

# 琉球大学学術リポジトリ

## トキソプラズマ症のゲル内沈降反応による診断(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金城, 俊夫, 黎, 憲祖, 清水, 亀平次, Kinjo, Toshio, Rei, Kenso, Shimizu, Kiheiji メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4500">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4500</a>

# トキソプラズマ症のゲル内沈降反応による診断

金城俊夫\*・黎憲祖\*\*・清水亀平次\*\*\*

---

Toshio KINJO, Kenso REI and Kiheiji SHIMIZU : Agar gel  
precipitation test for toxoplasmosis

---

## I 緒 言

Toxoplasma (Tp) は哺乳類、鳥類、爬虫類に及ぶ広範な宿主域をもつ偏性細胞寄生性原虫である。Tpはまた、世界各地に広く分布しており、我国においても、人を含めて各種動物に広範に浸淫していることが明らかにされている。近年、特に豚におけるTp症の発生状況は高率であり、公衆衛生面からも重要視され、本症の早期発見、摘発法の検討がのぞまれている現況である。

本症の血清診断法としては、従来、Sabin and Feldman (1948) による色素試験が信頼度の高いものとして賞用されていたが、手技が煩雑なため、これに代るものとして、Jacobs and Lunde (1957) による血球凝集反応やGoldman (1957) による蛍光抗体法などが使用されてきている。

著者らは、これらとは別に主として抗原分析等の研究に用いられている寒天平板ゲル内沈降反応の本症診断への応用を試みてみた。

沈降反応に関しては、既に、O' Connor (1957) が、Tpによる眼患者血清について応用し、その診断的価値のあることを示唆しているが、その後この面の研究はほとんど進展してない。

本反応は術式極めて簡単であり、一度に多数例について反応が実施でき、判定が容易であるなどの利点を有している。

また、平戸ら(2)は馬パラチフスの診断において多糖類抗原をもってする沈降反応が、体内菌の消長とよく一致するという興味ある所見を報告している。

このようなことから、著者らはまず種々の方法で作成した抗原についてその抗原性を検討し、次いでその結果にもとづき野外豚およびTp実験感染豚血清について沈降反応を実施し、他の諸血清反応の成績と比較検討を行なった。

こゝに得られた成績の概要を報告する。

## II 実験材料および方法

### 1. 使用原虫株

トキソプラズマの標準株として広く使われているRH株を使用した。

---

\* 琉球大学農学部畜産学科  
\*\* 北海道大学獣医学部  
\*\*\* 帯広畜産大学獣医学科  
琉球大学農学部学術報告 18 : 199~210 (1971)

## 2. 供試血清

- 1) 免疫家兎血清 RH株で免疫した家兎血清で、色素試験で1:8,192, 補体結合反応で1:512~1,024の抗体価を有する。使用に際し、これを60°C20分加熱非働化した。
- 2) 感染豚血清 生後約1ヶ月のヨークシャー種豚3頭を用い、RH感染マウスを餌食させ、以後経目的に採血してえた血清である。
- 3) 野外豚血清 と畜場において外見上健康な豚110例より採取した血清を使用した。豚血清は何れも使用前に56°C30分加熱非働化した。

## 3. 沈降反応

生理食塩水に1%の割に精製寒天(Difco)を加え、加熱溶解後ペトリ皿に流し込み、ペニシリンカップを用いて型の如く穴をあけて反应用寒天平板を作った。穴の間隔は6~8mmとした。抗原および抗血清を加えた後蒸発を防ぐよう密閉した容器に入れ、37°Cふ卵器内で反応せしめた。反応12, 24, 48時間目に取り出し沈降線出現の有無を観察した。

## 4. その他の血清反応

- 1) 色素試験 Sabin and Feldman (10) の原法に準じて行なった。
- 2) 補体結合反応 豚血清に対して直接法が利用できないため、間接法である補体結合阻止反応(7)を用いた。本反応には抗原として清水(11)の推奨するTp感染組織培養上清を使用した。
- 3) 血球凝集反応 主としてLewis and Kessel(4)の方法に準じた。

