

赤痢アメーバの免疫学的研究

(1) 培養虫体を腹腔内に注射したモルモット

血清の免疫反応

佐藤 礼治

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和31年5月21日受領)

アメーバ症の免疫に就ては既に20年前より幾多先人に依り研究されて来た。しかしその免疫反応に就てはその当時と現在を比較して著しい進歩を遂げたとは思われな

い。その最大の原因は赤痢アメーバが現在に至るも純培養が不能であり、従つて細菌及びその代謝産物が混在するために純粋な抗原を作る事が不可能な状態にあると云うことであろう。即ち免疫反応に欠く事の出来ない特異性に関して、尚不安定な面が多い。更に赤痢アメーバの株による抗原性の相違も考えに入れる必要があるであろう。

従来本アメーバの免疫反応に於て最もよく研究されて来たものは補体結合反応である。その最初の目的はアメーバ性肝炎及び肝膿瘍の早期診断であつた。此の疾患では虫体が糞便中に排泄される事無く、臨床的に重篤な症状が発現して来る迄気がつかれない事もある。此の様な場合に補体結合反応の利用価値があるわけである。

1927年に Craig は赤痢アメーバを感染せしめた動物の血清中に補体結合を起す抗体のある事を認めて居る。彼の用いた抗原は Boeck & Drbohlav の Lock-egg-serum medium の改良型に増殖した赤痢アメーバのアルコール・エキスである。彼は此の抗原を用いて実験的に感染させた犬の血清及びアメーバ症の患者の血清で補体結合反応を行つて11.5%の陽性を得た。

その後 Paulson & Andreus (1938) は 150例のアメ

ーバ症の血清に就てアセトン (Sherwood-Heathman 抗原)・アルコール (Craig 抗原), エーテル (Arnold 抗原) を用いてアメーバより抽出した抗原で補体結合反応を試みた結果35.3%の陽性を得て居る。これは同じ患者を検便して得た42.7%の陽性と比較して、補体結合反応は誤りが多く、むしろ種々の欠点はあるにしても、尚反覆した検便の方が価値があると述べて居る。

Magath & Meleney (1940) も同様に各種抗原を用い、且二つの研究室に分けて70例のアメーバ症と確認されて居る患者の補体結合反応を行つた結果僅か32例に陽性を認め、又70例中16.7%が両方の研究室に於て共に陰性の結果であつたことを報告して居る。

Böe (1945) は培養アメーバを乾燥させ、これをすりつぶし、食塩水で抽出したものを抗原として 121人の血清で試験した結果5名に検便で虫体を発見し、2例に補体結合反応陽性であつた。この2例中1例は carrier であり、他の1例では反覆した検便でも虫体は見つからなかつた。

以上は抗原として総て培養アメーバを用いたものであるが、Rita (1947) は急性アメーバ赤痢の状態にある動物から得た血清及び腸粘膜のアルコール抽出物を用いて、63例のアメーバ症の補体結合反応を試みて92%の陽性を得て居る。此の場合の抗原は恐らく非常に特異性が少いのであらうと Anderson は述べて居る。

此の他に Ghosh, Ghosh & Ray (1948) の如く培養アメーバを蒸留水で抽出し、これに石炭酸を加えた抗原を用いたり、Teery & Bocicevich (1948) の如く単一細菌「Organism t」をもつ赤痢アメーバより抗原を作つたりしたものもあるが、何れも特別優れた成績を得たとはいえない。

又 Wagener (1924), Spector (1932) は沈降反応を行つて或る程度の成績を上げて居る。前者は潰瘍の搔破物

Reiji Sato: Immunological studies on *Entamoeba histolytica*. (I) Immunological reactions with sera of guinea pigs which were intraperitoneally injected with living amoebae.

(Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

より、後者は虫体の Coca 氏液抽出物より 抗原を作つて居る。

本研究の目的は免疫を与えた動物に赤痢アメーバを感染せしめ、どの程度に病変が抑制されるかを調べるにある。従つて免疫反応は実験動物に免疫が成立して居るかを否かを知る為の方法である。此の様に免疫と病変との関係を調べた報告は未だ少く僅かに Swartzweder & Muller の報告があるのみである。彼等は幼若ラッテを用いて実験したが、免疫操作は 3 回の免疫原皮下注入であり、免疫成立の有無は検討しなかつた。

