正常人のトキソプラズマ抗体保有率について

Distribution of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Normal Human Sera

東京医科歯科大学微生物学教室

清水 文彦・橋本 雅一・藤田 光一郎・川上 省三・小林 勝
高山 正三・吉野 長康・染 矢 博・石川 近美・岡本 陽一郎
増田 悦蔵・武藤 十郎・甘粕 榮四郎

Fumihiko Shimizu, Masakazu Hashimoto, Kôichirô Fujita, Shôzô Kawakami, Masaru Kobayashi
Shôzô Takayama, Tsuneyasu Yoshino, Hiroshi Someya, Chikami Ishikawa, Yôichirô Okamoto

Etsuzô Masuda, Jûrô Mutô, Sanshirô Amakasu

Department of Bacteriology, Tokyo Medical and Dental University

I. 緒 言

トキソプラズマ症の病原体である *Toxoplasma gondii* は、1909年 Nicolle et Manceaux¹⁾ が北アフリカで、ヤマアラシの 1 種 *Ctenodactylus gondii* から初めて検出して以来、欧米諸国ではほとんどすべての哺乳類から検出されたばかりでなく、鳩、雀、鶏等の鳥類から、さらに蛇、亀、蛙、魚類からの検出例が報告され、日本においても、土竜、狸、目白、犬、猫、家兎、鶏、家兎等からの *T. gondii* の検出例が報告されている。

さらに、人間においても1939年、Wolf, Cowen and Paige²⁾ が、脳水腫の乳児から *T. gondii* を検出した報告を初めとして、世界各地で *T. gondii* の人体感染例が多数報告され、わが国においても宮川³⁾、宮崎および平岡⁴⁾、松林、瀬長および田崎^{5) 6)} 等が、人体感染の症例を報告している。

以上のように、*T. gondii* は、人を含めた動物界に広く存在することが明らかになったが、人間における検出例はすべてが乳幼児からのものであつて、成人からの検出はまだ 1 例も報告されていない。この点に関して注目すべき事実は、最近の血清学的な検索の成績から、*T. gondii* による不顕性感染が人および動物界にきわめて濃厚に存在することが指摘され、殊に成人の場合では、*T. gondii* に感染しても症状を発現することはきわめて稀で多くの場合は不顕性感染として存在することが報告されたことである。したがつて、わが国においても *T. gondii* による不顕性感染の存在が予測されるのであるが、この *T. gondii* の不顕性感染の存在に関する研究はいまだきわめて少ない。しかし、*T. gondii* による感染の疫学的な解明には、不顕性感染の存在を明らかにするこ

とがきわめて重要なことであると思われる。

このような見地から、われわれは、成人の *T. gondii* による不顕性感染の存在およびその分布状態を明らかにするために、臨床的に健康と思われる 512 名の成人血清を用いて Sabin and Feldmann の色素試験および補体結合反応を用いて血清学的検討をおこない、二、三の知見を得たのでここに報告する。

II. 実験材料および実験方法

A. 色素試験 (Sabin and Feldmann 法⁷⁾)

a) 実験材料

i) トキソプラズマ浮遊液：伝染病研究所 から分与を受けた *T. gondii* RH 株 (マウス累代接種 1,000 代を超えるもの) を用い、マウス腹腔内接種後 3 日目に 2 ml の生理的食塩水を注入して腹腔液を採取し、1,000 万～3,000 万/mm³ の虫体を含む浮遊液をつくり、腹腔液採取後 60 分以内に実験に用いた。

ii) Accessory factor：予備実験で合格した正常人血清を、ドライアイスで凍結保存したものを用いた。

iii) 色素試験陽性対照血清：*T. gondii* の生虫体を用いて兎を免疫し、色素試験で 500～4,000 倍の陽性血清を作製した。

iv) アルカリ性メチレン青溶液：0.53%炭酸ソーダ 9.73 ml と、1.91%硼酸ソーダ 0.27 ml に Merck 製の Methylenblue medicinate のアルコール飽和溶液 3.0 ml を加えて作製した。なお本溶液は、使用の都度新たに調製した。

v) 被検血清：凝固血液からの分離血清を用い、採血後 24 時間以内に実験に供した。

b) 実験方法

i) 予備試験: Accessory factor として用いる人血清を選出するためにおこなった。すなわち、トキソプラズマ浮遊液 0.1ml に被検人血清 0.5ml を加えて混合したのち、その 0.1ml に 0.9% 食塩水 0.1ml を加え、37°C の温浴で20分間作用させたのち、アルカリ性メチレン青溶液 0.05ml を加え、トキソプラズマ虫体 100個を数え、その 95%以上が染色している血清を Accessory factor として使用した。

ii) 本試験: 被検人血清を 56°C, 30分間加熱して非働性化をおこない、0.9% 食塩水で4倍稀釈した血清の 0.1ml を小試験管にとる。に、トキソプラズマ浮遊液と Accessory factor として用いる人血清の原液を 1:4 の割合に混合し、その 0.1ml を被検血清稀釈系列に分注する。ついて、この混合液を 37°C の温浴で60分間作用させる。作用後暫時低温(0~2°C)に放置したのち、再び室温において、アルカリ性メチレン青溶液 0.05ml を各試験管に加えてよく混合し、ほぼ15分後にその1滴を載せガラス上にとり、440倍の倍率で鏡検する。なお鏡検は、1時間以内に終了するように注意した。

