

培養赤痢アメーバの白鼠感染試験に及ぼす 二三の薬剤処置の影響

高田 季久

大阪大学微生物病研究所寄生虫原虫学部

(部長 森下教授 指導 猪木正三教授)

(昭和31年1月30日受領)

赤痢アメーバの実験動物としては従来、犬、猿、猫、白鼠、モルモット等々種々の動物を使用しているが、各々一長一短あり優劣をつけ難い。

Tobie (1949) 等は彼等の実験及び、従来の報告を総括して赤痢アメーバの動物感染試験には、a) 動物の費用の点、b) 動物の取扱の難易、c) 動物に依る感染率の不定な点、d) 感染持続期間の問題、e) 病変形成の難易、等々を常に考慮せねばならぬ事を指摘している。

私の行った二、三の実験及観察からも、以上の諸点を考慮する必要性は充分認められるが、種々の動物の内、とくに白鼠は、比較的以上の条件に、かなうものであらうと考え、実験動物として幼弱白鼠を選び、更に之に色々な処置をほどこす事に依り、其の感染率を高め、人間の場合と近似の感染状況を得、もつて種々な薬剤の効力検定への応用を意図して本実験を行った。即ち細胞毒である Nitrogen mustard-B (methyl bis (β -chloroethyl) amino hydrochloride) 又細菌、ウィールスの感染性を高めるものとされている Mucin 及び組織拡散剤 Hyaluronidase 等を用い、之等の前処置又は同時処置が、どの様に効果を及ぼすかを観察した。

実験材料及び実験方法

赤痢アメーバ：主として山神株 (Y株) を用い。一部藤田株 (F株) を使用した。前者は有症状患者より分離したものであり、後者は、嚢子保有者のチステより得たものである。

共にW, B, I培地に分離培養一年以上に及び、使用に際しては、W, B, 2培地に48時間培養後、下層部のアメーバを米粉と共に集め接種材料とした。接種材料1

cc中にアメーバは約10万前後存在していた。

以上2株の各株の共棲菌は、山神株：グラム陽性連鎖状桿菌1種、同塊状球菌1種、同小球菌1種、グラム陰性桿菌大及び小型各1種、計5種であり、藤田株：グラム陽性連鎖状桿菌1種、同連鎖状球菌2種、グラム陰性桿菌1種、計4種であつた。

使用白鼠：大小に依る感染率の変化を避ける為、50g以上80g以下の幼弱白鼠を雌雄を選ばず用いた。なお白鼠には、*Entamoeba muris* の自然感染が多く之と *E. histolytica* との鑑別が困難である故に、出来るだけ白鼠の頻回検便を行い、又時には、1群の白鼠中より試験的に数頭を屠殺し腸内容の検査を行い *E. muris* 自然感染白鼠群を除外した。之等の白鼠の飼料としては、専ら麦及び新鮮野菜を用いた。

試供薬剤：Nitrogen mustard-B は日本薬化学株式会社製白色粉末状結晶を用い、中性生理的食塩水に溶解各白鼠にアメーバ接種の前日、前処置として70 γ 乃至80 γ を、腹腔内に注入した。Mucin はアメリカ Willson Laboratory 製の灰白色小粒を粉砕し、之を中性生理的食塩水に10%の溶液として用い、又 Hyaluronidase は武田薬品工業株式会社試用品を同じく生理的食塩水に溶解し1cc中に2000 T. R. U (Turbidity Reducing Unit) を含む溶液として使用した。

アメーバ接種方法：先ず白鼠を固定し、麻酔する事なく、無菌的に開腹、盲腸部を露出し、先端を軽く保定する。次いで、Nitrogen mustard-B 前処置済みの白鼠では、前記アメーバ浮游液 0.5cc のみを盲腸内に注入する。又、Mucin 或は Hyaluronidase の場合には、各溶液 0.5cc とアメーバ浮游液 0.5cc とを事前に混合し、それを注射器により注入する。其の後は腹膜腹壁を縫合し、且 500乃至1000単位のペニシリン及びストレプトマイシンを腹腔注射する事に依り、術後の腹膜炎其の他の誘発を予防した。

Suehisa Takada: The influence of some chemicals on the experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*. (Department of Parasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University.)

