血清217例と採血濾紙102例についてそれぞれラテックス凝集反応と血球凝集反応との関係を、さらにブタ430頭について血清のラテックス凝集反応抗体価と

横隔膜筋肉部のマウス接種によるトキソプラズマ検出(Hiraoka and Ohshima, 1972) との関係調べた。

4. ネコの血清および採血濾紙

各地で採取された採血濾紙387例についてラテックス凝集反応抗体価の頻度分布と同時に血球凝集反応との比較を行った、またその際ネコ42頭について血清のラテックス凝集反応抗体価と脳、筋肉などからのトキソプラズマ検出(マウス接種による) との関係調べた。

5. マウス血清

ブタの筋肉を接種したマウス512頭について、接種後30~40日目のラテックス凝集反応抗体価と脳内シスト検出(圧片標本鏡検) との関係調べた。

6. ウサギおよびマウスの実験的感染

ウサギ(日本白色種, 雄, 体重約3 kg) 5羽にブタ由来のトキソプラズマ弱毒株シストを1羽当たり 10^2 個以上それぞれ腹腔内に接種し、以後経日的に85日目まで耳静脈から採血して血清を得、ラテックス凝集反応抗体価の推移を観察した。

マウス(ddY, 雌, 4週齢) に1匹当たり約 10^2 個のBeverley株とネコ由来D株(鈴木ら, 1974) のシストをそれぞれ腹腔内接種し、以後経日的に12週目まで1群5匹ずつ股動脈から放血して血清を採取し、ラテックス凝集反応抗体価の推移を見た。

成績

1. ブタ

血清736例および採血濾紙545例のラテックス凝集反応抗体価頻度分布は、それぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示す如く、いずれも $1:32$ を谷とする二峰性であり、この結果から $\geq 1:64$ を陽性、 $1:32$ を疑陽性、 $< 1:32$ を陰性と推定した。

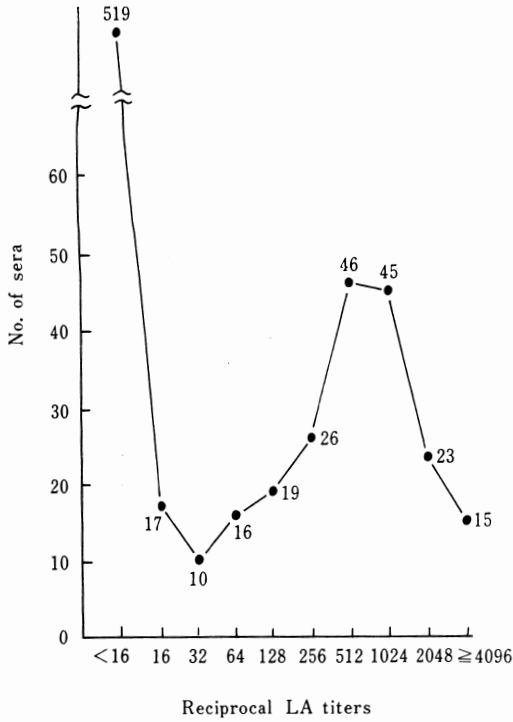


Fig. 1 Frequency distribution of the LA titers of 736 swine sera.

血清217例および採血濾紙102例について、それぞれラテックス凝集反応と血球凝集反応の抗体価を比較した結果、Table 1 および Table 2 に示す如く、ラテックス凝集反応の陽性限界を 1 : 64 とすれば定性的一致率はそれぞれ 91.7% および 90.2% であった。採血濾紙における不一致 10 例中 8 例は血球凝集反応陽性ラテックス凝集反応陰性であり、採血濾紙で採取し、吸収をしないトキソチェック法のために非特異抗体の影響があつたものと考えられた。

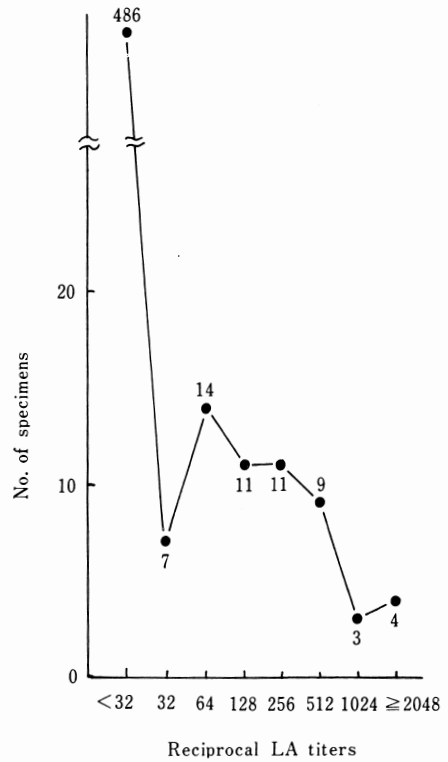


Fig. 2 Frequency distribution of LA titers of the eluate of blood-impregnated filter-paper strips obtained from 545 swine.

