

Trypanosoma 感染に Sabin-Feldman 方式を用いた色素試験について

藤 陵 至 功

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35年4月2日受領)

緒 言

Sabin-Feldman-dye test (以下 SFT と略す) (Sabin & Feldman, 1948) は, *Toxoplasma* の虫体を免疫原とした免疫血清中の抗体と, 人新鮮正常血清中の accessory factor との協同作用によつて同虫体の原形質がアルカリ性メチレン青 (pH 11) に染まらなくなる現象を利用した一種の抗原抗体反応である。同現象は *Toxoplasma* に独得なものとみなされているが, 同様な現象が他の原虫寄生にも見られるか否かは興味ある点である。すなわち, ある種の前虫と, それが生息している宿主の血清との間に同じ反応が起り得るか否かは, 本反応の本態を追求する上にも一つの資料を提供することになるし, また臨床面においても診断に応用される可能性が考えられる。

本研究は上記の目的で, *Trypanosoma evansi* 及び *Trypanosoma lewisi* 感染について検討したもので, 若干の見るべき成績を得たのでここに報告する。

実 験

(A) *Trypanosoma* 感染に SFT 方式を用いた色素試験

実験 (1) 抗 *T. evansi* 血清と同虫体とによる色素試験

〔実験材料〕 実験の材料は *Toxoplasma* の SFT に準じて用意したほかに, 加熱非働化した人新鮮正常血清を対照に加えた。すなわち次のごとくである。

T. evansi 虫体: 本実験に用いた *T. evansi* は, 群馬大学より分与された株で, マウスの腹腔内に接種して継代した。この虫体をリンガー液に約 3×10^7 /ml の割合に浮遊させて, その 0.1ml を 15g 前後の健康なマウスの腹腔内に接種感染させる。その後 2 日目に心臓穿刺によつて採血して得た虫体を使用した。

マウス抗 *T. evansi* 血清 (非働性) (第 1~10 号抗血清): *T. evansi* 虫体をリンガー液に約 10^8 /ml の割合に

浮遊させて, その 0.1ml を 15g 前後の健康マウスの腹腔内に接種する。その後 3 日目に尾端採血して同虫体の感染を確認した上で, 治療のため人正常血清 0.4ml を感染マウスの腹腔内に注入する (この治療方法は Laveran 1902 が発見した)。人血清注入後 5 日目に心臓穿刺により採血して, 血清を分離する。この方法でマウス 10 匹から 10 抗血清を作り, 実験に際してそれぞれ 56°C 30 分間加熱により非働化して用いた。

マウス健血清 (非働性) (対照用): *Trypanosoma* に感染していない 15g 前後のマウス 10 匹を用意し, それぞれ心臓穿刺により採血して, 血清を分離する。実験に際してそれぞれ 56°C 30 分間加熱により非働化して用いた。上記のマウス抗 *T. evansi* 血清の対照とした。

ラット抗 *T. evansi* 血清 (非働性) (第 11~13 号抗血清): 上記のマウス抗 *T. evansi* 血清の場合と同じ要領で, *T. evansi* 虫体をリンガー液に約 3×10^6 /ml の割合に浮遊したものを 1ml を 100~150g の健康ラットに接種し, 次いで治療の目的で人血清を 3ml 接種し, その後採血して, 血清を分離する。この方法でラット 3 匹から 3 抗血清を作り, 実験に際してそれぞれ 56°C 30 分間加熱により非働化して用いた。

ラット健血清 (非働性) (対照用): 100~150g の健康ラット 3 匹からそれぞれ心臓穿刺により採血して, 血清を分離する。実験に際してそれぞれ 56°C 30 分間加熱により非働化して用いた。上記のラット抗 *T. evansi* 血清の対照とした。

人新鮮正常血清 (働性) (accessory factor): 抗体のない人新鮮血清を生のまま使用した。

人加熱新鮮正常血清 (非働性) (対照用): 実験に際して上記人新鮮正常血清の一部を別の器に入れて 56°C 30 分間加熱により非働化し, 上記人新鮮正常血清の対照とした。

アルカリ性メチレン青溶液 (pH 11): *Toxoplasma*

のSFT 原法の処方 (Sabin & Feldman, 1948 ; Sabin *et al.* 1952) に従つて調製した。

〔実験方法〕 *Toxoplasma* のSFT 原法(Sabin *et al.* 1952) の手技を準用した。すなわち次のごとくである。

被検抗血清の稀釈：被検抗血清は、先に述べたように *T. evansi* の感染を経過したマウスより得て、非働性としたものである。10匹の感染マウスから得た血清について実験を行なつた。各血清に7本の小試験管を用意し、0.9% 食塩水で、第1表に見られるように、4倍階段稀釈で1:4から1:16,384 までの稀釈を行なつた。各小試験管に入れられる稀釈血清の量は0.1ml あてとする。これらの試験管には更に次に述べるごとき、人血清に *Trypanosoma* 虫体を浮游したもの0.1ml あてを加えた。各被検血清につき、更に3本あての小試験管を用意し、その1本には上記と同じ被検抗血清の1:4稀釈を入れ、これには人非働性血清に虫体を浮游したものを加え、この試験に用いた虫体浮游血清(働性)の対照とした。他の1本の小試験管には *Trypanosoma* に感染していないマウスの血清の1:4に稀釈したものを入れ、残りの1本の試験管には稀釈に用いた0.9% 食塩水だけを入れ、これらにはこの試験に用いたと同じ虫体浮游血清

を加えてそれぞれの対照とした(第1表)。

虫体浮游血清の作製：前述の、*T. evansi* 虫体を採取するために用意したマウスから心臓穿刺によつて得た血液を、リンガー液に混じて、先ず硝子棒により脱線維する。次いで血球を可及的に分離除去するために500~700rpm 10分間不充分遠心沈澱(長谷川, 1930 ; Taliaferro, 1932) を行なつて血球を沈澱させ、虫体が多数に浮游する上清白濁液を分離採取する。これを1,000~1,500rpm 5~10分間遠心沈澱して虫体を沈め、上清を捨てた後、これにリンガー液を添加して更に1,000~1,500rpm 5~10分間遠心沈澱を行なつて虫体を洗滌することを2回反復した(虫体の活力が弱い場合は1回に省略した)。最後に、上清を捨てて、ごく少量のリンガー液を加えて虫体の濃厚浮游液を作る。この虫体浮游リンガー液1容に対して人新鮮正常血清4容の割合に混和する。次いでこの虫体の運動を鏡検により観察して、その減弱ないし停止をみとめた場合には活発な運動の回復を待つてから実験を進めた。対照に用いる非働性の人正常血清での虫体浮游液も同様にして作つた。

恒温処理：被検抗血清を稀釈して虫体浮游血清を加えた上述の試験管列並びに対照試験管列を、よく振つて混

第1表 *T. evansi* 感染に SFT 方式を用いた色素試験13例のメチレン青不染虫体数の百分率(実験1)

