

## 赤痢アメーバの免疫学的研究

### (2) 赤痢アメーバの補体結合反応, 沈降反応 及び Immobilization test に就いて

福原 文明

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34年10月16日受領)

赤痢アメーバの免疫反応はこれ迄に実験的感染或いは感作動物については数多く行われて来ているが、何れも未だ臨床的アメーバ症の診断には応用価値が少く、時に補助的手段として利用されているに過ぎない。今回私は補体結合反応, immobilization test 及び沈降反応を家兎免疫血清について試みた。補体結合反応は既に多くの人々によつて試みられているが、私は前報で述べた比較的高い力価を示す抗原を用いた。immobilization test は Cole & Kent (1953) が赤痢アメーバについては初めて試みたものであり、其後 Brown & Whitby (1955), Valentino (1956), 佐藤 (1956) 等が追試している。沈降反応については Wagener (1924), Menendez (1932), Spector (1932) 等の報告がある。赤痢アメーバに関する以上三つの代表的な免疫反応を同一血清について比較検討した結果を茲に報告する。

#### 材料と方法

##### 〔A〕 免疫血清の作製

(1) 実験動物 体重 2.0~2.5kg の健康成熟家兎を用いた。

(2) 感作免疫原 過去数年間吾が教室で継代保存している赤痢アメーバ(以下 *E. hist.* と略す)H株を Balamuth 培地に48時間培養した栄養型生虫体を用いた。即ち多数の培養試験管底からアメーバを含む沈渣を一個の大遠沈管に集め、37°Cに保温した生食水で数回洗滌、遠沈(1,000 rpm 5分)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の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 20~40万虫体を含有する生食水浮遊液を作る。対照用免疫原としては共棲細菌だけを別に Balamuth 培地に米粉と共に培養し48時間後に上記と同じ手技で共棲菌生食水浮遊液を作り、0.3%の割に For-

malin 液を加えたものを用いた。

(3) 感作方法 家兎耳静脈内に上記免疫原を5日間隔5回注射した。一回注射量は虫体浮遊液では1.0~2.0 cc, 対照用の共棲菌浮遊液では0.2ccを注射した。

(4) 採血及び保存 最終免疫注射後10日目に無菌的頸動脈切開により全採血し、血清分離56°C30分非働化、マーズン $10^{-4}$ 倍加え、アムブレに封入後4°C氷室に保存した。

##### 〔B〕 免疫反応用抗原の作製

今回私の行つた免疫反応は補体結合反応(以下 C.F.T. と略す)と immobilization (以下 I.M.T. と略す)及び沈降反応(以下 P.T. と略す)であるが、謂う迄もなく I.M.T. の反応用抗原となるのは *E. hist.* 生虫体そのもので、C.F.T. 及び P.T. 用抗原は同一抗原を使用したがそれは次の如く作つたものである。即ち抗血清作製時の感作抗原の作り方と同じ手技により *E. hist.* の洗滌虫体浮遊液を作り、これを超音波管に移し、1,400 Volt, 180 mA, 250Watt 960KC で5分間超音波をあてて、その後12,000 rpm 30分間超遠沈し、その上清液をとり、これにマーズン $10^{-4}$ 倍を加えたものを反応用抗原とした。I.M.T. に用いた *E. hist.* は Balamuth 培地試験管々底よりそれぞれ0.5cc位づつ取り出し、これを別の小試験管に集め2~3時間37°C孵卵器内に置き、*E. hist.* の活動性を増加させる。その後遠沈管に移し37°Cに保温した生食水で洗滌、遠沈(500rpm 5分)を2~3回繰返して上清液をほぼ透明とする。斯くして得た *E. hist.* 生虫体の生食水浮遊液を実験に用いた。

##### 〔C〕 各免疫反応の方法及び判定

(1) C.F.T. 米国陸軍×医学校法の伝研改良法を用いた。即ち羊溶血系を用い、被検血清は0.1ccづつ階段稀釈し、4単位抗原を0.1cc, 補体(2 full unit) 0.2

本研究は昭和34年度日本ワックスマン財団研究助成金の援助を受けたものである。



ccを加え、よく混合し37°C60分温槽に入れ、その後前記溶血系を各0.2cc加え、再び37°C80分温槽に入れ反応を読んだ。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%、1を25%溶血阻止、0を完全溶血とした。対照としては共棲菌抗血清及び正常家兎血清を置いた。