# III 実験成績

## 1. 沈降反应用抗原に関する検討

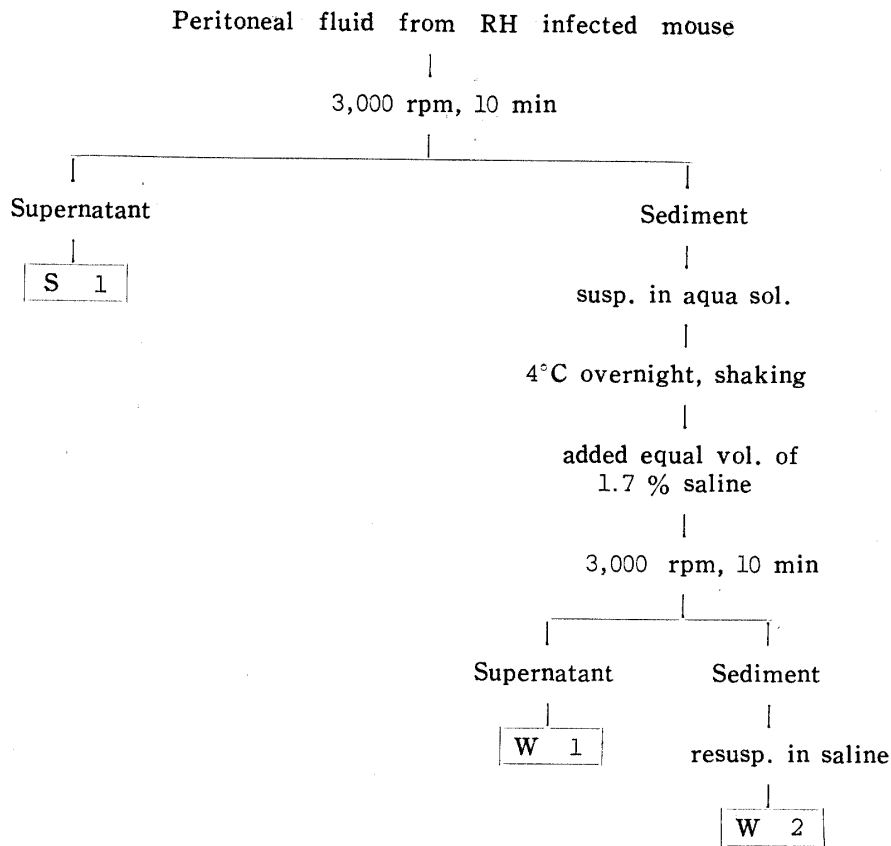
次の10種の抗原を作成し、抗原性を比較検討した。

- 1) 感染マウスの腹水そのもの、2) その遠心上清、3) 遠心沈渣を蒸留水抽出、4) アルカリ抽出、5) 凍結融解による抽出、6) 三塩化酢酸および7) 硫酸による分画、8) 豚皮内反应用抗原として使用されているトキソプラズミン(TSC抗原)(5)、9) 補体結合反应用抗原として使用したTp感染組織培養上清および10) 感染マウス肝をアセトンで抽出したもの等である。

各抗原は第1~3図に示す方法で作成した。このようにして得た抗原を第4~5図に示すような配置で寒天ゲルの穴に入れ、中心の穴にはそれぞれ免疫家兎血清を加えて反応させた。

その結果、1~3本の沈降線が形成されるが、一般に血清側の線が明瞭で、抗原側に結ぶ線はやゝ大きく不明瞭である。

第4図-1は上から右へ、凍結融解(FI)、アセトン抽出(Acet)、アルカリ抽出(A1)、蒸留水抽出(W1)、腹水上清(S1)、凍結乾燥したものをさらに凍結融解したもの(Df1)の順で、左側4種の抗原の線が一致している。アルカリ抽出抗原の抗原性は弱く、肉眼でかろうじて血清側に結ぶ線のみ



第 1 図 蒸留水抽出によるTp沈降反応用抗原の作成  
 Fig. 1. Extraction procedures for water extracted antigen of toxoplasma

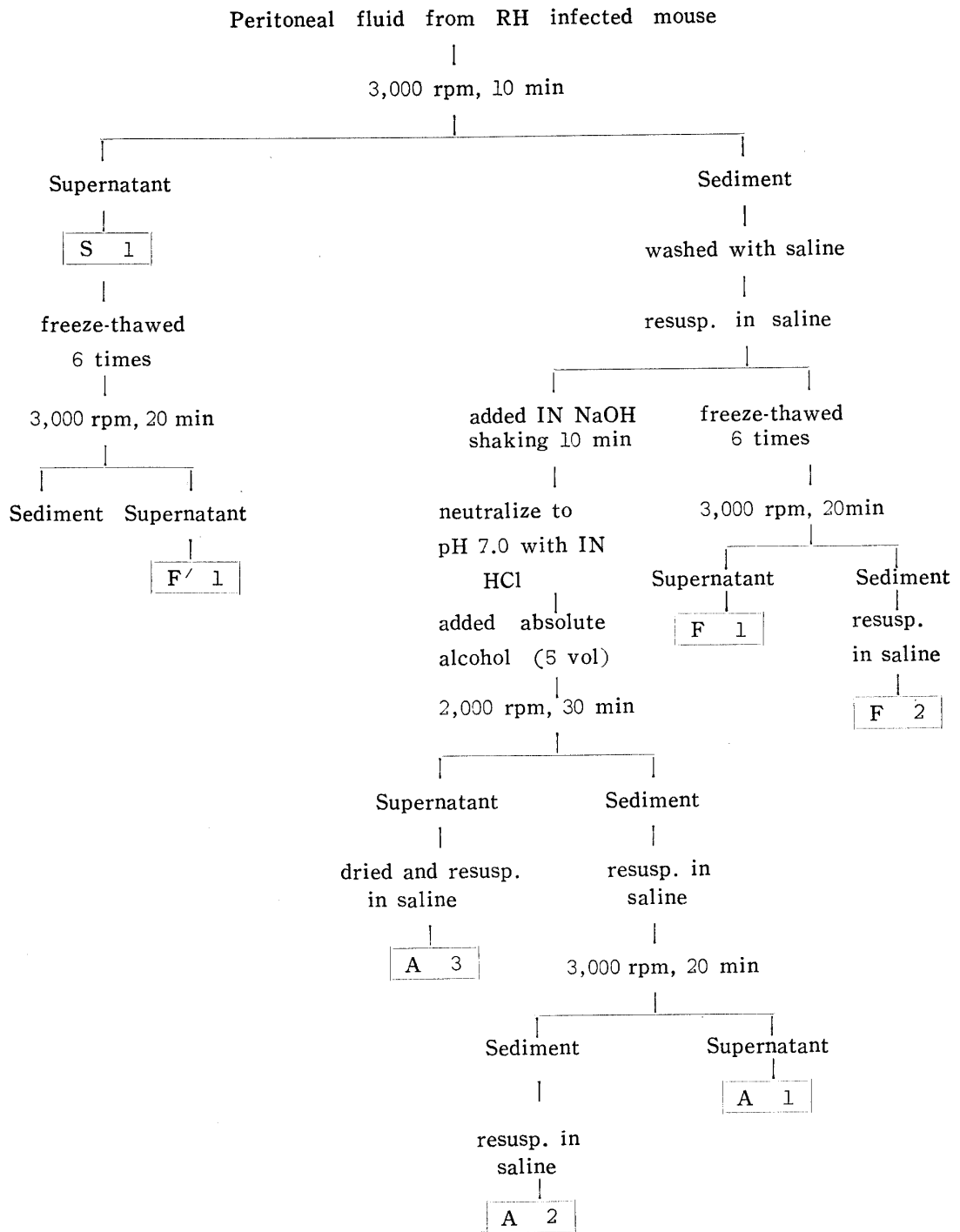
蒸留水抽出抗原と一致していることが認められた。感染マウス肝のアセトン抽出抗原にはほとんど抗原性を認め得ない。その他、トキソプラズミンや補体結合反応抗原として充分使用できる感染組織培養上清には抗原性がみられず、後者においては10倍濃縮することにより僅かに抗原性が確認できた程度であった。

