

赤痢アメーバのモルモット感染実験

特に拡散因子剤の感染に及ぼす影響

山川 速水

慶應義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和29年3月4日受領)

緒 言

私はさきに赤痢アメーバのモルモット感染実験に於て特に *Cl. welchii* を赤痢アメーバに随伴せしめ、盲腸内並に直腸内に接種を行い感染に及ぼす影響を報告したのであるが、今回は Hyaluronidase (拡散因子剤) が感染に如何なる影響があるかを見るために、赤痢アメーバの培養虫体液に一定濃度を混じてモルモットの盲腸内に接種し、感染の状況を観察した。1921 Dobell & O'Connor はアメーバは先ず酵素の作用によつて、上皮細胞を溶かし、その溶けた組織の中に位置を占めるものであつて、細胞を器械的に動かしたり、又は健康な組織に穿入する様な事はないと云つている。赤痢アメーバが何等かの物質を分泌して、それによつて組織に損傷を与えることは、病変の組織よりも認められることで、今日では全ての学者の認めている所である。その物質が酵素であるか、或は毒素と称すべきものであるかは、尙議論のある所である。併し Westphal (1938) は細菌の混合感染のないアメーバ性潰瘍の組織像から、アメーバの分泌する物質はあくまで酵素と見る可きであることを主張している。

Hyaluronidase は纖維間に存在する多糖類の一つであるヒアルロン酸を分解して、その粘稠度を減少せしめる酵素である。従つて結合組織内に注入された物質の拡散を容易ならしめる作用がある。赤痢アメーバが Hyaluronidase を分泌するか否かは別として、動物への実験感染に際し、この酵素を同時に注入することによつて、感染が如何なる影響を受けるかと云う事は興味あることと考えられるので、本実験を試みた次第である。

Hayami Yamakawa: Experimental infection of guinea pigs with *Entamoeba histolytica* with special reference to the effect of Hyaluronidase. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan.)

実験材料及び方法

実験材料として、モルモットは200~250gのものを使用した。出来るだけ幼弱のものをういたかつたか材料取得の關係上止むを得なかつた。アメーバ株は人体の赤痢アメーバ症の粘血便から得た広瀬株で、この株は約1カ年半継代した株である。拡散因子剤は持田製薬の Sprase 2000 V. R. U. を Ringer 氏液 1.0 cc に溶解してその 0.5 cc 即ち 100 V. R. U. をアメーバ浮游液に混じて盲腸内に注入した。動物の食餌はフスマ、人蔘のみを終始与えた。排便の状況に注意し、新鮮便の検査に於ては自然排出のアメーバは見当らなかつた。材料取得より2~3日飼育後、動物の健康状態の良好であるものにアメーバの接種を行つた。実験には最も暑い7, 8, 9月を選んで行つた。赤痢アメーバ培養基は、人血清7, Ringer 氏液3の割合に稀釈し、加温凝固して斜面となしたもので、液体部は Ringer 氏液のみとして、それに1白金耳の滅菌米粉を加えた。そして前述の Sprase 0.5 cc 即ち 1000 単位をアメーバ移植後 48 時間の増殖分裂の盛んな栄養型浮游液 (米粉を含んだ) 0.5 cc に混じ、総量を 1.0 cc とした。条件を一定にするため、アメーバ浮游液 0.5 cc に含まれている栄養型は 10 万程度として分裂増殖の活潑なものをういた。

接種方法：モルモットに軽いエーテル麻酔をほどこして腹壁を正中にて約 2.0 cm に開腹して盲腸部を求め、 $\frac{1}{3}$ 程度の注射針を以て、前記の混合アメーバ浮游液 1.0 cc を直接盲腸内に注入した。刺入部より注入液の逆流する事は認められなかつた。腹壁は腹膜、筋層並に皮膚と2層に連続縫合を行つて腹壁を閉鎖した。注入液で手術部の汚染される事を極力避けた。手術部位に対しては特に嚴重なる消毒を実施せず、腹壁縫合の箇所にマーキロクロムを塗布する程度とした。術後、腹壁縫合の化膿離開したものは1例もなかつた。腹膜炎を起して死亡したと思われるものが2例認められた。術後24時間、特

に運動不活潑で食思不振を呈するもの 4 頭認められたが死亡するものはなかつた。接種後 50 頭中、運動不活潑となつたもの 14 頭、食慾の低下したもの 10 頭、接種後 4~5 日で衰弱著しいと思われるもの数頭が認められた。又下痢をして肛門部が可成り汚染されているもの 10 頭を認めた。勿論之等のものについてアメーバは検便にて陽性であつた。

