ト キ ソ プ ラ ス マ の 研 究

I. 普通人及び動物のトキソプラズマ抗体保有率について

長谷川秀治 常松 之典 田中 信男

東京大学伝染病研究所

〔受付: 4月3日 1954年〕

トキソプラズマ症は近年にいたつて異常な注目を浴びるにいたつた原虫性の人獣感染症である。病原体 *Toxoplasma gondii* は “obligatory intracellular parasite” (Sabin & Olitsky)¹⁾ であつて、ほとんどすべての哺乳類 (特に齧歯類) に自然感染、実験的感染がおこり、さらに鳥類 (特に鳩) も感染するなど、極めて広い感染スペクトルを有することが特徴である。近年欧米では人のトキソプラズマ症も研究が進み、症例も増加の一途を辿っている併りではなく、広般な不顕性感染が成立している状況が明かにされてきた。

我国においては平戸²⁾ が狸、浜田³⁾ が犬においてトキソプラズマ症を認めた外には、研究らしい研究もなく、人の症例報告の確実な例がないばかりか、疫学的分野も全般的に未開の状態のまま残されている。

我々は1952年に A. B. Sabin より RH 株の分与を受けて以来、トキソプラズマの研究を続けているが、研究の第一段階としてトキソプラズマの日本における存在を血清学的に追求すると共に、血清学的診断における基礎的資料をうることに努めた。本研究は尙お継続中であるが、ここにその一部を報告する。

実験材料と方法

抗体の定量は色素試験 (dye-test) と補結試験によつて行つた。

(1) 色素試験

Sabin & Feldman (1948)⁴⁾ の方法にほぼ従つた。抗体 (Cytoplasm-modifying Antibody) と Accessory factor の共同作用によつて、原虫の原形質が変性してメチレン青に非染色となる現象を応用した独得の試験法である。

(i) 被検血清 (生か非働化) を食塩水で2倍階段希釈し、0.1 ml ずつ小試験管に分注。

(ii) 腹腔内感染後3日目のマウスの腹腔内に注射器を用いて2 ml の食塩水を注入し、逆に引いて採つた腹腔洗滌液を直ちに3,000 r.p.m. 10分間遠沈する。ドラ

イアイスに氷らせて保存した新鮮人血清 (抗体のないことを確かめたもの — Accessory factor 用) をとかし、500倍のヘパリンを10%に加える。これに上記の沈澱を再浮游する。マウス1匹につき1~1.5 ml。

(iii) 被検血清希釈液に (ii) のトキソプラズマ浮游液を0.1 ml ずつ分注し、よく混ぜた後、37°C に保存。

(iv) 1時間後氷水で冷して反応を止め、次の処方のアルカリ性メチレン青を0.05 ml ずつ加える。

アルカリ性メチレン青

{ メチレン青アルコール飽和溶液 1
炭酸塩—硼酸塩緩衝液 (pH 11) 3

メチレン青は Bayer の “methylenblau medicinate” 緩衝液は9.73 ml の0.53%炭酸ソーダ + 0.27 ml の1.91%硼酸ソーダ ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)。

混合後その日の内に使用。

(v) 2~3分後その1滴ずつをのせガラスの上にとり、かぶせガラスをかけて、500倍または油浸で鏡検。

(vi) 対照として食塩水対照と陽性血清対照をおく。

(vii) 判定は食塩水対照において非染色性トキソプラズマが10%以内であり、陽性血清対照で所定の力価より1管以上ずれないという条件で、50%以上の原虫が非染色性を示す管の被検血清の最高希釈を以て抗体価とすることにした。

被検血清の希釈はすくなくとも8倍、32倍、128倍の3管をおき、陽性を示した場合には更に2倍階段で細かに分けて試験を行つた。

(2) 補体結合試験

溶血素単位、補体単位、抗原単位の測定法は実習提要記載⁵⁾ のアメリカ陸軍軍医学校法に従つた。補体用のモ

HASEGAWA Shuji, TSUNEMATSU Yukinori & TANAKA Nobuo: Incidence of antibodies for *Toxoplasma* among men and some domestic animals. Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo., — Jap. J. of Bact., 9(6), 455-458, 1954.

