

赤痢アメーバの免疫学的研究

(1) 補体結合反应用各種抗原の比較

福原文明

慶應義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和34年8月31日受領)

赤痢アメーバの免疫学的研究は古くから数多くの人により実験的及び臨床的になされて来ている。研究された免疫反応は、主として補体結合反応であるが、その他に沈降反応、皮内反応、凝集反応、溶解反応、不働化反応、赤血球喰作用抑制反応、等がある。

補体結合反応(以下 C.F.T. と略す)に就いて見ると、最初に Izar (1914) が赤痢アメーバ虫体(以下 *E. hist* と略す)を含む人糞便及び肝膿瘍の膿の水性抽出液を抗原として *E. hist* に罹患した人及び猫の血清中に補体結合性物質の存在を見出し、von Hage (1920) は同一方法で作った抗原で患者につき検査したが陰性であつたとしこれに反対した。翌年 Scalas (1921) は患者の便の粘液を食塩水抽出し抗原として、特異抗体が血清中にある事を見て、Izar の説を支持した。その後 Craig (1927) は培養赤痢アメーバで、そのアルコール抽出物中に“haemolytic & cytolytic & Complement binding substances”を見出しこの抽出物を抗原として *E. hist* 感染個体血清との間に、種々の実験及び臨床的应用を行っている。特に C. F. T. に就いては、その後8年間に検便を同時に行つた1,000例の中、175例(17.5%)に C. F. T. 陽性例を出しこの中157例(89.7%)は検便で *E. hist* を見出しアメーバ感染を確認している。又彼は便中に *E. hist* が排出される事が比較的少なく、診断に困難とされているアメーバ性肝膿瘍その他の腸管外アメーバ症の患者血清にも殆んど常に陽性成績を得ている。更に実験感染せしめた犬の96.5%に C. F. T. 陽性を得、C. F. T. 陽性発現時期は接種後3~14日であり、*E. hist* が便中から消失して感染から脱して治療すれば C. F. T. は陰性化してくると云い、この時期は虫体消失後2~4週であるとし、この反応が特異性を示す事を強調し、臨床的应用がなし得ると力説している。

而し乍らその後各研究者の発表によると、必ずしも上記の如き診断的正確性を有せずとするものがあり、特に

腸管アメーバ症に於いてその成績には、発表者により著しい差がみられる。例えば Sherwood & Heathman (1932) の9例や、Kiefer (1932) の3例の如く少数例の成績ではあるが、100%陽性を出しているものから、Hussey & Brown (1950) の発表に見る如く、明らかに虫体を排出し症状のある124例の患者の中僅かに3例(2.4%)のみ陽性であつたと報告しているものまでである。斯かる成績の大きな相違の原因に就き、Bozicevich (1950) は、*E. hist* の株による抗原性の違い、特にこれは、large race と small race の違いにあるとし、更に抗原の作り方が各研究者により異なる事、又 C. F. T. の方法にも相違がある事等を指摘している。

Spector (1936) によれば large race cyst で作つた抗原で small race cyst 感染の25人の血清との間の C. F. T. は全て陰性であつたが、large race carriers の15人中12人は陽性反応を示したと報告し、更に彼女は small race 感染は一般に発症し難く且つ潰瘍形成し無かつたと云い、株により抗原性の相違や病原性の相違がある事を主張している。これに対し Craig (1937) 及び Meleney & Frye (1937) らは大小株間に抗原性の差は見出せなかつたと云い、且つ犬、小猫、猿等に対する病原性は共に強くあつたと云い、又 Menendez (1932) も数種の免疫反応を行つてみたが6種の *E. hist* 株間に抗原性の相違がなかつたと云つている。Swartzwelder & Avant (1952) は犬に実験的に感染を起しておき免疫産生の有無を再感染の発生を防禦するかどうかで調べているがこの結果も同種株、異種株間に共に差がなかつたと報告している。而し乍ら Bozicevich (1950) は25人の carriers に就いて C. F. T. を行い大小株間に明らかな差を見たとし、而し同じ large race の2種の *E. hist* 株間では C. F. T. が80~93%一致したと云つている。そして彼は臨床診断に用いられる抗原は是非 Polyvalent な抗原が必要であると強調している。又最近 Schaffer & Ansfield (1956) は5株の