抗血清番号	試 験								対 照	
	<i>T. evansi</i> 虫体浮游リンガー液								各0.02ml	
	人新鮮正常血清(働性)				人加熱新鮮正常血清(非働性)				人新鮮正常血清(働性)	
各0.08ml				0.08ml				各0.08ml		
マウス抗 <i>T. evansi</i> 血清 (非働性) (第1~10号抗血清)								マウス健血清(非働性)	0.9% 食塩水	
各0.1ml								0.1ml	0.1ml	
1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4,096	1:16,384	1:4	1:4		
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
1	100	100	100	100	42	2	12	6	4	6
2	100	100	100	70	30	23	18	4	8	10
3	100	100	60	28	26	14	12	4	10	10
4	76	74	82	74	32	22	24	14	24	20
5	96	74	72	74	44	26	10	18	16	20
6	88	92	92	82	78	16	20	8	16	16
7	96	92	84	83	78	16	14	10	18	16
8	100	100	100	100	86	62	12	8	12	18
9	100	100	100	94	54	46	20	10	18	18
10	100	100	100	40	12	14	4	10	6	8
ラット抗 <i>T. evansi</i> 血清 (非働性) (第11~13号抗血清)								ラット健血清(非働性)	0.9% 食塩水	
各0.1ml								0.1ml	0.1ml	
1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4,096	1:16,384	1:4	1:4		
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
11	100	100	100	36	36	14	14	10	8	16
12	100	100	100	98	12	4	0	0	2	2
13	100	100	44	40	28	24	24	20	0	20

和してから、直ちに恒温槽に入れ、37°C で1時間保つた後とり出す。

虫体の染色：恒温槽からとり出した小試験管列の各管には直ちに前記のアルカリ性メチレン青溶液 (pH 11) 0.03ml あてを分注して、よく混和する。

結果の判定：上記混合液の1滴ずつを、載せガラスにとつて、かぶせガラスをかけ、400倍で鏡検する。これで任意の虫体50個を数え、この50虫体についてメチレン青に染まらない虫体の百分率を算出した。

次に、ラッテ抗 *T. evansi* 血清について上記試験と同様の手技により実験を行なつた。

〔実験結果〕 マウス抗 *T. evansi* 血清と同虫体とによる色素試験10例、及びラッテ抗 *T. evansi* 血清と同虫体とによる色素試験3例の結果は全例に SFT 現象が認められた。すなわち第1図に示したように、メチレン青に染まらない虫体と染まつた虫体とが観察され、前者



第1図 *Trypanosoma* 色素試験における *T. evansi* のメチレン青染色虫体像(染虫体と不染虫体)

は核だけが青染して原形質が全く青染せず、多くは円形ないし長円形に変形し、後者は核と原形質が共によく青染し、目立つた変形は見られず、両者には明らかな差異が認められた。このメチレン青不染虫体の百分率は第1表に見られるように全例とも抗血清稀釈の低稀釈で高率で高稀釈に向かつて段階的な低下を示し、対照との間に著しい差が見られた。また、この SFT 現象は第1表の被検例と対照の健血清及び人非働性正常血清との比較から明かなように、2種の血清因子、すなわち抗体と易熱因子 (accessory factor) との虫体に対する協同作用に基づくことが分つた。

実験(2) 抗 *T. lewisi* 血清と同虫体とによる色素試

験並びに凝塊反応

実験の材料は実験(1)のものに準ずるが、虫体と抗血清とは下記のものを用いた。

T. lewisi 虫体：本実験に使用した *T. lewisi* は、東京都内で捕獲したドブネズミから分離した株で、ラッテの腹腔内に接種して継代した。この虫体をリンガー液に約 5×10^7 /ml の割合に浮遊させて、その1ml を100~150g の健康ラッテの腹腔内に接種感染させた後、5~7日目に心臓穿刺によつて採血して得た虫体を使用した。

ラッテ抗 *T. lewisi* 血清 (非働性) (第14~23号抗血清)：*T. lewisi* 虫体をリンガー液に約 $16^{\circ} \sim 2 \times 10^8$ /ml の割合に浮遊させて、その0.2~2ml (虫体数約 $2 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$) を100~150g の健康ラッテの腹腔内に接種感染させた後、尾端採血による血液中に虫体の完全な消滅を認めてから7~10日後 (虫体接種後38~63日目) に心臓穿刺により採血して血清を分離する。この方法でラッテ10匹から10抗血清を作り、実験に際して56°C 30分間加熱により非働化して用いた。なお、対照の健血清にはラッテ血清を用いた。

実験の方法は実験(1)の手技要領に従つた。なお、*T. lewisi* については凝塊反応も同時に試みた。それには非働性とした被検抗血清をリンガー液で10倍に稀釈し、次いで6本の小試験管に2倍階段稀釈を行なつた。各試験管内の液量は0.15ml とした。次いで実験(1)におけると同じ操作で集めた *T. lewisi* 虫体のリンガー浮遊液を0.02ml あて各管に入れ、よく混和した後、ホールグラスに取り、室温において、直後、30分後、60分後、90分後に鏡検して、凝塊の起こる状況を観察した。凝塊形成は30分ないし60分後に最高に達するので、60分後の凝塊形成最高稀釈倍数を凝塊価とした。対照には、稀釈に用いたと同じリンガー液0.15ml を入れた試験管1本と、1回だけではあつたがリンガー液で10倍に稀釈したラッテ健血清0.15ml を入れた試験管1本とを置いた。

実験の結果、ラッテ抗 *T. lewisi* 血清と同虫体とによる色素試験10例には全例に実験(1)の結果と類似した SFT 現象が認められた。すなわちメチレン青に染まらない虫体と染まつた虫体とが観察され、前者は核だけが青染して原形質は全く青染せず、伸長して針状を呈し、後者は核と原形質が共によく青染して、原形を保ち、両者の間には明らかな差異が認められた。このメチレン青不染虫体の百分率は、第2表に見られるように、実験(1)の結果ほど著明ではないが全例とも抗血清稀釈の1:4ないし1:16の低稀釈で対照との間に差を示した

第2表 *T. lewisi* 感染に SFT 方式を用いた色素試験10例のメチレン青不染虫体数の百分率、並びに各抗血清の凝塊価 (実験2)

抗血清番号	凝塊価	試 験 対 照									
		<i>T. lewisi</i> 虫体浮游リンガー液 各 0.02ml									
		人新鮮正常血清 (働性) 各 0.08ml					人加熱新鮮正常血清 (非働性) 0.08ml		人新鮮正常血清 (働性) 各 0.08ml		
ラット抗 <i>T. lewisi</i> 血清 (非働性) (第14~23号抗血清) 各 0.1ml							ラット健血清 (非働性) 0.1ml		0.9%食塩水 0.1ml		
		1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4	1:4			
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	
14	1:40	14	4	6	4	2	8	2	4	4	
15	1:160	96	26	18	6	6	4	4	4	4	
16	1:80	14	6	8	4	2	4	4	4	4	
17	1:40	38	12	10	6	10	0	2	4	4	
18	1:80	84	46	14	8	10	10	10	6	6	
19	1:80	20	12	16	18	12	10	10	8	8	
20	1:40	32	28	22	24	14	6	4	4	4	
21	1:80	46	38	24	8	4	10	10	4	4	
22	1:80	26	4	4	2	0	2	0	2	2	
23	1:160	18	2	0	0	2	4	6	2	2	

ほかに、数例には低稀積から高稀積に向かつての階段的な低下も見られた。また、この SFT 現象は、第2表の被検例と対照の健血清及び人非働性正常血清との比較から明らかなように2種の血清因子、すなわち抗体と易熱因子 (accessory factor) との虫体に対する協同作用に基づくことが分かった。なお、このメチレン青不染虫体の百分率と抗血清の免疫原として接種した虫体数との間に相関は認められなかった。