以上の各場合、常に無処置白鼠に依る対照実験を並行した事は云うまでもない。

接種後は、白鼠の検便を行いつつ 4 日乃至 20 日の観察の後、屠殺開腹し、腸内容及び腸壁の変化を精査した。

腸内容の検査は、生鮮標本、1%エオチン、ルゴール染色標本及び培養に依り検査し、且腸壁に変化の認められた場合は、組織標本に依り判定した。向田氏 (1950) に依れば *E. muris* は普通培養に依つては 2 日目で見られなくなると報告している。此の点培養試験は、両アメーバの混合感染の場合の判定に役立つわけである。

実験成績

I 予備実験

第 1 表に示した成績は、接種した赤痢アメーバが、若し感染しなかつた場合何日間白鼠の腸内で生存するか又感染した場合腸壁の病変の形成が何日目で行われるかの大略を推定せんとして行つた実験成績であり、先ず健康無処置白鼠に F 株を接種し、其の後 4 日目より 13 日目にかけて、少数づつを屠殺し其の感染状況を見た。

第 1 表 無処置白鼠に依る感染実験 (F-株に依る)

屠殺までの日数	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	計	感染率
実験白鼠数	2	3	0	4	2	5	3	5	0	5	29	
感染白鼠数	0	1	0	2	1	3	1	2	0	4	14	48.3%

(註：腸壁に病変を有したものは 11 日目に 1 例 13 日目に 2 例)

表示した如く、4 日目には、2 例ではあるが既にアメーバの見られなくなつた白鼠を認めている。之は若しアメーバが感染しなければ、4 日以内に排泄されるか又は、死滅し、感染の成立したもののみが其の後長く腸内に生存するものであらうと解釈される。なお此の成績は、病原性の弱いと考えられる F 株を使用した為か、感染率が割合に低く、且大きなアメーバ性の病変は認められず、ただアメーバ注入後 11 日目及び 13 日目に各 1 例及び 2 例の白鼠の腸壁に糜爛性充血炎症部を認めたに過ぎなかつた。

II Nitrogen mustard-B, 前処置による場合

赤痢アメーバ F 株を使用して実験を行つた場合は表の

第 2 表 Nitrogen mustard 処置白鼠に依る実験 (F-株)

	実験匹数	感染匹数	感染率(%)
処置白鼠	26	22	84.6
対照	30	14	46.6

如く (第 2 表) 無処置の対照白鼠群では、前述の予備実験の場合とほぼ同様の感染率を示したが、Nitrogen Mustard-B (NM-B) 前処置白鼠群では 84.6% の高率を示した。併しながら腸壁には定型的の病変は認められず僅かに 10 日目に屠殺した白鼠 2 頭の盲腸壁に軽い充血糜爛部を発見したのみであつた。

第 3 表 Nitrogen mustard 処置白鼠に依る実験 (Y-株)

	実験匹数	感染匹数 (感染量別)				感染率 (%)
		+	++	+++	小計	
処置白鼠	27	6	10	7	23 (潰瘍形成 5)	85.2
対照	26	7	6	3	16 (潰瘍形成 2)	61.5

(註：+...1/数視野 ++...1~15/1 視野 +++...15以上/1 視野 ×100)

次に Y 株を用いた場合は、(第 3 表) F 株の場合程対照との差は大きくはないが、しかし処置白鼠群の方が、

ずつと感染率が高い様である。その上に、表示した様に盲腸内に発見したアメーバの量も対照に比較して、はるかに多かつた。

腸壁に病変を形成した例は、F 株に比較して明確で且多く、対照群で 2 例、処置群で 5 例を認めたが、潰瘍自身は割合に小さく、すべて盲腸部に限局されており、他の腸壁には見られなかつた。

以上の成績に依つても明らかな様に Y 株と F 株とは病原性にかんがひる差が見られる様であり、感染率感染量及び病変を起させる度合は、Y 株ははるかに強い様である。此の様な赤痢アメーバ株間の病原性の相違については、松林氏等 (1951) も之を認め、強調している様である。

以上の各場合はすべて NM-B をもつて白鼠に前処置を行つたのであるが、逆に今度は、NM-B をもつて処置したアメーバを無処置白鼠に接種した。(第 4 表)

即ち W, B, 2 培地の液体部 1 cc に対して約 50 Y の NM-B を加え 6 代以上継代培養を行つた Y 株アメーバを

第4表 Nitrogen mutard 処置アメーバに依る実験 (Y-株)

