

トキソプラズマ症の血清学的診断法及び 長崎市における疫学的検討

鈴木 寛, 土橋 賢治, 宮崎 昭行,
中島 ひとみ, 松本 慶蔵

長崎大学熱帯医学研究所臨床部門

Serological Diagnosis and Epidemiological Study of Toxoplasmosis in Nagasaki City
Hiroshi SUZUKI, Kenji TSUCHIHASHI, Teruyuki MIYAZAKI, Hitomi NAKASHIMA and
Keizo MATSUMOTO

Department of Internal Medicine, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

Abstract: We studied the sensitivity and speciality of indirect hemagglutination test (IHA test) in serological diagnosis of toxoplasmosis by means of dye test which was the standard method. IHA test (HA-KW: KYOWA, Co) was commercially available in Japan. We measured 190 serum specimens with IHA titer and dye test (Fig. 1, Fig. 2). Coincidence rate was 89.5% and in uncoincident specimens (dye test(+), IHA test(-)) were 95%. And we found that IHA test was inferior to dye test and that there is a tendency to overlook the positive cases which have low titer. However, IHA test was more useful than dye test in clinical examination. We examined 2046 cases in Nagasaki city with IHA test since 1978 to 1981. Positive rate of pregnant women in Nagasaki city was $122/1893=6.4\%$. And it was suspected that about 0.2% of pregnant women were newly infected with toxoplasmosis every year.

We investigated the transition of IHA titer in 77 cases on 180 specimens in the passage of time. Four cases gave transition more than 4 times, but in pair re-examination all cases gave transition within 4 times. We compared IHA positive rate in various objects. Healthy pregnant women: $136/1936=7.0\%$, pregnant women having history of abnormal delivery: $6/37=16.2\%$, ophthalmologic patients: $11/34=32.4\%$, patients of end stage: $4/17=24.0\%$, lymphadenitis: $3/3=100\%$.

Key words: Toxoplasmosis, Serological Diagnosis, Dye test, IHA test, Epidemiological study.

Tropical Medicine, 25(2), 83-89, June, 1983

はじめに

今日トキソプラズマ (Tp) 症の診断には一般に血清学的診断法が広く用いられている。日本における健康成人の抗体陽性率は10~20%と報告されているが(常松・1967) 大部分は不顕性感染で臨床上問題無く経過していることが多い。しかし、時々 Tp 感染によると思われる網脈絡膜炎・リンパ節炎等が見られ、特に妊婦においては、流・死産・奇形児出産・新生児の先天性感染が問題となっている。(松本, 1981) しかしながら我国においては本虫体の病原性と本症の血清学的診断法に関して十分に解明されているとは言い難く研究報告も少ない。そこで我々は現在臨床検査法として一般に広く用いられている間接赤血球凝集法 (IHA 法) に関して、その特異性及び感度を Dye test を用いて検討し、さらに長崎市における本症の罹患状況を調べ以下の成績を得たので報告する。

対象及び方法

昭和53年から昭和56年の4年間に当科を受診もしくは入院した患者と、昭和54年9月から昭和56年6月まで長崎市医師会より検査を依頼された症例、合計2046名について検討した。その内訳は妊婦1973名、新生児19名、網脈絡膜炎等の眼底病変をきたした眼疾患患者34名、当科に入院死亡した末期患者17名、リンパ節炎患者3名で、各症例より血清を経時的に採取し -20°C に凍結保存して適時研究に用いた。Tp 抗体価は Dye test 及び間接赤血球凝集法 (IHA 法) により測定した。

Dye test: 小林の変法(小林, 1969)に従った。つまり alserver 液を用いて採血後血漿を得、感染マウス腹腔洗浄液より得た Tp 原虫 RH 株に 37°C 1時間反応させる。その後アルカリ性メチレン青にて90%以上の虫体が青染した者の血漿を accessory factor (AF) として用いた。80%濃度の AF 液に1視野あたり30~50匹となるように虫体数を調節した。その0.1ml を4倍より1024倍の5段階に4倍希釈した被検血清0.1mlに加え 37°C ・1時間反応させる。その後アルカリ性メチレン青0.1mlを加え、虫体100匹中非染虫体が50匹以上見られた血清最高希釈倍数を、その血清抗体価とした。

