

# ランブル鞭毛虫症に関する研究

## 第3編 ランブル鞭毛虫に対する Chloroquine の 殺滅効果について (効力試験)

### 第4編 総 括

荒木 恒治

大阪医科大学内科学教室 (指導 岩田繁雄教授)

(昭和35年7月9日受領)

### 第 3 編

#### ランブル鞭毛虫に対する Chloroquine の 殺滅効果について (効力試験)

#### 緒 言

先にランブル鞭毛虫症の2症例に文献的考察を行い、その治療の概要に付き記載した(荒木, 1959). 即ち抗マラリア剤なる Chloroquine diphosphate (Resochin) が1934年 Andrsag, Breitner, Gung 等により合成され, 1938年 Kikuti がマラリア患者に有効なる事を実証して以来, リウマチ性疾患へも種々応用されているが(加藤 1958; Haydu, 1953 等), Giardiasis (Lambliasis) に対しては少数の文献を見るのみである(Basnuevo G. 1946; Schneider J., 1947; Decourt P., 1947 等) 鞭毛虫症患者に対して本剤を試用しランブル鞭毛虫駆除と共に臨床的にその効果の遠隔成績についても考察を加え, 著効を有することを報告した.

次いで本症の病原性の追究の為にその培養実験を行い試験管内に於て始めて長期に生存せしめ得, 且著明な分裂増殖を来さしめることに成功し, その分裂増殖の過程について観察を行い併せ報告した(荒木, 1959). (第4編第1図)

そこでこの実験成績結果を利用して臨床成績を更に確めるべく試験管内に於て Chloroquine を使用してランブル鞭毛虫に及ぼす影響を観察したのでこゝに報告する.

#### 実験材料並びに実験方法

##### 1. 実験材料

実験に供した薬剤は Chloroquine-diphosphate なる Resochin (Bayer) の錠剤(1錠中 250mg の Chloroquine-diphosphate 含有) の溶解懸濁液を作成し, 実験に使用

したランブル鞭毛虫(以下「ラ原虫」と略す) 十二指腸ゾンデにて患者より採取した虫体を出来るだけ無菌的に操作し, L<sub>4</sub>-Bouillon (第1表) 中に浮遊せしめたラ原虫の栄養型を用いた.

第1表 L<sub>4</sub>-Bouillon 組成

Pig liver	15.0g
Water	100cc
Poly pepton	2.0g
Cystein HCl	0.2g
Maltose	1.0g
NaCl	0.5g
Serum of rabbit (非働化)	15%
pH	6.4
Penicillin (G.K 又は Na 塩)	1,000Unit/cc
Colimycin	1,000Unit/cc

##### 2. 実験方法

先づ Chloroquine-diphosphate (Resochin) 0.25g を10 cc の滅菌生理食塩水に溶解し, その白濁する液をよく混和し, (1cc 中 25mg の Chloroquine 含有) その0.1, 0.3, 0.5cc を正確にとつて L<sub>4</sub>-Bouillon 4.9, 4.7, 4.5cc 中に混和し, 0.05%, 0.15%, 0.25% の Chloroquine 懸濁 L<sub>4</sub>-Bouillon を各々数本づゝ作成し, その中に L<sub>4</sub>-Bouillon 中に浮遊せしめたラ原虫を2滴づゝ滴下し観察を行った. 同時に数本の L<sub>4</sub>-Bouillon にも同量滴下して対照とした(第2表).

第2表 実験使用培地の Chloroquine 濃度

実験使用培地名	L <sub>4</sub> -Bouillon (cc)	Chloroquine (mg)
0.05% Chloroquine L <sub>4</sub> -Bouillon	5 cc	0.25mg
0.15% Chloroquine L <sub>4</sub> -Bouillon	5 cc	0.75mg
0.25% Chloroquine L <sub>4</sub> -Bouillon	5 cc	1.25mg
対 照 L <sub>4</sub> -Bouillon	5 cc	0

尚此等の観察は位相差顕微鏡並びに普通顕微鏡強拡大及び油浸を以つてその培養基中の沈澱一滴を取り、1本の培養基に対して2枚の標本を作り検した。又実験には37°C 孵卵器を用いた。

生死の判定については前編に於いて委しく述べた通り鞭毛運動の停止を以つてその限界とした。即ち鞭毛運動の停止したものは一度加温し乍ら観察をつゞけ、尚も運動を示さないものを死と断じ、この基準を生るの限界と見做した。

実験成績

0.05%, 0.15%, 0.25%の Chloroquine 懸濁 L<sub>4</sub>-Bouillon の各々について4本づゝ培地を用いてラ原虫の運動状態及び生存について観察を行つた実験結果を報告する。尚対照として L<sub>4</sub>-Bouillon を使用して同時に観察した(第3, 4表)。

第3表 Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon の各濃度培地に於ける最高生存日数

実験培地種類	原虫数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chloroquine L <sub>4</sub> -Bouillon	0.05% Chl-L <sub>4</sub>	■									
	0.15% Chl-L <sub>4</sub>	■									
	0.25% Chl-L <sub>4</sub>	■									
L <sub>4</sub> -Bouillon (Control)	4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■ 躍動を認められたもの  
 ■ 分裂増殖を認められたもの  
 ▨ 鞭毛運動を認められたもの  
 □ 生存と推察されるもの

第4表 Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon の各濃度培地に於ける最高生存日数について

実験使用培地名	培地本数	躍動を認めたる日数	鞭毛運動を認めたる日数	分裂増殖像の著明なる日
0.05% Chl-L <sub>4</sub>	4	1日 (24時間)	1日 (24時間)	(-)
0.15% Chl-L <sub>4</sub>	4	24時間後 (-)	1日 (24時間)	(-)
0.25% Chl-L <sub>4</sub>	4	24時間後 (-)	24時間後 (-)	(-)
対照L <sub>4</sub> -Bouillon	4	10日以上	10日以上	2~4日目 (24~96時間)