また、同時に試みた凝塊反応の結果は全例に対照との差が認められた。すなわちその凝塊価は第2表に示した通りで、また、表には示さなかったがリンガー液対照は全例とも反応が見られず、健血清対照1例も全く反応が見られなかった。なお、第2表について凝塊価とメチレン青不染虫体の百分率との間には明らかな相関は認められなかった。

(B) *Trypanosoma* 感染に SFT 方式を用いた色素試験の特異性

実験(3) 抗 *T. evansi* 血清と *T. lewisi* 虫体とによる交叉試験

T. evansi 感染マウスより得た抗血清を *T. lewisi* に作用させ、色素試験が陽性に出るか否かを検討した。抗血清は実験(1)に述べたと同様な方法で新たに10匹のマウスより採取し、第24~33号の血清とした。その他、反応に用いた材料はすべて前実験におけると同じ方法で用意し、反応の手技も同じである。ただ、前実験で対照と

して試みた健血清、及び人非働性血清を用いる実験は本実験の目的には不必要であるので省略した、

成績は第3表に示した。抗血清のいずれの稀積においても不染の *T. lewisi* 虫体の数は0~4%という低率であり、これは対照の食塩水におけると同じことである。すなわち抗 *T. evansi* 血清と *T. lewisi* の間ではこの反応は陰性であつて、類属反応は起こらないことが判明した。

第3表 マウス抗 *T. evansi* 血清と *T. lewisi* 虫体とによる交叉試験10例のメチレン青不染虫体数の百分率 (実験3)

抗血清番号	試 験 対 照									
	<i>T. lewisi</i> 虫体浮游リンガー液 各 0.02ml									
	人新鮮正常血清 (働性) 各 0.08ml					マウス抗 <i>T. evansi</i> 血清 (非働性) (第24~33号抗血清) 各 0.1ml		0.9%食塩水 0.1ml		
		1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4	1:4		
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
24		2	0	2	0	2	0	2	2	2
25		2	0	4	2	4	2	4	4	4
26		4	2	2	0	2	0	2	4	4
27		2	0	0	2	0	2	0	0	0
28		0	0	2	0	2	0	2	0	0
29		2	0	0	2	0	2	0	0	0
30		0	0	4	0	2	0	2	0	0
31		0	0	2	0	0	0	0	0	0
32		0	2	2	0	2	0	2	2	2
33		4	2	0	2	0	2	0	2	2

実験(4) 抗 *T. lewisi* 血清と *T. evansi* 虫体による交叉試験

T. lewisi 抗血清と *T. evansi* との間で色素試験が成立するか否かを検討した。これに用いた抗血清は実験(2)に用いた第14~23号の血清である。その他の材料はすべて前実験に準じて用意し、反応の手技も全く同じである。

成績は第4表に示した。この実験でも不染の *T. evansi* 虫体数の出現は多くの例で 0~4% であり、これは食塩水の対照を用いて行なった成績と差はない。従つてこの場合にも類属反応は認められなかつた。

第4表 ラット抗 *T. lewisi* 血清と *T. evansi* 虫体による交叉試験10例のメチレン青不染虫体数の百分率 (実験4)。

抗血清番号	試 験						対照
	<i>T. evansi</i> 虫体浮游リンガー液 各 0.02ml						
	人新鮮正常血清 (働性) 各 0.08ml						
	ラット抗 <i>T. lewisi</i> 血清 (非働性) (第14~23号抗血清) 各 0.1ml					0.9 %	
	1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	食塩水 0.1ml	
14	4	0	0	4	4	4	
15	2	0	2	4	4	4	
16	0	6	2	0	4	4	
17	2	0	2	0	0	2	
18	2	0	0	2	2	2	
19	2	4	2	0	2	2	
20	0	0	4	2	4	2	
21	8	0	0	0	4	2	
22	2	0	0	4	4	2	
23	2	4	6	2	2	2	

(C) *Trypanosoma* 感染の色素試験における正常血清易熱因子について

実験(5) 正常血清易熱因子の量的検討

Toxoplasma における SFT には周知のように抗体をもたない人新鮮血清が accessory factor として必要である。*Trypanosoma* について行なった本実験においても同じ意味で人血清を用いて来たが、人血清中に含まれるこの易熱因子について検討を試みた。先ず最初に、この反応に必要な易熱因子の量を検討した。実験(1)の所で述べたようにこの人新鮮血清を反応に加えるに当たつてはこの血清4容に対し虫体浮游液1容を加え、この混合液0.1ml あてを、被検血清稀釈液0.1ml を含む各試験管に分注した。従つて、各試験管の全液量は0.2ml、その中に含まれる人血清は0.08ml でこれは40% にあたる。これが易熱因子として各試験管内で反応する人血清

の濃度である。この濃度をどの程度まで減じてなお反応が起こり得るかを検討したのが以下述べる実験である。

人血清の濃度を減ずるに当たつては、その血清の1部を別の器に移して非働化し、これをもとの、すなわち働性血清に適量添加して、働性血清の濃度を数段階にわたつて低下した。すなわち第5表に見られるように、働性血清の濃度で100%、75%、50%、25%、0%となる。

この実験に用いた抗血清は第34号血清でラットに *T. evansi* を感染せしめて採取したものであり、その他、反応の手技はすべて既述した通りである。この抗血清は勿論非働性とし、これを7本の試験管に4倍稀釈を行なった。この4倍稀釈7本の試験管列を5列用意し、各列に上記の人働性血清各濃度のものを一種あて混じて反応の成否を追求した。成績は第5表に示してある。表に見られるように、反応陽性の虫体 (メチレン青不染虫体) 数の百分率は添加された人働性血清の濃度に影響され、その稀釈倍率1:4 (25%)、終末濃度で10%になると、不染虫体数は激減する。従つて、*T. evansi* に SFT 現象を起こさしめるに必要な人働性血清の終末濃度は20~30%とみなされる。一般の補体結合反応に補体として用いられるモルモット新鮮血清は1:10ないし1:20の稀釈で用いられるのが普通であり、その終末濃度は略3%以下と想定される。従つて、*T. evansi* の色素試験に必要な人血清の最小有効濃度は、補体結合反応に必要な補体の最小有効濃度よりかなり大きいものであることが分つた。

実験(6) 正常血清易熱因子の質的検討

この実験では易熱因子として人以外の動物血清を用いて反応を行ない、人血清を用いた場合と相違があるか否かを検討した。用いた血清はマウス、モルモット、兎、ラットの4種の動物のものである。抗血清としては実験(1)に用いた第2号及び13号の血清 (非働性) を用いた。それらを前実験と同様に4倍7段階に稀釈し、対照として2本の試験管を用意し、1本には同じ抗血清の1:4稀釈を入れ、これには動物の非働性血清を加え、他の対照の1本には0.9% 食塩水を入れ、これには段階稀釈した抗血清と同じく動物の働性血清を加えた。なお、第12号抗血清ではマウス、モルモット、人の血清を易熱因子として検し、第13号抗血清では兎、ラット、人の血清を易熱因子として検した。その結果は第6表に見られるようにモルモット血清では人血清を用いた場合と全く同様に SFT 方式を用いた反応が陽性であり、ラット血清では