ルモットは予め色素試験で抗体のないことを確かめておく。本試験には非働化した被検血清の2倍階段稀釈液0.25 mlに抗原0.25 ml(2単位), 補体0.5 ml(2 exact units)を加えよく混ぜて37°Cに1時間おき, これに感作血球液(溶血素3単位)0.5 mlずつを加え, 更に37°Cに30分おいた後, 結果を判定した。対照としては血清対照, 血球対照, 補体対照, 陽性血清対照をおき対照において異状がない時の溶血の程度に従って4, 3, 2, 1, 0の記載をし, 2以上を示す管の最高血清稀釈倍数を以て抗体価とした。

抗原の調製

Westphal⁶⁾の抗原調製法を一部変更し, 更にSabin⁷⁾の超遠心法を加味した。

(i) 感染4日目のマウス腹腔内に2 ml ずつ3.8%クエン酸ソーダ(または3.8%のクエン酸ソーダを10%に加えた食塩水)を注射器で注入, 逆に引いて採った洗滌液をプールする。100 疋。

(ii) ガーゼ濾過後, 3,000 r.p.m. 10~15分。

(iii) 沈澱を3.8%クエン酸ソーダ液20 mlに浮游, 超音波(Kus-500型一久保田製作所)1分間照射して, 宿主細胞成分を破壊すると同時に集塊として浮上せしめる。

(iv) ガーゼ濾過後, 3,000 r.p.m. 10~15分。

(v) 沈澱を食塩水60 mlに浮游し, 超音波(2.2 KV)20分照射してトキソプラスマを完全に破壊する。

(vi) 5%カルボールを6.3 ml 加え, 氷室に1週間保存。

(vii) Spinco で21,000 r.p.m. 40分間超遠心する。

(viii) 上清を56°C, 18時間加温する。

(ix) 食塩水を16.7 cc 加え, これを抗原原液として氷室に保存する。100 疋より83 ml。

実験1 普通人のトキソプラスマ抗体保有率について

483例の被検血清は健康者, 妊婦, 内科, 外科, その他各科の外来及び入院患者より得られたものである。採取地は東京(港区, 板橋区), 埼玉県越谷町, 千葉県市川市, 静岡県清水, 吉原, 焼津の三市, 福岡市等に及んでいる。臨床的にトキソプラスマ症らしい患者は含まれていないので, これを以て一般日本人のサンプルとして考慮しても大過ないと思われる。

色素試験を縦軸に補結試験を横軸にして, 抗体価にしたがって分類した結果が第1表である。

集団検査において両反応の陽性の限界をどこに設定するかについては未だ定説がない。色素試験についてはこゝではFrenkel⁸⁾の意見に従って16倍を限界とし, ま

第1表 普通人のトキソプラスマ抗体保有状況

		補体結合試験						
		>1:2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	?
色 素 試 験	>1:8	329	39	21	5	1		13
	1:8	20	12	4	2			
	1:16	5	3	4	3	1		3
	1:32	3		2	2	1		2
	1:64	1		1		1		
	1:128					1	1	

た補結試験については抗原の性質上若干の非特異的反応があることと, 従来の臨床例の抗体価の幅を考慮に入れて8倍を以て限界として, 483例についての陽性率を算出した。その結果は陰性432例(89.4%), 色素試験陽性35例(7.2%), 補結試験陽性19例(3.9%), 両試験陽性11例(2.2%)であつた。

上記の例中比較的高い抗体価を示したもののみを, 拾い出してみよう(第2表)