尙この実験に於ては、アメーバと Hyaluronidase とを混合して接種するのですから、Hyaluronidase がアメーバ自身の生活力又は増殖に何等かの影響を与えるか否かを知つておく必要がある。この点を予め予備実験で確かめることにした。それには前述した培地の斜面部を 1.5 cc、液体部を 2.0 cc とし、之れを管径の一定している小試験管に用意した。

方法として：1) Sprase 2000 V.R.U. を 1.0 cc Ringer 氏液に溶解し、培養基の液体部に夫々 250, 500, 1000, 1500, 2000 V.R.U. を添加して、その直後略と一定数の栄養型を含有するアメーバ浮游液 0.1 cc を移植した。

2) 数本のアメーバ培養基に 48 時間アメーバを培養して分裂増殖の最も盛んな時に上と同じ各濃度に Sprase を添加して、添加後のアメーバ増殖の変化を観察した。

実験の成績

1. 予備実験

広瀬株を用いて実験した場合。

培地の液体部に Hyaluronidase を用いた場合と、用いない対照とを比較する時、Hyaluronidase を加えたものは対照より稍々増殖率が低下している様である。特に移植後 48 時間迄に於いてその差異が認められる。72 時

第 1 表 Sprase 使用アメーバ増殖 (広瀬株)

| 時間 濃度 | 24 | 28 | 72 | 96 | 120 | 144 | 168 |
|----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 250 | + | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |
| 500 | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + |
| 1000 | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + |
| 1500 | + | + | ++ | ++ | + | + | ++ |
| 2000 | + | + | ++ | ++ | + | + | + |
| 対照 1 | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 2 | + | ++ | ++ | ++ | + | + | - |
| 3 | ± | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 4 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ |

間に至つた場合は殆んど対照と増殖率の差異は認められない (第 1 表)。

アメーバ増殖 48 時間後に 2000 V.R.U. を培地に加えた場合は、その対照と比較して見る時 72 時間、96 時間とアメーバの増殖率には殆んど影響がない様である (第 2 表)。

第 2 表 48 時間後 Sprase 使用アメーバ増殖 (広瀬株)

| 時間 番号 | 24 | 48 | ↓ (Sprase 2000 V.R.U.) | 72 | 96 | 120 | 144 |
|----------|----|----|------------------------------|----|-----|-----|-----|
| 1 | + | ++ | | ++ | +++ | ++ | ± |
| 2 | + | ++ | | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 3 | ± | + | | ++ | +++ | ++ | ± |
| 4 | + | + | | ++ | ++ | + | ± |
| 対照 1 | + | ++ | | ++ | +++ | ++ | + |
| 2 | ± | + | | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 3 | + | ++ | | ++ | +++ | ++ | ++ |

次に高単位を入れた時の影響を更に反復して実験して見た。それによるとアメーバ移植前から培地液体部に 2000 V.R.U. を加えた場合に於ても、48 時間迄に僅かに対称に比して増殖の低下を見るが、72 時間以上になると全く対称と差異が認められない (第 3 表)。

第 3 表 Sprase 使用アメーバ増殖 (広瀬株)

| 時間 濃度 | 24 | 48 | 72 | 96 | 192 |
|----------|----|----|-----|-----|-----|
| 2000 | + | + | +++ | +++ | - |
| 2000 | + | + | ++ | +++ | - |
| 対照 1 | + | ++ | +++ | +++ | ± |
| 2 | ++ | ++ | +++ | +++ | + |

鈴木株を用いた場合。

Hyaluronidase を培地に加えた場合、その対照に比較してアメーバの増殖に僅かに悪影響を示している。その程度は広瀬株に於て示されるより更に著明である (第 4、5 表)。

大体 Sprase は水溶液にすると不安定となり易いと云われ、37°C 24 時間では 15% の効力の低下があり、60°C 5 分間で、40%、100°C では 5 分間で完全にその作用を消失すると云われている。Sprase を培地に入れて、37°C 孵卵器に入れておいた場合、48 時間以上に至れば確かにその作用は大いに消失してしまうものと思われる。実験の結果は Hyaluronidase の添加によつて、

第4表 Sprase 使用アメーバ増殖 (鈴木株)

| 時間 濃度 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
|----------|----|-----|-----|----|-----|
| 500 | + | ++ | + | + | + |
| 1000 | + | + | + | + | + |
| 1500 | + | + | ++ | + | + |
| 2000 | + | ++ | + | + | ++ |
| 対照 1 | ++ | +++ | +++ | ++ | + |
| 2 | ++ | ++ | + | + | + |