第5表 人新鮮正常血清(働性-非働性)の濃度差別によるメチレン青不染虫体数の百分率の変動(実験5)

人新鮮正常血清(働性-非働性)の濃度差別		試 験							対 照			
働 性—非働性		<i>T. evansi</i> 虫体浮游リンガー液 各 0.02ml										
		人新鮮正常血清(働性-非働性) 各 0.08ml										
濃 度	終末濃度	稀釈倍率	濃 度	終末濃度	ラッテ抗 <i>T. evansi</i> 血清(非働性)(第34号抗血清) 各 0.1ml			0.9% 食塩水 0.1ml				
					1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4,096	1:16,384	
%	(%)		%	(%)	%	%	%	%	%	%		
100	(40)	1:1	0	(0)	100	98	100	96	96	6	2	0
75	(30)	1:1 ¹ / ₃	25	(10)	100	100	100	100	86	2	2	2
50	(20)	1:2	50	(20)	100	100	94	94	42	0	0	0
25	(10)	1:4	75	(30)	30	18	14	16	6	0	0	0
0	(0)	-	100	(40)	0	0	0	0	0	0	0	0

第6表 新鮮正常血清(働性)の動物種別によるメチレン青不染虫体数の百分率の差異(実験6)

新鮮正常血清の動物種別	試 験							対 照		
マウス モルモット 人	<i>T. evansi</i> 虫体浮游リンガー液 各 0.02ml									
	新鮮正常血清(働性) 各 0.08ml							加熱新鮮正常血清(非働性) 0.08ml	新鮮正常血清(働性) 0.08ml	
	ラッテ抗 <i>T. evansi</i> 血清(非働性)(第12号抗血清) 各 0.1ml							0.9% 食塩水 0.1ml		
	1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4,096	1:16,384	1:4		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
	2	6	4	6	4	4	6	2	0	
	100	100	100	58	6	2	0	0	0	
	100	100	100	98	12	4	0	0	2	
ラット 人	ラッテ抗 <i>T. evansi</i> 血清(非働性)(第13号抗血清) 各 0.1ml							0.9% 食塩水 0.1ml		
	1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4,096	1:16,384	1:4		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
	30	30	26	30	32	30	28	26	20	
	48	4	2	6	10	4	2	2	4	
	100	100	44	40	28	24	24	20	20	

抗血清 1:4 の稀釈の場合のみやや高率に不染虫体が出現し、陽性の結果を示している。マウス、兎の血清を用いた場合は反応はすべて陰性である。すなわち、少なくともマウス、兎の血清にはこの反応を起こすに必要な易熱因子に欠ける所があるようにみえる。

(D) *Trypanosoma* 感染に SFT 方式を用いた色素試験の虫体像について

実験(7)メチレン青不染虫体と死虫体との比較

Trypanosoma 感染の抗血清について SFT 方式を応用した場合、メチレン青に染まった虫体と染まらない虫体との間に生物学的にいかなる相違があるかは興味ある問題である。*Toxoplasma* の場合にはこの反応を起こす抗体は cytoplasm-modifying antibody の名で呼ばれている。これは反応によつて protoplasm に化学的な変化

が起こつて染色性がなくなるという考え方によるものである。ここでは同じ抗血清について全く同じの2例の反応系列を用意し、37°C 1時間おいて反応を起こさせた後、その1例には既述したと同じようにメチレン青溶液を加えて、染不染の虫体の百分率を求め、他の1列にはメチレン青溶液を加えずに鏡検した。抗血清には実験(1)に用いた第12号の血清を用い、その稀釈の方法、対照の置き方も実験(1)におけると同じことである。

メチレン青溶液を加えずに鏡検した系列においては活発に運動している虫体と、円形ないし長円形に変形して動かなくなつていく虫体とが見られる。この運動の停止は不可逆であり、回復しない。また、この不動変形の虫体では原虫特有の色調と光沢を失つている。この変化虫体の形態は、メチレン青溶液を加えた場合に見られる不

第7表 メチレン青不染虫体数及び死虫体数の各百分率の対比 (実験7)

試		驗						対		照		
虫体数の百分率の項別		<i>T. evansi</i> 虫体浮游リンガー液 各 0.02ml										
		人新鮮正常血清 (働性) 各 0.08ml						人加熱新鮮正常血清 (非働性) 0.08ml		人新鮮正常血清 (働性) 各 0.08ml		
		ラッテ抗 <i>T. evansi</i> 血清 (非働性) (第12号抗血清) 各 0.1ml								ラッテ健血清 (非働性) 0.1ml		0.9%食塩水 0.1ml
		1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4,096	1:16,384	1:4		1:4	
		%	%	%	%	%	%	%	%		%	%
メチレン青不染虫体数の百分率		100	94	70	64	48	32	22	14		10	10
死虫体数の百分率		100	94	70	62	50	30	18	16		12	16

第8表 メチレン青不染虫体数及び死虫体数の各百分率の時間的推移 (実験8)

虫体数の百分率の項別		反応時間		試						驗		対		照			
				<i>T. evansi</i> 虫体浮游リンガー液 各 0.02ml													
				人新鮮正常血清 (働性) 各 0.08ml													
				ラッテ抗 <i>T. evansi</i> 血清 (非働性) (第35号抗血清) 各 0.1ml										0.9%食塩水 0.1ml			
				1:4	1:16	1:64	1:256	1:1,024	1:4,096	1:16,384							
		分		%	%	%	%	%	%	%			%				
メチレン青不染虫体数の百分率		20		34	12	10	2	2	0	4			2				
		40		54	64	12	2	4	4	2			6				
		60		80	86	68	34	24	20	10			8				
				ラッテ抗 <i>T. evansi</i> 血清 (非働性) (第12号抗血清) 各 0.1ml										0.9%食塩水 0.1ml			
死虫体数の百分率		分		%	%	%	%	%	%	%			%				
		20		54	36	26	20	16	6	10			8				
		40		88	78	30	30	30	20	16			14				
		60		100	94	70	62	50	30	18			16				

染虫体の形態 (第1図) によく一致している。この変形虫体と運動虫体の百分率を各試験管について求めてみると、それはメチレン青溶液を加えた場合に見られる不染虫体と染虫体の百分率によく一致している (第7表)。かくしてこの色素試験において陽性に現われる虫体、すなわち不染の虫体は反応の結果死亡した虫体と考えることが出来る。実際この色素試験においてはメチレン青溶液を加えなくとも不動変形虫体の百分率を求めることによつて反応の結果を誤りなく判定することが出来る。

実験 (8) メチレン青不染虫体の百分率と死虫体の百分率との時間的關係

実験 (7) の所で述べたように *Trypanosoma* の色素試験において不染虫体と死虫体が同じものであることは疑いのない所であるが、この点を更に確実にするために

それらの百分率を時間的に追求した。

用いた抗血清は新たにラッテに *T. evansi* を感染せしめて得た第35号の血清と、実験 (1) 及び (7) に用いた第12号の血清である。反応の手技はいままでの実験と全く同じであり、各抗血清について7段階の稀釈を3列用意した。第35号抗血清では反応開始後第1列は20分、第2列は40分、第3列は60分にそれぞれメチレン青溶液を加えて、不染虫体の百分率を求めた。また、第12号抗血清ではメチレン青溶液を加えずに、同じ各時間後に不動変形虫体の百分率を求めた (第8表)。両方の実験で、抗血清が異なつているので百分率の数字には隔りがあるが時間の経過と共に両者の百分率が増加してゆく点では同じことである。これらの点も不染虫体が死虫体そのものであることを示していると思う。