ブタ 430 頭についてラテックス凝集反応抗体価と横隔膜からのトキソプラズマ分離との関係を調べたところ、Table 3 に示す如くであった。すなわち、 $\geq 1 : 64$ を陽性とすればラテックス凝集反応陽性は 92 頭で、その内 72 頭 (78.3%) からトキソプラズマが分離された。一方、疑陽性の 1 : 32 を示した 4 頭中 2 頭も分離陽性であった

Table 1 Comparison between HA test ('Toxo-Test') and LA test with 217 swine sera

Reciprocal HA titers	Reciprocal LA titers									Total	% positive by LA test
	<32	32	64	128	256	512	1024	2048	≥4096		
<512	164	2	2	4	2					174	4.6
512	6	1		1	2	2	1			13	46.2
2048	4			3	2	6				15	73.3
8192						3	4		1	8	100
≥32768						1		5	1	7	100
Total	174	3	2	8	6	12	5	5	2	217	
% positive by HA test	2.3	0	0	37.5	33.3	83.3	80	100	100		

Table 2 Comparison between HA test ('Toxo-Check') and LA test with blood-impregnated filter-paper strips obtained from 102 swine

Reciprocal HA titers	Reciprocal LA titers								Total	% positive by LA test
	<32	32	64	128	256	51	21024	≥2048		
<256	48	1							49	0
256	22	1		2					25	4
1024	7		4	2	2				15	53.3
4096	1			1	2	4			8	87.5
≥16384					2		1	2	5	100
Total	78	2	4	5	6	4	1	2	102	
% positive by HA test	10.3	0	100	60	100	100	100	100		

Table 3 *Toxoplasma* isolation from diaphragm muscle and LA titers in swine

Reciprocal LA titers	No. of swine	<i>Toxoplasma</i> isolation	
		No. of positive	%
<32	334	1	0.3
32	4	2	50
64	8	1	12.5
128	4	1	25
256	6	5	83.3
512	19	15	79
1024	29	29	100
2048	13	11	84.6
≥4096	13	10	76.9
Total	430	75	

が、 $<1:32$ の334頭からは僅かに1例しかトキソプラズマが分離されなかった。

2. ネコ

採血濾紙387例について、ラテックス凝集反応と血球凝集反応とを比較したところ、Table 4に示す如き結果を得た。先ずラテックス凝集反応の抗体価頻度分布を見ると、 $1:32$ を谷とする二峰性が認められ、ブタの場合と同様に $\geq 1:64$ を陽性と推定した。この規準によるラテックス凝集反応と血球凝集反応との定性的一致率は84.7% (328/387)であり、不一致59例の大部分(56例)は血球凝集反応陽性-ラテックス凝集反応陰性であり、また固定血球による吸収操作で抗体価の減少を認めることより、トキソチェックに影響する非特異あるいは異好抗体がラテックス凝集反応には反応しないためと考えられた。

ネコ42頭について、血清のラテックス凝集反応抗体価

とトキソプラズマ検出との関係を調べたところ、Table 5に示すように、抗体価 $\geq 1:64$ の22頭からの分離率は86.4% (19/22)、 $\geq 1:32$ の22頭からは、全くトキソプラズマが分離されなかった。

3. マウス

ブタ筋肉を腹腔内接種して30~40日後のマウス512匹について、血清のラテックス凝集反応抗体価と脳内シストの有無を調べた結果、Table 6に示す如く、抗体価の分布は $1:16$ を谷とする二峰性で $\geq 1:32$ の19匹中14匹(73.7%)にシストが検出され、 $\leq 1:16$ の493頭からは僅か3匹(ラテックス凝集反応抗体価はそれぞれ $<1:2$ 、 $1:4$ および $1:8$)にシストが見出されたのみであった。

4. 実験感染におけるラテックス凝集反応抗体価の推移

ウサギにブタ由来弱毒株シストを接種して、ラテック

Table 4 Comparison between HA test ('Toxo-Check') and LA test with blood-impregnated filter-paper strips obtained from 387 cats