実験 匹数	感染匹数 (感染量別)				感染 率 (%)	
	+	++	+++	小計		
処置アメーバ使用	15	5	3	1	9	60.0
対 照	26	7	6	3	16	61.5

(註: +++の標準は第3表註と同じ)

用いた。

此の場合アメーバは培養24時間目には著しく増殖が抑制され、形も非常に小さく成るが、時間と共に再び増殖も盛と成り、大きさも旧に復する。此の様に旧に復した状態のアメーバを使用したか、感染率は対照と比較して大差を示さなかつた。之は NM-B はアメーバに対しては無く白鼠に作用してアメーバの感染率を高める事を示しているのではなからうか。

III Mucin をを使用した場合

赤痢アメーバの感染実験に初めて Mucin を用い其の効果を認めたのは、Jones and Stewart (1946) 等であるが、本実験は彼等とほぼ同様の手技を用いて実験を行ったのであるが、不思議な事に約半年程の間を置いて行

第5表 Mucin アメーバ同時接種に依る実験 (第1回)

白鼠 番号	感染アメーバ量	盲腸部潰瘍の性状と数	
山 神 株 使 用 群	G. 1	+++	粟粒大 1
	2	+++	粟粒大及米粒大 2
	3	+	(-)下部 1/3 壊死
	4	+++	米粒大 2
	5	+++	粟粒大 1
	6	++	小指頭大糜爛部 1
	7	++	粟粒大 1
	8	+++	小豆大及亞鈴型 2
藤 田 株 使 用 群	F. 1	+	小出血部 1
	2	++	帽針頭大 1
	3	+++	(-)
	4	(-)	"
	5	+++	"
	6	++	"
	7	++	"
	8	+	"

(註: +++の標準は第3表の註と同じ)

つた前後2回の実験成績が全く異なつた結果を得たので一応別個に分けて記載する事とする。

第1回の実験: 1951年1月より3月にかけて行つたものであるが、(第5表)先ずY株を使用した場合8匹中1例を除いて全例にアメーバ性の病変が盲腸壁に認められ、且全例にアメーバの感染を見た。之は Jones (1946) 等と同様、非常に良い成績であつたが、全白鼠を1週間後に屠殺した為か、他の腸壁にはあまり変化を見なかつた。

対照の意味において、健常白鼠4匹に Mucin のみを注入した場合、腸壁に何等の変化も認められず、又 E. muris、自然感染白鼠3匹に Mucin のみを接種したが、此の場合も又、何等の病変も示さなかつた。

潰瘍形成白鼠の病理組織所見

附図1, 2はムチン処置に依り病変を起した白鼠の盲腸部の組織標本であるが、第5表中のG, 8白鼠より得たものである。固定はホルマリンで行いパラフィン包埋切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行つた。

潰瘍部の組織所見: 残存する粘膜上皮は稍々増生の傾向があり、その外面に接して壊死性の剥離上皮・多核白血球及びフィブリン等に混じて、核小体の明らかな、大きな核を持ったアメーバの点在する苔被が附着している。所により、粘膜上皮は、殆んど剥離し糜爛性、或は、潰瘍性と成つている。

固有層 (Tunica propria) に円形細胞、多核白血球が浸潤し、毛細血管の新生を伴つた肉芽を作つているが、小出血も可成り多く見られ、其の他は形質細胞、多核白血球、淋巴球等が比較的瀰散性に浸潤し浮腫が著明な病巣もあり、之等は、粘膜下層にまで及び、其の他毛細血管の新生のみの多い場所もある。アメーバは上述の肉芽の直下に数ヶ集合し、更に粘膜下層の肉芽組織の周辺部にも、二、三集合したものが、所々に見られる。

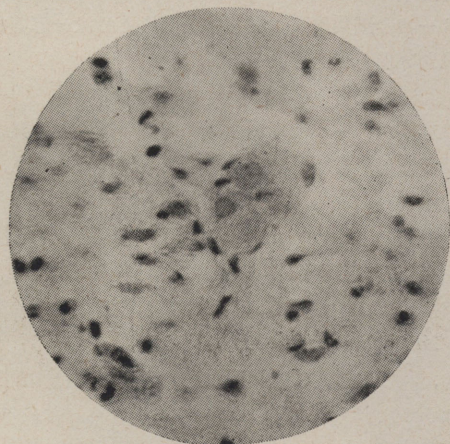
筋肉層は、間質に充血があり、其の間隙に白血球の浸潤があり、それ等の中にもやはりアメーバが一ヶ又は数ヶ侵入しているのが見られる。漿膜層にも淋巴球、白血球、毛細血管の他に形質細胞、繊維細胞等の増殖と浸潤より或る肉芽組織があり、漿膜上皮も肥厚し、炎症は此の部にも及んでいる事が判る。

