

赤痢アメーバの免疫学的研究

(2) 実験感染動物の免疫反応及び免疫動物に於ける感染の抑制

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 10 月 3 日 受領)

私は前報に於て、赤痢アメーバをモルモットの腹腔内に注入することにより、それを免疫し、その血清を得て各種免疫反応を試みたことを報告した。その結果は補体結合反応、沈降反応、赤血球凝集試験では何れも明確な陽性の成績を得なかつたが、培養虫体を用いての不動化試験 (Immobilization test) はかなり著明な陽性成績を示した。この赤痢アメーバの不動化試験については既に Cole & Kent (1953) が報告している所である。

今回は赤痢アメーバを腸管に感染せしめた動物の血清及び腸、肝等の懸濁液を得てそれを赤痢アメーバに作用せしめて不動化試験を試みた。又別に赤痢アメーバを抗原として腹腔に注入免疫した動物が、赤痢アメーバの感染に対して抵抗を獲得しているか否かをも検討した。従来アメーバ症に関する免疫反応は種々検討されて来ているが、免疫を得ている動物の感染の状況については研究が行われていないようである。

材料と方法

感染動物の血清その他を用いての不動化試験には先づ健康モルモット (200 g) の盲腸内に培養赤痢アメーバ浮遊液 2.0cc を注入して感染せしめる。その後の状態を観察しながら 4~7 日目に心臓穿刺に依り採血して血清を取り、更に開腹して盲腸の潰瘍部及び肝臓の一部を切除する。

此の盲腸及び肝臓を乳鉢内で磨滅し、生理的食塩水を加えて 0.5%, 1%, 5% の懸濁液とする。

此等血清、盲腸、肝臓の 3 種の材料 1.0cc とアメーバ液 1.0cc を小試験管内で混合し、孵卵器内に入れる。その後 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 3 時間後に不動化し

たアメーバの百分率を算定する。

盲腸、肝臓の懸濁液 0.5% と 1% では殆ど結果は同じであり、又 5% のものでは肝臓の場合では肝細胞が多数になるため、アメーバと鑑別し難い。そこで後には総ての実験を 1% 懸濁液で行つた。尚対照として健康なモルモットの血清、盲腸、肝臓を同様に用いた。

第 2 の実験、即ち免疫操作を施した動物が赤痢アメーバ感染に対して抵抗性を得ているか否かについては次の如く実験した。

- 1) 動物は 250 g ~ 300 g のモルモットを用いた。
- 2) 免疫原は Balamuth 培地に 48 時間増殖したアメーバを集め、これをガーゼ 3 枚を以て濾過し、粗大な米粉を除いた。この濾液を緩速遠沈して細菌を含む上清を捨てる。次で 37°C の生理的食塩水を加えてよく攪拌し、更に遠沈する。此の操作を上清が全く透明となる迄反覆する。かくする時沈渣には比較的細菌が少くなる。この沈渣を生理食塩水で 5 倍の懸濁液として用いる。
- 3) 上記 5 倍懸濁液の免疫原をモルモットの腹腔及び皮下に 5 日目毎に 3 回又は 5 回注入する。注入量は 0.5 cc 及び 0.25 cc の 2 通りである。
- 4) 免疫操作終了後 5 日目に該動物を開腹して、盲腸内に 1.0cc の培養アメーバを注入し感染を生ぜしめた。
- 5) 注入後約 7 日で剖検し、盲腸内アメーバの有無、及び腸壁の損傷の程度を検討した。
- 6) その他に共棲細菌のみでも免疫し、感染実験を行つた。
- 7) 対照として無処置の健康モルモットに感染実験を行つた。

本実験に於て実験頭数と称するは、免疫操作を完了し得た頭数であり、モルモットは免疫操作中に死亡するものが甚だ多く、アメーバの腹腔内免疫では初回注入後翌日迄に死亡するものが約半数であり、全免疫操作を完了し、盲腸内感染を行えるものは初めの 3 分の 1 にすぎな

Reiji Sato: Immunological studies on *Entamoeba histolytica*. (2) Immunological reactions on experimentally infected animals and resistance to the infection in immunized animals. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo).