(2) P.T. 重層法を用いて、抗原減量法で行った。対照には共棲菌抗血清及び正常家兎血清を置き、更に生食水対照も置いた。判定は抗原と血清を重層後、室温放置し30分間隔で観察した。沈降物の量的差により多い方から記号3, 2, 1, ?, 0の五段階とした。尚記号2, 3を陽性とした。観察時間は4時間とし、その間反応が最高に達した所で読んだ。

(3) I.M.T. 上記の I.M.T. 用に処置をした *E. hist.* の生食水浮遊液を約0.05ccと全量の非働化抗血清(予め37°Cに保温)をホールグラス(予め37°Cに保温)の中に入れカバーグラス(予め37°Cに保温)をのせてパラフィンで周囲を封じる。観察は10分間隔で強拡大顕微鏡下に虫体血清混合液中の虫体の運動状況をみる。判定は Brown & Whitby (1955) らと同様の規準でなした。即ち虫体が“丸まった”動かぬものを不動とし、虫体が“丸まっていなくて”動かぬもの及び動いているものを運動していると判定した。観察は始めの一時間までは10分間隔で以後は30分間隔で3時間行つた。上記の各時間毎に虫体25コをみて運動している虫体数をAとし、対照液中で同じく25コ虫体をみて運動している虫体数をBとし、次の数式で不動率を計算した。 $(B-A) \times \frac{100}{B}$ 。対照には正常家兎血清を虫体浮遊液と混ぜたものを用いた。

成 績

*E. hist.* 洗滌虫体の五日間隔五回感作の家兎免疫血清と同一 *E. hist.* の超音波破壊抽出抗原(4単位~16倍稀釈)との間のC.F.T.の成績は第1表に示す如くである。即ち抗血清32倍稀釈までは完全溶血阻止力価を示し、64倍稀釈で75%溶血阻止を示している。これに対し対照の共棲菌抗血清では全く反応は現はれていない。この事は明らかに *E. hist.* 免疫血清中に補体結合性抗体を有している事を示すものである。

而して乍ら同じ抗原抗血清間の沈降反応をみると第2表の如く、見るべき反応が現われず僅かに原液抗原と原液抗血清間に疑陽性(記号1)の沈降物を認める程度であった。尚対照の共棲菌抗血清の反応は殆んど認むべきものが現われなかつた。従つて本実験におけるP.T.は

第1表 C.F.T. 超音波抽出抗原4単位(16倍稀釈)

血清	稀 釈									
	2 <sup>x</sup>	4 <sup>x</sup>	8 <sup>x</sup>	16 <sup>x</sup>	32 <sup>x</sup>	64 <sup>x</sup>	128 <sup>x</sup>	256 <sup>x</sup>	512 <sup>x</sup>	対照
赤バ痢感ア作メ血1清	4	4	4	4	4	3	2	0	0	0
共感棲作細菌清	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

第2表 P.T.(重層法)超音波抽出抗原

血 清	抗 原 稀 釈									
	原	2 <sup>x</sup>	4 <sup>x</sup>	8 <sup>x</sup>	16 <sup>x</sup>	32 <sup>x</sup>	64 <sup>x</sup>	128 <sup>x</sup>	256 <sup>x</sup>	生食水
赤バ痢感ア作メ血1清	原液	1	?	0	?	0	0	0	0	0
	10倍稀釈	?	0	?	0	0	0	0	0	0
共感棲作細菌清	原液	0	0	?	0	0	0	0	0	0
	10倍稀釈	0	0	0	0	0	0	0	0	0
生食水		0	0	0	0	0	0	0	0	0

表中の0, ?, 1, 2, 3は夫々下記の観察事項を示す。  
 0……沈降物なく対照と違わぬもの。  
 ?……沈降物形成極めて少なく多少上層液が濁つていて対照とは違う。  
 1……薄い円板状のものが境界面にある。  
 2……かなり厚い円板をなしたものがある。  
 3……沈降物の量が甚だ多く厚い円板をなし、一部が管底に沈んだり液中に浮いたりしている。

極めて弱い反応を原液で示したに過ぎない。

*E. hist.* 生虫体と階段稀釈抗血清とを混じて虫体の運動状態を時間の経過と共に観察した所のI.M.T.の成績は第3表である。

免疫血清は生虫体に対して一時的にその運動性を抑制せしめる力を持っている。而してその力を最大に發揮したのは非稀釈血清であり血清虫体混合後30~40分の間で制動率は96%を示した。又混合後20分から90分迄は虫体の約70%の制動作用が認められた。2倍稀釈血清での制動能力は同じく30~40分後が最高であるがその制動率は72~84%であつた。4倍稀釈になると制動能力は半減し32~64倍稀釈血清では殆んど制動現象が現はれなかつ