癒着部: [註: アメーバ注入局所の腹壁と盲腸との癒着部分の組織像] 表皮に異常なく皮下に組織球が少数遊走し筋肉層は著変がない。癒着部の漿膜下層に繊維母細胞の増殖、組織球の遊走、形質細胞、淋巴球、肥厚細胞の浸潤増殖が著明であり、毛細管の発達も見られる

第 1 図
潰瘍部の組織標本, 第 5 表 G. 8 白鼠(×100)



第 2 図
第 1 図の強拡大, 中央部にアメーバを認める(×400)



が, アメーバは見られない。

淋巴腺： 淋巴組織の軽度の増生と間質の増殖性炎症があるのみで, アメーバ性の特長な変化を見ない。

脾臓及び肝臓： 共に鬱血性の変化が見られ, 淋巴球及び形質細胞の浸潤が見られるが, 特殊な所見はない。

以上の様に Y 株に於ては優秀な結果を得たが, F 株を用いた成績はやや Y 株とは異なり, 第 5 表の様に, 8 例中 7 例にアメーバの感染が見られ, 其の内 2 例に潰瘍形成例を見たのみである。此の場合にも両株間の病原性の差異が認められる様である。

第 2 回目の実験： 1951 年 6 月より同 12 月迄の間に行つた。実験方法其の他は全く前回の方法と同様に行つた

のではあつたが, 第 6 表に示した様に, 其の感染率は, 対照と比較して大差なく, たゞ潰瘍形成度が稍々増強される様であつた。これは, 第 5 表に示した第 1 回目の成

第 6 表 Mucin 及 Hyaluronidase に依る実験 (Y-株)

	実験匹数	感染匹数	潰瘍形成 白 鼠
ムチン注入白鼠	40	25 (62.5%)	9 (22.5%)
ヒアルロニダーゼ注入白鼠	23	12 (52.2%)	1 (4.3%)
対 照	9	5 (55.6%)	1 (11.1%)

績とは全く相反し, 且, Jones 等の云う様な好結果を得なかつた。勿論第 1 回目に行つた例数が少ない故に直ちには確言出来ないが, 一応 Mucin の効果は必ずしも常に期待する程では無いと想像される。

IV Hyaluronidase 使用の場合

前述の Mucin 第 2 回目の実験と並行して, 1951 年 6 月より 12 月迄の間に行い, 赤痢アメーバは Y 株のみを用いた。

Hyaluronidase (HYD) 1000T, R, U, をアメーバと同時に注入した白鼠 23 例中 12 例に感染が見られ, 其の 1 例の盲腸壁に潰瘍形成を認めたのみであり, (6 表) 対照と比較して特に良いとは思われず, 且感染量も反つて劣つて居た。

なおアメーバ Y 株は, W, B, 2 培地液体部 1 cc 中に 500T, R, U, の HYD を含む条件下でも何等の悪影響をも受ける事なく増殖した。

総括及び考案

Nitrogen mustard (NM) 及び其の他の Mustard-gas 等は従来臨床方面に於て, 其の細胞毒性及び, 主として白血球系の血球を減少せしめる作用を利用し, 悪性腫瘍及び白血病等の治療に用いられていたが, 先に Taliaferro (1948) 等は, *Plasmodium gallinaceum* を鶏に感染せしめる場合, 本剤を用いる事によつて, 其の感染率が高められる事を認め, 其の作用機作は, 動物の免疫性を低下させるのではないかと推定した。又 Philips (1950) も在来の多くの研究を総括して, NM は一般に動物の白血球特に淋巴球を著明に減少させる他に明らかに免疫性を低下させると結論している。又, 先に教室の猪木等 (1952, 1953) は NM-B を以てマウスを前処置し *Trichomonas foetus* の致死的な感染率を高める事に成功し当該原虫の各種研究を容易ならしめ, 更に病理組織