第2表 抗体保有者の一覽表

色素試験 1:32 補結試験 1:62 以上

検査番号	年齢(年)	性	診 断	色素試験	補結試験
81	6	♀	肺 炎	1:128	1:32
348	23	♀	胸 痛	1:128	1:16
460	13	♂	肺 門 リンパ腺炎	1:128	1:16
89	34	♀	肺 結 核	1:64	1:16
290	9	♂	小 頭 症	1:32	1:16
312	?	♂	肺 結 核	1:32	1:8
349	29	♀	〃	1:32	1:8
325	39	♂	〃	1:64	1:4
453	11	♀	肺 門 リンパ腺炎	1:64	0
121	33	♀	?	1:16	1:16
115	48	♀	貧 血	0	1:16

第2表を症例別にみると肺炎1, 胸痛1, 肺門リンパ腺炎2, 肺結核4, 小頭症1, 貧血1, 不明1であつて小頭症以外の患者においては血清学的に, 症候論的に現症とトキソプラスマ感染との間に直接的な関連を需めることはできなかつた。

年齢別, 地域別の抗体分布の統計は必要であり興味を持たれるところでもあるが, 年齢別については20~40歳の人が多数を占めていた関係上, 少数の陽性者では有意の統計的数値を導くことが不可能であつた。地域別については第3表を参照されたい。欧米においては一般に都市よりも郡部に多数の陽性者を見出しているのである

が、本実験の範囲では殆んど差がないと云つてもよいであらう。

第3表 地域別についての陽性率

地 域	総数	色 素 試験陽性		補 結 試験陽性		両試験陽性	
		例数	率%	例数	率%	例数	率%
東 京	216	17	7.8	6	2.7	3	1.3
東京近郊	132	7	5.3	5	3.9	4	3.3
静 岡	124	11	8.8	7	5.6	4	3.2
福 島	11	0	0	1	—	0	0

実験 II. 福島市における大動物の抗体保有率について

福島市屠畜場において採取した牛、馬、豚、緬羊、山羊の血清について色素試験を行つた結果は第4表の通りである。

第4表 福島地区の大動物の抗体保有状況

	総数	>1:8	1:8	1:16	1:32	1:64
牛	35	33	1	1		
馬	18	18				
豚	31	27	4			
緬羊	17	13	1	2	1	
山羊	13	8		2	2	1

牛については年齢的には1ヵ月(7頭)から10歳(3頭)の間にある35例である。10歳1頭16倍、6歳1頭8倍のほかすべて8倍以下であつた。

馬は2歳(2頭)から13歳(2頭)の間にあり、すべて8倍以下であつた。

牛馬は売買によつて移動するので、出生地、居住地は必ずしも福島であるとは限らない。

豚31頭の内訳は1歳1頭、2歳27頭、不明3頭であつた。8倍陽性のもの4頭について、福島市北方の平田村出荷の3頭が3頭とも陽性であつたことは、特に注目をひく事実であつた。

緬山羊は2歳3歳が大多数であり、牛、馬、豚にくらべると著しく陽性率が増し、16倍を陽性限界にとると緬羊3例(17.6%)、山羊5例(38.4%)に及んだ。

豚、緬山羊はすべて福島市周辺の町村の産であつて、平均年齢が若いにもかかわらず、高い陽性率を示したことは、不顕性感染が比較的広範囲にわたつて成立していることを想定せしめるものである。

考 察

我々は日本人一般のサンプルとして取扱つて、はゞ誤

りがないと考えられる483例の血清について、トキソプラズマ抗体の有無を検索した結果、色素試験と補結試験の陽性限界をそれぞれ16倍、8倍にとつた場合、両試験陰性432例(89.4%)、色素試験陽性35例(7.2%)、補結試験陽性19例(3.9%)、両試験陽性11例(2.2%)の成績を得た。

