

赤痢アメーバのモルモット感染実験

殊に免疫的考察

山 川 速 水

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和 29 年 3 月 18 日受領)

緒 言

赤痢アメーバに感染している動物体の血清中に生ずる補体結合物質に対する証明は、既に Spector (1932), Menendez (1932), Scherwood and Heathman (1932), Heathman (1932), Tsuchiya (1932), Weiss and Arnold (1934-1937), Meleney and Frye (1935-1937), Stone (1935), Paulson and Andrews (1936), Rees, Bozicevich, Reardon and Jones (1942), 等の多くの観察者によつて確められて来た。本邦に於ても里見 (1935) は原虫に対する所謂先天性免疫性なるものは之れを人、若しくは動物に於て求める事が出来ず、一度原虫病を経過して、爾後に於ける後天性免疫と認められるものも、これを細菌感染に於ける免疫と比較して、完全且つ絶対的であると云う事は出来ないと云つている。

又白男川 (1935) は赤痢アメーバのアルコール抽出液を加えて、家兎を免疫すれば、著明な特異性抗体の産生があると云つている。この場合補体結合反応の抗原はアメーバ培養の無水アルコール抽出液及び蒸溜水抽出液を用いている。沈降反応も明に陽性で、赤痢アメーバに特異的であり、大腸アメーバの抗原には反応なく、患者血清は既知赤痢アメーバ株及び対応赤痢アメーバ株に特異的であり、アメーバを溶解する作用をもつていると云つている。又山本 (1935) も培養赤痢アメーバのアルコール抽出液を使用して、本病患者血清と補体結合反応を試みて、陽性成績を得ていると云つている。Stone (1935) は洗つた赤痢アメーバのチステで実験し、同様の補体結合反応が出来て、それは細菌とアメーバとの混合材料で実

施した場合と同様の結果を得たと報告している。斯の如く多くの研究者によつて、現在補体結合反応が唱えられて、アメーバ症に対する血清学的の価値あるものとされ、この方法はアメーバの証明出来ない感染に対して、大いなる診断的意義がある様である。併しアメーバ栄養型を純粹にとり出し、純粹な抗原として使用する事は現在の所不可能であり、随伴菌の混入するは当然の事である。而してアメーバの増殖には、必ずや随伴細菌を必要とし、従つて感染もアメーバ単独の感染でなくして、随伴細菌が多分に影響しているものであり、自然界に於ける感染並に免疫も又随伴菌が大いに関与している事は容易に想像されるのである。既述の如く、アメーバの免疫学的研究は診断並に治療上にも大なる意義があるが、免疫により、動物体の感染防止について確固な論を聞かない。私は随伴細菌を伴つた赤痢アメーバ栄養型を直接に動物体内に侵入せしめて、免疫獲得を考え、爾後に於けるアメーバ感受性の低下、随伴菌の免疫に及ぼす影響を考察した。即ちモルモットを使用して、予めモルモット腹腔内に随伴菌を伴つたアメーバ栄養型を反復注入した。一部の動物は斃れたが、よくその操作に耐え生残つたものについて一定時間後に於て、アメーバ栄養型を盲腸内に接種し、主として感染状態の変化と、あわせて皮内反応との関係を観察した。以下若干の知見を得たので茲に報告する。

実験材料と方法

実験動物として、モルモットは 200~250 g 程度の健康なものを用いた。動物の食餌は終始フスマと人蔘の一定量を与えた。実験に用いた赤痢アメーバ株は、アメーバ赤痢患者の血便中から得て、約 2 年間継代培養を続けた広瀬株である。赤痢アメーバの培養基は人血清 7, Ringer 氏液 3 を混じ、加熱凝固で斜面となして、液体

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

部は滅菌 Ringer 氏液のみとして、それに滅菌米粉の一白金耳を加えた。赤痢アメーバは通常 24~48 時間培養の栄養型にして 1.0 cc に 10~15 万程度のもを用いた。本実験は主として 9 月より 11 月の間に行つた。動物の健康状態をよく検して、実験開始前数日は特に飼育に注意し、動物の糞便中の寄生虫をよく検した。