学的に検討を加えた結果、其の原因を、宿主マウスに於ける大喰菌細胞産生過程の障碍に關聯して解説している。

今回私の行ったNM-Bを用いての実験は、以上の諸点を考慮して行ったのであるが、実験Ⅱに示した様に赤痢アメーバの感染を相当高める事が出来た。此の様な高率な感染は、白鼠を用いての実験では、あまり其の報告を見ない様である。たゞ潰瘍形成の点に於ては全く期待を裏切つた成績を得たが、しかし、感染と発症を全く別個に考えねばならぬアメーバ症に対して一つの有益な事実を与えるものと思う。

実験Ⅱの内、アメーバ自体にNM-Bを作用させた場合、其の感染率に何等の変化をも来たさなかつたのは、NM-Bは、原虫自体へではなく宿主である白鼠に何等かの作用を与え、感染を容易ならしめるものと考えられる。

Philips (1950) は NM を動物に連日注入した場合白血球の減少は3~5日目に最高と成ると述べている。此の事から考えると、今回様のたゞ1回だけの前処置のみではなく白鼠のNM-Bに対する抵抗が許す範囲に於て多数回の前処置を行う事と、アメーバ注入の時期を前処置後3~5日目位とすれば、更に好成绩を得られたのではないかと思える。しかし白鼠は70~80%のNM-Bを連日注入すれば其の多くが、毒性により死亡し、実験を行ひ得なかつた。

続いて行ったMucinに就ては従来細菌等の動物感染実験に用いられ、好成绩を得ているのは周知の事実であり、其の作用機作に就ても種々の追求が進められている。Olitziki (1948) (1948) は色々な実験例を挙げ、其の作用に就て可成り入念な検討を加え、白血球に対する作用、アグレッション様作用補体作用の抑制、及び抗体作用の抑制等々の作用の在る事を認めてはいるが、しかし結論としては不明の様である。ところで赤痢アメーバの動物感染実験には既にJones (1946—1948) 等が使用し白鼠に対して90%以上の感染率を得る事に成功し、種々の抗アメーバ薬剤の検定にも応用している。併しながら今回行った私の実験では、残念ながら、彼等の報告の様な良い成績は得られなかつた。たゞ潰瘍形成性が増強される事と、感染量が可成り多いという事は未だ検討すべき余地がある様である。又時期を分けて行った成績の内第1回の実験では、例数は少なかつたが、しかし冬期の実験であつたに拘わらず、第2回目の主として温暖の時期の成績よりもずっと良かつたのは、従来定説である

“冬期よりも夏期の方が、実験感染率が高い”と云う考えに相反し其の説明に苦しむものであるが、しかし、アメーバの感染及び発症には、たゞ季節的な要因のみならず他の種々な条件が関与するものと考えられる故に、たゞ以上の成績のみでは軽々しく判断は出来ないと云う。

次にHYDは、近來臨床方面は勿論、各分野に利用されつつあり、且又生物の各種組織及び臓器中より発見されているが、此の物質の発見に依り赤痢アメーバが腸管壁に浸入するのもHYDの助けに依るのではないかと考えられる様になつて来た(榊原, 1950)。即ち赤痢アメーバの分泌する組織融解物質が、HYDの作用に依つて組織中の防禦物質Hyaluronic acidを分解し組織中に拡散せしめられ且、アメーバ自体の浸入をも助長するのではないだろうか。以上の様な考えのもとに本実験を進めたのであるが、使用したHYDの使用単位等に未だ不十分な点があつたためか、予期する様な結果を得なかつた。此の点を再考の余地はある様であるが、しかし実験経過を観察した結果より考へ、HYDのみを用いて、赤痢アメーバの感染率又は発症率を高めるのは一応難かしいのではないかと考えられる。

結 語

- 1) 赤痢アメーバは幼弱白鼠に可成り感染し、其の感染率及び潰瘍形成は、健康保有者より得た株よりも、有症状患者よりの株の方が高率である。
- 2) 適量のNitrogen mustard-Bの腹腔内前処置により白鼠に対する赤痢アメーバの感染率を高め得た。しかし潰瘍形成は増強し得なかつた。
- 3) Nitrogen mustard-Bを以て赤痢アメーバを処置しても、其の白鼠への感染率及び発症率に認むべき変化を見なかつた。
- 4) 赤痢アメーバを10% Mucinと同時に白鼠盲腸内に注入する事に依り、盲腸壁に於けるアメーバ性の潰瘍形成が増強される。しかし感染率は特に高められなかつた。
- 5) Hyaluronidase 1000 T, R, Uを赤痢アメーバと同時に白鼠の盲腸内に接種する事に依つても、感染率及び潰瘍形成を高め得なかつた。