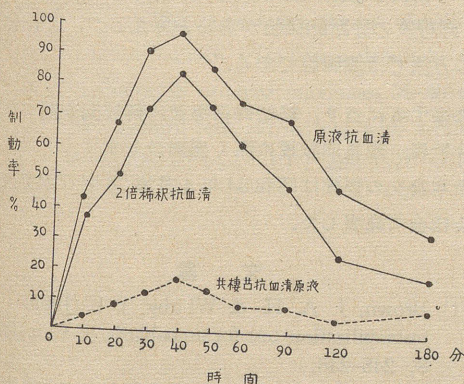
第3表 I.M.T. の制動率\*

時間	稀 積								
	B/25	原	2 <sup>x</sup>	4 <sup>x</sup>	8 <sup>x</sup>	16 <sup>x</sup>	32 <sup>x</sup>	64 <sup>x</sup>	128 <sup>x</sup>
		%	%	%	%	%	%	%	%
10分	23/25	43.0	37.2	37.2	18.0	8.6	0	0	0
20分	24/25	65.6	49.2	32.8	16.4	8.2	0	0	0
30分	22/25	90.0	72.0	40.5	22.5	13.5	0	4.5	0
40分	25/25	96.0	84.0	36.0	24.0	12.0	4.0	4.0	0
50分	25/25	84.0	72.0	28.0	24.0	4.0	4.0	0	0
60分	23/25	73.1	60.2	21.5	12.9	4.3	0	4.3	0
90分	23/25	68.8	47.3	17.2	8.6	4.3	4.3	0	0
120分	23/25	47.3	25.8	8.6	0	0	0	0	0
180分	22/25	31.5	18.0	0	4.5	0	0	0	0

\* (B-A) ×  $\frac{100}{B}$  但し A は抗血清中の虫体 25 個のうち動いている虫体数、B は正常血清中の虫体 25 個のうち動いている虫体の数。

第4表 対照血清(共棲細菌による抗血清)による I.M.T. の制動率

時間	稀 積			
	B/25	原	2 <sup>x</sup>	8 <sup>x</sup>
		%	%	%
10分	22/25	4.5	4.5	0
20分	24/25	8.2	4.1	4.1
30分	23/25	12.9	8.6	4.3
40分	24/25	16.4	8.2	4.1
50分	22/25	13.5	9.0	4.5
60分	22/25	9.0	4.5	0
90分	23/25	8.6	4.3	4.3
120分	22/25	4.5	4.5	0
180分	23/25	8.6	4.3	0



第1図 E. hist. 抗血清と共棲菌抗血清の制動率の時間的推移

以上の成績を図示すると第1図の如くである。

制動現象は E. hist. 抗血清の原液では混合後10分には既に40%以上に見られ、30~40分が peak で以後は徐々に低下している。而し3時間後でも尚30%以上の制動状態を維持している。血清稀釈が進むに従いその peak 値は低下するも peak 発現時間はほぼ30~40分の間に一定している。即ち E. hist. はその免疫血清と接する事により一時的に運動が抑制され、その後徐々に運動性が恢復する。