総括及び考察

(1) *Trypanosoma* 感染における色素試験の成立について

染色虫体の観察：*Trypanosoma* における色素試験で見られた同原虫のメチレン青染色虫体像は *T. evansi* については、第1図に示したように、染虫体は核、原形質が共によく青染し、不染虫体は核だけが青染して原形質が全く青染せず(実験1)、同様の所見は *T. lewisi* についても観察された(実験2)。また、メチレン青不染虫体数は抗血清の濃度がうすくなるにつれて少なくなった(第1表、第2表)。これらの所見は *Toxoplasma* の SFT についての所見と現象的に酷似しており、このことから *Trypanosoma* の色素試験が *Toxoplasma* の SFT と免疫血清学的に同類のものであることが想像される。なお、*T. lewisi* についてメチレン青不染虫体の百分率は対照との差があまり著明ではないが、抗血清の 1:4 稀釈ではほぼ全例に対照との差が見られるので、その百分率を 1:1 ないし 1:2 稀釈まで追求することによつて対照との間になお明らかな差が見られると思われる。(第2表)。

免疫の成立：本色素試験に用いたマウス、ラット抗 *T. evansi* 血清は、阿部(1958)の報告に準じて作製し、その凝塊反応は省略したが全例とも免疫は成立しているとみなされる。ラット抗 *T. lewisi* 血清については凝塊反応を同時に行なつて全例共に対照との差を認めた(実験2、第2表)ので免疫はそれぞれ成立しているとみなされる。

反応因子の証明：本色素試験の成立には3反応因子、すなわち *Trypanosoma* 虫体とこれに共働作用を及ぼす抗体、易熱因子の2血清因子とが関与していることは被検例と対照との比較から明らかである(第1表、第2表)。この易熱因子は *Toxoplasma* の SFT における accessory factor と同じものとみなされる。

反応時間の影響：本色素試験の成立には一定の時間的因子が関与しており、*Toxoplasma* の SFT の場合(直

江, 1958)と同様に、一定温度で反応の速度と時間との間にはその開始から完了までに平行関係がみられた(実験8)。

特異性の有無：*T. evansi*, *T. lewisi* 感染に SFT 方式を応用して陽性の成績を示した実験(1)と実験(2)の虫体とそれに対応する抗血清とを交差させた試験ではいずれも陰性の成績を得た(実験3, 実験4)。従つて本色素試験には種属特異性の存在が認められるのであり、言い換えればこの *Trypanosoma* の色素試験は真性免疫現象に属するものであり、免疫血清反応として成立し得るとみなされる。

抗体価：*Toxoplasma* の SFT 抗体価の表示基準に従い、メチレン青不染虫体の百分率が50%以上を示す抗血清の最高稀釈倍数を本色素試験の抗体価とすると、実験(1)及び(2)の結果から、第9表に示した抗体価が得られ、その分布は *T. lewisi* では *T. evansi* と比較して総体にかなり低位である。これは *T. lewisi* 感染ラットからの抗血清採血の時期が抗体産生量の消長の山からずれたためか、または同感染ラットの抗体産生能が弱いためか、その原因は本実験の結果からは明らかでない。また、*T. lewisi* について、本色素試験の抗体価と凝塊価との明らかな相関は認められない(第2表及び第9表)ので本色素試験の抗体と凝塊反応の抗体とは別種のものと考えられる。

(2) *Trypanosoma* 感染における色素試験の本質について

虫体像の特質：本色素試験でメチレン青を加えないで観察した場合に見られる *T. evansi* の変形不動虫体は死虫体であり、この死虫体がメチレン青溶液を加えた場合に不染虫体として認められるものであることが両虫体についての対比試験から分つた(実験7, 実験8)。同じことが *T. lewisi* 虫体についても実験(2)で認められた(その記載は省略した)。すなわち、この両種 *Trypanosoma* のメチレン青不染虫体は反応によつて特異的に殺された虫体である。しかしこれらの死虫体の中には反

第9表 抗 *T. evansi* 血清13例及び抗 *T. lewisi* 血清10例の各 *Trypanosoma* 色素試験抗体価の分布

抗血清類別	抗体価							
	1: < 4	1: 4	1: 16	1: 64	1: 256	1: 1,024	1: 4,096	1: > 4,096
マウス抗 <i>T. evansi</i> 血清 (第1—10号抗血清)	0	0	0	2	4	3	1	0
ラット抗 <i>T. evansi</i> 血清 (第11—13号抗血清)	0	0	1	1	1	0	0	0
ラット抗 <i>T. lewisi</i> 血清 (第14—23号抗血清)	8	2	0	0	0	0	0	0

応と直接の関係なく死んだ少数の虫体が含まれていることは当然で、このことは第1表及び第2表の対照試験で、抗体を含まない健常動物血清を被検液とした場合にも少数の不染色虫体が見られることから明らかである。特異的免疫反応により死亡した虫体と、それ以外の原因で死亡した上記対照試験管中の不染色虫体とは形態学的な相違は見られない。

Trypanosoma に見られるこの SFT 現象は結局する所、抗体と人血清中に存在する易熱因子の協同作用により *Trypanosoma* が殺され、その原形質に変化を生じ、色素に染まらなくなったものである。しかし一方ではこのような特異抗体の作用によらなくとも、死虫体では同じような形態上の変化や染色性を失う現象が見られることは注意すべきである。すなわち、*T. evansi* を感染させたマウスが死んで一定時間を経て、心臓から採った死虫体でも、あるいは感染マウスが未だ死なぬうちにその心臓から採った生虫体を加熱して殺した虫体でも、その形態は上記の抗体作用により死んだ虫体と区別されない。また、人血清とメチレン青を加えて見てもこれら死虫体は不染のままに残っていて、その状況は本色素試験陽性の時に見られる所と酷似している。

反応に必要な人正常血清中の易熱因子：本色素試験で accessory factor 様の作用をする人血清中の易熱因子の本態は不明であるが、この目的に用いられる人血清の最小有効濃度は約30%である(実験5)。補体結合反応に補体として用いられるモルモット血清の終末濃度は通常3%以下であり、最小有効終末濃度はこれより更に低いと考えられる。従つて、人とモルモットでその血清の補体作用の強さに違いのあることを考慮しても、本色素試験でいう易熱因子と、補体結合反応における補体とは量的に著しい差を示すもので、両者は同じものとは考えられない。直江(1958)は *Toxoplasma* の SFT を行なうにあつて、accessory factor の濃度を色々変化させ、それにつれて抗体価がどのように変化するかを調べた。それによると accessory factor の終末濃度を20%にすると抗体価は著しく低下し、そのことから accessory factor の最小有効終末濃度は35~40%とした。*Trypanosoma* を用いた本色素試験でも、accessory factor に相当する人血清の終末濃度を10%まで下げると抗体価は著しく低下する(第5表)。その最小有効終末濃度は前述したように略30%とみられ、*Toxoplasma* の SFT で直江が述べた35~40%というのとほぼ一致している。