各グループ中最高生存日数を示す。

1) 0.05% Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon

投入時活潑なる躍動運動を認められたラ原虫は、24時間後にしてその数を減じ乍ら一部に躍動運動が見られ投入時に比し活動性にやゝ減弱を認めた。又鞭毛運動の

みを認めるものは相当数観察出来た。此等の他に原形を留めるも自動運動を全く欠くものも一部見られ、此等は一応生存と推察されるものとして区別して表に示した。尚又顆粒の出現が著明で細胞の緊張感乏しく、周囲に凹凸を生じ萎縮像の見られるものや、一部には一見囊子状に変形し楕円形の緊張感を有する虫体が認められたが、此等を直ちに死滅、囊子化と断定する事は出来ない事を前編にて強調した。48時間後では躍動する虫体及び鞭毛運動を認める原虫は全く欠け生存と推察しうる原虫少数存在するのみで、一部囊子状変形したものを認めた他は大部分生存の確証は得られなかつた。引続き72時間後では全く生存なく、又生存と推察されるものも見出せなかつた。

尚本培地内で分裂像は全く認められなかつた。

2) 0.15% Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon

投入後24時間で既に躍動せる原虫は見られなかつたが少数の鞭毛運動を認める原虫の存在は確認し得た。又生存と推察されるものも少数認める程度で、多くは顆粒出現、囊子様変形を来し、その原虫数は0.05%の場合に比して著しく減少の傾向にあつた。48時間後の観察では生存の確証あるもの全くなく、一部に少数の囊子様に変形せる虫体を残すのみでこれ以上のラ原虫の生存は望めなかつた。又分裂像は全く観察され得なかつた。

3) 0.25% Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon

投入時活潑なる運動を示していた原虫は24時間後に於て少数の虫体影を認めるのみで、しかも之等は自動運動を全く欠き一部生存と推察されるものを認める他は大部分顆粒出現、囊子様変形を示すものであつた。48時間後では生存と推察されるものも消失し、顆粒出現せるもののみしか認められなかつた。尚分裂像は全く観察されなかつた。

4) L<sub>4</sub>-Bouillon (対照)

対照として L<sub>4</sub>-Bouillon を単独使用してラ原虫の生存の状態を観察したが、その自動運動は第2編に示した実験結果と殆んどその差を認めず、原虫投入後10日間に亘つて虫体の活潑な躍動及び著明な鞭毛運動を認めていた。更にその2乃至4日目には分裂増殖の様相を確認した事は前編の結果と一致している。

以上実験結果を一括すると第3, 4表に示す如くである。即ち対照 L<sub>4</sub>-Bouillon にてはラ原虫はその培地内にて10日間以上の生存の確証を得ているのに反し、Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon にては Chloroquine のどの濃度のものにも48時間以上の生存確証は認められず、特に

0.25% Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon にては24時間後ですら生存確実なものは望めなかった。又分裂像も対照と異なりどの濃度のものにも認め得なかった。

### 総括及び考案

以上最も優秀なラ原虫培養基である L<sub>4</sub>-Bouillon を利用して Chloroquine のラ原虫に及ぼす影響を実験的に観察した。尚之の結果に基づき次の諸項目に亘つて考察を行った。

1) Chloroquine のラ原虫の運動性に及ぼす影響について。

Chloroquine の 0.05%、0.15%、0.25% の各濃度の Bouillon にてラ原虫の運動性を観察した結果、先づ虫体の活潑な躍動は0.05%で24時間後まで認められたが、その48時間以降及び0.15%、0.25%では既に24時間後にて認められなかった。又虫体の鞭毛運動のみについて見れば0.05%、0.15%で24時間後まで確認出来たが、その48時間以降及び0.25%では24時間後で既に運動は停止していた。又分裂増殖の像は全然認め得られなかった。此等の結果と対照 L<sub>4</sub>-Bouillon に於けるその結果とを比較すれば明らかな有意の差が認められる(第3、4表)。

2) Chloroquine のラ原虫の生存に及ぼす影響について。

私は前編に於て生死の判定はその自動運動の存否によって区別されるべきであつて、野崎(1956)が提唱した判定に疑念を抱いている事を強調した。上記の実験結果はもとよりこの私の論示した基準により生死の判定を行い Chloroquine の意義について検討した。即ち生存と確認された時間的経過について見れば、0.05%、0.15%の Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon 中では24時間後迄は生存可能なるも48時間を経過しては既に生存能力を欠除し、0.25%のものでは24時間で既に生存しない。之に比し対照群では10日間以上の生存を示し特にその2~4日目に著明な分裂像を示す事より Chloroquine が明らかにラ原虫の生存に抑制的に働くことと云つて決して過言ではない(第3、4表)。

3) ラ原虫に対する Chloroquine の作用についての検討。

上記の結果より Chloroquine がラ原虫の生存に抑制的に働くことと云い得る。この抑制的と云う事が如何なる機序によつて行われるものか明確に指摘する事は出来ないが、一つの推論を仮定し得る。中島・山本の実験(1958)で顎口虫に対して本剤はその虫体の酸素消費量を抑制し呼吸代謝阻害作用のある事を報告している。この事実より