IHA test: トキソ HA-KW (協和) を用いた。

マイクロトレイを良く洗浄乾燥後25 μl 用ドロップパーで希釈液を第1穴に4滴、第2穴からは一滴ずつ滴下した後、被検血清を第1穴にマイクロピペットにて25 μl 加え、よく混合して第1穴から第2穴に移す。この操作をくり返し2倍希釈系列をつくる。非感作血球を第2穴に75 μl 滴下、第3穴より感作血球液を75 μl 滴下して十分混和した後、少くとも2時間は室温に静置して判定する。最終的には第2穴は非感作血球対照となり第3穴より80倍から2560倍までの2倍希釈系列となる。抗体が存在すれば感作血球による凝集像を呈し、その最大血清希釈倍数をもって IHA 抗体価とした。

成績

1. Dye test と IHA test の特異性及び相関性に関する検討

無作為に抽出した190検体に対する各法の抗体分布成績を Fig. 1 に示す。その分布は各々2峰性で、この成績より Dye test 16倍以上・IHA test で160倍以上の抗体価を陽性と判定することとした。それぞれの境界抗体価 (Dye test 4 \times , IHA test 80 \times) に分布する検体は、Dye test 0%, IHA test 7.5%で、IHA test に比して Dye test の特異性が高いことが示された。

Fig. 2 に Dye test と IHA test の相関性を示した。両法の一一致率は89.5%と高く不一致率は10.5%であった。不一致例の95%は Dye test 陽性・IHA test 陰性であり、Dye test の感度が秀れており IHA 法のみでは抗体陽性例を見落す例があることが知られた。

2. 長崎市における妊婦の Tp 抗体陽性率

長崎市医師会より検査依頼された血清2000検体について、その抗体価分布を見た。(Table 1) 2000検体中 IHA 抗体価160倍以上の陽性検体は207検体で10.3%に及んだ。大部分は妊婦血清であるが経時的に抗体価を測定した症例も含まれているため、最終的には1893名の妊婦を対象とした。1症例1検体として検討を行ったところ IHA 抗体価160倍以上の陽性者は、122名・6.4%であることが知られた。次に年令別における Tp⁺抗体陽性率を調べた。先の1893名中年令のわかった1307名について、17~20才・21~25才・26~30才・31~35才・36~41才の各年令群にわけて、その抗体陽性率を見た。(Table 2)

(n=190)

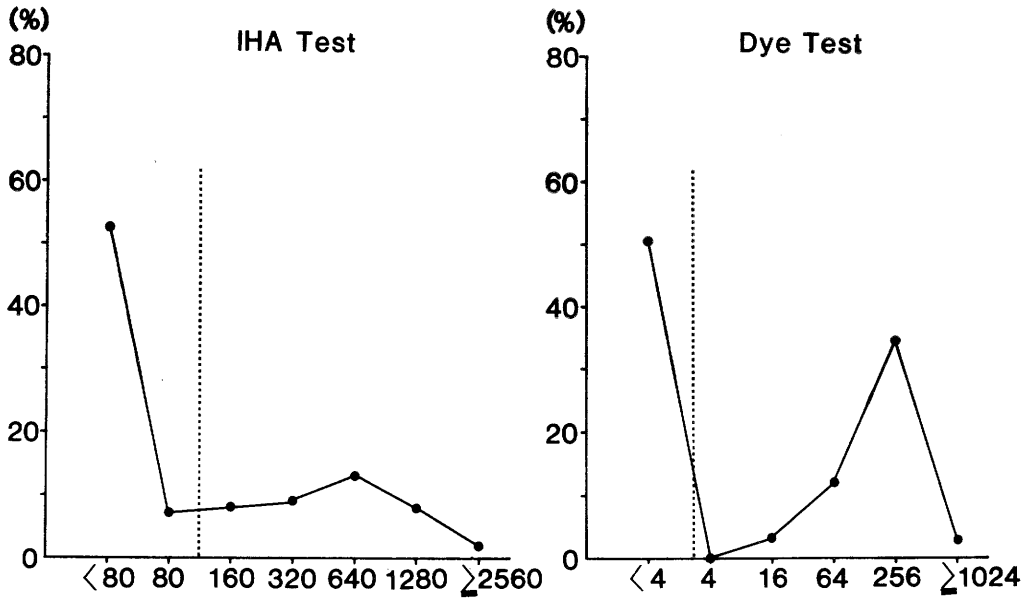


Fig. 1 Antibody distribution of *Toxoplasma gondii* by IHA test & Dye test.