本色素試験に関与する正常血清は *Trypanosoma* の場

合にならつて人血清を用いたのであるが、これを他の動物の血清で置きかえた試験も行なつた(実験6)。モルモット血清では反応は人血清を用いた時とほぼ同様に起こり、ラッテ血清ではわずかに起こり、兎血清、マウス血清では反応は陰性となつた。Sabin & Feldman (1948)によると *Toxoplasma* の SFT において、accessory factor は補体とは異なるもので、この因子は人血清に低濃度に、モルモットには更に少なく、マウス血清には全く存在しないという。このことは上の事実にはほぼ一致しているので、本色素試験における正常血清中の易熱因子は *Toxoplasma* の SFT における accessory factor と同じものであると思われる。しかし一方では Sabin & Feldman は、モルモット、兎、ラッテ等の血清はそれぞれ自身 *Toxoplasma* をメチレン青溶液に対して不染色にする作用があるので、これらの血清は accessory factor としては用いられないとしている。*Trypanosoma* の場合にはこのような作用はこれらの血清に見られなかつた。このことは虫体の側の特性に基づくものであつて、反応しない因子の本質的な差異によるものではないのであろう。

本色素試験の正常血清として兎血清、ラッテ血清を用いた場合に反応が充分に起こらないことは上に述べた。これらの血清中には溶血反応等を起こすに必要な補体は充分に含まれており、しかもラッテ血清を用いたものでは抗血清も同じくラッテ血清であるから補体の働きを抑制する作用が起こることは考えられない。従つてこれらの血清を用いた場合に補体の作用は充分に保たれているわけである。それにもかかわらず反応が充分に起こらないのは、本色素試験における正常血清中の易熱因子が、溶血反応等における補体とは異なつたものであるためと考えられる。このことはこの易熱因子が、量的にみて補体結合反応における補体と同じものではないという上述の考えを質的な面から裏書きしている。

SFT における虫体像と accessory factor の本態：*Toxoplasma* における SFT において、色素に染まらない虫体は死んだ虫体であることを Sabin & Feldman (1948) は記載している。この点を確認するために RH 株の *Toxoplasma* 虫体を用いて SFT を行ない、メチレン青溶液を作用する前に虫体を鏡検し、形態学的に生死の判別を行なつてみると、死虫体が、色素を作用した場合に不染性であることをほぼ認めることが出来た。この関係は *Trypanosoma* においても認められる所である。*Trypanosoma* では死虫体は変形がはなはだしいので、色素

を作用させなくとも生死の判別は容易であり、この意味では *Trypanosoma* の色素試験では必ずしも色素を必要としない。これに反して *Toxoplasma* では生死の判別は形態からだけでは容易でない場合もあつて、色素による染色を必要とするものである。

SFT の accessory factor の本態は、Grönroos (1955) によれば properdin と補体成分の C_2' 、 C_3' 、 C_4' とからなる共働因子であるとみなされる。この点は補体結合反応、溶血反応等において、補体成分の C_1' 、 C_2' 、 C_3' 、 C_4' の4節が反応に関与している所と趣を異にするものである。すなわち、前者の accessory factor の properdin は後者の補体の C_1' に相当するわけである。色素試験以外で補体を必要とする種々なる免疫反応における補体の作用は、 C_1' が主たる働きをなし、 C_2' 、 C_3' 、 C_4' は副作用的な役割にあることを守山は述べているが、その考えからすれば properdin は accessory factor の主作用因子ということが出来るであろう。

Toxoplasma の SFT において抗体と accessory factor との作用により虫体は殺され、染色性を失うのであるが Sabin & Feldman によると、*Toxoplasma* の原形質は酸性であり、これが抗体と accessory factor の作用を受けると、その acid group が変化を受け、アルカリ性メチレン青に染まらなくなるという。すなわち、虫体の原形質に変化を生じて不染性になるというのである。*Trypanosoma* においてもおそらくこれと相似た変化が、抗体と人血清中の易熱因子とによつて引き起こされるものであろう。

Trypanosoma の色素試験に用いられる人新鮮血清が *Toxoplasma* の SFT における accessory factor と同じ役目、作用を果たしているものか、あるいは補体結合反応や制動反応における補体としての役目を果たしているものかは *Trypanosoma* 色素試験の本態を決めるに重要な問題である。補体結合反応における補体の必要終末濃度は3%以下であると考えられる。制動反応の場合は人によつて用いた補体の量は異なるが、やはり10%あるいはそれ以下で十分に作用している。*Trypanosoma* 色素試験においてはしかし終末濃度10%では反応の起こりかたがはなほだしく低下している(第5表)。このような点から考えて、本色素試験に用いられる人血清はおそらく単に補体としてのみ作用するものでなく、それに含まれている properdin も関与するものであり、人血清を10%にも減すると properdin の量が減少するために反応が低下するものと考えられる。

同じような推測を数種動物血清を用いた実験(6)(第6表)にあてはめて考えると、この *Trypanosoma* 色素試験の本態を理解するのに役立つように思われる。Pillemer *et al.* (1954) によるとここに用いた数種動物の血清中の properdin の量はラッテが最高でマウスがそれに次ぎ、人、兎は中間でモルモットが最低であるという。実験(6)で、モルモット血清で反応が陽性に出ている所をみれば、以上の動物の血清いずれにおいても properdin の量は充分であると思われる。しかるにマウス血清で陰性というのは補作成分が欠けている(Brown, 1943; Rice & Crowson 1950) ためと考えられる。ラッテ、兎では補体成分がそろつている(Hegedüs & Greiner, 1938; Rice & Crowson, 1950) ので、properdin も充分存在するところから、何故に本色素試験が陽性に出ないのか分からない。何か本試験を抑制する因子が存在するのか、あるいは不明な必要成分が不足しているのかも知れない。

原虫の溶解反応との比較：*Trypanosoma* はその抗血清と補体との作用で溶解されるという現象が報告されている。すなわち、古川(1928)は *T. gambiense* に兎、モルモット、マウスの各抗血清を作用させて、虫体が空胞形成、形態変化を経て溶解死滅するまでの経過を観察している。しかしこの変化は本色素試験に見た *Trypanosoma* の変化とは形態的には著しく異なるものである。この相違は *Trypanosoma* の種類が異なることによる質的差異か、あるいは宿主動物の抗体産生能や、実験に際しての抗血清稀釈度、反応時間が異なることに基づく量的な差異か分らない。また、補体についても古川は C_1' 、 C_2' 、 C_3' の3節によるものと述べているが、この因子が properdin と C_2' 、 C_3' 、 C_4' である可能性についても検討の余地があると思う。この溶解反応と本色素試験とは現象的には相違するが、方式的には共通性がありそうで、両反応の間には多少の関連性があると思われる。

Taliaferro (1932) は *T. lewisi* についてラッテ抗血清を用いて溶解反応を観察した。その際の虫体の変化は明瞭な記述がないので本色素試験の場合と比較することが出来ない。補体としては新鮮モルモット血清の1:20、すなわち5%稀釈が用いられているので、本色素試験における accessory factor 様の因子と異なり、補体そのものである可能性が強い。抗体は本色素試験と同じかどうかは分からない。すなわち、Taliaferro の行なつた溶解反応と本色素試験とは現象的に、言い換えれば虫体像の