E. hist を使用して各株に対応する家兎抗血清を作り、*E. hist* の赤血球喰能力を、同種或は異種抗血清下に見て、*E. hist* 株間に差のある事を認めている。

アメーバ症に於ける C.F.T. の方法に就いて Kenney (1952) は特に腸管アメーバ症の検査成績が高率に間違つた陽性反応を呈するので、これを避ける為被検血清を薄めたり、抗原量を少なくしたり、fixation の時間を短縮したりされているが、これにより false positive は多少は減少しても、抗原価が低いとか、抗体価が低い時は sensitivity が落ち false negative になり易い、従つて抗補体作用を起す傾向のない強力な抗原を使用して、抗原量も増量し、長時間の fixation で C.F.T. を行えば低い抗体価の患者血清でも陽性たらしめ得ると云つている。Bozicevich (1950) も同様の観点から polyvalent 抗原で長時間の fixation に賛成している。これに対し Hussey & Brown (1950) 及び Kent は臨床的に診断し難い疾患の C.F.T. では sensitivity は多少落ちても specificity の方が大切であるとして、長時間の fixation では非特異反応が現われ易いと反対している。

従来赤痢アメーバの C.F.T. に用いられた抗原は多量あるが、その主なものを歴史的に見ると、1) *E. hist* の含まれている便、粘液、膿等の水性抽出液 (Izar, Scalas) 2) 培養栄養型のアルコール抽出液 (Carig), 3) 培養栄養型をアセトン抽出後アルコール溶解、更に Cholesterol を加えた抗原 (Sherwood & Heathman), 4) 培養栄養型をアセトン抽出後、アルコール抽出抗原 (Weiss & Arnold), 5) 培養チステのアルコール抽出液 (Stone), 6) 単一共棲菌 organism "t" と共に培養した栄養型の水性抽出液 (Rees *et al.*), 7) 培養栄養型の乾燥粉末化したものの生食水溶解抗原 (Böe), 8) *Escherichia coli* と共棲せしめ培養した栄養型の水性抽出液 (Fulton *et al.*) 等がある。

Magath & Meleney (1940) は *E. hist* 感染が確認されている 90 人の血清を 2 か所の研究所に各々送り同一血清につき、Craig の抗原、Stone の抽出方法を modify した抗原、Sherwood & Heathman の抗原で別々に検査した所、29 例 (32%) のみ C.F.T. が陽性に出、而も両研究所共に一致したのは 17 例 (18.9%) のみであつたと報告している。

斯の如く、*E. hist* の免疫学的研究上に於ける問題点は多々あるが、最も重要であり且つ困難なのは適切な抗原を得る事であろう。未だアメーバの無菌培養が成功せず、この為色々な方法で、例えば Meleney & Frye (1940)

は化学的方法で、Rees (1942) は micro-manipulator を使用して無菌的に虫体を取り出し、又 Jacobs (1947) は抗生物質を使用して死菌の混在のもとでアメーバを発育せしめたり、Schaffer *et al.* (1953) ちは組織細胞と共にアメーバを培養、Rees (1954) は肉のコマギレを透析、熱処理培地で発育せしめたりして、多くの努力がなされているが未だ特異性並に感受性等の点に就き、充分満足出来る抗原は作られていない現状である。

私は実験的に一株の *E. hist* 生虫体を感作抗原とし、家兎に注射して免疫血清を作り、別に 5 種の抽出法により同一株 *E. hist* の反応用抗原を作製し、各抗原で同一血清について C.F.T. を行つてみて、抽出方法による抗原の優劣を比較した。

材料及び方法

A) 抗原

本実験に使用した *E. hist* 株は過去数年間、吾が教室で継代保存しているアメーバ性肝膿瘍の患者の便から分離された H 株であり、本株の cyst 直径は 14μ で所謂 large race *E. hist* である。

1) 感作抗原の作り方: Balamuth 培地に 48 時間培養した栄養型生虫体を多数の培養試験管底部から 1 個の大遠沈管に集め、 37°C に保温した生食水で数回洗浄、遠沈 (1,000 rpm 5 分間) を上清液が透明になる迄繰返して、行い (4~5 回) この間に可及的に米粉や共棲細菌その他培地内成分を除去する。最後に虫体数を Thoma 計算盤で算定し、per cc 20~40 万にした。