第5表 Sprase 使用アメーバ増殖 (鈴木株)

| 時間 濃度 | 24 | 48 | 72 | 96 |
|----------|----|----|----|----|
| 500 | ± | ± | + | + |
| 1000 | ± | + | ++ | + |
| 1500 | ± | ± | + | ± |
| 2000 | ± | + | ± | ± |
| 対照 1 | + | + | ± | ± |
| 2 | ± | + | ++ | + |

赤痢アメーバの増殖に特に著しい悪影響があると思われるなかつた。又僅かな影響が見られる場合でも培養時間が経過すると共にその作用は全く消失するものゝ様であつた。

2. 本実験

アメーバ接種後、手術並に気温の影響と思われるもの、その他原因の判然としない死亡例は除外した。アメーバ浮游液に Sprase を混じたものゝ接種例に於ては、3日目に死亡したものが1頭あり、剖検によつて、盲腸部の病変も、腸内容からアメーバの検出も共に認められなかつた。死亡原因は不明である。4日目に死亡した例は、盲腸内に軽度の病変を認め、且つ腸内容にアメーバの増殖を認めた。5日、6日目に、夫々1頭死亡していたが、共に盲腸内に病変が認められ、腸内容にはアメーバの中等度の増殖が見られた。又5日目に下痢が烈しく運動不活潑な1頭を剖検するに、盲腸内に高度の病変即潰瘍が認められ、腸内容には多数のアメーバが見られた。第6日目に食欲並に運動状態が稍々衰えているものについて4頭剖検を行つた。その中3頭に病変を認め、その中の1頭には潰瘍らしきものが見られた。腸内容を検すると、病変のある3頭には、共にアメーバの増殖が認められた。しかし就れも下痢による肛門部の汚染は認

められなかつた。第7日目に5頭を剖検した。4頭に於いて盲腸内の病変を証明し、それ等の腸内容には共に活潑なるアメーバの増殖が認められた。第8日目に元気のもの15頭について剖検を行つた。その中6頭に病変が認められ、特に著しい潰瘍を生じているものが3頭見られた。この3頭に於ては中等度の下痢を証明している。病変の認められる腸内容には全例に亘つてアメーバの著しい増殖を認めた。

対照群については：3日目に死亡したものについて剖検を行つた。1頭には何等の病変をも認められず、腸内容にアメーバも検出されなかつた。即ち死亡原因が不明であつた。他の1頭には軽度の病変が認められ腸内容にはアメーバは極く僅少に証明された。第4日目に死亡せんとする直前に剖検したものについては、盲腸内に軽度の病変と少数のアメーバを検出したに過ぎず、決定的な死因は判然としなかつた。5日目に1頭の死亡を見た。之れも病変並にアメーバの検出が判然としなかつた。別の2頭に於ては、下痢が証明され、食思不振と運動が不活潑であつたので直に剖検した。この2頭については、盲腸内に病変は共に認められ、腸内容には可成り烈しいアメーバの増殖も見られた。6日目に死亡1頭あり、病変は相当に高度で潰瘍があり、腸内容にアメーバの増殖は極めて烈しく、下痢も証明された。他の1頭は下痢があり死亡せんとする直前のものを剖検した。之れには病変もありアメーバの増殖も認められた。第7日目残りの12頭を剖検した。その中5頭に於て病変があり、特に2頭には可成高度の病変を認めた。5頭共腸内容にアメーバはよく増殖していた。5特にその中の1頭にはアメーバの増殖が極めて烈しく下痢も又著明であつた。

以上の実験成績は第6及び7表にまとめた。尙第7表の盲腸内の病変の程度を次の如く定めた。(一) 全く病変が認められないもの、(±) 病変の判定困難であるがアメーバの増殖しているもの、(+) 軽度の病変が存するもの、(++) 中等度の病変が存し、その中の一部に潰瘍と思われる個所のあるもの、(+++) 病変が高度であり明に潰瘍が存在しているもの。

この成績によると、Sprase 使用のもの30頭中17頭に感染し、感染率は56.6%であり、アメーバのみの注入の場合は、20頭中11頭に感染し、感染率は55.5%であつた。又病変の程度から観察すると、Sprase を使用したものの中、3頭に高度の潰瘍を認めた。中等度以上の病変を呈したものについては、Sprase を用いたものに5頭、アメーバのみ接種したものに3頭夫々認めら