かつた。

成 績

I. 感染動物の血清及び腸、肝の浮遊液によるアメーバの不動化試験。

成績は表1に示した。表中の数字は各時間毎に不動となっているアメーバの百分率を示す。動物は合計10頭用いた。此等はいづれも盲腸内容から直接塗抹に依つて虫体を検出し得たものである。

併しながら潰瘍の形成状況は各例によつて多少の相異がある。即ち No. 1, 3, 7 では中等度の潰瘍であり, No. 2, 5, 9 は比較的大きな潰瘍を形成して居た。又 No. 4, 6, 8, 10 では潰瘍と云う程の所見は無く, 腸皺壁の陥入部が発赤, 浮腫状を呈し, 該部より虫体を検出し得たものである。

血清を用いた場合には No. 8 のモルモットに於て30分後に20%の虫体が不動となっているのが最高である。この数値は前報の試験, 即ち家兎静脈内に虫体を注入して免疫した時の不動化虫体53%, モルモットの腹腔内免疫の場合の52%よりも遙かに低い値であり, 且本実験の場合は血清とアメーバ浮遊液の比が1:1であり, 前報の場合は家兎でも, モルモットでも血清1. アメーバ浮遊液2の割合で混合して居た。此等の事情を考える時赤痢アメーバに感染した動物の血中抗体は甚だ少ないのではないかと推察出来る。

1%盲腸懸濁液の場合には最高25%を示して居るが, その対照との差は僅に6%であつて有意の差があるとは云えない。他の場合でも何れも対照との差は4%内外である。

1%肝臓懸濁液ではその不動化率は更に低下して居る。即ち最高20%で全く対照と変りが無いと云える。

血清, 盲腸, 肝臓の3者とも平均を見ると, 不動化の最高値が実験開始後略30分に認められて居る(第1図)。これは対照の場合にも云える事で, アメーバは何か異物接した場合に一度は運動が不良となるのでは無いかと考えられる。

II. 免疫動物の感染に対する抵抗力。

1) 感染率。本実験に使用したH株と称する赤痢アメーバはアメーバ性肝臓膿瘍のために死亡した患者より分離したもので, 初め動物に対する感染性が非常に強かつたが, 既に当教室に於て5年以上に亘り継代培養しているため, その感染性は著しく弱化され, 本実験に於ては無処置動物に対する接種(第2表, 対照)で46.4%の感染成功率を示したに過ぎなかつた。

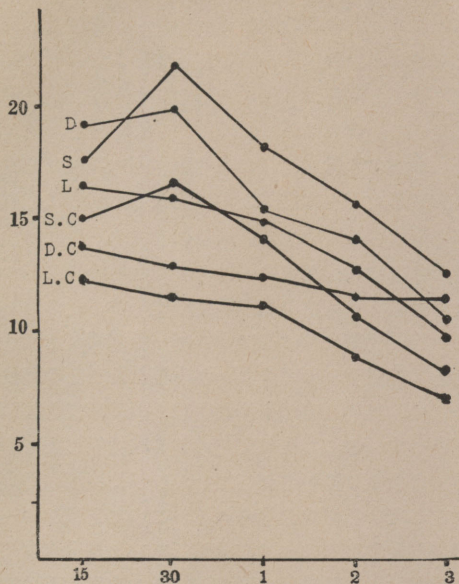
第1表 各時間後における不動化アメーバの百分率

番 号	材 料	試 験					対 照				
		15分	30分	1時	2時	3時	15分	30分	1時	2時	3時
1	S	18	20	14	12	12	16	18	16	10	12
	D	20	18	12	8	8	16	12	14	10	12
	L	19	20	16	16	14	18	12	8	10	6
2	S	22	24	18	18	10	16	20	20	6	6
	D	19	20	12	6	4	16	19	14	10	7
	L	17	22	20	14	10	12	17	18	14	12
3	S	16	18	20	22	18	18	14	15	12	10
	D	24	20	18	16	10	20	18	12	10	14
	L	19	16	18	12	10	16	15	13	14	8
4	S	16	26	20	21	18	18	20	12	10	9
	D	19	21	24	18	17	16	12	10	8	12
	L	12	14	10	12	8	9	10	11	11	9
5	S	12	24	26	20	19	18	19	21	22	14
	D	17	21	18	19	15	12	14	16	10	10
	L	14	15	12	9	8	4	5	9	2	4
6	S	14	20	19	17	11	10	9	11	4	7
	D	19	25	20	21	18	17	19	21	24	20
	L	14	10	11	13	8	9	11	13	10	9
7	S	15	14	11	6	5	10	14	7	9	5
	D	14	21	18	15	7	11	7	13	14	11
	L	18	12	9	5	5	12	14	17	6	7
8	S	22	29	18	14	13	20	17	16	10	7
	D	18	19	11	11	8	16	15	12	7	6
	L	18	20	24	19	15	14	12	14	13	7
9	S	24	28	18	15	12	20	22	14	13	10
	D	17	17	15	16	12	15	10	12	14	11
	L	16	18	20	17	14	19	14	11	10	7
10	S	21	20	19	19	14	12	18	17	15	12
	D	19	20	11	15	9	10	8	7	10	11
	L	14	17	16	13	10	12	14	10	8	6