Reciprocal HA titers	Reciprocal LA titers								Total	% positive by LA test
	<32	32	64	128	256	512	1024	≥2048		
<64	176								176	0
64	81		2		1		2		86	5.8
256	39	2	2	2	1				46	10.9
1024	12		3	4	4				23	60.9
4096	2	1	1	3	10	5	1	4	27	88.9
≥16384				1	2	5	7	14	29	100
Total	310	3	8	10	18	10	10	18	387	
% positive by HA test	17.1	100	75	100	94.4	100	80	100		

Table 5 *Toxoplasma* isolation from muscle and brain and LA titers in cats

Reciprocal LA titers	No. of cat	<i>Toxoplasma</i> isolation	
		No. of positive	%
<16	20	0	
16	0	0	0
32	0	0	
64	5	4	
128	7	6	
256	6	5	
512	0	0	86.4
1024	1	1	
2048	2	2	
≥4096	1	1	
Total	42	19	

ス凝集反応抗体価の推移を観察したところ、Table 7に示す如く、7日後に5羽中2羽に抗体の出現が見られ、14日後には揃って1:128~1:512を示し、以後さらに抗体価は上昇して≥1:1024となり、85日後にも下降は認められなかつた。

マウスに Beverley 株とD株とをそれぞれ腹腔内接種したところ、Fig. 3に示すようなラテックス凝集反応抗体価の推移が見られた。すなわち、いずれの株を接種した場合にも、2週後に抗体価の上昇が認められ、5週後には1:128~1:2048になり、以後も高い抗体価が持続した。

考 察

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、ヒトに從來実施されて来た血清学的診断である色素試験および Jacobs and Lunde 法による血球凝集反応(小林ら,1977),ならびに Lewis and Kessel 法およびトキシテストによる血球凝集反応(坪田ら,1977)とラテックス凝集反応抗体価1:32を陽性限界としてそれぞれ94.4%, 95.5%, 90.7%および90.8%という高い定性的一致率を示し、ヒトのトキソプラズマ感染の診断法として信頼がおけることが明らかにされている。

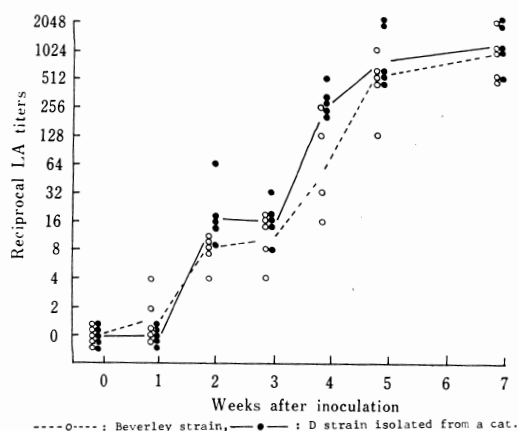
本報では、ブタおよびネコの血清および採血濾紙についてラテックス凝集反応抗体価とトキシテストおよびトキシチェックによる血球凝集反応抗体価およびトキソプラズマ分離との関係を調べた結果を報告したが、抗体価頻度分布から1:64をラテックス凝集反応の陽性限界とし、1:32を疑陽性、<1:32を陰性と見なすべきこと

Table 6 *Toxoplasma* isolation and LA titers in mice inoculated with a homogenate of swine diaphragm muscle 1 month before test

Reciprocal LA titers	No. of mouse	<i>Toxoplasma</i> isolation	
		No. of positive	%
<16	491	3	0.6
16	2	0	
32	6	5	73.7
64	2	0	
128	1	1	
256	4	3	
512	3	2	
≥1024	3	3	
Total	512	17	

Table 7 Change in titer of anti-*Toxoplasma* sera from rabbits after inoculation of *Toxoplasma* cysts

Rabbit No.	Days after inoculation								
	0	7	14	21	30	35	48	60	85
	Reciprocal LA titers								
1	0	8	512	512	2048	1024	2048	2048	2048
2	0	16	512	512	512	1024	2048	1024	1024
3	0	0	256	512	1024	1024	1024	1024	1024
4	0	0	512	512	512	2048	2048	2048	≥4096
5	0	0	128	256	512	1024	1024	1024	2048

Fig. 3 Change in titer of anti-*Toxoplasma* sera from mice after inoculation of 10^2 cysts of *Toxoplasma*.