2) 免疫反応用抗原の作り方: 免疫反応用抗原には出来る丈大量の虫体が必要の為、試験管培養から *E. hist* を集めることをせず、三角コルベン内に培地を作り、それに大量培養した。虫体の集め方は前記の感作抗原作製時と全く同じである。およそ一抗原に *E. hist* 虫体数は 5,000 万~7,000 万であつた。

3) 対照用共棲細菌感作抗原の作り方: 対照用抗原として共棲細菌だけを別に Balamuth 培地に米粉と共に培養し、48 時間後に上記手技と同じく洗浄、遠沈 (3,000 rpm 20 分間) して生食水浮游液を作り、0.3% の割合に Formalin 液を加えたものを作つた。

B) 免疫血清の作製

1) 実験動物: 体重 1.7~2.3 kg の健康成熟家兎を用いた。

2) 感作方法: イ。家兎耳静脈内に 5 日間隔 5 回注射及び 2 日間隔 10 回注射の 2 方法を行つた。1 回注射量は、上記虫体浮游液は 1.0~2.0 cc、対照の共棲細菌浮

液は菌数が多いと思えるので(但し算定せず) 0.2cc 注射した。

ロ. 家兎腹腔内に上記同様の間隔で注射した。1回注入量は虫体浮游液では 2.0~4.0 cc, 共棲細菌浮游液は 0.2cc である。

3) 採血と保存: 最終感作後 7~10 日目に無菌的に頸動脈切開後全採血し, 血清分離し, 56°C 30 分非働化, マーゾニンを 10⁻⁴ 倍に加え, アムプレ封入, 4°C 保存。

C) C.F.T. 抗原の製法

抗原 [A] 純アルコール抽出

Craig の原法を稍々変えた白男川(1935)の方法に従った。即ち前述の洗浄, 遠沈操作で得た沈渣 1 容に対し無水アルコール 10 容を加え, 長頸コルベン中に入れ, パラフィン密栓し 37°C 孵卵器内に入れ 1 日数回振盪抽出し 10 日間続け, 濾過したものを氷室保存。

抗原 [B] 超音波破壊抗原

洗浄虫体生食水浮游液を超音波管に移し, 1,400 Volt, 180 mA, 250 Watt, 960 kc で 5 分間, 超音波振動を与えて, その後 12,000 rpm 30 分間超遠沈してその上清液を取り, マーゾニンを 10⁻⁴ 倍に加え氷室保存。

尙 *E. hist* の超音波抵抗を見ると第 1 表の様であつた。但し虫体の破壊有無は光学顕微鏡で観察した。

第 1 表 *E. hist* の超音波振動抵抗(虫体の有無は光学顕微鏡で検査した)

電 圧	電 流	電 力	時 間	有 無
1,600 V.	250 mA	400W	3分	(-)
1,400	180	250	5	(-)
1,200	160	190	3	(±)
1,000	120	120	3	(+)

抗原 [C] 凍結融解抗原

洗浄虫体生食水浮游液を梨子型コルベンに入れ, ドライアイスを含むアセトン中にこれを漬け, 速やかに凍結せしめ, 次いで流水中で融解し, 再び凍結する。この操作を 8~10 回反覆し, その後 12,000 rpm 30 分超遠沈し上清液をとる。マーゾニン加, 氷室保存。

抗原 [D] エーテル可溶抗原

抗原 [C] と同じく凍結融解せしめたものに同量のエーテルを加えて, 分液漏斗中に入れ, 激しく振盪することを繰返し行つて, 抽出後静置し, エーテル層がはつきり分れてから, これを三角コルベンに取り出し, 真空ポンプでエーテルを除去して生食水に置換したもの, マーゾニン加, 氷室保存。

抗原 [E] エーテル可溶物除去

抗原 [D] 抗原の作製時, エーテル層を除いた残りを三角コルベンに入れ, 更に真空ポンプで完全にエーテルを除き, 12,000 rpm 30 分超遠沈しその上清を取る。マーゾニン加, 氷室保存。

D) C.F.T. の方法及び判定

本実験で行つた C.F.T. は米国陸軍々医学校法の伝研改良法である。即ち羊血球溶血系を用い, 被検血清は 0.1cc づつ階段稀釈し, 抗原液も階段稀釈して 0.1cc, 補体 0.2cc (2 Full units) 加える。よく混ぜた後 37°C 60 分温槽に入れ, その後, 前記溶血系を各 0.2cc 加え cc 再び温槽に入れ, 30 分後に取り出して反応を読む。従つて fixation period は 37°C 60 分である。