S 血清 D 1%盲腸懸濁液 L 1%肝臓懸濁液

予め免疫操作を施したモルモットに対する接種の成績は表2に示した如く, 免疫操作の際の注射量, 殊に注射回数によつて著しく異なる。アメーバ浮遊液 0.5ccを腹腔に注射した場合, 3回注射群では15頭中4頭(26.6%)が感染し, この場合も対照に比して, 感染が或る程度抑制されているように見えるが, 5回注射群では7頭中1

第 1 図 不動化アメーバ百分率の平均値の時間的推移



- S. 免疫血清と赤痢アメーバ
- S. C その対照
- D 潰瘍部盲腸と赤痢アメーバ
- D. C その対照
- L 肝臓と赤痢アメーバ
- L. C その対照

頭も感染していない。即ち感染は強く抑制されたと云つてよいであろう。アメーバ浮遊液0.25ccを同じく腹腔中に注射した例では、3回注射の場合は7頭中6頭までが感染し、却つて感受性が高まっているように見え、5回注射の場合では18頭中2頭のみで感染で、著明な抑制が見られる。

対照として共棲細菌だけを腹腔に注射した例では、3

回注射では著しい影響は見られなかつたし、5回注射でも(10頭中3頭感染)感染が抑制されているようには見うけられない。かくしてアメーバ浮遊液を腹腔内に5回注射した場合は、アメーバの腸管感染を防禦するような抗体が生じていると認められる。

アメーバ浮遊液を皮下注射して免疫した場合には、0.5cc宛3回注射では6頭中5頭まで感染して感受性が高まっているように見えるし、5回注射の場合には7頭中1頭も感染せず、強い抵抗性を示している。この関係は丁度、アメーバ浮遊液0.25ccを腹腔中に注射した時に似ている。対照の共棲細菌の皮下注射では、3回注射の場合は稍感染性が高まつたようにも見えるが、例数が少なくて明瞭でない。5回注射でも抵抗性を得ているようには見えない。要するに3回注射では0.5cc宛の場合を除いてはむしろ感受性を増した結果となり、5回注射では何れの場合でも著明に抵抗性を増し、それが共棲細菌のみによる免疫と比較して、アメーバ自身の抗原によつて得られた抵抗性であることが確認される。

2) 潰瘍形成に対する影響。この実験に用いたH株は無処置のモルモットに接種した場合、28頭中13頭に感染し、そのうち9頭に肉眼的潰瘍が見られた。(第2表、対照) 予め免疫操作を施した動物に接種した試験では、その免疫注射を3回行つたか、5回行つたかで結果に著しい違いがあるので之等を別々に考える必要がある。

3回免疫の場合、アメーバ浮遊液0.5cc宛を注入した例では潰瘍は1例も出来ていない。感染した4頭について見ると3頭で腸腔内容にアメーバが認められ、他の1例ではその内容を培養して初めてアメーバを認め得たものである。3回免疫の他のグループに於ては何れも相当数に潰瘍が認められた。潰瘍を認めなかつた感染例では腸腔内に虫体が直接認められ、それらを培養して虫体の