第4図一2は第2図に示した過程で得られた各抗原の反応を示したものである。

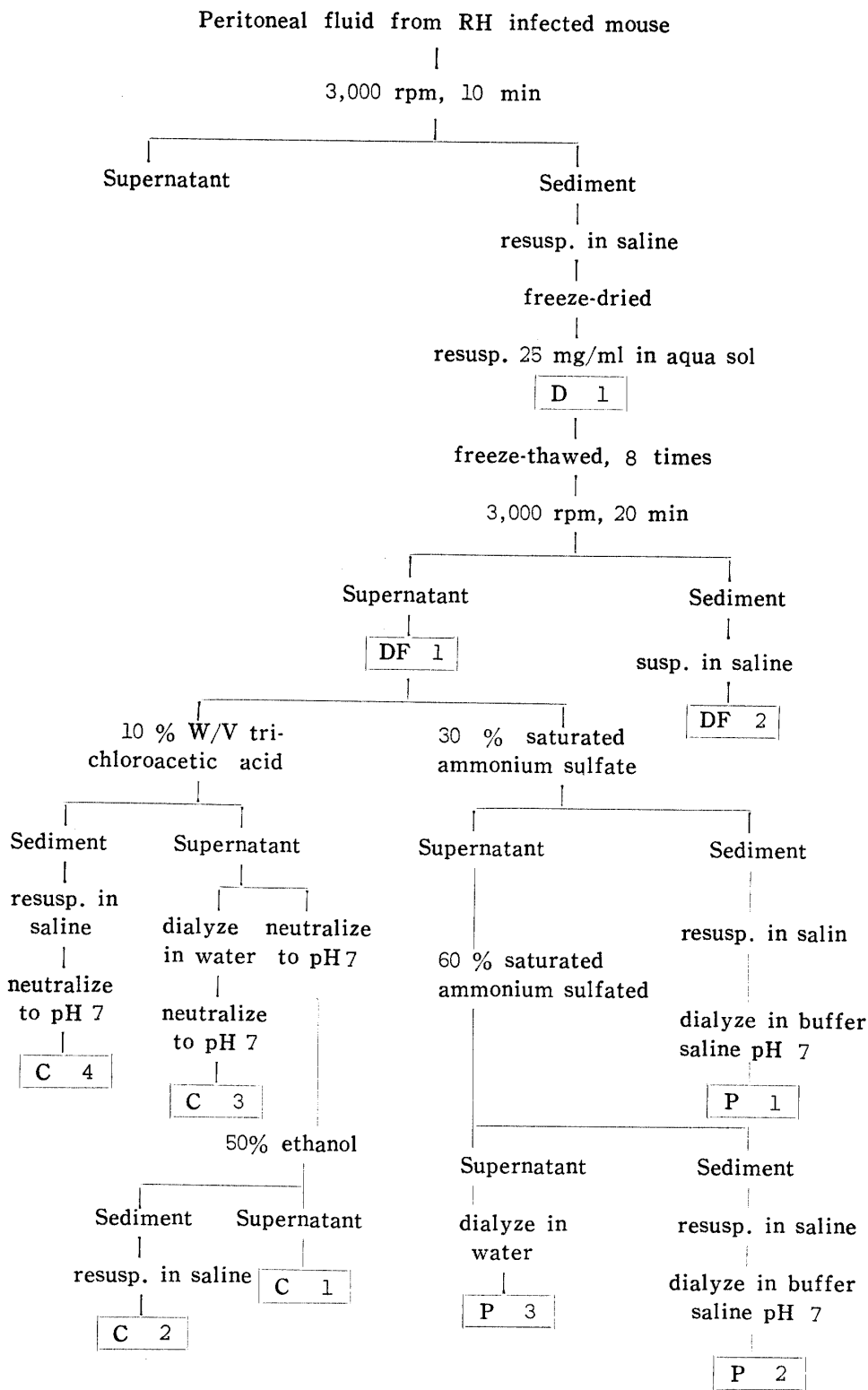
上は感染マウス腹水上清を凍結融解したもの(F'1)で、左へ腹水沈渣の凍結融解上清(F1)およびその沈渣(F2)で、右側の3つがアルカリ抽出抗原(A1~3)である。F'1とF1は全く共通の3本の沈降線を有し、F2の方は一部共通するが、分析不能な太い線を形成している。一般に種々の処理を加えた虫体残渣を食塩水に浮遊して抗原とした場合、若干の抗原物質の存在を認めるが、線が不鮮明でかつ太くなる傾向がある。一方、右側のアルカリ処理抗原の反応をみると、凍結融解抗原と一致した血清側の線が認められるが、抗原側の線は消失する。