判定は完全溶血阻止を記号 4 とし, 以下 3 を 75% 溶血阻止, 2 を 50% 溶血阻止, 1 を 25% 溶血阻止, 0 を完全溶血とした。

第 2 表 純アルコール抽出抗原 [A] を用いての C.F.T.

a. 血清は生虫体感作による免疫血清
(表中太線は 75% 溶血阻止以上)

血清	抗原									
	2×4	8	16	32	64	128	256	512	対照	
2×	4	4	3	2	2	2	1	1	0	0
4	4	4	3	2	2	1	1	0	0	0
8	4	4	3	2	1	1	0	0	0	0
16	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0
32	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0
64	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0
128	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
256	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b. 対 照
血清は共棲細菌のみで免疫したもの

血清	抗原									
	2×4	8	16	32	64	128	256	512	対照	
2×	4	3	2	2	1	0	0	0	0	0
4	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0
8	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0
16	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0
32	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
64	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

第3表 超音波抽出抗原 [B] を用いての C.F.T.

a. 血清は生虫体感作による免疫血清

(表中太線は 75% 溶血阻止以上)

血清	抗原									
	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	4	4	4	4	4	3	2	2	1	0
4	4	4	4	4	4	3	2	2	1	0
8	4	4	4	4	4	3	2	1	1	0
16	4	4	4	4	4	3	2	1	1	0
32	4	4	4	4	3	2	1	0	0	0
64	4	4	4	3	3	2	1	0	0	0
128	4	3	3	2	1	0	0	0	0	0
256	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
512	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b. 対照

血清は共棲細菌のみで免疫したもの

血清	抗原									
	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
4	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

第4表 凍結融解抗原 [C] を用いての C.F.T.

a. 血清は生虫体感作による免疫血清

(表中太線は 75% 溶血阻止以上)

血清	抗原									
	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	4	4	4	4	4	3	3	2	1	0
4	4	4	4	4	4	3	2	1	1	0
8	4	4	4	4	4	3	2	1	0	0
16	4	4	4	4	3	3	1	0	0	0
32	4	4	4	4	3	2	1	0	0	0
64	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0
128	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b. 対照

血清は共棲細菌のみで免疫したもの

血清	抗原									
	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0
4	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0
8	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
16	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

対照は次の2つを置いた。

1. 共棲菌洗浄淨游液の静脈内及び腹腔内感作血清,

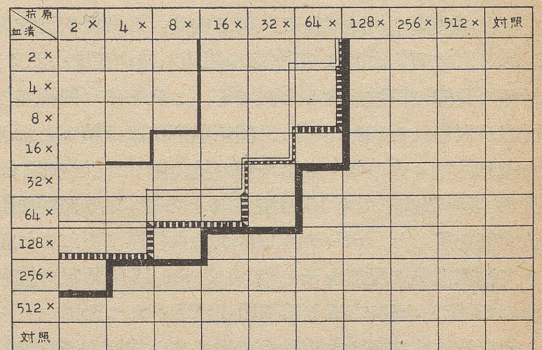
2. 健常家兔血清.

成績

各抽出抗原と同一株 *E. hist* で作った免疫血清との間の C.F.T. 成績は表 2a, 3a, 4a, 5a, 6a で、対照としての共棲菌抗血清との成績は表 2b, 3b, 4b, 5b, 6b である。尙対照の健常家兔血清との間には各抽出抗原とも陰性であったが、共棲菌抗血清との間では低稀釈で反応が現われている。

これらの成績を総括的に図示すると第1図の如くなる。

これらの成績からみると、同一 *E. hist* 株で抗原の抽出方法により同一抗血清に対して示す抗原力価がそれぞれ異なる。而して本実験に於いては、エーテル抽出抗原中には抗原性物質が移行しない模様で第5表の如く反応



第1図 各抽出抗原の比較 (75% 溶血阻止以上)

— 純アルコール抽出
 ▨ エーテル可溶物除去
 凍結融解
 — 超音波破壊

第5表 エーテル抽出抗原 [D] を用いての C.F.T.

