

大腸バランチジウムに対する各種動物正常血清の為害作用

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5月24日受領)

緒 言

諸動物の正常血清が微生物に対して *in vitro* で障害作用をもつことは、Buchner(1889)による Alexine 作用の発見以来知られた事実である。すなわち生体が微生物に対して生まれながらもつ防衛力として、喰細胞等のほかに Alexine 作用が重要な役割を果たすものであることが判明している。Alexin 作用は後に正常殺菌素(正常抗体)と補体の協力による殺菌系の作用として解釈され、理解されるようになり、この面における自然免疫の機構が漸次明らかにされて来た。一方近年 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、この物質は上記の正常抗体のごとく補体と協力して働き、自然免疫に重要な役割を果たすものであることを明らかにした。しかるに最近 Nelson (1958) は properdin が所謂正常抗体と同じものであるとする仮説を発表し、この両者の異同について論議せられる所となったが、これについての明確な結論は未だ得られていない。

原虫学の領域においても、後に述べるごとく種々の原虫に対する正常血清の *in vitro* の障害作用を認めた諸家の報告が見られる。この障害作用が原虫の種類ないしは血清の動物種によつていかなる差異を示すかは興味ある問題である。このことは、原虫寄生において宿主の防衛力と宿主体内における寄生部位との関係を知るための一つの参考資料ともなる。つまり宿主の血清によつて障害を受けるごとき種類の原虫は口腔、腸管、腔腔に寄生することは可能であつても血液、組織内に寄生することは困難であると考えられる。また一方このような障害が正常血清中のいかなる因子によつて引き起こされるか、言い換えるとこの障害因子が正常抗体の系であるか、properdin の系であるか、あるいは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。この障害因子の本態を追究することは、原虫学の分野における自然免疫の機構を明らかにする上

に重要であり、免疫学的に興味ある課題である。

本研究は、上記の目的で数種動物の正常血清が豚の *Balantidium coli* に対して *in vitro* でいかなる作用をもつかを、またその作用因子の本態を追求したものであり、若干の見るべき成績を得たのでここに報告する。

実験及び結果

実験 1. *Balantidium coli* に対する各種動物正常血清の *in vitro* の作用

各種動物の正常血清の中にそれぞれ *B. coli* を入れて、その虫体像がどのような変化を示すかを追求した。

材料及び方法

被検正常血清：健康な人、牛、馬、豚、羊、兎、モルモット、ラット、マウスから採血して、血清を分離し、採血後15~20時間の新鮮なものを実験に用いた。

虫体像の観察：先ず人血清 0.3 ml を小試験管に入れこれに次に述べる *B. coli* 浮游リンガー液 0.03 ml を加えて、混和する。これを直ちに 37°C の恒温槽に入れて、30分、60分、90分、120分後における虫体像を弱拡大(80倍)で鏡検した。対照血清として、被検血清に用いたと同じ人血清を別の器に入れて 56°C 30分間の加熱によつて非働性としたもの 0.3 ml を置いた。

次に牛、馬、豚、羊、兎、モルモット、ラット、マウスの各血清について上記の人血清におけると同じ方法で実験を行なった。

B. coli 浮游リンガー液：実験に用いた *B. coli* は豚の盲腸内から分離して、滅菌米粉加 Balamuth 培地に継代した株で、その最終継代後24~48時間経過したものである。この培地の底に沈んだ虫体を残して上清を捨てる。次いでリンガー液を加えて混和し、虫体が壊れないように手動遠心沈澱機でしずかに10~15廻転させて虫体を沈め、上清を捨てる。このような洗濯操作を2回反復した後、ごく少量のリンガー液を加えて混和する。加えるリンガー液の量は虫体数が略 5×10^5 /ml になるように適宜加減した。

第1表 正常血清の動物種別による *B. coli* の死虫体数百分率の差異 (実験1.)