判定は、食塩水対照でトキソプラズマ虫体が95%以上染色し、また、陽性兎血清の所定の濃度で50%以上の非染色のトキソプラズマ虫体を示す対照実験の成績が得られた場合において、虫体 100個の中、50%以上の非染色虫体の存在を示す場合の被検血清の、最大稀釈度を抗体価とした。

B. 補体結合反応

a) 実験材料

i) 抗原の作製: Westphal⁹⁾, Sabin⁹⁾, 長谷川, 常松等¹⁰⁾の方法に準じて抗原を作製した。すなわち、100匹のマウスの腹腔内に *T. gondii* を接種し、3~4日後に8%クエン酸ソーダ液 2ml を注入して採取した腹腔洗滌液を集める。3,000 r.p.m. 10分間遠心沈澱して得た沈澱を50ml の 3.8%クエン酸ソーダ溶液に浮遊させ、sonic osillator (10 K cycle, 200W) で30~60秒照射して細胞成分を破壊したのち、再び3,000 r.p.m. 10分間遠心沈澱をおこなう。沈澱を 50ml の生理的食塩水に浮遊させ、再び Sonic osillator を20~30分間照射して虫体を完全に破壊する。この浮遊液に 0.5%の石炭酸を加え、氷室に数日~1週間放置したのち、10,000 r.p.m. 60分間遠心沈澱をおこない、得た上清液を抗原液とした。抗原価の測定は、精製抗原が正常血清との反応で補体結合反応を示さず、50倍、100倍および500倍稀釈免疫血清と作用させるとき、補体結合反応陽性であった抗原稀釈液に含まれる抗原量を1単位とした。この成績から、

精製抗原液の抗原価は毎常40単位前後であつた。

ii) 補体: あらかじめ色素試験で完全に陰性であることを確認したモルモット血清を使用した。

iii) 感作赤血球: 抗緬羊赤血球兎血清の3単位で感作した3%の緬羊赤血球を用いた。

b) 実験方法

アメリカ陸軍々医学校法にしたがつた。すなわち、56°C, 30分間加熱した被検血清を生理的食塩水で倍々稀釈をおこない、それぞれその 0.25ml を小試験管にとる。ついて抗原 0.25ml (4単位), 補体 0.5ml (2単位) を順次稀釈系列に加えたのち、37°C で60分間作用させる。作用後、3%, 3単位の感作赤血球浮遊液 0.5ml を加え、37°C, 30分間作用させたのち、溶血の度合を判定した。判定は、感作赤血球対照、補体対照および既知陽性血清対照において所期の結果が得られた場合、中等度以上の溶血を示す最大稀釈倍数をもつて抗体価とした。

III. 実験成績

i) 色素試験と補体結合反応の相関について

色素試験と補体結合反応の成績から、陽性を示した血清濃度の頻度を記載した成績は、第1表に示すとおりであつて、この結果から、色素試験と補体結合反応の相関

第1表 色素試験および補体結合反応陽性例の頻度

C.F.T.陽性 D.T. 陽性	1:4 以下	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	計
1: 2以下	451	0	0	0	0	0	451
1: 4	23	5	1	0	0	0	29
1: 16	18	3	3	2	0	0	26
1: 64	1	1	2	1	1	0	6
1: 256	0	0	0	0	0	0	0
計	493	9	6	3	1	0	512

係数を求めると $r=+0.612$ ($\alpha=0.01$ で有意) となり、この両反応の間には有意の正相関を認めることができる。

しかし、これらの反応でトキソプラズマに対する特異的抗体の証明に対する陽性の限界を、どの血清稀釈で示すかについては、なお意見の一致を認められないが、Sabin, 常松等にしたがつて、色素試験では16倍以上、補体結合反応では8倍以上陽性である場合を特異的抗体の出現による反応と判定すると、総数 512例中、色素試験では32例 (6.2%), 補体結合反応では19例 (3.7%) が陽性であり、両反応ともに陽性を示すものは、13例 (2.5%) であつた。