Sabin et al¹⁰⁾によれば、色素試験についてはトキソプラズマ感染後10~20日の内に早くも250~4000倍の抗体価に達し、その値は数年持続した後徐々に低下し、5~6年後にも尙お32~64倍の値を示す例が多いという。補結試験についてはこれに比べると抗体の出現が遅れ(恐らく1ヵ月以上)、抗体価は32~512倍に達し、比較的長期間持続はするが、色素試験よりも早期(4~5年)に低下する傾向にある。今回の被検例について見れば色素試験では128倍(3例)、補結試験では32倍(1例)が最高であつて、陽性者といつても一般に低い抗体価を呈するもの伴りであつたから、現在活動性のトキソプラズマ症を有する者の存在は極めて可能性がすくないと考えることができる。臨床的にも現在症とトキソプラズマ感染を結び付ける何の所見もなかつたことは前述の通りである。

低い抗体価の意義については一般感染症の場合と同様に不明の点がすくなくない。トキソプラズマについては血清の特異性の問題が他の感染症との関連において充分究明されていない憾みが残されているが、自然界の動物からのトキソプラズマ分離報告、人の症例報告乃至は偶然に病理学的検査において原虫を発見したという報告が累積するに及んで、低い抗体価の説明をトキソプラズマの感染株にその不顕性感染に帰せんとする考えが次第に強くなりつつある。

従来諸外国における一般人検査の報告では、色素試験、或いはこれとFrenkelのToxoplasminによる皮膚反応との組合せが多いのであるが、我々は上記の問題に資するために特に色素試験と補結試験を組合せて行つたのである。両試験は共に抗体を定量できる上に、それに関与する抗体が異つてゐるものである。その結果は第1表の数字の分布が示すように、抗原の性質上補結試験で若干の非特異性反応を見る以外は全体的に両試験の相関性が明瞭に認められた。殊に両試験の消長の時期的ずれを前提的に考慮に入れるならば、抗体価の比較的高い領域において相関性が認められるということは、両試験の特異性を実証すると同時に、抗体がトキソプラズマ感染のために産生されたことを強く示唆するものであらう。

諸外国の一般人検査の報告の主なるものを挙げると、

米国では Pittsburgh (Pennsylvania) の住民について色素試験陽性率 (16 倍以上) 0~4 歳 5%, 5~9 歳 10% 10~29 歳 25~30%, 30~39 歳 45%, 40~60 歳 65~70% (Weinman),⁸⁾ また Sabin¹⁰⁾ が地元の Cincinnati の住民について皮内反応陽性者, 0~4 歳 0%, 5~9 歳 5%, 10~19 歳 14%, 20~29 歳 20%, 30~39 歳 50%, 40~49 歳 65%, 50~81 歳 63% を得ている。ドイツでは Mohr¹¹⁾ によると Bonn 市で Piekarski が色素試験陽性率 10~15%, 同じく群部で 26%, また Westphal & Mohr が Hamburg で 15~20% の数値をえている。オーストリアでは Thalhammer¹²⁾ がウィーンの住民で色素試験及び皮内反応で平均 46.1%, またスウェーデンでは Harboe¹³⁾ が 1600 例について色素試験 40 倍以上 7%, 200 倍以上 1.6% の統計を出している。イギリス, イタリア, フランス, 等の統計もまた陽性率が高い。統計の計数の出し方が或る程度異なるし, また色素試験においては用いたメチレン青によつて抗体価のずれがおきるから¹¹⁾ 正確な比較は困難であるが, 我々の統計はこれ等欧米各国の数値に比べて少なくとも中等量以上の抗体を有するものの比率はかなり低位にあるらしいことが想像される。これに関連して微量の抗体測定を行つた我々の経験によれば, 色素試験が血清原液で陰性のものは平均 60~70% であり, 皮膚反応陽性者も平均 20~30% に過ぎなかつたことを附記しておきたい。これについては別の報告で詳しく述べる予定である。

大動物については福島市屠畜場で得た血清について色素試験を行つたのみであるが, 牛, 馬は殆んど陰性であること, 豚, 緬山羊は比較的高率に抗体を保有することが証明された。