a. 血清は生虫体感作による免疫血清

血清 \ 抗原	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b. 対照

血清は共棲細菌のみで免疫したもの

血清 \ 抗原	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

が出なかつた。純アルコール抽出抗原は反応が低稀積部でのみ表われ、抗原力価が低い事を示し、且つ2倍稀積抗原は抗補体作用を表わし(第2表a)、8倍稀積で抗血清の8倍稀積との間に75%溶血阻止を示す程度であり、対照の共棲細菌抗血清との間でも、これとはほぼ同程度の反応が表われた(第2表b)。凍結融解抗原は稍々これより優れ、第4表の如く8倍稀積で抗血清32倍との間で、又32倍稀積抗原でも16倍抗血清との間に75%溶血阻止力価を呈した。エーテル可溶物除去抗原は更にこれより高稀積部位で反応を示し(第6表a)、16倍稀積で抗血清の64倍との間に75%溶血阻止能力があつた。

超音波破壊抗原は本実験中で最も高い抗原力価を示したもので(第3表)、8倍稀積で抗血清128倍稀積と、32倍稀積抗原で抗血清64倍と、又64倍稀積でも抗血清16倍稀積と、それぞれ75%溶血阻止能力を示し、対照の共棲細菌抗血清との間の反応も他のものに比して最も弱い反応しか呈さなかつた。

第6表 エーテル可溶物除去抗原 [E] を用いての C.F.T.

a. 血清は生虫体感作による免疫血清

(表中太線は75%溶血阻止以上)

血清 \ 抗原	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	4	4	4	4	4	3	2	1	0	0
4	4	4	4	4	4	3	2	1	0	0
8	4	4	4	4	4	3	1	0	0	0
16	4	4	4	4	3	1	0	0	0	0
32	4	4	4	3	2	0	0	0	0	0
64	4	4	3	3	1	0	0	0	0	0
128	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0
256	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
512	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b. 対照

血清は共棲細菌のみで免疫したもの

血清 \ 抗原	2×	4	8	16	32	64	128	256	512	対照
2×	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0
4	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0
8	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
16	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

第7表

(25%溶血阻止以上) 数字は血清稀積倍数

血清 \ 抗原 (4単位)	A	B	C	E
抗 A	32	16	16	32
抗 B	16	256	64	128
抗 C	8	64	128	64
抗 E	16	64	64	256

A: 純アルコール抽出抗原, B: 超音波破壊抗原
C: 凍結融解抗原, E: エーテル可溶物除去抗原

次に反应用抗原として作製したものを家兎に感作抗原として静脈内感作し、その抗血清を各々採取しこれと各種抗原との間にC.F.T.を行つて、その反応の出方を調べてみた。第7表の如く、それぞれ対応する抗原と抗血清との間の反応が異種抗原抗血清との間の反応に比して

第8表 免疫家兔の感作方法の比較
(25%溶血阻止以上) 数字は血清稀釈倍数

血清	抗原 (4単位)	純アルコール抽出 抗原	超音波 破壊抗 原	凍結融 解抗原	エーテル 可溶物除 去抗原
腹腔内	5日間隔5回	8	128	32	32
	2日間隔10回	8	64	16	32
静脈内	5日間隔5回	16	64	64	64
	2日間隔10回	16	128	64	128

稍強く現われた。

第8表は動物感作方法によつて、その動物の血清中に現われる抗体の力価を各抗原で調べたものである。静脈内感作法と腹腔内感作法では僅かに前者が優れているが、殆んど差はみられない。又感作間隔では5日間隔5回感作法も、2日間隔10回感作法も、産生抗体量に大きな差は認められなかつた。

総括並びに考按

赤痢アメーバで免疫された家兔血清の補体結合反応に於て各種抽出法による抗原の優劣を、現われる抗原価に就いて比較した。家兔免疫血清に用いた虫体と抗原作製に用いた虫体とは全て同一株のアメーバである。純アルコール抽出抗原は Craig (1928) が最初にこれを作り、抗原価が弱いから非稀釈の原液のままで使用しているが、彼自身抗補体作用の発現可能性があると云つている。Menendez (1932) はこの抗原について追試した際、5倍に稀釈すると抗補体作用が現われず、且つ彼の作った数種抗原の中でも、このアルコール抽出抗原と生食水抽出抗原は良好な抗原価を示したと云い、Cholesterinized absolute alcohol 抗原は無価値であつたと云つている。

本実験に於ける成績では純アルコール抽出抗原は抗原価が低く、且つ抗補体作用が2倍稀釈で認められ、更に対照の共棲菌抗血清とも反応が可成りみられ、特異性の弱いものであつた。従つて抗補体作用を避ける為、高稀釈をすればそれだけ抗原価が低下し反応の陽性発現率は低下する事になり甚だ都合が悪い。