材料と方法

- 2) 実験動物は 250 ~ 300 g のモルモットを用いた。
- 2) 免疫原は Balamuth 培地に48時間増殖した赤痢アメーバを集め、これをガーゼ 3 枚を以て濾過し、粗大なる米粉を除去した。これを遠心沈澱管に入れ、5 分間 1000 回転位で緩速遠心沈澱する。次で上清を捨て、沈澱の上に生理的食塩水を加えて良く攪拌し、更に遠沈を行う。此の操作を 3 ~ 5 回反覆し、共棲細菌を出来得る限り除去する。此の沈渣 1 を生理的食塩水で 5 倍に稀釈する。
- 3) 上記免疫原をモルモットの腹腔内に注入する。即ち 5 日毎に 3 ~ 5 回注入する。第 1 回は 0.5cc, 第 2 回は 0.75cc, 第 3 回以後は 1.0cc を与える。
- 4) 最終免疫後 5 日目に心臓穿刺に依つて採血し、血清を分離した。
- 5) 対照として Balamuth 培地に増殖した共棲細菌のみで同様に免疫した動物の血清を用いた。

免疫反応

免疫反応としては補体結合反応、沈降反応、赤血球凝集試験, Immobilization test を行つた。

I) 補体結合反応。

- a) 補体, 溶血系, 抗血清は型の如く作つた。
- b) 抗原は培養赤痢アメーバのアルコール・エキスである。即ち Balamuth 培地に増殖した 赤痢アメーバを遠沈し、免疫原作製の所で述べた如く生理的食塩水で数回洗滌して共棲細菌を除去する。得た沈渣 1 に対して無水アルコール10を加え、三角コルベンにガラス球と共に入れ、パラフィンで密栓す。これを 37°C の孵卵器内に入れ 1 日数回振盪を与えて虫体の破壊を助長せしめる。約 10 日間孵卵器に入れ、後細菌濾過器で引き氷室内に保存する。
- c) 施行せる補体結合反応の様式を述べれば次の如くである。先ず使用する抗原が特殊なものである故、抗補体作用を調整した。即ち抗原の原液は抗補体作用が強く、補体を増量しても溶血を示さないため、5 倍稀釈抗原を用いた。之に対する補体の補正量を検討した結果10倍稀釈補体0.04ccが必要であることが判明した。(表 1)
- d) 此の補正量を加えて補体結合反応を実施した成績は表 1 に示す如く、全管溶血を示し、抗原性に関しては不明の成績であつた。

II) 沈降反応

前述の方法即ち生鮮虫体の腹腔内注入法に依る免疫法では動物の死亡率が非常に高いので、此の場合は生鮮虫体に依る以外に凍結融解法に依り虫体及び共棲細菌を破壊したものも免疫原とした。検査は血清減量法に依り行つた。用いた抗原と成績は次の如くである。

a) アルコール抽出抗原

前述の補体結合反応の項で述べた如く作る。此の抗原に依る時は 5 例の免疫血清に於て 1 例も陽性を認めなかつた。

第 1 表 補 体 結 合 反 応

	1	2	3	4	5	6	対照	対照
Mag 食塩水	—	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25		
血 清	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	—
補 体	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
抗原 (5×)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	—	0.25
補体 (10×)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
37°C 20 分								
溶 血 系	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
結 果	L	L	L	L	L	L	L	L

b) Coca 氏抗原

本抗原は Craig, Menendez, Wagener, 白男川等に依り用いられたもので、沈降反応用抗原としては少々優良なるものと伝えられて居る。

その製法は培地より集めたる虫体を只一回軽く遠心沈澱し、此の沈渣1に対して Coca 氏液 (NaCl 0.7%, NaHCO₃ 0.05%, Phenol 0.4%) の10を入れて孵卵器に入れ、更に氷室に入れ、時々振盪を加えること1週間～10日間で濾過して氷室に貯える。此の抗原を用いて行った実験では25例中僅か6例が陽性であつた。その程度も漸く原血清及び2倍稀釈血清迄しか陽性は認められなかつた。

c) 凍結融解抗原

本抗原は凍結融解法に依る免疫原と同じもので、その製法は赤痢アメーバを共棲細菌と共に梨子型コルベンに入れ、これをドライアイスを含むアセトン中に漬けて速に凍結せしめる。次で流水で融解し、再び凍結する。此の操作を5回以上反覆し、後濾過して透明なものを得る。この抗原で10例の試験をした所、2例陽性であつた。そのうち1例は原血清であり、他の1例は16倍稀釈血清迄陽性であつた。

d) 対照として共棲細菌のみで免疫した血清を上記3種の抗原で試験したが、何れも陰性であつた。

Ⅲ) 赤血球凝集試験

本法は原虫類については現在迄にトリパノソーマ、陸トリコモナスの寄生の有無を調べるために用いられた報告がある。本実験では M. G. Entegart が陸トリコモナスで実施した方法を応用した。