第 6 表 アメーバ接種より死亡迄の日数

| 接種材料 | 頭数 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8~12日 |
|------|----|-----|-----|-------|-------|------|----------|
| A+H | 30 | 1 | 1 | 1 (1) | 1 (4) | (5) | (15)~(1) |
| A | 20 | (2) | (1) | 1 (2) | 1 (1) | (12) | |

註 A: アメーバ, H: 拡散因子剤, () 屠殺剖検

第 7 表 赤痢アメーバのモルモット感染実験

| 接種材料 | 頭数 | 病変程度 | | | | | 感染率 | 下痢 | アメーバ |
|------|----|------|---|----|----|-----|-------|----|------|
| | | - | ± | + | ++ | +++ | | | |
| A+H | 30 | 12 | 1 | 12 | 1 | 4 | 56.7% | 5 | 17 |
| A | 20 | 7 | 2 | 8 | 2 | 1 | 55.6% | 5 | 11 |

註 A アメーバ, H 拡散因子剤

れた。Sprase を用いた方が病変の程度が稍々高い様に思われた。

考 按

予備実験として、試験管内にて Hyaluronidase の種々の濃度の一定量をアメーバ移植前に予め斜面培養基の液体部に混入して、アメーバの増殖状態を観察し、又一方アメーバ移植後虫体が一定程度増殖した後に Hyaluronidase を培地に添加して、増殖アメーバに対する影響を観察した。アメーバの株によつては増殖に著しく悪影響を示したものもあつたが、本実験に使用した広瀬株に対しては殆んど認むべき悪影響も及ぼさなかつた。併し対照試験に比較すると増殖率は少し悪い様に思えた。これまでモルモット、白鼠、家兎、猫等を使用して、アメーバ栄養型を感染せしめた実験が多く報告されて来たが、その成績には可成りの差異が見られている。即ち Carrera 及び Faust (1949) はモルモットの回盲部にアメーバの栄養型を接種して、34 例中 31 例に感染せしめた。又 George-W. Luttesmoser (1952) は人間の急性アメーバ症より分離された栄養型を家兎の回盲部に移植して、217 例中 87.5% に発症させる事が出来たとの報告がある。又近年猪木、高田、中林等 (1951) は赤痢アメーバ培養虫体液に Hyaluronidase を混じて白鼠の盲腸内に注入感染実験を行っている。即ち Hyaluronidase を使用したものは、23 頭中 12 頭 52.2% に、又 Hyaluronidase を用いない対照群 9 頭に於ては、5 頭、55.6% に、夫々感染し、両者に殆んど差異がない。

本実験に於いて使用したアメーバ広瀬株は、長期に亘つて継代培養されたものであり、又モルモットは 200~

250 g の比較的大きいものを用いた為に、感染率を考慮して、特に盛夏を選んで実験を行つた。従つて飼育にあつたのは飼料、通風には特に意を用い暑さの為の自然死も出来るだけ防いだ。飼料は水分の多いものは下痢に傾き易い為水分の少いフスマ、人蔘を以て飼育したが飼料については悪影響が無かつた様である。1 日の飼料の量は略々一定にした。盲腸内に接種後の動物は、術後は概ね元気で、特に大なるショックがあるとは思えなかつた。原因が全く不明で接種後 3 日以内に死亡したものもあるが、大体その他は 1 週間後の剖検時迄元気で、動物の食欲、運動等の状態をよく観察する事が出来た。盲腸部に可成りの病変が存在しているにも不拘、極めて元気で食欲も全く低下しないのも認められ、或は又接種後食欲の低下し、運動不活潑になりながらもよく生存しているものもあつた。感染頭数の中で肛門部が汚染されている程度の下痢症状を示したものは一部のものであつた。相当感染があつても下痢が判然としないものもあつた。剖検時腹壁と腸管との癒着は可成りの頻度に見られ、時に腹壁縫合部とアメーバ接種部位との間の癒着を見て、その部分に膿苔が存して病変を呈するものもあつたが、これ等は器械的に誘発された病変で、Serosa より進行した様に観察されたので、腸管内に注入したアメーバ増殖からの病変と区別するため、器械的に起つたと思われる症例は除外した。手術創より出来るだけ遠ざかつて、癒着していない盲腸部の病変を主として観察の対象とした。盲腸以外の臓器も一応観察したが、肝臓等の病変は認められなかつた。病変が上行結腸に向つて可成りに強く蔓延した 1 例を認めたが、他は総て病変が盲腸部に限られていた。もつと長期に亘つて生存せしめておけば、更に病変は蔓延したであろう。病変の程度は種々であつた。感染して病変のある腸内容には 100% に於てアメーバが検出され、多くの例に於てアメーバの分裂増殖は活潑であつた。感染していない、アメーバの検出が出来ないものについては糞便の培養試験は行わなかつた。私はさきにアメーバ浮游液にウエルシュ菌を随伴せしめて、モルモットの盲腸内接種実験を行つたが、幼弱モルモットを用いた為か 4 日目位で多く死亡し、死亡後の剖検に於いては、病変の高度の例に於ても腸内容にアメーバの活潑なる増殖状態を観察しうる例が少なかつた。今回の実験に於ても死亡例の剖検に於ては、病変のある腸管内容からアメーバ栄養型を検出するのは困難である様に思われた。死後の剖検例では、腸内容に於てアメーバの数は極めて少なく、速に虫体は崩壊していく像を屢々認めた。