Table. 1 Distribution of *Toxoplasma* antibody titer in 2000 serum specimens

Antibody titer	≥80×	160×	320×	640×	1280×	2560×≥	Total
Number of specimens	1793	68	46	59	17	17	2000
Ratio of distributon	89.7%	3.4%	2.3%	3.0%	0.9%	0.9%	100%

Table. 2 Positive ratio of *Toxoplasma* antibody in each age distribution of pregnant living in Nagasaki city

age distribution	17-20	21-25	26-30	31-35	36-41	Total
positive number /all number	2/32	20/382	44/641	16/252	5/36	87/1307
positive ratio	6.3%	5.2%	6.9%	7.4%	13.9%	6.7%

Table. 3 Fluctuation of *Toxoplasma* antibody titer measured separately

Rate of fluctuation	0×	2×	4×	8×	16×	32×	64×	128×	256×	Total
Number of purson	29	24	20	2	0	1	0	0	1	77

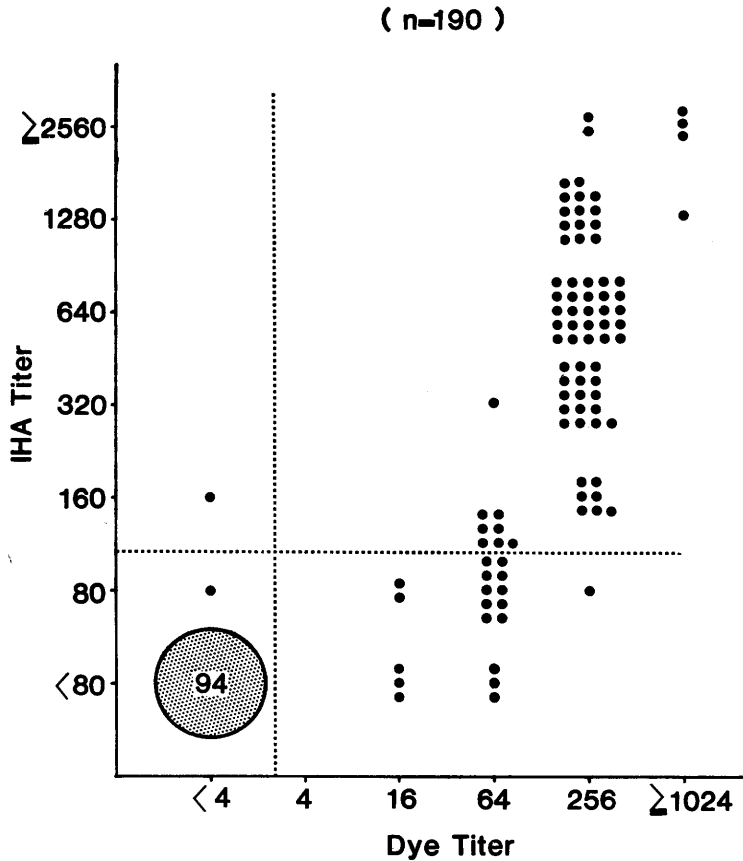


Fig. 2 Correlation between IHA test and Dye test.