考按並に総括

実験的に動物に E. hist. 或いはその抽出物を感作せしめて、これに対応する抗体を血清中に求める努力は古くから行はれ種々報告されているが、その成績は報告者により同じ免疫反応でも極めて差がある。私は前報において E. hist. の C.F.T. に関して述べたが、今回の実験では前回報告の実験結果の中、最も特異性及び感受性の高かつた超音波破壊抗原を使用し、実験的感作家兎血清につき補体結合反応を行い、その血清が高い力価を示し、可成り多量の補体結合性抗体をもつことを証明した後、この血清が沈降反応では如何なる反応を示すか、又 E. hist. 生虫体に対しどの程度の制動能力を示すかを調べた。佐藤 (1956) は腹腔内感作 モルモット 血清につき C.F.T., P.T., I.M.T. 及び赤血球凝集試験を行い、C.F.T. は全く陰性、P.T. は血清減量法で原血清で僅かに陽性、赤血球凝集試験は10例中3例陽性、I.M.T. では対照に比して明らかな差があり最高制動率52%を作用後30分に認め、本免疫反応が最も良い成績を示したとしている。又文献によれば、C.F.T. と P.T. を同時に施行した報告は Menendez (1932), Spector (1932), 白男川 (1935) 等によりなされているが、彼らの使用した抗原は反応により抽出法が違ったものであった。Menendez (1932) は両反応共に極めて特異的に且つ高度に反応し、併せ行つた皮内反応と共に臨床的応用が可能であると述べている。Spector (1932) は C.F.T. は特異的であつたが P.T. は不正確であると結論し、白男川 (1935) は P.T. につき Menendez の追試をして僅かに15倍稀釈抗原原価しか得られず、Menendez が特異的且つ 500~1,000 倍稀釈抗原原価が出たと云う事に疑問を持っている。元来 E. hist. の P.T. は Wagener (1924) が実験感染猫血清につき、血清稀釈法で行つて、8日以上虫体を排出している7匹の猫では全部4倍稀釈血清まで陽性であり、吸収試験の結果及び対照としてのチフス患者血清との成績からみて、本反応は特異性反応であると報告したものである。これ



に対し Swartzwelder & Muller (1949) は *E. hist.* 感染犬29匹に P. T. を行い全部陰性であり Wagener の報告と相反したと云っている。最近 Moan (1957) は rapid 且つ simple で而も anticomplemental な血清でも使用出来ると云う所謂 Moan precipitin test を発表し反応は極めて specific で急性症以外のものや、組織浸襲が認められる者の血清であれば 85~100%陽性に出ると云っている。而して乍ら McHardy (1956) は Moan test につき、彼女の云う程の成績は出ないと反対し、又 Frye もこの Test は信用し難いと述べている。私の行った本実験における P. T. は第 2 表の如く、原液抗原と抗血清間に僅かに沈降物を認めたのみであった。

Cole & Kent (1953) らは *Trypanosoma cruzi* と共に培養した *E. hist.* で家兎に抗血清を作り、虫体制動能力を調べ抗血清の濃度に比例しその能力が増強する事及び作用時間には比例せず最大効果は 20~30 分後に現はれてその後は虫体は再び活動性を回復したとしている。更にこの現象を 13 人のアメーバ症患者血清につき調べ 5 例が陽性であり、48 人の正常人血清は総て陰性であったと報告している。而して制動された虫体の形態的变化を簡単に記し、この immobilization は補体を要しない免疫現象であろうと云っている。私の行った I.M.T. の成績は第 3 表の如く、高濃度血清では極めてよく制動現象を認め、その他第 1 図の如く Cole & Kent の報告とよく一致した成績を得た。Brown & Whitby (1955)、Valentino (1956) は C.F.T. と I.M.T. を比較した報告を出しているが、前者らは C.F.T. を Weiss & Arnold の方法で作ったアルコール抗原を用い免疫家兎血清について行って 4~8 倍陽性であった血清で I.M.T. は最高制動率 95% 以上を作用 30 分後に観察しているが、人のアメーバ症血清では 25 例中 3 例 C.F.T. 陽性で、I.M.T. は 25 例中 6 例が 70% 以上の制動率で陽性であり 3 例は 70~80% 制動率を有する疑陽性であったとし、I.M.T. は C.F.T. より稍々優つていと結論している。又彼らは I.M.T. 陽性血清を非働化しないで使用すると虫体の溶解を来す事から、この I.M.T. は補体を要する反応とは無関係且つ多分基本的に相違するものと思へると云っている。Valentino も家兎免疫血清及びアメーバ患者血清で 80% 以上の制動率を示す成績を得て、I.M.T. は同一血清での C.F.T. より一層 sensitive である様だと云っている。私の本実験での感作血清では I.M.T. の成績は Brown & Whitby の判定に従うならば、制動率 70% 以上を陽性とする故、第 3 表、第 1 図の如く 4 倍稀釈以上の稀釈血清では

疑陽性又は陰性となる。従つて原液血清及び 2 倍稀釈血清が I.M.T. 陽性と云う事になり、為に C.F.T. では 64 倍稀釈まで陽性に出るこの血清からみて、純然たる稀釈倍数の観点から免疫反応を比較すると、C.F.T. の方がより鋭敏に現われると云わざるを得ない。尚 Brown & Whitby らの C.F.T. はアルコール抗原を使用しているが、私の前回の報告の如く彼等が高力価抗原を使用すれば C.F.T. も決して I.M.T. に劣るとの結論は下し得なかつたのではないかと思える。