第4図一3,4は第3図の硫酸および三塩化酢酸処理で得た抗原の反応を示したものである。

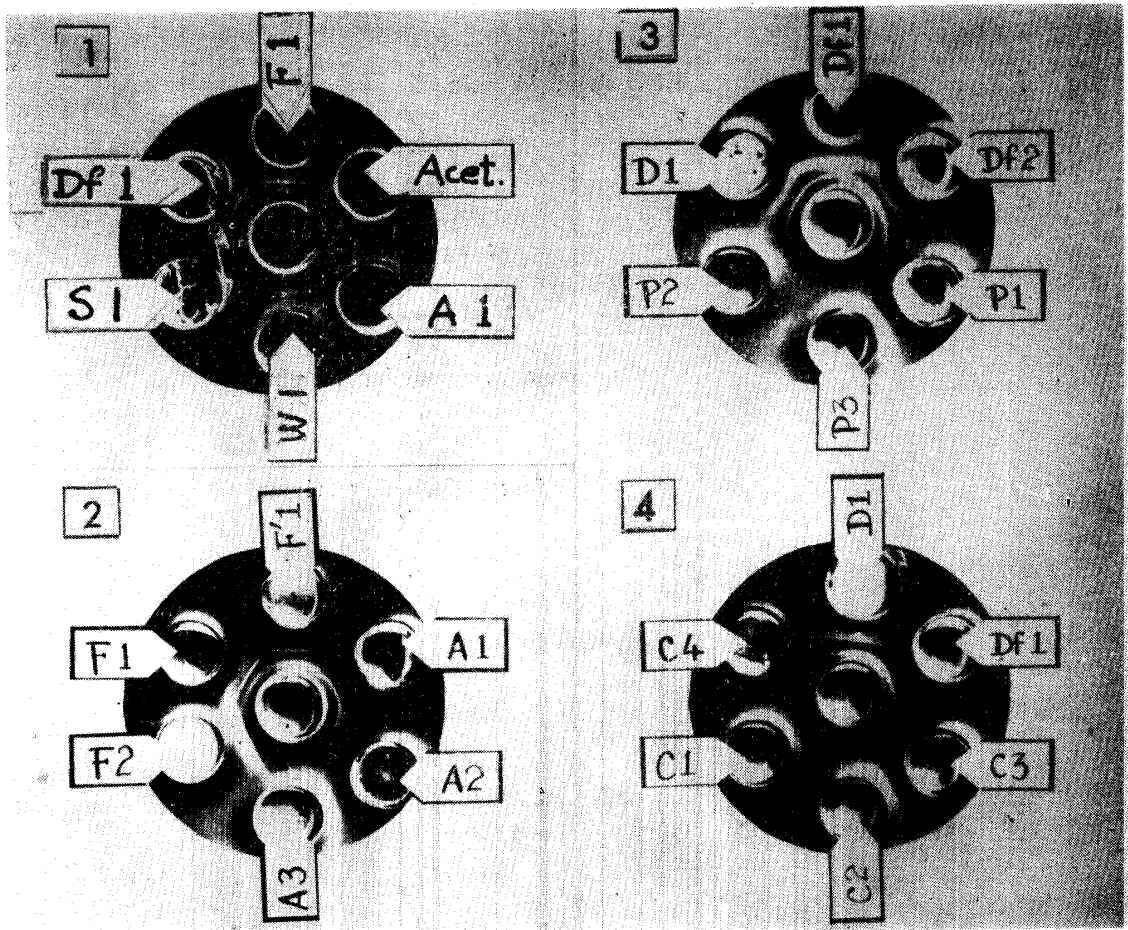
まず、硫酸処理による場合、30%および50%飽和による何れの分画(P1およびP2)にも抗原性は認



第 2 図 凍結融解あるいはアルカリ処理によるTp沈降反応用抗原の作成  
 Fig- 2. Extraction procedures for freeze-thawed and alkaline extracted antigens of toxoplasma



第 3 図 三塩化酢酸あるいは硫酸処理によるTp沈降反応用抗原の作成  
 Fig. 3. Extraction procedures of toxoplasma with trichloroacetic acid and ammonium sulfate



Preparation procedures and abbreviations of antigens were illustrated in the figs 1—3 except Acet. Acet means acetone extracted antigen from *Tp* infected mouse liver.