推してラ原虫に対しても Chloroquine の微粒子が虫体に接触し、虫体内に於ける代謝を阻害し、終には死に至らしめるものであろう。本実験に於ては微細構造の変化迄とらえ得られずこの結論は付せられないが、恐らく虫体の生存に必要な物質代謝ひいては酵素系の障碍等を来たすものと考えられよう。この様な推論の究明からして更に本原虫の純培養及び継代培養に於ける必要代謝物質ひいては培地改良の示唆が得られるものと信じている。

4) Chloroquine 濃度についての検討—本実験成績とランブル鞭毛虫症臨床治療経験の関連性について—

上記実験の各々 Chloroquine の濃度と臨床例に於ける Chloroquine 内服による腸管内のその濃度について検討すれば、Chloroquine は内服後殆んど吸収される前に腸管内寄生のラ原虫に作用するものと考えられる。すれば腸管内に於ける濃度が問題となる。即ち内服量と腸管内水分量の割合がその濃度を決定する。この考えより虫体駆除に対してはその腸管内濃度を高濃度に保つ方が虫体により強力に働く事が実験結果より暗示される。併し乍ら本剤は抗マラリア剤なる本質からして、やがては腸管内より吸収される運命にある為、自らその吸収速度及び血中濃度にも考慮が必要となる。更にひいては吸収後の副作用が問題となること必定である。之等本剤の特長を如何にうまく利用し、欠点を如何にうまく埋めるかラ原虫の駆除を左右するものと思われる。

第1編にてランブル症の2症例につきその病原性の問題について検討し、寄生部位に於ける炎症及び機械的障害による病原性は考えられるが、本原虫の胆嚢内及び胆道に於ける一過性寄生はあつても永続的寄生はないものと言及した。この点よりして本薬剤の効果については吸収後の血中濃度の上昇と云う事より腸管内に於ける濃度が主に関係するものである事を強調したい。故に本剤の内服を推奨したい。但し投与に当つてはその副作用を考慮すべきで、1日3錠(1錠中250mg の Chloroquine-diphosphate を含有)3回分服10日間連用を先に提唱した(荒木, 1959)。即ち持続内服により腸管内濃度を維持し乍ら腸管内吸着寄生の本原虫の撲滅を計るべきである結論に達した。

### 結 語

L<sub>4</sub>-Bouillon を使用してラ原虫の Chloroquine に対する影響を *in vitro* に於て観察した。

1) Chloroquine 懸濁 L<sub>4</sub>-Bouillon を用いてラ原虫の運動性につき観察した結果、0.05%、0.15%、0.25%の順に早くその運動性を失つた。換言すれば濃度の稀薄な

程永く生存した。即ち 0.05% Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon に於てさえ 24 時間迄しかその運動が認められず又分裂増殖の像は全然見られず、対照の L<sub>4</sub>-Bouillon に於けるラ原虫の運動性、分裂増殖を来たすことを比較すれば明らかにその運動が抑制された。

2) 0.05% Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon でさえ 24 時間迄しか生存を確認出来なかつたのに比し対照では 10 日間以上にも生存した。

3) 腸管内に於ける Chloroquine 濃度とラ原虫の寄生態度より推察して、Chloroquine によるラ原虫駆除の目的では 1 日 3 錠 (1 錠中 250 mg の Chloroquine-diphosphate 含有) 3 回分服 10 日間持続内服が望ましいとの結論に達した。

## 文 献

- 1) 荒木恒治 (1959 a): ランブル鞭毛虫症に関する研究, 第 1 編 ランブル鞭毛虫症の臨床的観察とその治療, 日本内科学会雑誌, 47, 1300-1306.
- 2) 荒木恒治 (1959 b): ランブル鞭毛虫症に関する研究, 第 2 編 ランブル鞭毛虫の培養, 日本内科学会雑誌, 47, 1306-1311.

- 3) Basnuevo, G. & Sotolongo, F. (1946): Chloroquine (quinoline derivative), Rev. Kuba med. trop., 2, 187-188.
- 4) Decourt, P. & Schneider, J. (1947): Traitement curatif du paludisme par divers sels du 3-méthyl-4 (diéthylaminopentyl) amino-7-chloroquinoléine (nivaquine), Bull. Soc. path. exot., Paris 40, 14-17.
- 5) Haydu, G. G. (1953): Rheumatoid arthritis therapy: rationale and use of chloroquine diphosphate, Amer. J. M. Sc., 225, 71-75.
- 6) 加藤浩志 (1958): リウマチ性疾患に対するクロロキシン (Resochin) の使用経験, 新薬と臨床, 7, 470-474.
- 7) 野崎恭勝 (1956): ジアルジア・ムーリスの培地内における生存のついて (培養を目的とした一実験), 医療, 10, 401-405.
- 8) 中島 一・山本清利 (1958): 顎口虫症の治療管見とレゾヒンの治療, 最新医学, 13, 1411-1414.
- 9) 根本康子 (1959): Resochin によるランブリア症の一治験例, 今日の医学, 4, 40.
- 10) Schneider, J. & Uzan, M. (1947): Nivaquine (quinoline derivative), Bull. Soc. path. exot., Paris 40, 155-156.