ii) 性別による陽性率について

性別による陽性例の頻度は、第2表に示すとおりであつて、抗体の保有率は、両反応ともに性別による差を示していない。

第2表 性別による陽性率

性別	例数	D. T. 陽性		C. F. T. 陽性		両試験陽性	
		例数	%	例数	%	例数	%
男	407	25	6.1	16	3.9	10	2.4
女	105	7	6.6	3	2.8	3	2.8

iii) 年令別による陽性率について

年令別による陽性率の頻度は、第3表に示すとおりであつて、色素試験、補体結合反応ともに年令別陽性率の間に有意の差を認めることはできなかった。

第3表 年令別による陽性率

年令	例数	D. T. 陽性		C. F. T. 陽性		両試験陽性	
		例数	%	例数	%	例数	%
10~19	67	4	5.9	2	2.9	2	2.9
20~29	142	8	5.6	6	4.2	4	2.8
30~39	182	11	6.0	5	2.7	4	2.1
40~49	81	6	7.4	4	4.9	2	2.4
50~	40	3	7.5	2	5.0	1	2.5

さらに、性別と年令別による陽性例の頻度は第4、5表に示すとおりであつて、男女ともに年令別陽性率の発現に有意な差を認めることができなかった。

iv) 地域別陽性率について

東京都内、都下、埼玉県、神奈川県、千葉県在住者の陽性率を求めた。その成績は第6表に示すとおりである。東京都内 241例は、ほとんどすべての区にまたがついて

第4表 男性の年令別陽性率

年令	例数	D. T. 陽性		C. F. T. 陽性		両試験陽性	
		例数	%	例数	%	例数	%
10~19	43	4	9.3	2	4.6	2	4.6
20~29	107	6	5.6	4	3.7	2	1.8
30~39	150	8	5.3	4	2.6	3	2.0
40~49	67	4	5.9	4	5.9	2	2.9
50~	40	3	7.5	2	5.0	1	2.5
計	407	25	6.1	16	3.9	10	2.4

第5表 女性の年令別陽性率

年令	例数	D. T. 陽性		C. F. T. 陽性		両試験陽性	
		例数	%	例数	%	例数	%
10~19	24	0	0	0	0	0	0
20~29	35	2	5.7	2	5.7	2	5.7
30~39	32	3	9.3	1	3.1	1	3.1
40~49	14	2	14.2	0	0	0	0
50~	0	0	0	0	0	0	0
計	105	7	6.6	3	2.8	3	2.8

るが、特に東部、西北部在住者が多く、都下 112例は大部分が三多摩在住の人々である。埼玉県92例はその半数以上が西部農村地方の人々であり、残りは川口市、浦和市在住者であつた。神奈川県48例の大半は川崎市、横浜市の人であり、千葉県10例はすべて市川市、船橋市の在住者であつた。この成績について検定した結果からは、地域別陽性率の発現には有意の差を認めることができなかった。

第6表 地域別陽性率

地域名	例数	色素試験陽性		補体結合反応陽性		両試験陽性	
		例数	%	例数	%	例数	%
都 内	241	13	5.3	7	2.9	5	2.0
都 下	112	8	7.1	5	4.4	3	2.6
埼 玉	92	8	8.6	6	6.5	4	4.3
神奈川	48	2	4.1	1	2.0	1	2.0
千 葉	18	1	5.5	0	0	0	0
その他	1	0	0	0	0	0	0

IV. 考 察

トキソプラズマ症の診断に対して行われる色素試験および補体結合反応の特異性に関して行われた現在までの報告によれば、色素試験はきわめて特異的であつて、トキソプラズマ症以外の疾患の患者血清で8倍以上陽性に出現する例は1例もない。そして、Sabin and Feldmann は、10倍以上色素試験陽性血清では中和試験もまた陽性であつたと報告し、また、4倍陽性程度の抗体価を示した場合でもトキソプラズマ虫体が検出された例もあつて、色素試験で16倍以上の血清稀釈で陽性を示した場合を抗体陽性として採用すると、色素試験は、きわめて高い特異性をもつてトキソプラズマ症の診断に利用することができる。

一方、補体結合反応の施行に当つては、その抗原の作

製法になお多くの問題があるようである。Warren and Russ¹¹⁾ は、孵化鶏卵漿尿膜にトキソプラズマを接種して抗原を作製する方法を推奨している。われわれがこの実験に使用した補体結合抗原は、トキソプラズマを腹腔内に接種したマウスの腹腔液から、凍結融解および高速遠心法によつて作製したものである。この点において、補体結合抗原の特異性について、なお若干の問題があるが、マウス腹腔液から抗原を作製した場合でも、8倍以上を陽性として判定するとかなりの特異性を示すものであるとされている。

このような、色素試験あるいは補体結合反応の特異性に関しては、上述のような知見が述べられているが、この両者に陽性である血清は、きわめて顕著な特異性を有するものと判定することができる。