第 2 表 免疫注射を施した動物の盲腸へ赤痢アメーバを接種した試験

免 疫 原	3 回 免 疫			5 回 免 疫			
	実験頭数	感染 (%)	潰瘍 (%)	実験頭数	感染 (%)	潰瘍 (%)	
腹注	アメーバ0.5 cc	15	4 (26.6)	0	7	0	0
腔	アメーバ0.25cc	7	6 (85.7)	2 (28.6)	18	2 (11.1)	1 (5.6)
内射	共棲細菌0.5 cc	5	3 (60.0)	2 (40.0)	10	3 (30.0)	1 (10.0)
皮注	アメーバ0.5 cc	7	5 (71.5)	2 (28.6)	6	0	0
下射	共棲細菌0.5 cc	3	2 (66.6)	1 (33.3)	8	3 (37.5)	1 (12.5)
対照	無 処 置	実 験 頭 数 28	感 染 13 (46.4 %)	潰 瘍 9 (32.4 %)			

増殖を認めたものである。之等の中には潰瘍までになつていないが、盲腸皺襞の陥入部に小さな炎症巣(発赤)が存在し、そこから直接に虫体を検出し得た例も存在した。

5回免疫の場合にはアメーバ浮遊液 0.5cc宛注射した例では、腹腔内でも皮下でも1例として感染した例がないのであるから潰瘍形成例のないものも当然である。0.25cc宛の場合でも、18頭中1頭にのみ潰瘍が形成されたにすぎない。即ち何れの場合にも潰瘍形成は強く阻止されている。共棲細菌を0.5cc宛腹腔内又は皮下に注射した例でも、潰瘍の形成は尚ある程度阻止されている。このことはアメーバ性潰瘍の形成に共棲細菌の働きが関係することを示すものとして注意す可きであると思う。

考 按

前報に述べた如く、赤痢アメーバ培養虫体を家兎静脈内、或はモルモット腹腔内に注射する時は、それらの血清中に、培養アメーバの運動を停止せしめる如き抗体を生じる。

本報では、腸管に赤痢アメーバが感染しているモルモットの血清や、腸、肝の浮遊液をアメーバに作用せしめたのであるが、アメーバを不動化する能力は甚だ弱いものであった。静脈内や腹腔内に注入されたアメーバは全て死滅崩壊するものであり、それらより遊離した抗原が上述の如き抗体を生ずるものと思われる。腸管感染の場合、アメーバはそこに潰瘍を形成はするが、そこから血中に移行するものは比較的僅少であり、大部分のアメーバは腸腔に脱落して排泄されてしまう。従つて虫体内物質が直接抗原として作用することは少いのであろう。併し、組織内に生活しているアメーバが何等かの物質を絶えず分泌して、それが宿主に吸収されているとすれば、それに対する抗体は生じてもよい筈である。そのような抗体の存在を否定することは出来ないが、その物質によつてアメーバを不動化するような抗体は著明には生じないと云い得る。アメーバが実際に如何なる物質を体外に分泌しているかはわからないが、多くの学者の云う所では、少くとも毒物と云う如きものではないらしい。一方赤痢アメーバに感染したモルモットは比較的早期に(略1週間以内)死亡するものが多いので、抗体を充分に産成するだけの期間がないことも考えられる。以上要するにアメーバの体内物質も宿主にはあまり吸収されず、分泌するものも強い抗原性のあるものとは考えられず、又死亡するまでの期間が短いため、モルモットではアメーバの腸管感染により、虫体を不動化するような抗体が出来にくいものと思われる。腸壁、或は肝臓はアメーバ

物質が直接作用する部位であるので、その磨碎浮遊液を作用させて見たが同様に強い抗体は見られなかった。

一方モルモットの腹腔内に赤痢アメーバを注入して免疫しておけば、赤痢アメーバの腸管感染をある程度防ぐことは可能であると云う結果を得た。その際、注射する抗原(生きているアメーバ)の量及び回数を色々変えて試みた。3回の注射では0.5cc宛腸腔内に入れた時のみ感染を抑制したような結果を得、感染した動物にも潰瘍は1例も形成されていない。0.25ccを注入したものの、共棲細菌のみを注入したものでは、3回注射の場合却つて対照におけるよりも感染率が高まつている。その原因は判らないが、腸壁におけるアレルギー性の病変と云うようなことも関係するのではないかと思われる。5回注射の場合には、感染は著しく抑制され、潰瘍形成も甚しく困難となつている。共棲細菌だけを5回注射したものでは、感染はあまり抑制されてはいないが、潰瘍の形成は困難になつている傾向が見られる。このことはアメーバ性潰瘍が形成されるのには、共棲している細菌が少くともある期間は大腸粘膜面で増殖してそこに何等かの障害を与えることが必要であるかのように見受けられる。山川(1954)もモルモットに同様な免疫操作を施したあとで盲腸腔内にアメーバを接種すれば、潰瘍の形成が抑制されることを報告している。