## 第 4 編 総 括 緒 言

ランブル鞭毛虫は 1859 年 Lambl が小児の粘性性下痢便より多数の本虫体を見出して以来, その病原性について幾多の論議がなされ且推測されて来たが, 現在未だその *Giardia lamblia* の培養が不成功であり, 病原性に関する動物実験の不可能な点から確定的な結論が得られなかつた。私は先に第 1 編に於てランブリア症の 2 症例につき記載し臨床的観察及びその治療の問題につき吟味した。その中特に本症の病原性につき若干文献の考察を行い, 且本症例についても検討を加え, 更にその胆嚢内寄生の在否についても本症例を詳に検討した (荒木, 1959)。

本虫の病原性に関し吟味する為には飽くまで本虫の培養が先決であると考え, 本症例の十二指腸ゾンデ法によつて得た胆汁中に純培養様に多数認めた *Giardia lamblia* の栄養型を用いてその純培養を試み, 野崎 (1956) が先に *Giardia lamblia* に近い種類の *Giardia muris* を用いて行つた生存実験より長期に亘つて試験管内に於て生存せしめ得, 且著明な分裂増殖を来さしめたことを第 2 編に於て報告した (荒木, 1959)。この結果は試験

管内に於て今まで見られなかつた分裂増殖像を認め得た事により純培養の可能性を暗示するものであり, ランブリア症の病原性の究明及び治療に対する動物実験並びに免疫反応の可能性を明示するもので, 今後これらの探究に可なりの前進を示すものと信じている。

更にその培養基中に於ける分裂増殖の過程を位相差顕微鏡下で観察し考察を加えた。

又第 3 編に於てはその培養基中で分裂増殖を行い乍ら長期生存する事を利用して, 本症の治療に有効と認めた Chloroquine diphosphate (Resochin) の本虫に対する影響を試験管内にて観察し有効なる裏付けを行つた。

以上 3 編に亘つてランブル鞭毛虫症に於ける未解決の諸問題について実験観察及び検討を加えて来た。ここに再度振返つて本症の病原性の問題並びに病原性究明の可能性, 更にその治療の確立について総括的に文献的考察を加えて論じたいと思う。

### ランブル鞭毛虫症の病原性

本原虫の病原性についての論示は本原虫の純培養を行いその動物感染を可能ならしめ, 此等による一連の動物実験の結果と本症を併わせ論じる事が主道であるが, 本原虫による動物実験の未だ困難な点から決定的な結論を

得る事は出来ない。現在迄その病原性については個々の症例について述べ且考按されて来た処である。即ちその病原性は多くの学者により認められ一部の人々によつて反対されている。此等の病原性を認める根拠として 1) 臨床症状を有する事、2) 治療によりそれらの症状が虫体消失と共に消褪する事に拠つている。

第1編に於て考按した如く卜部 (1951, 1956) の統計でもその寄生の90%が有症状者であり、Véghelyi (1938, 1939, 1940), De Muro (1936) 及び Strong (1943) もその症状を指摘している。又吉田 (1953, 1954) は(1) Gastrointestinal-form(胃腸型)と(2) Cholango-cholecystoform(胆道胆嚢型)の2種の症状に大別している。これに加えて著者 (1959) は成人、殊に女子に来る場合一定の神経症状の発現に留意すべきを特記した。又 Papke (1940) も有症状を認め、Rossier, Daecke (1952) や中村・秋葉 (1955) もそれぞれ有症状に留意している。これ等の報告より 1) 臨床症状を有する事の条件はほぼ満されるものと思われる。先に報告した2症例についても胆嚢炎様症状、即ち右上腹部の疼痛、圧痛及び腹部膨満感、悪心、発熱、頭痛、異和感並びに左上腹部痛を来していることは之等の報告と一致している。

Manson-Bahr (1939), 内藤 (1934), 吉田 (1953, 1954), 卜部 (1951, 1956), 増山 (1956), 鮎子田 (1956) 等は治療を行い、それらの症状が軽快することを報告している点、2) 治療によりそれらの症状が虫体消失と共に消褪する事、の条件をほぼ満すものと思われる。私の経験した症例の治療による症状の推移は虫体の消失と共にやゝ軽快を見ているが、約4週間後に左上腹部腫瘤に激痛及び圧痛を訴え、試験開腹術を行つたもので以上の報告と一致するとの断定はしがたい。

此等より考えて一定数以上の寄生では必ず病原性を發揮するものと考えてよからう。かかる点は培養の成功、動物実験の可能、皮内反応その他の可能性の検討によつて吟味しなければならない事を論示した。

#### ランブル鞭毛虫症に於ける胆嚢寄生の問題

胆道胆嚢寄生の問題については古く内藤 (1934) が記載し吉田 (1953, 1954) もそれを認めている。又 Papke (1940) は katarrhalisch-spastische Form と katarrhalisch-eitriche Form に分け後者は小腸より上行性の胆道胆嚢内寄生による二次的炎症を意味している事を記載した。その他胆嚢内寄生を認めている報告も多いが、胆嚢内に本原虫を証明した例は少なく Chariot, Westphal, Smithies, Calder (1935), 野木 (1952) と数える位しか

ない。私は偶々検査所見より胆嚢寄生を思わしめた一症例について胆嚢剔出を実施し、その内容及び病理組織学的検索を詳に行い第1編に記載した。即ち駆虫後4週間を経て剔出を行つたものであるが、外見上及び胆汁中にも本原虫は認め得ず、病理組織学的観察でも虫体寄生で当然惹起される管の炎症性細胞浸潤、浮腫、血管の変化等は認めなかつた。此等の点から十二指腸ゾンデ採取法による B, C 胆汁中に多数のラ原虫排泄があるからとて、直ちに胆嚢内並びに肝内胆管寄生を取上げる事は早計と考えねばなるまい事を主張した。即ち胆嚢収縮剤としての注入硫苦液による十二指腸の反射的蠕動亢進の為に粘膜面に吸着せる虫体が上皮と共に剝離されて B, C 胆汁中に証明される事の考慮が必要である。此等の考察より胆道及び胆嚢内一過性寄生はあるにしても永続的寄生はないものと考えたい。