感作の方法：抗原として前記アメーバ培養基の液体部をよく混和して、主として下層の米粉に密集しているアメーバ虫体を米粉と共によく混じた。米粉は比較的速やかに沈澱するので、米粉の沈澱を待つて、米粉を除いたもの即ちアメーバ浮遊液と共棲細菌の混和している液体部を採取して抗原とした。又対照の意味で、アメーバを混じらない随伴細菌のみの抗原をも試用した。その製法は上記の血清斜面培地の液体部の上層部にて、アメーバの存在しない共棲菌のみと思われるものを他の培地に移植して、共棲菌のみと思われる液体部が得られる。これをアメーバの存在しない抗原とした。この操作にて時にアメーバが迷入して来て、24~48 時間後にアメーバの増殖を見る事もあつたが、2~3 回の移植によつてアメーバの迷入を防止し得た。以上 2 種類の抗原を用いて次の如く感作をした。即ち動物を 3 群を分け、第 1 群はアメーバと共棲細菌の混和した抗原を用い、第 2 群はアメーバの存在しない共棲菌のみを抗原とし、第 3 群は操作を行わぬ対照のものとした。第 1 群、第 2 群に於て夫々抗原を 0.1 cc, 0.2 cc, 0.3 cc, 0.4 cc と隔日に腹腔内に注入して、総量抗原 1.0 cc を用いた。腹腔内注入に於て、抗原を増量する毎に注入後動物に可成の変化が見られた。即ち注入直後から動物の多くは不活潑となり、且つ横臥するものが約 $\frac{1}{3}$ に見られた。多くのものは呼吸が可成促迫した。一部のものに軽い間代性の痙攣を表わし、極く一部のものに於て(全実験頭数中 2~3 頭) その儘死亡するものがあつた。注入後上記の症状は多くは 20~30 分にて徐々に回復を始め、翌日は略々正常に復し、食慾も運動も次の注入に至る迄に回復するのが常であつた。併し全般的に感作実施期間中動物は少しく弱り、体重の減少も軽度に見られた。1 週間にて感作を終了し、更に其の後 2 週間に至るまで動物をよく観察した。腹腔注入によつて腹膜炎を起して死亡したものが極めて少数に見られた。4 回の腹腔内注入後 2~3 日で動物の状態は安定し、以後異常は認められなかつた。運動、食慾、体重増加も順調であつた。2 週間後 Arthus 現象を検した。即ち米粉を除いたアメーバと共棲細菌の混和している培養液液体部を 60°C 30 分間滅菌して、その 0.1 cc を動物

の脊部の毛を除去して、第 1 群、第 2 群、対照の第 3 群の皮内に注射を行い僅かな膨隆を生ずる程度にした。注射局所の変化を 2 時間、5 時間、8 時間、24 時間 48 時間、62 時間後に観察した。その成績は後述の通りである。その翌日動物(第 1, 2, 3 群)の腹部を約 2 cm に開腹して、1 cc 中 10~15 万のアメーバを含有する培養液 0.5 cc を盲腸内に注入した。注射針の刺入部より注入液の流出しないのを確かめて後、腹壁は腹膜筋層、皮膚と 2 層に縫合を行つて腹壁を閉鎖した。その際皮膚、皮下組織にマーキクロムを塗布した程度にて特に嚴重なる消毒は行わなかつた。麻酔はエーテル麻酔を行つた。術後動物は元気で死亡するものは 1 頭もなかつた。手術創は化膿離開するものはなく、総て第 1 期癒合をした。直接手術死と思われるものは無かつたが腹膜炎を起して死亡したと思われるものが 2 日目に 3 例を見たに過ぎなかつた。手術後第 2 日目までは概ね食慾不振、運動不活潑であつたが第 3 日目以後は殆んど回復して、食慾も増加して、運動も活潑になつて正常と変らぬ程度となつた。

実験成績

第 1 群、実験頭数 15 頭中 I 頭は 3 日目に死亡した。盲腸内にはアメーバは著しく増殖して、下痢を伴つていたが盲腸内の病変は見られなかつた。2 頭は 4 日目に死亡して、その中の 1 頭には盲腸内にアメーバの増殖は見られたが、下痢も病変も認められなかつた。

併し軽度の腹膜炎の状を呈していた。他の 1 頭にはアメーバの増殖と、軽度の下痢を証明したが盲腸内の病変は無かつた。1 頭は 5 日目に死亡して、盲腸内に僅かのアメーバの増殖が見られ、下痢症状を示して斃れたが盲腸内には病変は無かつた。1 頭は 6 日目に死亡しこれには盲腸内にアメーバの増殖があり、下痢を伴い且つ可成の潰瘍をも証明した。他の 10 頭は 7 日目に屠殺した。10 頭中 1 頭に針の刺入部附近に円形の病変と思われるものがあつたが、アメーバは其の病竈中に見出せなかつた。下痢も示さなかつた。他の 9 頭には就れも病変を証明し得ず、アメーバの増殖もなく、下痢もなかつた。