## 結 論

1) 赤痢アメーバの生虫体を用いて家兎静脈内感作方法で得た免疫血清につき C.F.T., P.T., I.M.T. を行った。

2) 反応抗原として超音波抽出抗原を使用した C.F.T. で 64 倍稀釈まで陽性を呈した血清が P.T. では僅かに原液抗原と抗血清間にのみ疑陽性反応を呈したに過ぎず、*E. hist.* 生虫体と免疫血清との間の I.M.T. では原液及び 2 倍稀釈血清までは共に著明な制動能を示した。対照として行った培地内共棲細菌免疫血清では、C.F.T. 及び P.T. では殆んど反応はなかつたが、I.M.T. では原液血清で僅かの制動能を認めた。

3) I.M.T. の発現は血清虫体混合後 10 分で見られ、30~40 分が最高の制動率を示し、以後は漸次活動虫体数が増える。而し 3 時間後にも尚 31.5% の制動率が遺残していた。最高制動率は免疫血清原液では 96%、2 倍稀釈では 84% であり、対照共棲細菌抗血清の原液で最高 16.4% の制動率を認めた。

4) C.F.T. 及び I.M.T. は共に適切な条件で行うならば、同程度の診断的価値があると思えるが、P.T. は本実験の方法では無価値である。

摺筆するに当り、終始御指導並に御校閲を賜つた恩師松林教授、浅見助教授に深く感謝致します。

尙本論文の要旨は昭和 34 年 4 月第 28 回日本寄生虫学会総会で発表した。

## 文 献

- 1) Brown, J. A. H. & Whitby, J. L. (1955): An immobilization test for amoebiasis. *J. Clin. Path.*, 8, 245-246.
- 2) Cole, B. A. & Kent, J. F. (1953): Immobilization of *E. histolytica* in vitro by antiserum produced in rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83, 811-814.
- 3) 福原文明 (1960): 赤痢アメーバの免疫学的研究, (1) 補体結合反応用各種抗原の比較, *寄生虫学雑誌*, 9(1), 76-84.



- 4) McHardy, G. (1956) : The Moan precipitin test for amebiasis. *Gastro-enterologie*, 30, 535-536.
- 5) Menendez, P. E. (1932) : Serological relationships of *E. histolytica*. *Am. J. Hyg.*, 15, 785-808.
- 6) Moan, J. C. (1957) : The serological diagnosis of amebiasis by means of the precipitin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 6, 499-513.
- 7) 佐藤礼治 (1956) : 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. *寄生虫学雑誌*, 5, 462-467.
- 8) 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.
- 9) Spector, B. K. (1932) : A comparative study of cultural and immunological methods of diagnosing infections with *E. histolytica*. *J. Prev. Med.*, 6, 117-128.
- 10) Swartzwelder, J. C. & Muller, G. R. (1949) : Failure to demonstrate precipitins in dogs infected with *E. histolytica*. *J. Parasit.*, 35 (6), Section 2, 32.
- 11) Valentino, L. (1956) : The immobilization reaction in amoebiasis. *Riv. Ist. Sieroter. Ital.*, 31 (4), 310-317.
- 12) Wagener, E. H. (1924) : A precipitin test in experimental amoebic dysentery in cats. *Univ. Calif. Publ. in Zoology*, 26, 15-20.

## IMMUNOLOGICAL STUDIES ON *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

### (2) ON COMPLEMENT FIXATION TEST, PRECIPITATION TEST AND IMMOBILIZATION TEST

FUMIAKI FUKUHARA

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

Complement fixation test (CFT), immobilization test (IMT) and precipitation test (PT) were carried out with a rabbit antiserum. The rabbit was immunized through 5 intravenous injections of 200,000-400,000 amoebae with the intervals of 5 days. Whole blood was shed 10 days after the last injection and the serum obtained was inactivated, added with merthiolate and kept in ampules at 4°C. The antigen for CFT and PT was made by destroying amoebae with irradiation of sonic vibration.

CFT proved positive at the dilution of 1:64 while PT was almost negative even with the undiluted serum. IMT was definitely positive with undiluted and 1:2 diluted sera. The immobilization attained maximum 30-40 minutes after the amoebae were immersed in the antiserum. The control tests carried out with serum immunized with associated bacterial flora gave negative results in all tests. CFT and IMT may be prospective for clinical use.