#### ランブル鞭毛虫の培養

##### 1. 培養に関する文献的考察

1859年 Lambl によつて発見され、1915年 *Giardia lamblia* Stiles と学名が決定されて以来、臨床例によつてその病原性につき論議されてはいるが、本原虫の培養に関しては殆んどその文献を見ない。その病原性が確立せぬ理由の根源として培養の不可能の点が指摘される。この点について二、三の学者により検討されてはいるが明るい見通しはついていながつた。今振返つて此の培養の問題につき二、三の研究報告から考察を進めたい。

卜部 (1956) はラ原虫の栄養型の感染の可能性についての実験として、Sonde にて採取した胆汁内栄養型の外界に於ける抵抗力即ち外界での生存期間の測定を行つている。その結果は7~5°C で大部分は1~2時間で死滅し、数時間乃至9時間で消失する。13~14°C では2~3時間後で死滅減少し、24時間後には消失する。18~37°C では5~6時間後ではさして減少せず、30時間後迄生存を認めたものもあつた。此等綜合して見ると低温では生存期間が短縮し、常温ではほぼ24~30時間の生存を示している。又37°C の5倍稀釈生理食塩水及び蒸留水中で前者で4時間、後者で6時間で死滅、又10倍稀釈では前者で8時間、後者で12時間で消失している。又著者も外界に於ける抵抗力の実験を行い、第1表に示す如く自然外界に放置したB胆汁中に於て7~23時間で虫体は減少し、51時間後迄生存を認めた。この結果は卜部の実験結果と殆んど一致し、その感染について栄養型の可能性を言及する一つの根拠となりうると共に培養実験への手懸りとなつた。

第1表 採取胆汁中に於けるラ原虫の生存期間

採取後 経過時間	4	7	23	51	72 時間
実験試験室の温度	30°C	30°C	19°C	20°C	18°C
第一組 A-Bouillon	生存	生存	生存	生存	生存
第二組 B-Bouillon	生存	生存	生存	生存	生存
実験試験室の温度	30°C	30°C	16°C	16°C	15°C
第一組 A-Bouillon	生存	生存	生存	生存	生存
第二組 B-Bouillon	生存	生存	生存	生存	生存

生存の保証あり  
 運動の停止

又野崎 (1956) の培養を目的とした培地内の生存についての実験で Balamuth 培地 (1946) 及び浅見 (1952) の Trichomonas 培地を使用して *Gardia muris* の生存を観察している。Balamuth 培地では 6~8 時間で虫体は消失している。浅見の培地で pH 5.0~5.2 とシマウスの尿をもつて Precondition (Jacobs, 1947) して用いたものでは 4 日間に亘り虫体の運動が見られた。此の実験は卜部の外界に於ける抵抗性の実験と比し種類こそ異なるが培地を使用して更にその生存を引延ばし得た結果となつている。

又 Behnke (1931) の実験ではラ原虫栄養型が水又は血清中で 80 時間生存し得ると述べている。

此等の諸実験の如く培養を目的としたものは少なく、栄養型の感染の可能性を実証する為の抵抗性実験であるものが多く、純培養を目的としたものは殆んど見られない現状であり、その培養の困難さを物語っている。私は此の病原性の問題に直面し、純培養の可能性の研究の必要性を痛感し、この問題と取組みやゝみるべき結果を得て之を報告した。

2. 培養に関する新発見

第1編に於てランブル鞭毛虫症の2症例について記載しその病原性を論じた(荒木, 1959)。併し乍ら本原虫の純培養並びに感染実験が困難な事よりその実験的裏付けなく病原性を論ずる事は結論を得がたい。やはり病原性の探究の第一の課題は不可能とされている本原虫の純培養の問題である。この培養の問題こそ病原性の決定につき不可欠の点であると考え、純培養の研究に着手した。即ち先の野崎 (1956) や、卜部 (1956) の実験に試案を得て私は色々の液体培地を工夫試作し、又トリコモナスの培養に使用される浜田 (1953) の V-Bouillon に着眼し、それを応用しその成分、主として豚肝臓エキスの濃度並びに pH を変え、又雑菌繁殖抑制の為に用いた抗生剤の組合せを色々と変えてラ原虫の栄養型の培養を行

つた。即ち此等の培地を L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> 並びに L<sub>5</sub>-Bouillon と名付けて本原虫の培養に使用した。

第2表 培地 L-Bouillon 組成

培地名	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>
豚肝臓	50g	50g	50g	15g	23g
水	100cc	100cc	100cc	100cc	100cc
Polypepton	2.0g				
Cystein HCl	0.2g				
Maltose	1.0g				
NaCl	0.5g				
Serum of Rabbit	15%				
pH	7.2	7.2	6.4	6.4	6.4
抗生剤	Penicillin	Streptomycin	Penicillin	Colimycin	

(L<sub>1</sub>~L<sub>5</sub> 左組成に同じ)

その実験結果を総括すると次の如くである。即ち先づ本原虫寄生の腸管内 pH を考慮してその培地の pH の問題について考察した。培地の pH 7.2 と 6.4 の L<sub>2</sub>-Bouillon と L<sub>3</sub>-Bouillon とでは 6.4 の方がその生存期間がより長く、やゝ酸性に傾く方が却つてラ原虫の生存に有利なる事を実証した。次いでその Bouillon 中の豚肝臓エキスの濃度について検討した。水 100cc に対して豚肝臓 50g, 23g 並びに 15g と三種の Bouillon, L<sub>3</sub>, L<sub>5</sub> 及び L<sub>4</sub>-Bouillon について観察した所、第3表の如く L<sub>4</sub>-Bouillon に於ては確然たる差を以つて 11 日間に亘る著明な躍動, 12 日間に亘る鞭毛運動が認められ、特にその 2~4 日目に於て顕著な分裂増殖像を認めた点、本培養基が増殖生存の可能性を明示し、又継代の可能性が考えられる。12 日間以上の生存については雑菌及び真菌類の混入繁殖の為に更に長期虫体を認め得なかつたものであつて、此等を更に考慮することによりこれ以上の生存も可能ならしめること必定である。この点より L<sub>4</sub>-Bouillon に示す組成が本原虫の生存並びに増殖に至適にして且有利な条件を具備している事を物語るものと推論する。更に培地内使用の抗生剤についても検討した。特に Streptomycin と Colimycin とでは虫体に及ぼす明確な差異はなかつたが、前者 Streptomycin 使用の方が、人体腸管内に生存共棲せる真菌類、即ち Candida 属或は酵母菌類の培養基内混入繁殖をやゝ助長し、ラ原虫の生存に不利な影響を与える様であつた。