即ち 15 頭中 1 週間以内に死亡したものが 5 頭で、そのうち病変のあつたものが 2 頭、盲腸内にアメーバの増殖を見たものが 5 頭、下痢を呈していたものが 4 頭であつた(第 1, 2 表)。第 2 群、実験頭数 11 頭中 1 頭は 3 日目に死亡し、それには盲腸内に極めて著明なるアメーバの増殖が見られ、且つ下痢を起して、潰瘍も可成り著しいものがあつた。他の 10 頭は 7 日目に屠殺した。10 頭中 1 頭に針の刺入部附近に軽度の潰瘍と思われるものを認めたが

アメーバは見出せなかつた。又下痢も起していなかつた。又他の1頭には盲腸内にアメーバの増殖が著しかつたが、下痢もなく病変も証明されなかつた。残りの8頭には全例に盲腸内のアメーバの増殖も見られず、且つ又下痢も示していなかつた。

即ち11頭中1週以内に死亡したもの1頭、潰瘍を呈したのも2頭、盲腸内にアメーバを証明したもの2頭、下痢を示したのも1頭であつた(第1,2表)。

対照群, 10頭に於ては、2頭は3日目に死亡し、その中の1頭には変性したアメーバが盲腸内に多数に見られ、下痢もあり潰瘍も認められた。他の1頭は頻死の状態であつたので死亡と見なして剖検した。これには盲腸内にアメーバの増殖は著明であり、下痢もあつたが病変は極めて軽度であつた。1頭は5日目に死亡した、盲腸内のアメーバ増殖は著明で、下痢もあり潰瘍も強度のものを証明した。3頭は6日目に死亡し、その中2頭に於て共にアメーバの増殖は極めて著しく、下痢も共に存在し、且つ潰瘍は2頭共中等度のものを証明した。他の1頭にはアメーバの増殖は極めて著しく、下痢は軽度であつたが強度の潰瘍を認めた。残りの4頭には共に病変無く、アメーバの増殖も下痢もなかつた。

即ち10頭中1週以内の死亡6頭、病変のあつたもの5頭、アメーバを証明したもの6頭、下痢を証明したものの6頭であつた(第1,2表)。

第1表 モルモット感作後の感染状況

区分	実験頭数	病 変						ア メ ー バ	下痢
		-	±	+	++	+++	%		
I	15	13	1		1		13.3	5	4
II	11	9	1		1		18.2	2	1
III	10	4	1	2	1	2	60	6	6

III.....対照群

第2表 感作後盲腸内アメーバ接種し死亡迄の日数

区分	実験頭数	1	2	3	4	5	6	7
I	15	•	•	1	2	1	1	10殺
II	11	•	•	1	0	0	0	10殺
III	10	•	•	2	0	1	3	4殺

殺.....屠殺

III.....対照群

Arthus 現象については、5mm 径程度の明瞭な発赤硬結のあるものを陽性とした。注入後3時間後より発赤

し始め、20時間、48時間、62時間に至るも発赤を示したものがあつたが、4~5時間後より48時間後までが明瞭であつた。潰瘍を生じたものは無かつた。皮内注入に於て全く無変化のものもあり、或は動物の毛の色が体全般に亘つて褐色又は黒色のものについては判定全く困難のものがあつた。Arthus 現象の実験成績については、第1群15頭中6頭は3時間後より20時間に於て局所の発赤が漸次強くなつて、局所過敏と思われる状態を示した。全く無変化のもの4頭、不明のもの5頭であつた。不明のものとは前述した如く皮膚、毛の褐色又は黒色のものにて白色の部分が無くして、注射局所の反応不明のものである。第2群では11頭中5頭に過敏症と思われるものがあり、3頭は無変化、3頭は不明のものであつた。対照10頭にも2頭に於て軽度の発赤を見た。8頭は殆んど無変化であつた。局所過敏を呈するものに、更に皮内に Ringer 氏液 0.1 cc を注入したが何等変化は生じなかつた(第3表)。

第3表 感作後アルサス現象

区分	実験頭数	-	±	+	陽性率
I	15	4	5	6	40%
II	11	3	3	5	45.4%
III	10	8	0	2	20%

III.....対照群

以上 Arthus 現象は予期の如くに明瞭な成績は得られなかつたが、Arthus 現象陽性と思われる症例で盲腸に病変の見られたものはなかつた。

考 按

既に記載した様に、赤痢アメーバに関しての抗体、抗原反応のある事は、多くの人によつて立証されて来た。それに用うる Antigen は種々あるけれども多くはアルコール抽出物質であり、アメーバに随伴菌の混じた Antigen である。即ち Sherwood and Heathman (1932) は赤痢アメーバの培養抽出を以て兎を免疫しその血清中に特異な補体結合物質を証明している。又 Menendez (1932) は赤痢アメーバの洗つたものを兎に静注した場合、アルコール抽出液と同様の補体結合物質が出来たと云い、Stone (1935) は腹膜内に赤痢アメーバの生きたチステをよく洗滌して注入した所、その血清は洗つたチステを Antigen として行つた補体結合反応で強い陽性を示したと云つている。