変化における差異があるかないか不明であるが、方式的には相違するので、両者の関連性は少ないと思われる。

登倉 (1935) は *Trichomonas hominis*, *T. tenax*, *T. vaginalis* に兎の抗血清を作用させて溶解反応を観察した。この反応では虫体の運動減退、運動停止、溶解の3型が見られている。補体としては新鮮モルモット血清の1:10稀釈が用いられている。Robertson (1934) は *Bodo caudatus* の溶解反応で補体として新鮮モルモット血清を1:10に稀釈して用いている。その終末濃度は1:80すなわち1.25%となっている。Menendez (1942) は *Entamoeba histolytica* に兎の抗血清を作用させて溶解反応を試み、虫体は変形、運動停止、溶解等の起こることを報告した。補体としては新鮮モルモット血清の1:1—1:10の稀釈を用いている。以上3人の報告した溶解反応では虫体の形態的变化が本色素試験とは異なっており、モルモット血清も補体そのものとして作用している可能性が強い。要するにこれらの溶解反応は現象的的方式的にも本色素試験とは異なっているものである。

補体の関与する制動反応との比較：*Trypanosoma* におけるこの色素試験と、従来報告されている補体の関与する制動反応 (immobilization test) との最も大きい違いは色素試験ではメチレン青を用いて結果を判定することである。しかし前述したようにこの色素は反応の本質には何ら関係のないものであり、色素を用いなくとも *Trypanosoma* では反応の結果を判定出来るものである。従つて両反応は現象的にかなり似ている所がある。馬場 (1957) は *Trichomonas vaginalis*, *T. foetus*, *T. gallinae* で、新鮮モルモット血清1:50稀釈を補体とし制動反応を行なつた。この反応で虫体は不動化ないし死ぬる像が認められた。松井・富川 (1953) は *Treponema pallidum* について、新鮮モルモット血清の1:4.5稀釈を補体として制動反応を試みている。同じ試験を行なうにあつて Nelson は1:10稀釈、Magnusson は1:18稀釈のモルモット血清を用いている。以上の *Trichomonas* や *Treponema* についての試験ではモルモット血清は補体そのものとして用いられ、作用しているものとみなされるのであり、本色素試験で accessory factor 様物質としてそれが用いられているのとは意味が異なっている。従つて制動反応と本色素試験とは現象的には似た所があつても、その本質において関連性が少ないものである。

(3) SFT 方式の適用範囲について

Trypanosoma と *Toxoplasma* との類似性：*T. evan-*

si 及び *T. lewisi* について色素試験がそれぞれ適用され得ることが分かり、*Trypanosoma* のこの兩種以外の虫種については未検討であるがその適用可能の公算は大きいと思われる。*Trypanosoma* と *Toxoplasma* とは、Westphal (1954) の説のように形態学的にみて分類学上近縁関係にあるとする考えもあるので、この兩種原虫双方に SFT 方式が成立することは免疫血清学的に興味深い。

適用範囲の追究：SFT 方式の適用範囲を追究する目的で、*Trichomonas gallinae*, *T. vaginalis* について予備的な実験を試みた結果、人新鮮正常血清に浮遊させたこれらの生活虫体はアルカリ性メチレン青 (pH 11) にあまりよく青染しないばかりでなく、青染するまでかなりの時間を要する不便がある。特に虫体の活力が強いもの程その傾向が著しい。また、この生活虫体を働性の人正常血清に浮遊させると比較的すみやかに虫体の変形から不動ないし死に至る現象が観察される。馬場 (1957) も *T. gallinae*, *T. vaginalis* 等の虫体に人、モルモット、兎の各働性正常血清を各種濃度で作用させ運動阻止、虫体溶解の起こることを報告している。また私は *Balantidium coli* について同様の予備的な実験を試みた結果、その生活虫体はメチレン青にきわめてよく青染するが、この虫体を働性の人正常血清に浮遊させると比較的すみやかに虫体の運動停止から溶解死滅に至る現象が起こることを知つた。SFT 方式は前述の考察から明らかなように、生きた原虫が抗血清と人新鮮正常血清 (accessory factor) との協同作用によつて殺された結果をメチレン青染色により判別する反応方式であるが、*Trichomonas* や *Balantidium* は非特異的に人新鮮正常血清の単独作用によつて比較的すみやかに殺されることが分かつたのでこれらの原虫に SFT 方式を応用することは出来ない。なお、この2種の原虫について、人新鮮正常血清を一定度に稀釈すればその非特異的殺滅作用はなくなるが同時にその accessory factor としての作用もなくなるので、そのような手段を SFT 方式としてこれらの原虫に用いることも出来ない。

人新鮮正常血清の殺原虫作用：人新鮮正常血清の、原虫に対する上述のごとき非特異的作用に関しては、諸種動物の新鮮正常血清のそれをも含めて多くの報告が見られる。その作用は血清中に存在する正常抗体と補体との協力に基づくと考えられている。近年、Pillemer *et al.* (1954) は properdin なる物質が自然免疫の因子として血清中に存在することを発見した。この properdin は正

常抗体と同様に補体と協同して非特異的殺菌、ヴィールス中和、溶血作用を現わすという。一方、properdin はその性状が正常抗体と類似した点があるところから、最近 Nelson (1958) はこの両因子を同じ物質とみなす仮説を発表した。しかしながら両因子の性状の間には一致しない点もあるので、両因子が果たして同じ物質であるかは疑わしい。

原虫に対する、新鮮正常血清の *in vitro* の作用が、正常抗体と補体の協力によるものか、properdin と補体の協力によるものか、あるいはまた、原虫の種類によつてこの両者のいずれかに規定せられているものか、この点未だ明らかでない。その説明は今後に残された興味ある課題である。

適用範囲の推察：原虫について SFT 方式の適用に不可欠の制約条件は、第一にその生活虫体がメチレン青によく染まる虫種であること、第二に上述の人新鮮正常血清の殺原虫作用についての考察から明らかなようにその生活虫体が同血清で障害を受けないものでなければならぬ。このような原虫としては血液や組織に寄生するのが考えられ、消化管や腔に寄生する種類はこの条件にあてはまらないものように思われる。

結 論

Toxoplasma に独得な現象とみなされている SET 現象が、*Toxoplasma* 以外の原虫についても見られるか否かを検討するために、*T. evansi*, *T. lewisi* 感染でそれぞれの虫体を抗原として SFT 方式を試みた。その結果は次のごとく要約される。

(1) *T. evansi*, *T. lewisi* 感染に SFT 方式を応用した色素試験は、それぞれ陽性に出るので、免疫血清反応として成立することが出来る。この *Trypanosoma* における色素試験と *Toxoplasma* の SFT とは免疫血清学的に同じ種類の反応に属するものと推定される。

(2) *T. evansi* と *T. lewisi* についての交叉試験によつては SFT 現象は起こらない。従つて *Trypanosoma* 色素試験には種属特異性の存在が認められる。

(3) *Trypanosoma* 色素試験の accessory factor として、人新鮮正常血清 (働性) の代りに他の動物の新鮮正常血清 (働性) を用いると、その血清の動物種によつて SFT 現象が見られるものと見られないものがある。

(4) *Trypanosoma* 色節試験における SFT 現象の本質は、虫体が抗体と accessory factor との協同作用によつて特異的に殺されて、その原形質に変性が起こることに基づく色素親和性の変化であるとみなされる。すな