擧筆するに當り、御指導と御校閲を賜つた森下教授並びに猪木教授に深く感謝します。尙病理組織検査について、種々御助力下さつた本学医学部第二病理岡野助教授に対して心から感謝の意を表します。

本研究は本部署科学研究費によつて行われた。記して

感謝の意を表す (猪木正三)

(本論文要旨は第 20 回寄生虫学会及び昭和 26 年度文部省科学研究成果報告会席上にて報告した)

文 献

- 1) Inoki, S., Nagai, A., Kitaura, T., Takada, S. and Nakabayashi, T., (1950): Studies on the new-culture methods of *Endamoeba histolytica*. Med. J. Osaka Univ., 2, 53-72. —2) Inoki, S., Takada, S., and Nakabayashi, T. (1953): New culture mediums for *Endamoeba histolytica*. Amer. J. Clin. Path., 23, 197-199. —3) 猪木正三, 永井光, 高田季久, 北浦敏行 (1950): 赤痢アメーバの培養に関する研究, 第一報, 余等の所謂全血加培地に就て, 阪大医誌, 2 (2), 71-84. —4) 猪木正三, 浜田義雄, 中馬英二, 藤原二郎 (1952): *Trichomonas foetus* の小動物における感染に関する研究 (第一報). 純培養を以てするマウスへの感染試験, 阪大医誌, 4 (5) (6), 1-10. —5) 猪木正三, 浜田義雄, 釜洞潤太郎, 岡村昌一 (1954) *Trichomonas foetus* の小動物における感染に関する研究 (第 2 報). マウスへの継代感染試験, 阪大医誌, 6 (3), 211-218. —6) Jones, W. R. (1947): The experimental infection of rats with *Endamoeba histolytica* with a method for evolving the antiameobic properties of new compounds. Trop. Dis. Bull., 44, 313. —7) 向田利男 (1950): 赤痢アメーバの白鼠感染試験, 1. 実験的感染率, 慶応医誌 27 (1), 11-14. —8) 松林久吉 (1951): アメーバ赤痢発症機転, 慶応医誌, 28 (3), 89-98. —9) Olitzki, L. (1948): Mucin as a resistance-lowering substance. Bact. Rev., 12, 158-163. —10) Philips, F. S. (1950): Recent contributions to the pharmacology of bis (2-Haloethyl) amines and sulfides. J. Pharm. & Exp. Therap., 99, 281-323. —11) Stewert, G. T., and Jones, W. R., (1948): The pathology of an experimental amoebic infection in rats. Trop. Dis. Bull., 45, 1001-1002. —12) 榊原任 (1950): ヒアルロニダーゼと臨床, 医学書院, 37頁. —13) Tobie, J. E. (1949): Experimental infection of the rabbits with *Endamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med., 27, 859-870. —14) Taliaferro, W. H., and Taliaferro, L. G. (1948): Reduction in immunity in chicken malaria following treatment with Nitrogen mustard. J. Infect. Dis., 82, 5-30.

Summary

Many investigators have made several trials to produce the typical infections in rats with the mixed cultures of *Entamoeba histolytica*, however no satisfactory results have ever been achieved.

The author inoculated few strains of *E. histolytica* kept in our whole blood mediums into the coecums of the young rats which had preparatorily treated with some chemicals at the same time or prior to the inoculation, by which it was examined how would be changed the rates of both infection and ulcer formation in those inoculated rats.

The chemicals used for this treatment were Nitrogen-mustard B, Granular mucin and Hyaluronidase. The results obtained are summarized as follows:

1. The considerable number of untreated young rats could be infected with *E. histolytica* by experimental inoculations, and these infection were established in higher percentages with the strains from acute patients than with those from contact carriers.
2. The infection rate of *E. histolytica* in rats was raised up by intraperitoneal treatment with proper quantity of nitrogen mustard B, a day before inoculation.
3. The pathogenicity of *E. histolytica* was not increased by treating with nitrogen mustard B before intracaecal inoculation.
4. The rate of ulcer formation in rats was raised up by inoculating simultaneously with both *E. histolytica* and 10% mucin solution into the coecums of rats.
5. The both rates of infection and ulcer formation in rats were not increased by simultaneously inoculating with *E. histolytica* and 1000 T. R. U. of hyaluronidase in the coecums of rats.