Sherwood & Heathman (1932) は培養栄養型のアセトン抽出後、アルコール抽出し更に Cholesterol を加えた所謂 lipid 抗原を作り、高い抗原価をもつ抗原を得たとしているが、Menendez (1932) はこの抗原はアルコール抽出抗原より sensitivity は増加しなかつたと云い、Meleney & Frye (1937) も、これは抗補体作用が強いと述べている。私はエーテルで直接虫体の抽出をしたが、

このエーテル抽出抗原は全く反応が出ず、抗体との結合能力が無かつた。この事は抗原性物質がエーテルに移行しない事を示すのであろう。

凍結融解抗原は前者に比すれば、可成り強い能力を示したが、Rees *et al.* (1942) らが *E. hist* を micromanipulator を使用し共棲菌から遊離せしめ、単一菌“t”と共棲した虫体を集めて凍結融解して作った抗原は、その後多くの人により追試され可成り好成績を出している。Kent & Rein (1946) も Rees's method の modification から作られた所謂 commercial antigen を以て追試し、現状では最もよい抗原であると云つている。私は残念乍ら commercial antigen の入手が出来ず比較してみる事が出来なかつた。

エーテル可溶物除去抗原は更に抗原力価が高く、2倍稀釈では512倍稀釈抗血清との間に25%溶血阻止能力を示し、対照血清とも反応はあつたが比較的弱かつた。

超音波破壊抗原は本実験中で最も高い力価を示し、2倍稀釈で512倍稀釈抗血清との間に50%溶血阻止能力を示し、64倍稀釈でも抗血清16倍稀釈との間に75%溶血阻止力価を呈した。又対照血清との間も前者らに比べ最も低い反応しか示さず、特異性の点でも優れていた。

一般に抗原として具えるべき条件は、優れた抗原性と特異性であり (安東, 1953)、抗原性とは抗体産生能力と、これと結合する能力がある事であり、所謂完全抗原がこれである。本研究で問題となるのは、その結合能力 (感受性) と特異性である。即ち *E. hist* 感染の場合の抗体産生は所謂 host-parasite relationship で種々の factor がこれに関係するが、*E. hist* 自体、他の病原性原虫類と同じ様に一時的免疫を産生するに過ぎず、Kligler *et al.* によれば斯る原虫類の抗原性の不安定は、これらの体内に永続的免疫を作り得ない所の lipid hapten が多く存在する事に因るもので、細菌類と異なる。更にこれに関して Ray & Sen Gupta らにより *E. hist* の原形質内に lipid が存在する事を確認されていると Hoare (1958) が述べている。又 Meleney & Frye (1937) らは犬、兎の実験感染例及び猿 (*Macacus rhesus*) の自然感染所見等からみて、腸管アメーバ症では感染があつても *E. hist* の組織侵襲が——それも侵襲程度、個体差等により異なるが——無ければ抗体産生は無いと云つている。又 *E. hist* が組織侵入しても個体の血清中に生ずる抗体は一時的には存在するが、虫体が除去されるか、死滅すれば抗体はなくなり、永続的に抗体が残るものではない事は多くの研究者の一致した意見である。斯る前提条件のある

もとで *E. hist* の血清学的研究, 特に臨床的に応用可能な反応用抗原は, 極めて能力の高い感受性と特異性が必要となる訳である。

本実験では抗血清作製のため, 実験的に大量の生虫体を, 静脈内或いは腹腔内に注入して家兎を感作したものであるが, 各抽出抗原中, 最も高い力価を示した超音波抗原は 2 倍稀釈濃度で 512 倍稀釈の抗血清との間に 50% 溶血阻止能力を示した。之等比較の高い力価を示した抗原を用いて, 将来, 実験感染動物の血清について, 補体結合反応を試みる積りである。

各抽出抗原は何れも共棲細菌抗血清との間に反応が多少ずつ現われているが, この事は抗原(感作抗原及び反応用抗原共)作製時に共在する細菌及びその他倍地成分等が完全に除去されずに残っている為と思える。未だ *E. hist* の純培養が成功せず免疫反応に不可欠の特異性に関して不安定な面を示している。