a) 免疫法

上記の通り生きた洗滌アメーバを腹腔内に5回注入する。

b) 感作血球の製法

1) 48時間培養した虫体(培養基約5本)を滅菌遠沈管中に、滅菌ガーゼを以て濾過して可及的米粉を除去して集める。これを生理的食塩水で3～4回洗滌する。

2) この洗滌沈渣に Formamide 0.1ccを加えて充分振盪する。

3) 150℃の流動パラフィン中で15分間加熱(150℃を5℃以上上下せぬ様)後急に流水で冷やす。

4) 0.25ccの塩酸アルコールを加えて遠心沈澱し、上清を他管に移す。

5) 0.5ccのアセトンを加えよく振盪し、遠心沈澱後上清を捨てる。此の際沈渣は極少量であるが、この中に

Group antigen がある。この沈渣よりアセトンを可及的捨て残りは重盪煎で蒸発させる。

6) 此の沈渣に 1.0ccの生理的食塩水を加えて十分に攪拌する。弱アルカリ性とする。

7) 赤血球は緬羊のものをを用い、これの2%浮游液を同量の上記抗原液と混じ、37℃の温浴中に1時間入れて感作する。

c) 被検血清

心臓穿刺に依つて得た血清 0.5ccを5倍に稀釈して総量 2.5ccとして56℃30分で非動性にする。これに 0.1ccの正常(非感作)血球を加え37℃の孵卵器に20分間入れ後遠沈し、血球と血清を分離して血清の吸収を行い、後使用する。

d) 術式

被検血清及び感作血球抗原を5倍から10倍迄稀釈し、両者とも 0.3cc宛を混合する。対照として非感作血球を血清に加えたものと感作血球に食塩水を加えたものを用意した。これを37℃の温浴中に1時間又は2時間入れる。判定は温浴中より取出した直後と更に18時間後に肉眼的に行つた。

e) 成績

5回免疫のものでは10例中3例陽性であつた。その程

第2表 赤血球凝集試験

Antigen dilution	Immune serum dilution					Controls
	5	10	25	50	100	
5	++	++	±	±	—	—
10	++	++	±	±	—	—
25	++	++	±	—	—	—
50	±	±	—	—	—	—
100	±	—	—	++	—	—
Normal cell	—	—	—	—	—	—

第3表 赤血球凝集試験

Antigen dilution	Immune serum dilution					Controls
	5	10	25	50	100	
5	++	++	+	+	±	—
10	++	++	+	+	±	—
25	++	++	+	±	±	—
50	++	++	+	±	—	—
100	+	++	—	—	—	—
Normal cell	—	—	—	—	—	—

第4表 赤血球凝集試験

Antigen dilution	Immune serum dilution					Controls
	5	10	25	50	100	
5	+++	+++	++	±	—	—
10	++	++	+	—	—	—
25	++	++	±	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—
100	—	—	—	—	—	—
Normal cell	—	—	—	—	—	—

度は血清、抗原とも25倍迄よく反応して居る。しかし+++即ち赤血球の全凝塊は認められなかった。(表2, 3, 4)。

3回免疫のものは3例試みたが総て陰性であり、対照も同じく陰性であった。

IV) Immobilization test

トリポネーマ・バリーダに免疫血清を混ぜると、その運動が不活潑になり、やがて静止して仕舞うと云う実験は既に知られて居る。

此の方法をアメーバに利用したのは Cole 及び Kent である。しかしトリポネーマ・バリーダと赤痢アメーバの相違は前者が一度運動不良となつたら最後迄その運動性を恢復しないが、後者では時間の経過と共にその運動性が恢復して来る事があると彼等は述べて居る。

a) 免疫法。従来と同じ方法で5回免疫した。

b) 術式。Tube methode と Slide methode の二方法を行つた。前者は赤痢アメーバの増殖して居る Balamuth 培地に血清 1.0ccを加えて37℃に保つ、後者は培地より約 0.1ccの沈澱を採り、これを Slide の上に置き、これに約0.05ccの血清を混じ、カバーグラスを乗せてパラフィンで封じ37℃に保つ。此の虫体、血清混合液を30分後より観察し4時間迄見る。各時間毎に虫体 100を数え、その中の運動不良となり円型化した虫体の百分率を求める。