わち、この殺された虫体はメチレン青に不染性で、生鮮のままでの形態観察によつても判別が可能である。なおこの結論は *Toxoplasma* における SFT のメチレン青不染現象の本質とも共通するとみなされ、これについて考察した。

(5) *Trypanosoma* 色素試験と、原虫における溶解反応及び原虫、スピロヘータにおける補体の関与する制動反応との間には、一部に若干の共通性があると思われるが本質的な関連性は認められない。

(6) SFT 方式の適用範囲は、原虫の中で少なくともその生活虫体がメチレン青によく染まる虫種で、しかも血液ないし組織寄生性の種類に限られると推察される。

稿を終わるに臨み、御指導御校閲下さつた松林久吉教授並びに浅見敬三助教授に深く感謝する。

本論文の要旨は第17回日本寄生虫学会東日本支部大会並びに第27回日本寄生虫学会総会で発表した。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。

文 献

- 1) 阿部道夫 (1958) : Sabin-Feldman dye test の特異性に関する研究, 慶応医学, 35(5), 453-458.
- 2) 馬場弘志 (1957) : トリコモナスの免疫学的研究 1—immobilization test と凝塊反応との比較検討, 日新医学, 44(12), 655-664.
- 3) Brown, G. C. (1943) : The complementary activity of mouse-serum. J. Immunol., 46, 319-323.
- 4) 古川穂東 (1927) : 実験的トリパノゾミアージスにおける免疫学的研究 (第1回報告) —アグロメラチオンの実験的研究, 福岡医科大学雑誌, 20(8), 982-1041.
- 5) 古川穂東 (1928) : 実験的トリパノゾミアージスの免疫学的研究 (第2回報告) —溶トリパノゾーマ現象とその機転について, 福岡医科大学雑誌, 21(1), 1-62.
- 6) Grönroos, P. (1955) : The action of properdin on *Toxoplasma gondii*. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 33, 310-315.
- 7) 長谷川毅一 (1930) : トリパノゾーマ免疫に関する実験的研究, 福岡医科大学雑誌, 23(11), 1925-2145.
- 8) Hegedüs, A. & Greiner, H. (1938) : Quantitative Bestimmung der Komplementbestandteile. Zschr. Immunitätsforsch., 92, 1-9.
- 9) Laveran, A. & Taliaferro, W. H. (1902) : The

- immunology of parasitic infections. 1929, The century co., New York, London による(164).
- 10) 松井清治・富川栄一 (1953) : *Treponema pallidum* immobilization test の研究, 東京都立衛生研究所年報, V, 41-47.
 - 11) Menendez, P. E. (1932) : Serological relationships of *Entamoeba histolytica*. Amer. J. Hyg., 15, 785-808.
 - 12) 守山英雄 : 免疫及び免疫反応, 第1版, 1958, 医学書院.
 - 13) 直江敏郎 (1958) : トキソプラスマの研究 IV—色素試験の反応条件について, 東京医事新誌, 75 (4), 199-207.
 - 14) Nelson, R. A., Jr. (1958) : An alternative mechanism for the properdin system. J. Exp. Med., 108, 515-535.
 - 15) Pillemer, L. et al. (1954) : The properdin system and immunity—I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomenon. Science, 120, 279-285.
 - 16) Rice, C. E. & Crowson, C. N. (1950) : The interchangeability of the complement components of different animal species—II. In the hemolysis of sheep erythrocytes sensitized with rabbit amboceptor. J. Immunol., 65, 201-210.
 - 17) Robertson, M. (1934) : An *in vitro* study of the action of immune bodies called forth in the blood of rabbits by the injection of the flagellate protozoan *Bodo caudatus*. J. Path. Bact., 38, 363-390.
 - 18) Sabin, A. B. & Feldman, H. A. (1948) : Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (toxoplasma). Science, 108, 660-663.
 - 19) Sabin, A. B. et al. (1952) : Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man—Indications and provisions for routine serologic diagnosis. J. Amer. Med. Ass., 150, 1063-1069.
 - 20) 齊藤正敬 (1927) : トリパノゾーマの細胞学的研究—特に諸種化学的治療剤X線及び紫外線の影響について, 福岡医科大学雑誌, 20 (7), 850-903 (884).
 - 21) Taliaferro, W. H. (1932) : Trypanocidal and reproduction-inhibiting antibodies to *Trypanosoma lewisi* in rats and rabbits. Amer. J. Hyg., 16, 32-84.
 - 22) 登倉 登 (1935) : *Trichomonas* の生物学的及び免疫学的研究, 福岡医科大学雑誌, 9 (4), 817-908.
 - 23) Westphal, A. (1954) : Zur Systematik von *Toxoplasma gondii*—Die Toxoplasmen als Trypanosomidae. Zschr. Tropenmed., 5, 145-182.

DYE TEST AFTER SABIN-FELDMAN'S PRINCIPLE IN TRYPANOSOMA INFECTION

SHIKŌ FUJIOKA

(Department of Parasitology, School of medicine, Keiō University, Tokyo, Japan)

Sabin-Feldman's dye test is an immune reaction taking place between living *Toxoplasma* and the antiserum. It is a matter of importance whether the same reaction would occur between some other kind of parasite and its antiserum. In the present study, dye tests were performed with Trypanosomes and their antiserum. *T. evansi* and *T. lewisi* were used in the experiment.

Altogether 10 mouse-antisera for *T. evansi* and 3 rat-antisera for *T. lewisi* were tested. In the tests with *T. evansi*, the percentages of unstained Trypanosomes were mostly 70-100% in the dilutions from 1:4 to 1:256 and decreased in higher dilutions, giving almost the same titer as the controls in 1:4,096 dilution. Rat-antisera also gave positive results (50% or more unstained Trypanosomes) in the dilutions of 1:64 or 1:256. Thus it was elucidated that the same immunological reaction occurred between Trypanosomes and its antiserum as between *Toxoplasma* and its antiserum.

The same experiment was carried out with *T. lewisi* and its antiserum. The results were positive in these cases, too, though the titers were lower than in *T. evansi* infection, being mostly 1:16 or 1:64. Agglomeration test with the same sera were carried out and was positive at the dilutions from 1:40 to 1:160. The agglomeration titer, however, had no correlation with dye test titer.

The cross tests were carried out with *T. evansi* and *T. lewisi*: dye tests were performed with *T. lewisi* and evansi-antiserum or with *T. evansi* and lewisi-antiserum. Results were all negative and high specificity of the test was substantiated.

The necessary concentration of accessory factor in the reaction system was estimated by serial dilution. It must be contained in amount of at least 30% of the total volume of one tube. Among animal sera which were tested as accessory factor in the dye tests, only guinea pig sera gave positive results, rat sera gave only a low titer and sera of rabbit and mice gave negative results.

The unstained Trypanosomes in the dye test changed their shape, becoming more rounded or curved while the stained one keep their original slender form. These changes in shape occurred before the addition of methylenblue solution, and the percentages of these degenerated Trypanosomes well coincided with the unstained ones after the dye was added. The percentages of both unstained and degenerated Trypanosomes increased in the similar rate with lapse of time when they were examined 20, 40 and 60 minutes after the incubation. These findings indicated that only the degenerated Trypanosomes remained unstained in the dye test.