200人以上の妊婦が分布する21~35才の区分での陽性率をみると、年を取るにつれて5.2%から7.4%と抗体陽性率が高くなる傾向が見られた。この成績から単純に推測すると10年間に5.2%から7.4%、2.2%の抗体陽性率の増加が見られる。つまり年間0.2%の妊婦が新たにTp原虫症に罹患していると言えよう。従って今日においても妊娠期間中にTp原虫に感染する可能性は決して低いものではないと推測される。

3. 経時的 IHA 抗体価測定の意義

2回以上経時的に検体を得た77症例・180検体について、その抗体価の変動を見た。(Table 3) 経過中に8倍以上の変動を示した例は4症例で血清診断上明らかに有意とみなされる32倍・256倍の変動を示す症例も2例に認められた。しかし77症例中73症例・95%は4倍以内の変動に止まった。8倍以上

の変動を示した4症例について、更にpair血清による同時再測定を行った。(Table 4) 結果はいずれの症例も4倍以下の変動であった。従って最終

Table. 4 Results of reexamination by measuring pair serum specimens

measured separately		measured at same time
256×	→	4×
32×	→	0×
8×	→	2×
8×	→	2×

Table. 5 Positive ratio of Toxoplasma antibody in various objects

Object	Number of persons	Number having antibody	Positive ratio
Healthly pregnant women	1936	136	7.0%
Pregnant women having abnormal delivery history	37	6	16.2%
Ophthalmologic patients	34	11	32.4%
Patient of end stage	17	4	24.0%
Lymphadenitis	3	3	100%

的には77症例全例が4倍以下の抗体価の変動であり、急性感染患者は1例も発見されなかった。

このことは経時的に別個に測定された抗体価の変動のみで急性感染を診断することは危険であること、又経時的に別個に抗体価を測定した場合でも8倍以上の抗体価の変動を示す症例は少く、万一8倍以上の抗体価の変動を見た場合にはPair血清による再検を要すると言える。

4. 妊婦と他疾患とのTp抗体陽性率の比較

健常妊婦1936名、死産・奇形児出産歴者37名、眼疾患患者34名、末期患者17名、リンパ節炎3名のTp抗体保有率を調べた。(Table 5) 健常妊婦の抗体保有率7.0%に対して異常出産歴妊婦16.2%、眼疾患患者32.4%、重症末期患者24%、リンパ節炎患者100%と高い陽性率を示した。健常妊婦以外の症例数が少ない事、年令等の因子が詳細に検討されていない事、又主に他施設よりの紹介患者が多い大学症例に限定すると健常妊婦抗体陽性率は、43名中14名・32.6%と市中の一般妊婦1893名中122名・6.4%に比して著明に高く、施設によって大きく抗体陽性率が異っていた。これらを考慮すると我々の成績から結論を出すことは困難である。健常妊婦に比して異常出産歴のある妊婦や眼疾患患者でのTp抗体保有率が高いとするならば、これらの疾患・病状にTp原虫感染が関与していることを示唆しており、積極的な本原虫の駆除が、これら疾患の予防及び治療につながるものと思われる。Tp原虫感染防禦には宿主の細胞性免疫が大きく関与するとされる。そこで我々は重症末期患者17名(肺癌9名、肺線維症

・肺性心各2名、悪性胸腺腫・胃癌・肺炎・成人型T細胞性白血病各々1名)で、経時的に採取保存された104血清検体について抗体価を測定した。その結果、大量のステロイド・抗癌剤・免疫抑制剤の使用・病状進行による細胞性免疫の低下にもかかわらずTpによる急性増悪、急性感染を示す症例は発見されなかった。

考 察

Tp症の診断は、一般に臨床所見・虫体検出・免疫学的診断を総合して行われる。臨床所見のみで本症と診断することは危険であり、虫体検出法としては脳脊髄液や組織より直接的に見出すか、又は抗体陰性マウスへ材料を接種し、その発症の有無で間接的に判定されるが、いずれも操作が煩雑で広く臨床検査に用いることは不可能に近い。従って今日最も広く用いられている方法は免疫学的診断法である。

1. Dye test と IHA test

Dye test は血清学的診断法として最も特異性が高く感度の点からも優れた方法とされている。Tp抗体陽性血清に、補体+未知因子的役割を持つと考えられるTp抗体陰性の新鮮人血漿をAccessory factorとして加え、虫体に反応させると一種の融解現象をきたし、メチレン青に染色されなくなるのが基本的原理である。被検血清の希釈倍数でその抗体価をあらわす。しかし本法を実施するためには、上述のように強毒Tp株を常時マウスに継代保持する必要がある、accessory factorも準備しておかねばならず、感染の危険もあるので広く一般に実施す