その他工夫試作した Polytamin 培地、ラーメル R 培地、両者混合培地、胆汁培地等を使用して同じく原虫の生存能力を観察したが、Polytamin 培地に於て 48 時間迄

第3表 各培地に於ける最高生存日数

培地	培養日数	観察開始日	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	8	24/XI	●	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L <sub>2</sub>	4	24/XI	●	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L <sub>3</sub>	12	12/I 19/I	●	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L <sub>4</sub>	11	12/I 19/I	●	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L <sub>5</sub>	7	19/I	●	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

● 増殖を認められたもの  
■ 生存を推察されたもの  
▨ 鞭毛運動を認められたもの  
■ 著明な分裂増殖を認められたもの

生存を認めた以外は既に24時間にてその運動は認められず、至適な培養基とは云えない。

卜部の実験、野崎の成績と比較して L<sub>4</sub>-Bouillon に於ける培養が遙かに優れていること必定であり、野崎の培地内で4日間しか運動を認めなかつたが、L<sub>4</sub>-Bouillon に於ては12日間に亘つて著明な運動を確認し得た点、これを裏付ける唯一の根拠と云えよう。

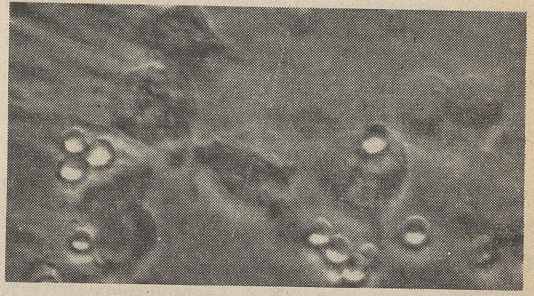
3. 新知見としての分裂増殖像について (第1図)

私は L<sub>4</sub>-Bouillon を使用して12日間の長きに亘つて本原虫の培地内生存を確認し得た事を言及したが、この培地が果して純培養に適した培養基となり得るかの問題がある。即ちこの培地内に於て生存のみならず増殖し得るかその必要条件である。野崎(1956)が先に行つた実験の結果では増殖と云う点は全く満されていない。彼は生存のみを認めたに過ぎない。余の実験結果では第2編にて報告供覧した如く明らかな虫体の分裂増殖の様相を把握し得た事が、今迄の実験よりの特に大なる飛躍と云えよう。

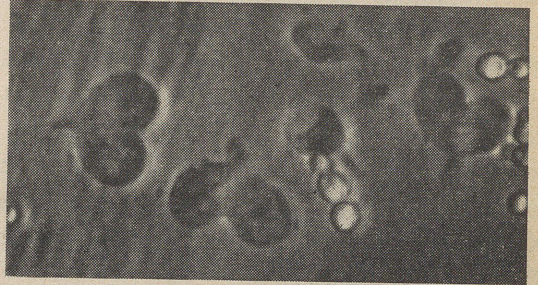
この分裂増殖の様相は、実験に使用した L-Bouillon 即ち L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> 並びに L<sub>5</sub>-Bouillon のすべての培養基内に培養後2乃至4日目に之を確認している(第2編にて報告)。

更にその分裂に関する様相を位相差顕微鏡を用いて追究し、時間の経過と共に二縦分裂を行へることを確認し、その詳細について観察検討した。

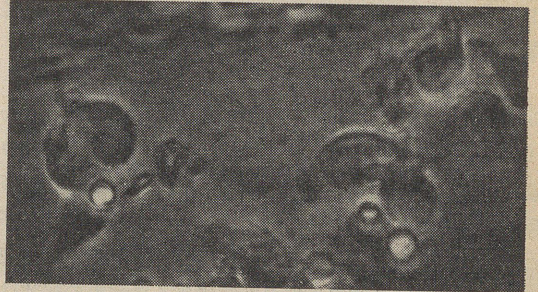
この新知見はラ原虫の培養に関する大なる飛躍であると共に、純培養を可能ならしめ得る新しい事実であり、更に継代培養並びに動物実験の可能性を大ならしめ、今後の本原虫の研究に大いに貢献し得るものと考えている。



やや膨大してくる虫体 分裂増殖像 ×400



中央にくびれを生じ心臓型を呈する虫体



左右が更に大きく切離され、ねぢ切る様な運動をする虫体

第1図 分裂増殖像

Chloroquine のランプル鞭毛虫に対する作用 (in vitro 法)

本原虫について L-Bouillon を用いてほど満足な培養結果を得た。即ち L<sub>4</sub>-Bouillon にて長期生存せしめ得、且著明な分裂増殖の様相を観察し得た事を記載した。私はこの事実を利用して Chloroquine の本原虫に及ぼす影響を観察した。即ち 0.05%、0.15% 及び 0.25% の Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon を作成し、それぞれ培養の場合と同じ方法にて原虫を投入してその運動性並びに生存能力を観察した。その実験結果として対照 L<sub>4</sub>-Bouillon が著明な分裂像及び長期生存を示すに反し、Chloroquine L<sub>4</sub>-Bouillon では何れの濃度の培地にてても著明な生存抑制が