が示唆され、この規準に従えば、ブタ血清および採血濾紙の血球凝集反応との定性的一致率はそれぞれ91.7%および90.2%、ネコ採血濾紙のそれは84.7%であり、また、いずれもトキソプラズマ分離とも高い一致率を示した。このラテックス凝集反応試薬マイクロタイター用は、これらの動物のトキソプラズマ感染診断に感度と特異性が高く、血清の非働化も非特異抗体の吸収も不要で、簡便かつ多数処理に有利な方法である。

また、さまざまな材料からトキソプラズマを検出するために使われるマウスについて、ラテックス凝集反応抗体価と脳内シストの関係調べたところ、抗体価 $\geq 1:32$ の動物に高率にシストが認められた。マウスはトキソプラズマの各種の実験に使用されるので、マウスの血清学的診断が簡便に出来ることは非常に有意義であると考えられる。

感染初期における抗体価の上昇の仕方が、色素試験と血球凝集反応とは異なり、ヒト (Kayhoe *et al*, 1957 ;

Frenkel *et al.* 1960 ; Fairchild *et al.* 1967 ; Karim and Ludrum, 1975), ラット (Lunde and Jacobs, 1963) およびウサギ (Smit, 1964) で色素試験抗体価の方が血球凝集反応抗体価より先に出現して、早く最高値に達するといわれ、これは色素試験抗体を産生させる初期の抗原刺激はトキソプラズマ虫体の細胞膜に由来し、おくれ細胞の内容が放出され、それが血球凝集反応抗体の産生とさらに色素試験抗体の産生を刺激するのではないか (Lunde and Jacobs, 1967) といわれている。ラテックス凝集反応抗体価の上昇の仕方が、色素試験と血球凝集反応のいずれに近いが、直接同一の材料について示さなかったが、実験感染のウサギにおいては7日後から、抗体が現われ35日後にはピークに近くなり、マウスにおいては2週後から抗体が出現し、矢張り、5週後にはほぼピークに達し、色素試験の抗体価上昇の経過 (Smit, 1964 ; Raizman and Neva, 1975 ; 小林ら, 1977 ; Siim, 1960 ; 小林, 1967) に近いパターンを示した。また感染マウスの血清につき、血球凝集反応とラテックス凝集反応の抗体価を追跡したところ、血球凝集反応抗体価の方が明らかにおくれで上昇した (坪田, 未発表)。これらの点からラテックス凝集反応は血球凝集反応よりむしろ色素試験に近いと考えられる。

要 約

トキソプラズマラテックス凝集反応試薬マイクロタイター用 (坪田, 1977 ; 坪田ら, 1977) がブタ、ネコおよびマウスの診断に使えるか否かを検討し、またウサギおよびマウスの実験感染後のトキソプラズマラテックス凝集反応抗体価上昇経過を追跡した。

1. ブタ血清736例および採血濾紙545例のラテックス凝集反応抗体価頻度分布は、ともに1:32を谷とする二峰性で、1:64を陽性限界とし、1:32を疑陽性、<1:32を陰性と推定した。この規準によれば、血清217例および採血濾紙102例のトキソテストおよびトキソチェックによる血球凝集反応との、定性的一致率はそれぞれ91.7%および90.2%であり、また、ブタ430頭のラテックス凝集反応抗体価と横隔膜からのマウス接種によるトキソプラズマ検出の関係を見たところ、 $\geq 1:64$ の92頭の内72頭 (78.3%) がトキソプラズマ陽性であり、ラテックス凝集反応抗体価<1:32の334頭からは1例しかトキソプラズマが検出されなかった。

2. ネコ採血濾紙387例の抗体価頻度分布は1:32を谷とする二峰性で陽性限界は1:64と推定され、この規準にしたがえばトキソチェックによる血球凝集反応との

定性的一致率は84.7%であつた。血清のラテックス凝集反応抗体価とトキソプラズマ分離との関係を見ると、 $\geq 1:64$ の22頭中19頭 (86.4%) が分離陽性で、ラテックス凝集反応抗体価 $\leq 1:32$ の20頭からは全てトキソプラズマが検出されなかった。

3. マウスについて血清のラテックス凝集反応抗体価と脳内シストの関係を見たところ、 $\geq 1:32$ の19匹中14匹 (73.7%) にシストが認められ、 $\leq 1:16$ の493匹からは3匹にのみシストが検出されたにすぎなかった。

4. ウサギおよびマウスにトキソプラズマを感染させて、ラテックス凝集反応抗体価を経日的に追跡したところ、初期抗体の検出は良好で、5週後にほぼピークに達し、以後高い抗体価を持続した。