一方、色素試験および補体結合に關与する抗体は、その性質がそれぞれ異なつたものであると思われ、色素試験抗体はトキソプラズマ感染後2～4週間後から抗体価が上昇しはじめ、数年間ほぼ同一の抗体価を維持し、その後次第に低下して、16～32倍の抗体価が5～10数年間持続するものといわれている。これに対して、補体結合抗体は感染後1カ月以上を経過したのち上昇し、数年で陰性になるといわれる¹²⁾。このような知見からみると、色素試験陽性率は補体結合陽性率を上回ることが予測され、われわれの実験結果もまたこのような知見に一致している。

このような概念を基礎にして、色素試験および補体結合反応による抗体保有率について集団検査をおこなつた成績によると、欧米諸国での成績は、色素試験で10～30%以上の陽性率を示しているものが多い。本邦における成績では、長谷川、常松等が、432例の被検材料中、色素試験陽性率 7.2%，補体結合反応陽性率 3.9%，両反応陽性率 2.2%という成績を報告し、藤陵は、56名の被検材料で色素試験陽性率 6.6%，宮崎は、48名の色素試験で 4.2%という陽性率を報告している¹³⁾。

著者等が試みた 512 名の成績では、色素試験で 6.2%，補体結合反応で 3.7%，両反応陽性率が 2.5%であつて、ほぼ本邦において先人がおこなつた成績と一致するが、欧米での成績に比してかなり陽性率が低い。しかし、このような陽性率は、本邦においてもトキソプラズマによる感染がかなり高率に存在していることを示すものである。

しかも、色素試験および補体結合反応による陽性率がともに正相関を示していることは、その陽性率がどの試験をおこなつた場合でも、トキソプラズマによる感染に

對する有力な診断法を提供するものである。

このような陽性例について、性別、年齢別、地域別に調査した試験によれば、これらの分類によつては有意な差を認めることはできなかつた。このことは、トキソプラズマの感染経路についてきわめて重要な見解を示唆するものと思われる。すなわち、少なくとも10才以上になると、性、地域に拘らず、トキソプラズマに対する抗体の保有率に有意な差を認めえないことは、トキソプラズマによる感染が少なくとも10才以下の年齢でおこなわれたことを推察させるものであり、トキソプラズマ感染経路に対して、多くの場合母体での胎盤感染が重要視されている現在では、この成績はまたある程度、このような見解を支持するものであろう。

殊に、最近著者等は、脳水腫を有した生後48日の新生児が、典型的なトキソプラズマ症で死亡した例を経験した。しかも、生後における感染経路はまったく不明であつた。しかし、その実母がトキソプラスミン反応陽性であつたことは、トキソプラスミン反応の特異性についてはまだ多くの疑問はあるが、少なくともトキソプラズマによる感染を受けたことがあるという疑を抱かせるものである。

したがつて、著者等がおこなつた成績にあるような陽性者の中には、現在なおトキソプラズマの感染を受けているものがあることが予想され、トキソプラズマによる感染が公衆衛生的に、また、殊に母子衛生上きわめて重要な問題を提供するものであろう。

現在、このトキソプラズマの感染経路についてはなお実験を続行中であり、前記のような例についてはさらに詳細にその経過を追求することによつて、トキソプラズマの疫學に關してより詳細な知見を報告したい。

文 献

- 1) Nicolle, C. and Manceaux, L.: Arch. Inst. Pasteur, 2: 97, 1909.
- 2) Wolf, A., Cowen, D. and Paige, B. H.: Amer. J. Path., 15: 657, 1939.
- 3) 宮川米次他: 診療の実際, 5: 63, 1954.
- 4) 宮崎一郎, 平岡輝明: 日本医事新報, 1722号: 38, 1956.
- 5) 瀬長良三郎, 田崎光: 日本医事新報, 1673号: 23, 1955.
- 6) 松林久吉, 瀬長良三郎, 田崎光他: 日本医事新報 1674号: 23, 1955.
- 7) Sabin, A. B. and Feldmann, H. A.: Science, 108: 660, 1948.
- 8) Westphal, A.: Ztschr. Tropenmed. u. Parasit., 3: 72, 1951.

- 9) Sabin, A. B. : Pediatrics, 4 : 443, 1949.
- 10) 長谷川秀治, 常松之典, 田中信男 : 日本細菌学雑誌, 9 : 455, 1954.
- 11) Warren, J. and Russ, S. B. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 67 : 85, 1948.
- 12) Sabin, A. B. : J. A. M. A., 150 : 1063, 1952.
- 13) 松林久吉 : 北里メディカルニュース, No. 34 : 1, 1957.

(受付 : 1957 年 12 月 10 日)