第 4 図 各種抗原による沈降反応の比較

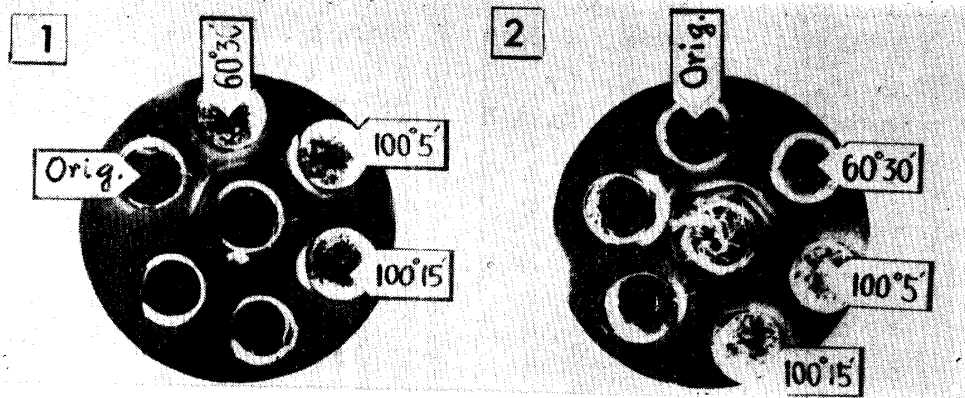
**Fig. 4. Comparative precipitation patterns obtained by the rabbit anti-toxoplasmic immune serum (center-well) and various kinds of antigens (outer well)**

められ血清側の線が残る。これに対し、三塩化酢酸抽出による分画 (C1~3) には全く抗原性が認められない。

次に、これら抗原の熱抵抗性について検討してみた。

第5図—1は蒸留水抽出抗原 (W1), —2は凍結融解で抽出した抗原 (F1) の成績を示したものである。何れの場合も、60°C30分加熱処理ではほとんど影響がないが、100°C5分以上の処理で抗原側の線が消失している。

血清側に出る線は100°C15分処理でも消失せず、耐熱性抗原によるものと考えられる。



Orig. : Original antigen

第5図 Tp 沈降反応用抗原の熱抵抗性

Fig. 5. Effect of heat treatment of antigens, W 1 (left) and F 1 (right) for their precipitation patterns

以上の成績より、抗原抽出が簡単でしかも明瞭な沈降線が出現する凍結融解抗原 (F1) を標準抗原として、以下の実験に使用することにした。

2. 野外豚血清に対する反応

と畜場で採取した110例の健康豚血清についての諸血清反応の成績は第1表の通りである。

第1表 豚血清110例における各種血清反応の比較

Table 1. Comparison of 4 immunological procedures to detect of toxoplasmic antibodies of 110 pig sera

Procedure	Serum dilution									
	<1:2	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Dye	40*	27		16		14		6		7
	27 (24.5%)									
CFI	30	52	13	10	5					
	15 (13.6%)									
HA		47		12		28		10		12
	22 (20.0%)									
Precipitation	Negative 100					Positive 10 (9.1%)				

\* Number of sera showed positive reaction at the indicated serum dilution

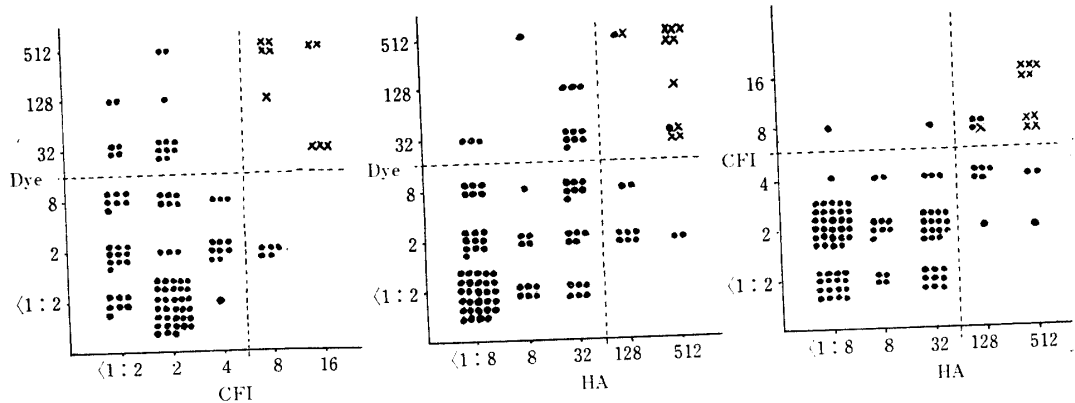
CFI : complement fixation inhibition test

HA : hemagglutination test



各反応による陽性率は沈降反応10例9.1%，色素試験 (>1:32) 27例24.5%，間接補体結合反応 (>1:8) 15例13.6%および血球凝集反応 (>1:128) 22例20%で、沈降反応の陽性率が他に比して極めて低率であった。

これら個々の例について他の反応との一致性を調べるため、第6図に示すような分類を試みた。



Note Dotted line indicates the border-line between positive and negative reactions. The symbol · or × means each individual serum and especially, the latter (×) means the serum positively reacted by precipitation test.