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 小林昭夫教授に深謝するとともに、材料の入手に御協力いただきました田辺製菓株式会社東京特約営業所技術部 赤司志郎氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) Fairchild, G. A., Greenwald, P. and Decker, H. A. (1967) : An evaluation of the indirect hemagglutination test as a serologic test for toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, 278-283.
- 2) Frenkel, J. K., Weber, R. W. and Lunde, M. N. (1960) : Acute toxoplasmosis. *J. Amer. Med. Ass.*, 173, 1471-1476.
- 3) Hiraoka, K. and Ohshima, S. (1972) : Simplified hemagglutination test as a serologic test for toxoplasmosis. *Jap. J. Parasit.*, 21, 247-251.
- 4) Karim, K. A. and Ludlam, G. B. (1975) : The relationship and significance of antibody titers as determined by various serological methods in glandular and ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Path.*, 28, 42-49.
- 5) Kayhoe, D. E., Jacobs, L., Beye, H. K., and McCullough, N. B. (1957) : Acquired toxoplasmosis: Observations on two parasitologically proved cases treated with pyrimethamine and triple sulphonamides. *New Engl. J. Med.* 257, 1247-1254.
- 6) 小林昭夫 (1967) : トキソプラズマ症の免疫学的試験。寄生虫誌, 16, 223-225.
- 7) 小林昭夫・平井徳幸・鈴木康弘・西川洋昭・渡辺直照 (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.

- 8) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1963) : Toxoplasma hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. *J. Parasit.*, 49, 932-936.
- 9) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1967) : Differences in Toxoplasma dye test and hemagglutination antibodies shown by antigen fractionation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, 26-30.
- 10) Raizman, R. E. and Neva, F. A. (1975) : Detection of circulating antigen in acute experimental infections with *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.*, 132, 44-48.
- 11) Siim, J. C. and Lind, K. (1960) : A toxoplasma flocculation test. *Acta. Path. Microbiol. Scandnav.*, 50, 445-446.
- 12) Smit, G. L. (1964) : The use of formalin-preserved human erythrocytes in the toxoplasma haemagglutination test. *Trop. Geory. Med*, 2, 152-158.
- 13) 鈴木 宏・前川博司・松川岩夫・吉本武男・本多抄絵・斎藤泰夫・安東治邦・津荷裕子・長谷川貴代志・藤本寿美子・土井邦雄・大島 慧 (1974) : 猫トキソプラズマ症の2症例. *日獣会誌*, 27, 272-277.
- 14) 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.
- 15) 坪田宣之・平岡謙一・沢田良信・渡辺俊子・大島 慧 (1977) : 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.

Abstract

STUDIES ON LATEX AGGLUTINATION TEST FOR TOXOPLASMOSIS
(3) EVALUATION OF THE MICROTITER TEST AS A SEROLOGIC
TEST FOR TOXOPLASMOSIS IN SOME ANIMALS

NOBUYUKI TSUBOTA, KEN-ICHI HIRAOKA, YOSHINOBU SAWADA
*(Research Laboratory, Eiken Chemical Co., Ltd., Higashi-shinkoiwa,
Katsushika, Tokyo 124, Japan)*

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

The sensitized latex reagent for microtiter agglutination test (Tsubota and Ozawa, 1977) gave satisfactory results as a serologic test for *Toxoplasma* infection in pigs, cats, mice and rabbits.

1) The frequency distribution of both the agglutination titers of 736 pig sera and those of the eluate of filter-paper strips impregnated with blood samples from 545 pigs showed two peaks with a trough at 1 : 32 (Fig. 1, 2). The endpoint of the reaction for positive diagnosis was determined at 1 : 64 for pigs. When compared with the hemagglutination test, agreement of the reaction by the latex agglutination was 91.7% with that by 'Toxo-Test' method in 217 pig sera and 90.2% with 'Toxo-Check' method which utilized blood-impregnated filterpaper strips for sampling 102 pig sera (Table 1, 2). Positive latex agglutination tests and occurrence of *Toxoplasma* in diaphragm muscle was in good agreement in pigs (Table 3).

2) Since the frequency distribution of the agglutination titers of the eluate of blood-impregnated filter-paper strips obtained from 387 cats showed two peaks with a trough at 1 : 32, titer at 1 : 64 or more were considered serologically positive. Agreement of reactions was observed in 84.7% between the latex agglutination test and the hemagglutination test using 'Toxo-Check' (Table 4). Correlation between a positive latex agglutination titer and *Toxoplasma* occurrence in muscle and brain of cats was excellent (Table 5).

3) When 512 mice were inoculated with diaphragm muscle of pig, 14 out of 19 mice with latex agglutination titers of $\geq 1 : 32$ and only 3 out of 493 mice with titers of $\leq 1 : 16$ had cerebral cysts (Table 6).

4) In rabbits and mice which were experimentally infected with *Toxoplasma*, the antibody was detected by the latex agglutination test from the early stage and the titer rose to peak at 5-6 weeks after infection and maintained high values thereafter (Table 7, Fig. 3).