感受性の高い抗原を得るには勿論 *E. hist* 虫体を極めて大量を使用する事も必要であるが, 更に大切な事は一層進歩した抗原を得る事である。本実験で第 7 表で見られる事は抽出方法が異なると, その抗原構成に多少の違いがある事を思わしめる。更にこの表で見られる如く *E. hist* 抽出物はそれぞれ対応する抗体を産生し, 且つ結合し得る能力を持ち一応, 所謂完全抗原の形をとっている。一般に完全抗原は蛋白質が大半とされている(安東, 1953)が, 尙今後 *E. hist* の抗原分析が必要と思われる。尙実験的な動物感作方法に於いては第 8 表の如く両接種場所及び, 間隔では現われる抗体価に差が無かつた。

結 論

- 1) 5 種の抽出方法により作製した抗原の抗原価を同一免疫家兎血清について比較した。
- 2) エーテル抽出抗原及びアルコール抽出抗原はそれぞれ抗原価を示さないか, 或いは低い抗原価しか示さなかつた。超音波破壊抗原が最も高い力価を示し, 次いでエーテル可溶物除去抗原, 凍結融解抗原の順であつた。
- 3) 各抽出抗原とこれに対応する抗血清との間に交叉反応を試みた所, 異種抗血清との間の反応に較べて, 対応する抗血清との間の反応の方が稍々強く現われた。
- 4) 家兎の免疫方法の違いによる血清抗体価の出方の差は殆んどなかつた。

摺筆するに当り, 終始御指導, 御校閲を賜つた松林教授並びに浅見助教に深く感謝します。

本論文要旨は昭和 34 年 4 月日本寄生虫学会総会で発表した。なお本研究は日本ワックスマン財団第二回研究助成金の援助を受けたものである。

文 献

- 1) 安東洪次(1953): 感染と免疫, 丸善株式会社, 東京。
- 2) Böe, J. (1945): Complement fixation antigen in *E. histolytica* infection. Proc. Soc. exp. Biol. & Med., 60, 31-33.
- 3) Bozicevich, J. (1950): The complement fixation test for Hepatic Amebiasis. Am. J. Trop. Med., 30, 154-157.
- 4) Bozicevich, J. (1955): Serological considerations relative to the diagnosis of amebiasis. Am. J. Gastroenterology, 23, 332-334.
- 5) Craig, C. F. (1927): Observations upon the Hemolytic, Cytolytic and complement binding properties of extracts of *E. histolytica*. Am. J. Trop. Med., 7, 225-240.
- 6) Craig, C. F. (1928): Complement fixation in the diagnosis of infections with *E. histolytica*. Am. J. Trop. Med., 8, 29-37.
- 7) Craig, C. F. (1933): A study of complement fixation in experimental amebiasis in dogs. Am. J. Hyg., 18, 202-219.
- 8) Craig, C. F. (1937): Observations upon the practical value of the complement fixation test in the diagnosis of amebiasis. Am. J. Public Health & the Nations Health, 27, 689-693.
- 9) Craig, C. F. (1948): Laboratory diagnosis of protozoan diseases. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A.
- 10) Craig, C. F. (1950): Amebiasis and complement fixation test. U. S. Armed Forces Med. Jour., 1, 1337-1342.
- 11) Fulton, J. D., Joyner, L. P. & Orpwood Price, I. N. (1951): Studies on protozoa. Part IV. A complement fixation test for amebiasis. J. Trop. Med. & Hyg., 54, 27-33.
- 12) von Hage (1920): Über die Diagnose der Amöbenruhr. Deutsche Med. Wchnschr., 46, 682-684.
- 13) Heinz, H. J., Brauns, W. & Mac Nab, G. M. (1956): A new antigen for the amoebic complement fixation test. South African J. Med. Sci., 21, 9-10, Interim Report.
- 14) Hoare, C. A. (1958): The enigma of host-parasite relations in amebiasis. Rice instituto