第6図 豚血清110例における各種血清反応の比較

Fig. 6. Distribution and correlation of antibody titers obtained by precipitation and other tests about 110 pig sera

図より明らかなように、沈降反応陽性を示した10例(×印)は何れの反応でも陽性でしかも高い力価を示している。換言すれば、沈降反応で陽性の場合、他の諸反応も陽性であるといえる。この図をもとに沈降反応と他の各反応間の一致率を求めてみると、色素試験(Dye)と84.6%，間接補体結合反応(CFI)と93.5%，血球凝集反応(HA)と89.1%という何れも高い値を示し、他の反応相互間のそれより優れた成績が得られた。

以上の成績から、本反応が他の反応同様、Tp症の抗体調査に利用しうるものであること特に多数例についてスクリーニングする場合好適な反応手技であるといえる。

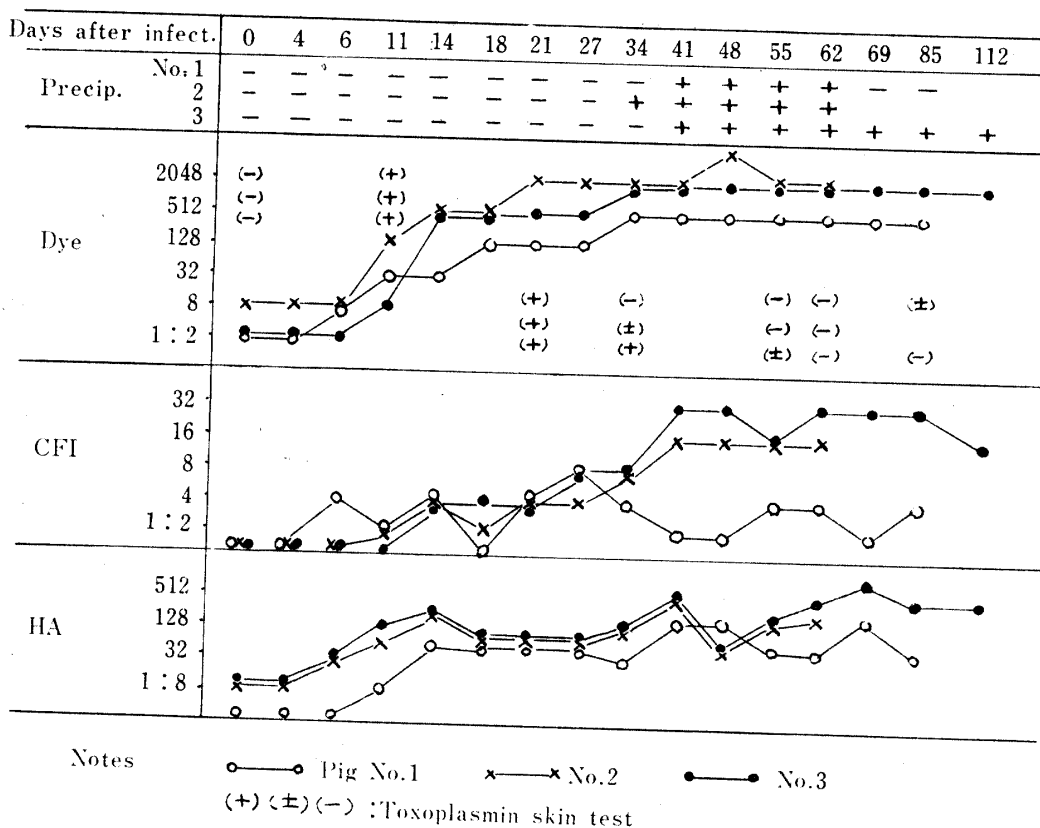
### 3. 実験感染豚血清に対する反応

前項において沈降反応の他の諸血清反応との一致率を調べたが、さらに本反応の特異性あるいは疾病との関連性等を検討するため、実験的にTpを経口感染させた仔豚3頭を用い抗体の消長を追突した。

すなわち、仔豚3頭に感染3日目のマウス10匹を細切してこれを餌に混ぜ、平等に餌食させ感染せしめた。以後毎体温を測定し、感染2週間は2~3日毎、その後は7~10日毎に血液を採取し、一部は血中Tpすなわちパラジテミヤの有無を検査するためマウス腹腔内接種を、残りは血清を分離して抗体検出用に供した。なお、血清反応と平行して、現在豚のTp症診断に応用されているトキソプラズミン(5)による皮内反応を行なった。

3頭の豚共に感染4~10日目の間に2~3日間稽留する40°C以上の発熱を示し、発熱後期にはパラジテミヤも認められ、感染の成立したことが確かめられた。

熱の下降と前後して、すなわち感染7~10日頃から第7図に示す通り、色素抗体、血球凝集抗体が出現し、ほぼ2~3週目に最高値に達し、以後3ヶ月以上も同力価を持続し、両反応とも平行して消長している。