結 語

1) 赤痢アメーバをモルモット腸管に感染させてもその血清中にはアメーバの運動を停止せしめる抗体は殆んど産生されない。腸壁、肝臓等、感染したアメーバが直接に接触し得る組織の抽出液にも同じ抗体は認められなかった。

2) モルモット腹腔又は皮下に、生きている赤痢アメーバを反覆注射すれば免疫を生じて、その後の感染及び潰瘍形成に対して抵抗性を増す。この場合アメーバとそれに共棲する細菌を混合のまゝ5回の注射で著明に感染を防禦した。3回注射では殆んど効果が認められなかった。

3) 共棲細菌のみを用いて同様に免疫した場合には感染を防禦すると云う所見は得られなかったが、潰瘍の形成はかなり抑制される傾向が見られた。このことは潰瘍形成には共棲細菌の増殖が、それを助長するように作用することを示すものであろう。

本論文の要旨は昭和30年4月日本寄生虫学会総会で発表した、摺筆にあたり御指導、御校閲を頂いた松林教授並びに浅見助教授に深謝致します。

文 献

- 1) Craig, C. F (1928): Complement fixation in the diagnosis of infections with *E. histolytica* Am. Jour. Trop. Med. 8, 29~37. —2) Cole, B. A. & Kent, J. F. (1953): Immobilization of *E. histolytica in vitro* by antiserum produced in the rabbit. Pro. Soc. Exp. Biol. & Med. 83, 811~814. —3) E. C. Faust (1954): Amebiasis —4) Heathmann, L. (1932): Studies on the antigenic properties of some free-living and pathogenic amebas. Am. Jour. Hyg. 16, 97~123. —5) Swartzwelder, J.C. & Muller G.R. (1950): A comparison the infections rate and gross pathology of amebic infections in normal and antigen injected rats. Am. J. Trop. Med. 30, 181~183. —6) 松元陽郎 (1956): 赤痢アメーバのモルモット感染実験特に共棲細菌転換の病原性に及ぼす影響, 日新医学, 43, 28~34. —7) 坂元祐実 (1939): 犬蛔虫高度感染白鼠臓器浸出液及び血清の同虫仔虫に対する作用, 慶応医学 19, 1343~1352. —8) 百男川久 (1935): 赤痢アメーバの免疫学的研究, 福岡医大雑誌, 28, 2635~2760. —9) 山川速水 (1954): 赤痢アメーバのモルモット感染実験殊に免疫的考察, 寄生虫学雑誌, 3 (3), 189~192. —10) 山川速水 (1954): 赤痢アメーバのモルモット感染の病理組織学的研究, 寄生虫学雑誌, 3 (4), 249~254.

Summary

Guinea pigs were experimentally infected by inoculating *Entamoeba histolytica* into caecum by laparotomy. Serum and suspension of caecum and liver were examined by mixing with suspension of amoebae whether the fluids were able to make amoebae immobile (Immobilization

test). Animals were autopsied 4-7 days after the inoculation as they usually die of infection in those days. Some animals showed severe ulcers in their caecum and colon, others showed no gross pathological changes in the intestinal wall, though abundant amoebae were found in the lumen. Intermediate types occurred. None of the serum or suspensions of organs gave positive immobilization test. This seemed to be attributed to the presumption that amoebae in the intestinal wall might be discharged in the lumen and rather a small amount of their product was absorbed into host, which was insufficient to produce immobilization antibody.

The second experiment was carried out to test the resistance for infection in guinea pigs which were immunized by the injection of living amoebae into abdominal cavity or subcutis. The injection was repeated 3 times in one group and 5 times in another with the interval of 5 days. It was already demonstrated in my previous paper that these procedures produced immobilization antibody in the serum. These immunized animals were inoculated with *Entamoeba histolytica* into caecum and resultant infection and ulcer production were examined compared with the findings in control animals.

The infection was markedly inhibited in animals which were injected 5 times with antigens, no matter whether it was in abdominal cavity or in subcutis. Even when the infection was established, amoebae rarely penetrated into tissues. Immunization by 3 injections of antigen did not protect animals from infection and immunization by the injection of associated bacteria only seemed to have produced some protecting effects.