対照には正常モルモット血清を虫体に加えたものを用いた。

c) 成績 Cole & Kent (1935) の報告に依れば80%以上もの虫体が円型化しているが、本実験に於ては40%位がその最高値である。その最高値も大体初めの30分に認められ、その後は次第に或は急速に運動性を恢復して来て居る。此の様な傾向は全例に於て認められる。そして一部の例外を除いては4時間後には対照と殆ど同じに

成る。Tube methode より Slide methode の値が高いのは矢張りパラフィンで封じて内部は十分流動性にしてあるが、37℃に保つ間に乾燥するためであろうと考えられる。(表5—8。表中番号とあるは全て動物の番号であり、各数字は不動化したアメーバの百分率を示す)。

3回免疫と5回免疫では後者の方が遙かに免疫度が強力である事を示して居る。図1には各試験の平均値の時間の推移を示した。

第5表 5回免疫に依る血清の Tube-methode

時間 番号	実 験					対 照				
	0.5	1	2	3	4	0.5	1	2	3	4
1	48	20	18	14	16	12	10	14	12	14
2	44	26	16	10	12	18	15	12	8	12
3	52	30	14	15	12	15	12	10	11	10
4	34	12	14	10	8	8	10	11	6	9
5	38	22	21	14	11	18	16	8	8	10
6	33	16	14	12	10	8	7	2	2	3
7	40	18	11	8	8	12	10	9	6	5
8	30	12	14	10	8	11	8	10	5	5

第6表 5回免疫に依る血清の Slide-methode

時間 番号	実 験					対 照				
	0.5	1	2	3	4	0.5	1	2	3	4
9	48	40	38	32	35	32	36	30	28	25
10	38	36	30	29	26	32	34	21	21	18
11	46	38	28	16	16	22	18	10	10	8
12	42	32	20	12	10	26	17	10	8	7

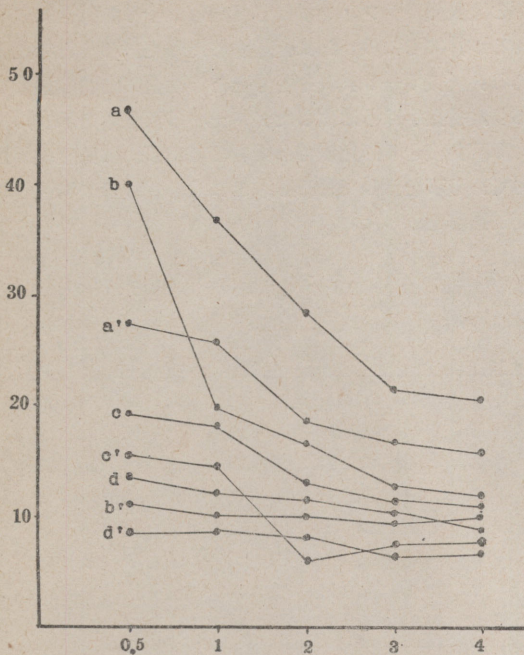
第7表 3回免疫に依る血清の Tube-methode

時間 番号	実 験					対 照				
	0.5	1	2	3	4	0.5	1	2	3	4
13	18	15	18	14	10	15	16	15	12	8
14	12	13	10	12	8	10	9	10	10	8
15	12	12	8	5	5	8	10	5	5	4
16	15	6	6	4	5	2	3	2	4	4

第8表 3回免疫に依る血清の Slide-metode

時間 番号	実 験					対 照				
	0.5	1	2	3	4	0.5	1	2	3	4
17	24	26	18	19	22	21	22	12	16	20
18	14	10	4	2	0	10	6	0	0	0

図1 Immobilization test



- a 5回免疫 Slide method
 a' 対照
 b 5回免疫 Tube method
 b' 対照
 c 3回免疫 Slide method
 c' 対照
 d 3回免疫 Tube method
 d' 対照

総括

以上種々なる免疫反応を行つて見たが、期待した成績は得られなかった。

過去に於て最も喧伝されて来た補体結合反応は1例も陽性は無かつた。これは抗原が適当でない為か、或は先人の研究では家兎を用いて居るに反し、本実験ではモルモットを使用したので、その免疫獲得が弱かつた為か不明である。

沈降反応は種々なる抗原を以て試みたが、比較的良好な成績を得たのは Coca 氏抗原であつた。しかしその成績は Wagener の報告には及ばず多くは非稀釈の血清に陽性を認めるのみであつた。