茲に行つただけの実験では Hyaluronidase がアメーバ性潰瘍の形成に直接関係があると云う証拠は何等つかむ事が出来なかつた。赤痢アメーバが分泌する物質の中に Hyaluronidase が存するか否かは興味のある所であるが、本実験を行つている時に、米国に於て Bradin, J. L. Jr. (1953) は、赤痢アメーバは培地にて長期に亘つて培養を維持されている時に Hyaluronidase を産生しないと云い、又彼の実験に於て、実験的に起した hamster の肝臓膿瘍から得たそれは、Hyaluronidase を産生したとも報告している。たとえ赤痢アメーバ自身がそれを分泌しないにしても、共存する細菌が分泌する場合にその細菌の同時感染が起つたとすれば、アメーバ性潰瘍の発展もその Hyaluronidase に影響されることは考えられる。赤痢アメーバの病原性に対する共存細菌の影響と云うこともこの様な点に関係があるかも知れない。今後の研究にまつべき問題である。

結 論

1) 拡散因子剤 (Hyaluronidase) を混じたアメーバ (広瀬株) 浮游株浮游液をモルモットの盲腸内に注入感染実験を行つた。

2) 拡散因子剤を用いたものに於て、30頭中 56.7% アメーバのみ注入したものには 20頭中 55.6% 夫々感染率を示した。

3) 拡散因子剤を赤痢アメーバと同時に腸腔に接種しても、アメーバの感染に大なる影響を及ぼすと思われな

い。
稿を終るに臨み、御指導御校閲下さつた恩師松林教授に深謝する。

文 献

- 1) Chang, S. L. (1948): Experimental physiology of amebiasis. Proc. 4th, Internat. Congr. Trop. Med. Malar. 2, 1065~1074.
- 2) Carrera, G. M. and Faust, E. C. (1949): Susceptibility of guinea pig to *E. histolytica* of human Origin. Amer. J. Trop. Med., 29, 647~667.
- 3) Luttermosser, G. W., Haskins, W. G., Nell Coleman, and Jumper, J. R. (1952): Experimental *E. histolytica* infections in Rabbits with reference to chemotherapy. Amer. J. Trop. Med. 1, 162~170.
- 4) Ishii, Y. (1950): On the influences of Extracts of *Rhizoma rhei* and *Semen pharbitidis* upon the infections of *E. histolytica* in rats. Kitasato Arch. of Exp. Med. 23, 27~31.
- 5) 猪木正三, 高田季久, 中村敏夫 (1951): 赤痢アメーバの白鼠感染実験, 研究成果報告.
- 6) 猪木正三, 高田季久, 中村敏夫 (1951): 赤痢アメーバの生物学的研究, 研究成果報告.
- 7) Bradin, G. L. Jr. (1953): Studies on the production of Hyaluronidase by *E. histolytica*, Exp. Parasit. 2, 230~235.
- 8) 松林久吉 (1947): 赤痢アメーバ, 東西出版社.
- 9) 松林久吉 (1951): アメーバ赤痢発症機轉, 慶應医学, 28, 89~98.
- 10) 島津優 (1952): 赤痢アメーバの猫感染実験及び其の治療, 慶應医学, 29, 247~251.
- 11) 榊原任 (1953): ヒアルロニダーゼの臨床應用, 医学のあゆみ, 15, 320.
- 12) Tobi, J. E. (1949): Experimental infection of the rabbit with *E. histolytica*. Amer. J. Trop. Med. 29, 859~870.
- 13) Taylor, D. G., Greenberg, G., Highman, B. and Coatney, G. R. (1950): Experimental infection of guinea pigs with *E. histolytica*: Amer. J. of Trop. Med. 30, 817~828.