認められ、48時間以上の生存が望めず、分裂像も勿論認められなかつた点、Chloroquineの臨床効果を裏付ける根拠となり得る。

### ランブル鞭毛虫症の治療

ランブル鞭毛虫症に対して多くの報告があり、特にAcrinamin(Atebrin)による治験例の報告が大多数を占めている。その他Chloramphenicolを投与して治療効果を認めた例(今井, 1958), Trichomycinの使用治験例(浅野, 1959)及びTetracyclin系薬剤(Achromycin)にて症状軽快した例(津田, 1958)の報告がある。私の症例についてSulfa剤, Chloramphenicol, Colimycin, Tetracyclin系薬剤(Achromycin)及びTrichomycinを使用して症状及び虫体の消失の状態を観察したが、著効は認められなかつた。そこでChloroquine diphosphate (Resochin)の使用を思い立ち、これによつて虫体の消失を計り得た事を第1編に記述した(荒木, 1959)更にChloroquineの効力を裏付ける為前編にて述べた様に試験管内実験を行つてその効力を確信し得た。

この一連した研究より、Chloroquine使用に対して1日0.75g 3回分服10日間持続内服が最適なる事を論示実証した。

尚Chloroquineの副作用についてはPillsbury & Jacobson (1954), Dubois (1956), Alving (1948), Müller (1959), 石原 (1959), 木村 (1959), 辻 (1958)等の報告があり、胃腸障害や皮膚症状(痒痒症や紅斑性発疹等)、神経症状(耳鳴、耳雑音、眩暈、頭痛)、不眠並びに眼の調節障害や血液像変化(白血球減少特に顆粒細胞の減少)毛髪褪色並脱毛等の記載はあるが此等の症状は可逆的であり、殆んど投薬を中止する必要は認めず、症状強ければ投薬量の減少乃至中止で消失する事を述べている。本剤使用に際して殆んどその副作用は見られなかつた。

### 結 語

以上ランブル鞭毛虫症について特に病原性の問題を上げ、更に胆嚢寄生の問題を詳に検討した。その病原性については臨床所見のみにて結論は得がたく、不可能とされている本原虫栄養型の純培養を思い立ちこれと取組んだ。その結果L-Bouillonにて長期に亘つて試験管内にて生存その躍動するのを認め、特にその培地内に於て顕著な分裂増殖像が観察され、その分裂の様相を追究した。これは明らかに本培地がラ原虫の生存及びその増殖に至適なる事を論示し、純培養及び継代培養ひいては感染実験の可能性に大いに貢献する事を強調した。引続い

て本症の治療について概況を述べ、臨床的並びに基礎的実験を行つてChloroquineが本症に有効なる事を実証した。

本論文の要旨は第26回日本寄生虫学会総会並びに第12回日本寄生虫学会西日本支部大会にて発表した。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜つた岩田繁雄教授、中村逸朗助教授に深甚なる謝意を表します。又研究に際し御助言下さつた本学内科学教室の各位並びに微生物学教室の各位に心より感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 荒木恒治 (1959 a): ランブル鞭毛虫症に関する研究, 第1編ランブル鞭毛虫症の臨床的観察とその治療, 日本内科学会雑誌, 47, 1300-1306.
- 2) 荒木恒治 (1959 b): ランブル鞭毛虫症に関する研究, 第2編ランブル鞭毛虫の培養, 日本内科学会雑誌, 47, 1306-1311.
- 3) 浅野五三男ら (1959): ランブリア性胆嚢炎の1症例, 臨床内科小児科, 14, 191-192.
- 4) Asami, K. (1952): Bacteria-free cultivation of *Trichomonas vaginalis*, *Kitasato Arch. Exper. Med.*, 25, 149-156.
- 5) Alving, A. S. *et al.* (1948): Studies on chronic toxicity of chloroquine (SN-7618), *J. Clin. Invest.*, 27, 60-65.
- 6) Behnke, H. (1931): Der Infekt des Menschen mit *Lambliia intestinalis* seine Klinik und Therapie, *Erg. inn. Med.*, 39, 175-215.
- 7) Balamuth, W. & Hauard, B. (1946): Biological studies on *Endamoeba histolytica*; growth cycle of population in mixed bacterial flora, *Amer. J. Trop. Med.*, 26, 771-782.
- 8) Calder, R. M. & Rigdon, R. H. (1935): Giardia infestation of gallbladder and intestinal tract, *Amer. J. Med. Sc.*, 190, 82-88.
- 9) De Muro, P. (1939): Successful treatment in man with acranil (acridine dye), *Acta med. Scand.*, 102, 17-21.
- 10) De Muro, P. (1939): Clinical aspects, *Acta med. Scand.*, 99, 78-91.
- 11) Daেকে, K. (1952): Lamblien-Infektionen als Ursache unklarer Bauchschmerzen und Hepatopathien bei Kindern, *M Schr. Kinderhk.*, 100, 479-484.
- 12) Dubois, E. L. (1956): Systemic lupus erythematosus: recent advances in its diagnosis and treatment, *Ann. Int. Med.*, 45, 163-184.
- 13) 鮎子田繁雄ら (1956): チャルデア症について(特に収容施設を中心として), 臨床内科小児科, 11, 711-715.
- 14) 浜田義雄 (1953): *Trichomonas vaginalis* の生