ることは困難である。IHA 法として(1)医科研法 (Lewis-kessel 法) (2)予研法 (Jacobs-Lunde 法) (3)化血研法 (4)栄研法が使用されてきた。これらは赤血球による吸収操作を必要とするなど操作が複雑で、担体としての赤血球の安定保持に関しても問題があった。最近ではこれらを改善した方法が一般に用いられている。栄研化学のラテックス凝集反応 (MT) ・日本凍結乾燥研究所の間接蛍光抗体法 (IFA) ・間接血球凝集反応 (IHA-KW) などである。鬼木ら (1980) は、この3者を比較検討し Dye test との相関は IFA 100%, IHA-KW 98%, MT 94%で、特異性・感度とも IFA が最も秀れ、次いで IHA-KW ・MT の順であるが、IFA は他の2法に比べ検査料が高く高度の手技を要するので IHA-KW か MT をルーチンに行い、疑問血清に対しては IFA を行うようにすすめている。我々は Dye test と IHA-KW の検討を行ったが、その相関率は89.5%と前者に比較して、やや低い値を示した。IHA-KW (商品名: トキソ HA-KW ・協和) は、ニワトリ赤血球を使用し、グルタルアルデヒドで血球を固定し、タンニン酸溶液で赤血球表面を処理し、RH 株の虫体破壊物 (超音波使用) で感作したものを抗原として用いる間接赤血球凝集反応である。方法としてマイクロタイター法を取り入れている。鳥類の赤血球を使用することで人血清との非特異的反応を抑制する事、固定処理され凍結乾燥が施された赤血球を用いるため長期にわたりその精度が安定して保たれる事、鳥赤血球は有核球で大きく重いため短時間で判定が可能である事、被検血清が少量で済みかつ大量の検査が可能である事など従来のものに比して利点がある。欠点としては陽性限界付近での判定がまぎらわしい。つまり、凝集パターンで感作赤血球と対照用非感作赤血球の非凝集像が多少異り、感作赤血球の非凝集像ではボタン状の凝集像の周縁部に、わずかではあるが凝集像と類似した像が出現し判定がまぎらわしい。又 Dye test, IFA に比して感度・特異性が落ちる欠点がある。

2. 妊婦における Tp 抗体陽性率

長崎市の妊婦の Tp 抗体陽性率は平均6.4%であったが、これは黄 (1972) ・小林 (1974) が東京都妊婦で調査した23.7%, 25.3%に比して明らかに低い陽性率である。最近の報告では伊勢ら (1981) は東京都の妊婦7350名に対して、自らが開発した赤血

球凝集反応 (HA 法) ・ラテックス凝集反応 (LA 法) を用いて、HA 法で16.8% ・LA 法で21.3%と極めて高い抗体陽性率を報告している。しかも東京都の妊婦は1.8% ・約56人に1人の割合で妊娠中あるいは、その直前に Tp に感染しているとしている。我々は年令別 Tp 抗体陽性率からして、年間約0.2%が新たに Tp 原虫に感染していると考えており、この成績は小林 (1974) の妊娠全期間中における初感染率・0.26%に近いものであった。いずれにせよ東京都と長崎市における Tp 抗体陽性率にかなりの差があり単なる地域差によるものか、検査法の差によるものか検討を必要とする。

3. 妊婦と他疾患との Tp 抗体陽性率の比較

Tp 症と異常産との関連性については Langer (1966) から始まり今日に至るまで数多くの報告がある。先に松本は (1982) 異常産の発症機序及び国内外の成績に関して詳細に文献的考察を行っているが、異常出産の原因の1つとして本症の関与は充分に考えられるものと思われる。最近の本邦における報告としては伊勢ら (1981) が妊婦および新生児の血清検体 (13,933検体) の検察によって、早・死産については抗体陽性者と陰性者との間に有意差は見られず、流産ではむしろ陰性者で高い傾向を示したが、妊娠中に抗体が陽転化したグループで奇形が4.5%に見られたとしている。しかし、これらの奇形は口蓋裂・合趾症・食道閉鎖・クモ指症で、先天性 Tp 症として代表的な症状とされる網脈絡膜炎・脳石灰化・脳水腫または小頭症・中枢神経障害等は認められなかったと報告している。