- pamphlet, XLV, 23-35, Houston, Texas, U. S. A.
- 15) Houssey, K. L. & Brown, H. W. (1950): The complement fixation test for hepatic amebiasis. *Am. J. Trop. Med.*, 30, 147-164.
 - 16) Izar, G. (1914): Studien über Amöbenenteritis. *Arch. f. Schiffs- u. Tropen-Hyg.*, 18, 35.
 - 17) Kenney, M. (1952): Micro-kolmer complement fixation test for amebiasis. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 1, 717-726.
 - 18) Kent, J. F. & Rein, C. R. (1946): The serodiagnosis of amebiasis. *Science*, 103, 598.
 - 19) Kiefer, E. D. (1932): The Craig complement fixation test for amebiasis in chronic ulcerative colitis. *Am. J. M. Sc.*, 183, 624-631.
 - 20) Magath, T. B. & Meleney, H. E. (1940): The complement fixation reaction for amebiasis. *Am. J. Trop. Med.*, 20, 211-238.
 - 21) Meleney, H. E. & Frye, W. W. (1937): Practical value and significance of the complement fixation reaction in amebiasis. *Am. J. Public Health*, 27, 505-510.
 - 22) Menendez, P. E. (1932): Serological relationships of *E. histolytica*. *Am. J. Hyg.*, 15, 785-808.
 - 23) Paulson, M. & Andrews, J. (1938): Complement fixation in amebiasis. A comparative evaluation in clinical practice. *Arch. Int. Med.*, 61, 562-578.
 - 24) Rees, C. W., Reardon, L. V. & Baernstein, H. D. (1954): Symbiosis in cultures of *E. histolytica* and single species of Bacteria. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* abstr. to be presented, 3, 839-848.
 - 25) Rees, C. W. (1955): Problems in amoebiasis. Chas. C. Thomas, Springfield, Ill., U. S. A.
 - 26) Rees, C. W., Bozicevich, J., Reardon, L. V. & Jones, F. (1942): A preliminary note on the complement fixation test for amebiasis with antigens prepared from *E. histolytica* grown with a single species of bacteria. *Am. J. Trop. Med.*, 22, 581-586.
 - 27) Schaffer, J. G. & Ansfield, J. (1956): The effect of rabbit antisera on the ability of *E. histolytica* to phagocytose red blood cells. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 5, 53-61.
 - 28) Schaffer, J. G., Sienkiewicz, H. S., & Washington, J. E. (1953): The propagation of *E. histolytica* in tissuebearing culture without accompanying bacteria or other mikroorganisms. *Am. J. Hyg.*, 57, 366-379.
 - 29) 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.
 - 30) 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.
 - 31) Spector, B. K. (1936): Significance of the small variety *E. histolytica*. *Am. J. Public Health*, 26, 813-818.
 - 32) Spector, B. K. (1932): A comparative study of cultural and immunological methods of diagnosing infections with *E. histolytica*. *J. Prev. Med.*, 6, 117-128.
 - 33) Stone, W. S. (1935): Bacteria-free antigen for complement fixation test in amebiasis. *Am. J. Trop. Med.*, 15, 685-687.
 - 34) Swartzwelder, J. C. & Avant, W. H. (1952): Immunity to amebic infection in dogs. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 1, 567-575.
 - 35) Terry, L. L. & Bozicevich, J. (1948): The importance of the complement-fixation test in amebic hepatitis and liver abscess. *Southern Med. J.*, 41, 691-702.
 - 36) Weiss, E. & Arnold, L. (1934): Complement fixation test for amebiasis. *Am. J. Dig. Dis. & Nutrition*, 1, 231-233.
 - 37) Wright, W. H. (1955): The Laboratory approach to problems in amebiasis. *Am. J. Gastroenterology*, 23, 303-306.

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* (1)
COMPARATIVE STUDIES ON VARIOUS ANTIGENS
FOR COMPLEMENT FIXATION TEST

FUMIAKI FUKUHARA

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

Rabbits were immunized by repeated injections of living *Entamoeba histolytica* growing in culture media. The animals were killed 7-10 days after the last injection and blood sera obtained from these animals were inactivated, added merthiolated and kept in ampules at 4°C. Five different antigens were prepared for the complement fixation test. They were extracts of *E. histolytica* by 1) alcohol, 2) ultrasonic vibration, 3) freezing and melting, 4) ether and 5) the residual of ether extraction. The C. F. T. were carried out with one and the same antiserum of rabbit using those different antigens. Antigens prepared from associated bacterial flora by the same methods stated above were also used as controls.

The highest titer was obtained by the antigen of ultra-sonic vibration method. The residual of the ether extraction and the extract by freezing and melting method come next by that order. Extracts by alcohol and ether showed only low titers.

Rabbit antisera obtained by injections of these amebic extracts were also tested by each of these antigens. Somewhat higher titers were shown in the test in which corresponding antigens were used.