第7図 Tp経口感染豚における各種抗体の消長  
 Fig. 7. Persistence of toxoplasmic antibodies detected by various test procedures of 3 experimentally infected pigs

間接補体結合抗体は感染初期はやゝ不安定な力価を示し、以後、前2反応同様長期間持続する。それに比して皮内反応は感染11日目には全例陽転するが、比較的速かに陰転するようである。一方、沈降反応の成績は他の反応が既に最高値に達した、すなわち感染5～6週目に至り初めて検出され、以後他と同様検出されているが、抗体の出現時期がかなりおけている。以上の成績から、感染初期の患者の摘発という観点からすれば、沈降反応は鈍感な反応の部に属するものといえる。しかし、個々の例についてみた場合、No1豚では2ヶ月以降沈降反応陰転しているが、これは他の豚に比し臨床症状も軽く経過したもので、皮内反応で3週以降、補体結合反応で40日以降それぞれ陰転していることをも考慮すると、色素試験や血球凝集反応より、むしろよく発病後の病の消長を示しているものといえる。

#### IV 考 察

Tp症患者、患者の体内におけるTpの動きを適格に捕え得る抗原を検討するために、10種類の抗原を作成し、この面の研究に便でしかも簡単な沈降反応によって解析した。

その結果、一般にTp抗原抗体系に1～3本の沈降線が形成されるが、その数と鮮明度の面から、比較した10種中Tpを凍結融解して得た抗原(F)あるいは凍結乾燥後凍結融解したもの(Df)が最も優れた成績を示した。本抗原によって得られる沈降線は、抗原側に結ばれる易熱性抗原によると思われる沈降線と、血清側に結ばれる、硫酸によって沈殿した蛋白分画(P)と共通の沈降線、さらにその他不解明な

1~2本の線からなっている。しかし蛋白分画と共通な線も第4図-3から分るように、分離不十分な複数の線からできているように思われる。このことは抗原の熱抵抗性を調べた実験(第5図-2)で血清側に結んだ線が100°C 5分の処理で、分離していることから推察できる。

今回の実験では、この抗原をさらに単離、精製したり、化学的性状を調べたりすることまで行わず、単に抗原性が強くしかも鮮明な沈降線を形成するという点から、凍結融解抗原(F1)を以後の豚の症例摘発に応用した。

本抗原を用いる沈降反応でと畜場豚の検索をした結果、陽性を示す例は他反応のそれに比して低率であったが、たゞ本反応陽性例は他の何れの反応でも強陽性を示すものであるという興味ある所見が得られた。しかも他反応との一致率が84.6~95.5%と高い点などから、本反応が、その術式の容易さなどからも、多数例の診断の際スクリーニング法として適したものであるといえる。

これに対し、実験感染豚における成績では、血中にTpが出現して明らかに感染が成立したに拘わらず、沈降反応が陽転するのは感染5週後で、他反応より2~3週おくれるという悪い結果に終わっている。すなわち感染初期の摘発に本抗原による沈降反応が適さないといえる。この点は前述のように、体内Tpの動きを特異的に捕え得る抗原の精製、濃縮をさらに進めることにより改良しうるように思われる。目下この面の検討を進めつゝある。

著者らはTp症の適格な診断法という同じ目的で、Tpの他の抗原物質による反応を平行して試みつゝある。すなわち、高橋が結核の診断に応用して病の消長とよく一致するという成績を出している磷脂質抗原によるカオリン凝集反応の応用である。既に本反応が豚のTp症の診断に使用できることを確認している(9)。その実験においては、直接豚肉からTpの分離を試みるという実験を実施しているが、前記抗原をもってする沈降反応もTp磷脂質抗原によるカオリン凝集反応同様、Tpの体内寄生の有無を表わす指標をうる反応として、従来の諸反応より優れていることが示された(8)。

このような結果を併わせて考察すると、沈降反応がTp症の簡易かつ確実な診断法として充分利用しうるものといえる。特にと畜場に搬入される豚でその血清が沈降反応陽性の場合、体内にTpの存在することを強く示唆するものであって、食肉衛生面から対策を講ずる上に有用であるといえる。

たゞ、感染初期のTp症を摘発しえないという短所を有しているので、今後抗原の側からこの面を改良する必要がある。

## V 総 括

トキソプラズマ(Tp)症の診断に術式簡単なゲル内沈降反応の応用を試みた。まず反作用抗原の検討を行ない、次いでその結果に基づき、と畜場および実験感染豚血清について反応を実施した。その成績を従来の諸血清反応のそれと比較すると以下の通りである。

1. Tp RH株感染マウス腹水を材料として凍結融解、硫酸、三塩化酢酸、アルカリ等各種処理により計10種の抗原を作成した。

一般に3本の沈降線が形成されるが、血清側にできる沈降線が明瞭で、これに関与する抗原は100°C 15分の加熱処理でも不活化されない。一方抗原側にできる沈降線はやゝ太く不鮮明であり、その抗原は100°C 5分の加熱処理によって抗原性を失う。