- 物学的研究, 第1報 純培養について, 大阪大学医学雑誌, 5, 429-435.
- 15) 今井昭司 (1958): *Lambli*a 性胆嚢炎の1例, 広島医学, 11, 214.
  - 16) 石原 勝 (1959): 抗マラリヤ剤 Chloroquine の諸種皮膚疾患に対する治療効果並びにその作用機序に就て, 日本皮膚科学会雑誌, 69, 132-146.
  - 17) Jacobs, L. (1947): Elimination of viable bacteria from cultures of *Endamoeba histolytica* and subsequent maintenance of such cultures, Amer. J. Hyg., 46, 172-176.
  - 18) 木村郁郎ら (1959): 若菜病に対する新治療法の提唱—磷酸クロロキソ (レゾヒン) 療法を中心として—, 総合臨床, 8, 796-803.
  - 19) Manson-Bahr, P. (1939): The Dysenteric Disorders, London.
  - 20) 増山善明ら (1956): 胆道内に寄生したランブル鞭毛虫症の2症例, 臨床内科小児科, 11, 461-465.
  - 21) Müller, W. (1959): Die Chlorochin-Behandlung der chronischen Polyarthrit, Dtsch. med. Wschr., 84, 1072-1075.
  - 22) 野崎恭勝 (1956): ジアルジアムーリスの培地内における生存について (培養を目的とした一実験), 医療, 10, 401-405.
  - 23) 中村敬三・秋葉朝一郎編 (1955): 細菌学各論 II, 南山堂.
  - 24) 内藤益一 (1934): ランブリア症, 実験消化機病學, 9, 580-592.
  - 25) 野木一雄 (1952): 不幸の転帰をとつたランブリア性胆嚢炎, 総合臨床, 1, 472-473.
  - 26) 根本康子 (1959): Resochin によるランブリア症の一治験例, 今日の医学, 4, 40.
  - 27) Papke, W. (1940): Die Bedeutung der Lamblen für Erkrankungen des Duodenums, der Gallenwege und der Gallenblase, Dtsch. med. Wschr., 66, 629-633.
  - 28) Pillsburg, D. M. & Jacobson, C. (1954): Treatment of chronic discoid lupus erythematosus with chloroquine (Aralen), J. Amer. Med. Ass., 154, 1330-1333.
  - 29) Strong (1943): Stitt's Diagnosis, prevention and treatment of tropical disease, Blakiston.
  - 30) 津田隆治ら (1958): 胆道内寄生 *Lambli*a 症の1例, 日本消化機病学会雑誌, 55, 335.
  - 31) 辻昇三ら (1958): 腎炎の藥物療法—特に Chloroquine 療法に就いて—, 総合臨床, 7, 2343-2351.
  - 32) 卜部 昭ら (1951): 京都地方人体腸管寄生原生類に就いて (第2報): 日本寄生虫学会記事, 20, 85-86.
  - 33) 卜部 昭 (1959): ランブル鞭毛虫 (*Giardia lamblia* Stiles 1915) の病原性に関する研究—主として虫体側条件について—第1篇, 感染者の症状と虫体寄生とに關係, 京都府立医科大学雑誌, 59, 653-661.
  - 34) 卜部 昭 (1956): ランブル鞭毛虫 (*Giardia lamblia* Stiles, 1915) の病原性に関する研究—主として虫体側条件について—第2篇, 病原性に対する虫体側条件の検討, 59, 662-681.
  - 35) Véghelyi, P. (1938): Giardiasis in children, Amer. J. Dis. Child., 56, 1231-1241.
  - 36) Véghelyi, P. (1939): Celiac disease imitated by giardiasis, Amer. J. Dis. Child., 57, 894-899.
  - 37) Véghelyi, P. (1940): Giardiasis, Amer. J. Dis. Child., 59, 793-804.
  - 38) 吉田邦男 (1953): ランブル鞭毛虫感染小児の臨床, 小児科診療, 16, 529-536.
  - 39) 吉田邦男 (1954): ランブル鞭毛虫感染小児の臨床的觀察, 日本小児科学会雑誌, 56, 615.

STUDIES ON GIARDIASIS  
III. ON THE EFFECT OF CHLOROQUINE ON GIARDIA LAMBLIA  
IV. GENERAL SUMMARY

TSUNEJI ARAKI

(Department of Internal Medicine, Osaka Medical College, Takatsuki, Japan)

In a previous paper it was shown that *Giardia lamblia* survived in L<sub>4</sub>-Bouillon medium for a long period of time, and during that period their reproduction and multiplication was recognized. On the basis of this result, in the third report the effect of chloroquine diphosphate on *Giardia lamblia* was studied *in vitro*. *G. lamblia* which was put into L-Bouillon containing 0.05%, 0.15% and 0.25% of chloroquine respectively, died of this chemical and showed no reproduction. This result may be taken to indicate that chloroquine has an curative value clinically. It may be given as a conclusion that a patient of giardiasis should be taken 750 mg of chloroquine three times a day, continued for 10 days.

In the fourth report a general consideration was made on earlier three papers of this series. First of all, the pathogenesis of *G. lamblia* were examined, and then the parasitism in the gall-bladder in detail. Because it is so difficult to reach a conclusion on the problem of pathogenesis from only the clinical point of view, the pure cultivation of vegetative form was conducted *in vitro*. In modified L<sub>4</sub>-Bouillon medium the vegetative form survived actively for a long period of time and showed remarkable reproduction and multiplication. This apparently indicates that this culture medium is best suited for the survival and multiplication of *G. lamblia*. This, moreover, makes a contribution to studying the pure and successive cultivation *in vitro*, the infection experiment and the immune reaction of the parasite. In addition, therapeutics of giardiasis were outlined and the results of clinical and biological experiment indicated that chloroquine has a curative effect on giardiasis.