以上の考察のしめくくりとして, 我々は (1) 色素試験, 補体結合試験は共に特異性が強い, (2) 比較的高い抗体価はトキソプラズマの感染の結果もたらされたものである, (3) 日本においても欧米にくらべ低率ではあるが, 不顕性感染が広範囲に人及び動物の間にひろがつている, ということを主張したい。

結 論

(1) 一般人 483 名について色素試験 (dye-test) と補体結合試験により抗体保有率を検査した結果, 陰性者 432 名 (89.4%), 色素試験陽性者 (16 倍以上) 35 名 (7.2%), 補体結合試験陽性者 (8 倍以上) 19 名 (3.9%) 両試験陽性者 11 名 (2.2%) の結果を得た。

(2) 地域別陽性率については陰性者, 色素試験陽性者, 補体結合陽性者, 両試験陽性者の順序で, 東京都 (216 名) 90.7%, 7.8%, 2.7%, 1.3%, 埼玉県越谷

町及び千葉県市川市 (132 名) 93.9%, 5.3%, 3.9%, 3.3% 静岡県吉原市, 清水市, 焼津市 (124 名) 88.7%, 8.8%, 5.6%, 3.2% で著差を認めなかつた。

(3) 福島市周辺の牛 (35 頭), 馬 (18 頭), 豚 (31 頭) 緬羊 (17 頭), 山羊 (13 頭) について色素試験により抗体の保有率を検査したところ, 牛 2.8%, 馬 0%, 豚 0% 緬羊 17.6%, 山羊 38.4% の陽性率をえた。

(4) 色素試験, 補体結合試験の特異性について論議し, 上記の数値より日本にもトキソプラズマの不顕性感染が人及び動物の間に広範囲にひろがつていることを推論した。

(5) 諸外国の統計との比較を行つた。

本研究に際しては, 材料の蒐集について日本大学田教授, 吉原病院長有橋博士, 協立焼津病院長宮下博士, 清水厚生病院長渡会博士, 化学療法研究所長高橋博士, 公衆衛生院金子博士, 福島県大原病院大原博士, また伝染病研究所の各研究部, 臨床研究部の各位の絶大な御助力を賜つた。茲に厚く感謝の意を表する。

(本研究は昭 28 年度文部省科学研究費に負うところが多い)

文 献

- 1) Sabin, A. B. & Olitsky, P. K.: Science, 85, 336~338, 1937.
- 2) 平戸勝七: 日本獣医学雑誌, 1, 544~552, 昭 14 (1939)
- 3) 浜田輔一: 日本獣医師会雑誌, 4, 339~342, 昭 26 (1951)
- 4) Sabin, A. B. & Feldman, H. A.: Science, 108 660~663, 1948.
- 5) 伝染病研究所学会友会編: 細菌学実習提要, 改版, 丸善, 昭 26 (1951) p. 283~287, 399~400.
- 6) Westphal, A.: Z. Tropenmed. Parasitol., 2 191~204, 1951.
- 7) Sabin, A. B.: Pediatrics, 4, 443~453, 1949.
- 8) Frenkel より Weinman えの私信: Weinman, D.: Annual Rev Microbiology, 5, 281~298, 1952.
- 9) Sabin, A. B., Eichenwald, H., Feldman, H. A., & Jacobs, L.: J.A.M.A., 150, 1063~1069, 1952.
- 10) Sabin, A. B.: Am. Academy of Ophthalmology & Otolaryngology, Transaction Jan-Feb., 1950.
- 11) Mohr, L. & Staehelin: Handbuch d. Inneren Medizin, 版, Springer-Verlag, 1952 の pp 730 ~769 (Mohr, W が Toxoplasmosis を執筆分担)
- 12) Thalhammer, O.: Wien Klin. Wochenschr., 63, 565~569, 1951.
- 13) Harboe, A.: Acta Path. Microb. Scand., Suppl. 93, 325~321, 1952.