悪性の消耗性疾患ことに血液悪性腫瘍性疾患に侵された場合や、強力な抗癌剤・ステロイド療法等によって免疫防禦機能が低下した場合、Tp 原虫の急性感染・急性増悪をきたすことがあると報告されている。Remington (1974) は欧米で、それまで報告された悪性腫瘍に合併した Tp 症59例について論評しており、基礎疾患としてはホジキン病の21例、次いで白血病の16例で大部分が脳から Tp 原虫が検出されている。本邦においては鈴木ら (1979) が慢性骨髄性白血病で免疫抑制剤による治療中に肺炎を併発して死亡し、剖検によって脳を除く多くの臓器に Tp 原虫の増殖が認められたと報告しているが、その他の報告は極めて少い。慢性 Tp 症患者においては体内にシスト形式した Tp 原虫が存在し、免疫機

能の低下で急性増悪をきたすと考えられる。しかし我々の成績からしても、その発症は極めて稀であろうと推測される。

ま と め

現在我々が臨床検査法として一般に用いている IHA 法の感度・特異性を、基準法とされる Dye test と比較検討することによって明らかにした。190血清検体における一致率は89.5%と高く、不一致例の95%は Dye test 陽性・IHA test 陰性であり、IHA 法のみでは抗体陽性例を見落す例があった。

IHA 法による長崎市妊婦の Tp 抗体保有率は6.4%であり、年間約0.2%が新たに罹患していることが推測された。

経時的に別個に抗体価を測定した場合8倍以上の抗体価の動きを示す症例は77症例中4例に見られたが、Pair 血清による再検ではいずれも4倍以下の変動であった。

妊婦と他疾患との Tp 抗体陽性率を比較検討すると健常妊婦7.0%、異常出産歴妊婦16.2%、眼疾患患者32.4%、重症末期患者24%であったが、健常妊婦以外の症例数が少いために明確な結論を出すことは困難であった。

謝 辞

本研究は厚生省心身障害研究・妊婦管理研究班国庫補助金によって行った。

引 用 文 献

- 1) 伊勢やよい, 有滝千恵子, 飯田 孝, 佐藤功栄, 鈴木貴和, 嶋田孝吉 (1981): 妊婦のトキソプラズマ感染と児への影響. 寄生虫学雑誌, 30 (6), 563-570.
- 2) 小林昭夫 (1969): トキソプラズマ症の臨床検査. 臨床検査, 13 (14), 299-304.
- 3) 小林昭夫, 熊田三由, 佐久間不二男, 秋田美千代, 大村忠夫 (1974): 妊産婦および新生児におけるトキソプラズマ感染調査—とくに先天性感染の頻度について. 寄生虫誌, 23, 383-390.
- 4) 松本慶蔵, 鈴木 寛, 土橋賢治, 宮崎昭行 (1981): トキソプラズマ感染に関する研究. 厚生省心身障害研究・妊婦管理研究班, 昭和55年度研究報告書, 152-154.
- 5) 松本慶蔵, 鈴木 寛, 土橋賢治, 山本真志, 中島ひとみ (1982): 妊婦および新生児におけるトキソプラズマ症. 産婦人科の世界, 34 (7), 705-709.
- 6) 黄 麗珠, 元山清子, 大内広子, 自坂龍彙, 大須賀道代 (1972): 当大学病院におけるトキソプラズマの赤血球凝集反応検査成績—特に妊産婦の赤血球凝集反応について. 東女医大誌, 42, 733-743.
- 7) 鬼木信乃夫, 倉員健一 (1980): 各種トキソプラズマ血清反応の比較. 日本眼誌, 84 (9), 1408-1416.
- 8) Remington, J. S. (1974): Toxoplasmosis in the adult. Bull. N. Y. Acad. Med., 50, 211-227.
- 9) 鈴木俊夫, 石郷岡清基, 三浦 亮, 小野 巖 (1979): 成人における急性トキソプラズマ症の臨床所見. 寄生虫誌, 28 (4), 241-251.
- 10) 常松之典 (1967): トキソプラズマ感染症の研究—その疫学的および免疫学的局面について. 細菌学会誌, 22 (3), 179-190.