2. 検査した抗原中、感染マウス腹水の遠心沈渣を凍結融解して得た抗原が最も反応性が高い結果が得られた。硫酸分画には同様に抗原性認められるが、アルカリ抽出抗原は微弱であり、また三塩化酢酸処理して得た抗原には全く抗原性を認めなかった。

3. 凍結融解抗原を用いて、と畜場豚110例についてゲル内沈降反応を実施したところ、陽性9例9.1

%であった。この成績は色素試験の24.5%，間接補体結合反応の13.6%，血球凝集反応の20.0%に比し最も低率であった。しかし、沈降反応陽性例は他の何れの反応でも高い力価を示し、各反応と84.6%以上の高い一致率を示した。

4. 実験感染豚3頭について、経目的に抗体の消長を調べたところ、沈降反応は感染初期の抗体を捕える点で、他の反応に比し劣っているが、感染中期以降は病の経過とよく平行した態度を示した。

5. 以上の諸成績より、沈降反応がTp症の診断法として、感染初期の診断にかなり抗原の作出法について検討の余地を残してはいるが、手技簡単でしかも一度に多数例の診断が可能である点などから、充分利用できるものといえる。

本研究は著者らが、北海道大学獣医学部家畜衛生学教室において実施したもので、研究の一部は文部省科学研究費の援助によって行なった、記して感謝の意を表する。

#### 文 献

- 1) Goldman, M. 1957 Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein-labeled antibody  
1. The reaction in smears of peritoneal exudate J. exp. Med., **105** : 549—553
- 2) 平戸勝七・清水亀平次・佐藤儀平・伊藤時哉 1953 馬パラチフスの血清診断に関する研究  
特に多糖類抗原を以てする沈降反応について 獣医学研究, **1** : 49—50
- 3) Jacobs, L. and Lunde, M. N. 1957 A hemagglutination test for toxoplasmosis  
J. Parasit., **43** 308—314
- 4) Lewis, W. P. and Kessel, J. F. 1961 Hemagglutination test in the diagnosis of  
toxoplasmosis and amebiasis Arch. Ophthal., **66** : 471—476
- 5) 信藤謙蔵・佐藤卯三郎・花木琢磨 1962 豚トキソプラズマ病診断用皮内反応精製乾燥抗原  
(TSC)の製造に関する研究 日獣学誌, **24** : 297—303
- 6) O'Connor, G. R. 1957 Antitoxoplasma precipitins in aqueous humor A. M. A.  
Arch. Ophthal., **57** : 52—57
- 7) 大森常良 1953 補体結合阻止反応に関する研究 I. 鶏免疫血清(日本脳炎, インフルエンザ)  
に対する応用 ウイルス, **3** : 269—272
- 8) 黎憲祖, 金城俊夫, 平戸勝七 1964 豚血清におけるゲル内沈降反応とトキソプラズマ保有との  
関係 日獣学誌, **26** : 457
- 9) ———, ———, ——— 1964 トキソプラズマ症における磷脂質感作カオリン凝集反  
応について 同上誌, **26** : 457
- 10) Sabin, A. B. and Feldman, H. A. 1943 Dyes as microchemical indicator of a new  
immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*) Science,  
**108** : 650—663
- 11) 清水亀平次, 1961 Toxoplasmosis に関する研究 IV, 組織培養メジウム中に出現する CF  
抗原物質について 日獣学誌, **23** : 167-180

### Summary

Agar gel precipitation test was applied, for diagnosis of toxoplasmosis.

In the former part of this experiment, various kinds of antigens were prepared from harvests of toxoplasma from mouse peritoneal exudate and were compared their antigenicities against rabbit serum immunized with RH strain in agar gel.

Generally, 3 precipitate lines were observed, and one of these which formed at the side closer to antibody well, was intense and clear. The antigen participated in this line formation was not inactivated by heating 100°C for 15 min. Other line yield at the side closer to the antigen well was faint and wide. The antigen of the line was heat labile.

Of 10 kinds of antigens tested, freeze and thawed antigen was most active. The antigen fractionated by ammonium sulfate showed also high antigenicity. The antigen extracted by alkaline solution was less active, and no antigenicity was observed in trichloroacetic acid treated antigen.

The freeze and thawed antigen was therefore applied for diagnosis in the following experiment.

In the latter part of this experiment, the precipitation test with the antigen was performed using sera obtained from 110 apparently healthy pigs of field samples and also from 3 pigs of experimental toxoplasmosis.

The data obtained were also compared with those of other tests.

The percentages of positive reaction were as follows : 9.1 % in precipitation, 24.5 in dye, 13.6 in complement fixation inhibition and 20.0 in hemagglutination tests respectively. Positive reactors with precipitation test were the smallest in number but always showed high antibody titers when tested with other procedures described.

There were good correlations, more than 84.6%, with other tests used. Precipitation test, however, seemed to be less sensitive to detect an early course of an acute infection, the antibodies generally appeared 2~3 weeks later than the dye test antibodies. But after middle course of infection, the precipitation test antibodies persisted parallel with the clinical signs of the disease.

From the data obtained, the precipitation test which is very simple and easy to perform can be able to use as the diagnostic tool for toxoplasmosis.