Craig は Kagy と共に(1933) 犬の廻腸, 盲腸に赤痢アメーバを含むものを接種して, 血清中に補体結合物質を生ずると云っている。又赤痢アメーバを治療によつて駆除した時に人間の補体結合反応は消滅するとも云っている。以上の様に赤痢アメーバの注入や感染によつて, 補体結合反応が陽性に現われ診断や, 薬剤投与, 治療の示指として或る程度利用し得られるけれども, この様にして生じた抗体が感染を防止し得るか否かについて, 確かな説を聞かない。私はこの点について本実験を行つた。即ち最も自然の条件を保ちつつ原虫及びその共棲生菌を直接モルモットの腹腔内に接種して, 漸次にそれを増量し, 動物がよくそれに耐えて生存を続けるならば, 体内に免疫物質が生産されている事は想像されるのであり, その様な免疫動物の盲腸内に培養アメーバを接種し, 感染の有無, 病変の程度を観察した。本実験に於ては, 生原虫栄養型並に随伴菌の混合したものを腹腔内に隔日4回の注入を行つた。注入行為によつて, 動物の健康状態は注入直後に障害を示した以外大なる変化は見られなかつた。併し注入によつて衰弱死したと思われるものもあつたが, 大部分は腹膜炎等の病変を惹起する事なくよく耐えた。可成り多数のアメーバ虫体, 並に随伴菌群の注入にもかかわらず, 生存を続け得たのであるから, 漸次免疫が成立して来たことが想像される。然して実験の結果に於ても, 予め操作した第1, 2群と無操作の第3群との間に潰瘍形成の頻度にかなり相違が認められる。即ち予め操作をする事によつて, 潰瘍が形成され難くなる。これは明らかに感染防止の作用が働いたと解してよいと思われる。次に第1, 2群を比較すると, この間に於ては大なる差異を示していない。これは随伴細菌に対して免疫を得ることによつても, アメーバの組織内感染を防禦し得ることを示すものと思われる。即ちアメーバが組織内に感染するためには, 細菌感染の助を蒙ることが大きい様に見える。併し腸内には感作に用いたとは異なる細菌が多数に生存するのであるから, これだけの成績をもつて直ちに上述の様な結論を導くことは出来ない。

又 Arthus 現象に対して緒方(1946)は常に確実な成績が得られるものでなく, 抗原の濃度, 抗体価によつても其の成績は全く不安定であり, その発現も時間的, 質的, 量的に変化して来るのは極めて当然の事であると云い, Arthus 現象は典型的壊死を生じて来る時は可成り特異的であるが局所の変化が減ずるに従つて, その特異性は不明になると云っている。本実験に於て Arthus 現象は確然とした陽性所見を示さなかつた事は既述した如くである。猶お本実験の病理組織所見は次の報告にゆずる。

結 論

1) 赤痢アメーバと随伴細菌をモルモットの腹腔内に反復注入後一定期日を経て, 盲腸内に赤痢アメーバを接種して, 感染実験を行いその感染の成否を観察した。

2) 感作後の動物では, 無感作動物に比してアメーバ性潰瘍の形成は著しく困難であつた。

3) Arthus 現象を検したが, その所見とアメーバ感染の難易との間に確然とした関聯性は認められなかつた。

4) 感作によつて免疫性は可成りの程度に生じ得るものと思われる。

稿を終るに当り御指導御校閲下さつた松林教授に深謝する。

文 献

- 1) 秋元壽恵夫(1943): 生きた反応, 柏葉書院。
- 2) Craig, C. F. (1944): The etiology diagnosis and treatment of amoebiasis, 245~256. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, U.S.A.
- 3) Becker, E. R. (1953): How parasites tolerate their Host, Journ. Parasit. 39, 467.
- 4) 畑上良造(1938): 赤痢アメーバの随伴細菌に関する研究, 大阪, 37, 2517.
- 5) 松林久吉(1947): 赤痢アメーバ, 東西出版社。
- 6) 緒方富雄(1946): 血清学の領域から, 河出書房。
- 7) 白男川久(1935): 赤痢アメーバの免疫学的研究, 福岡, 28, 2635.
- 8) 里見三男(1935): 原虫病に対する免疫, 大阪高等医専雑誌, 3, 1.
- 9) 山本義夫(1935): アメーバ赤痢の免疫学的研究, 満洲医学雑誌, 23, 165.