赤血球凝集試験では10例中3例に陽性を得たが、これは5回免疫のものであり、3回免疫のものでは総て陰性であつた。

Immobilization test では5回の免疫反応を行つたものでは、全例において、対照よりも高率に不動化が見られた。即ち陽性の成績が得られた。従つて本研究に於て試みた如き免疫方法による時は、種々なる免疫反応のうち、Immobilization test が最も高率に陽性成績を示したことになる。

拙筆に当り、御指導、御校閲を頂いた松林教授に深謝致します。亦種々御助言を頂いた浅見助教授、都立衛生研究所松井先生、荏原病院斎藤先生に御礼申し上げます。本論文の要旨は昭和30年4月、第24回日本寄生虫学会総会に於て発表した。

文 献

- 1) Böe, J. (1945): Complement fixation antigen in *E. histolytica* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 60, 31-33.
- 2) Craig, C. F. (1947): Observations upon the hemolytic cystolytic and complement binding properties of extracts of *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med.*, 7, 225-240.
- 3) Craig, C. F. (1928): Complement fixation in the diagnosis of infections with *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med.*, 8, 29-37.
- 4) Craig, C. F. & Kagy, E. (1933): A study of complement fixation in experimental amebiasis in dogs. *Am. J. Hyg.*, 18, 202-219.
- 5) Cole, B. A. & Kent, J. F. (1953): Immobilization of *E. histolytica* in vitro by antiserum produced in the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 83, 811-814.
- 6) 平岡心輝 (1936): エントアメーバブッカーリスに関する実験的研究, 福岡医大雑誌. 29, 607-658.
- 7) Heathman, L. (1932): Studies on the antigenic properties of some free-living and pathogenic amebas. *Am. J. Hyg.*, 16, 97-123.
- 8) Hussey, K. L. & Brown, H. W. (1950): Complement fixation test of hepatic amebiasis. *Am. J. Trop. Med.*, 30, 147-157.
- 9) 松林久吉 (1947): 赤痢アメーバ, 東西出版社.
- 10) McEntegast, M. G. (1952): The application of a haemagglutination technique to the study of *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Clin. Path.*, 5, 275-280.
- 11) Menolasino, N. T. & Hartman, E. (1954): Immunology and serology of some parasitic protozoan flagellates. *J. Imm.*, 72, 172-176.
- 12) Menendez, P. E. (1932): Serological relationships of *E. histolytica*. *Am. J. Hyg.*, 15, 785-808.
- 13) 緒方富雄 (1946): 血清学の領域から, 河出書房.
- 14) 緒方富雄 (1944): 血清学実験法, 南山堂.
- 15) Ochsner, A. & De Bakey, M. (1943): Amebic hepatitis and hepatic abscess. *Surgery*, 13, 460-493.
- 16) Paulson, M. & Andrews, J. (1938): Complement fixation in amebiasis, comparative evaluation in clinical practice. *Arch. Int. Med.*

61, 562-578. —17) 白男川久(1935): 赤痢アメーバの免疫学的研究, 福岡医大雑誌. 28, 2635-2760. —18) 里見三男(1935): 原虫病に対する免疫, 大阪高等医専雑誌. 3. 1-5. —19) Sherwood, N. P. & Heathman, L. (1932): Further studies on the antigenic properties of pathogenic and free-living amebas. II. Complement fixation in amebic dysentery. Am. J. Hyg., 16, 124-136. —20) Spector, B. K. (1932): A comparative study of cultural and immunological methods of diagnosing infections with *E. histolytica*. J. Prev. Med., 6, 117-128. —21) 進藤宙二 (1952): 血清学の新しい見方と考え方, 医学書院. —22) 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.

Summary

Guinea pigs were injected intraperitoneally with suspension of *E. histolytica* growing in Balamuth's medium, after they were repeatedly washed with normal saline by centrifugation to eliminate as much associated bacteria as possible. The injection was repeated 3 or 5 times

with interval of 5 days. The animals were killed 5 days after the last injection and the serum was tested with several immunological procedures.

The complement fixing reactions, carried on with alcoholic extract of amoebae as antigen, was always negative. The precipitation test was carried on with several different antigens, such as extracts of amoebae in alcohol, Coca's solution, or by freezing and melting method. No positive reaction was obtained with alcohol extract antigen. Only a small number of cases gave a positive reaction with other kinds of antigen, but the titre was very low. Erythrocyte agglutination reaction was also tried. Among 10 serums of guinea pigs which had received 5 injections, 3 gave positive reaction by 25 times dilutions. Immobilization test was carried on by mixing the suspension of living amoebae and test serum and estimating the percentages of immobilized amoebae. Serums obtained from animals which had received 5 injections of amoebae all gave positive reactions.