検査別	作用時間	人	牛	馬	豚	羊	兎	モルモット	ラット	マウス
		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
	分	%	%	%	%	%	%	%	%	%
被検血清	30	100	100	100	90	100	97	100	100	0
各0.3ml	60	100	100	100	90	100	96	100	100	0
働性	90	100	100	100	86	100	97	100	100	1
	120	100	100	100	68	100	96	100	100	0
対照	30	0	2	0	0	0	0	0	0	0
各0.3ml	60	4	0	0	0	0	2	2	2	0
加熱	90	2	2	0	2	2	2	3	2	0
非働性	120	2	0	0	0	2	1	1	0	0

結果 実験の結果、人、牛、馬、豚、羊、兎、モルモット、ラットの各血清は *B. coli* の虫体を殺す作用をもち、虫体は運動障害、変形、溶解の像を示して死亡することが分かった。すなわち虫体の運動は不活潑になり、あるものは虫体が崩壊し、原形質が融出して運動が全く停止し、あるものは崩壊せずに運動が全く停止する像が観察された。またこのような変化の過程において虫体が丸く変形、または虫体の一部が膨隆するものも見られた。これらの虫体像は血清の動物種によつて特別な差異は認められなかつた。一方マウス血清は虫体を殺す作用がなく、虫体の形態、運動に対して全く影響が認められなかつた。各血清について任意の虫体50個または100個を数え、この中で運動が全く停止して死亡したと思われる虫体数の百分率を算出したものを第1表に示した。死虫体の出現は比較的早く、この表には示さなかつたが15分前後でほぼ完了する。その完了後は虫体像に変化は見られないが、表の豚血清におけるごとく、虫体の運動が全く停止して死亡したと思われる虫体の中にも一部には時間の経過と共にその運動が回復してくるものも認められた。一方、対照の非働性血清では被検血清におけるごとく現象は全く認められなかつた。従つてこのような現象は正常血清中の易熱因子に基づくことが分かり、マウス血清中にはこの易熱因子が欠けていることが分かる。

実験2. *B. coli* 殺滅作用をもつ数種動物正常血清の各種濃度による *in vitro* の作用のちがひについて

前実験で人、牛、馬、豚、羊、兎、モルモット、ラットの各血清が *B. coli* を殺す作用をもつことが判つた。次にこれらの血清をリンガー液で稀釈し、何倍稀釈までこのような作用が見られるかを追求した。

材料及び方法 この実験に用いた牛、馬、豚、羊の各血清は前実験に用いたと同じものであり、その他は別の

第2表 人正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動 (実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml					対照 各0.3ml	
	人働性血清のリンガー液稀釈系					人加熱非働性血清	
	1:1	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1	リンガー液
分	%	%	%	%	%	%	%
15	94	81	3	0	0	0	0
30	100	98	3	2	0	1	0
45	100	99	5	6	3	1	2
60	100	98	2	4	1	2	0
90	100	100	3	3	1	0	3
120	100	100	6	3	2	0	99

血清を用いた。方法は次のごとくである。

第2表に見られるように人血清の原液、並びにリンガー液で2倍階段に稀釈したもの0.3ml あてを5本の小試験管に入れ、以下前実験と全く同じ操作により実験を行なつた。血清対照は前実験におけるものと同様である。このほかにリンガー液対照として、被検血清の稀釈に用いたと同じリンガー液0.3ml を置いた。

次に牛、馬、豚、羊、兎、モルモット、ラットの各血清について上記の人血清におけると同様の実験を行なつた。

結果 結果は第2~9表に示した。表で見ると各血清が *B. coli* を殺すことの出来る濃度の限界は、その血清の動物種によつて多少の差異が見られるが、大体1:2ないし1:8稀釈までの比較的高濃度であることが分かつた。なお第3,7,9表に見られるように、作用の現われる限界の濃度において作用の開始ないし完了の遅れが認められるものもある。

実験3. zymosan 処理を行なつた人正常血清の *B. coli* に対する *in vitro* の作用

前実験で、*B. coli* を殺す作用をもつ正常血清中の因子が易熱性の物質であることを知つた。この易熱物質

第3表 牛正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動(実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml 牛働性血清の リンガー液稀釈系					対照 各0.3ml 牛加熱非 働性血清		リンガ ー液
	1:1	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1		
分	%	%	%	%	%	%	%	%
15	100	100	36	0	0	0	0	0
30	100	100	84	10	8	8	8	8
60	100	100	90	10	10	10	8	8
90	100	100	92	12	16	12	12	12
120	100	100	80	16	16	10	36	36

第4表 馬正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動(実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml 馬働性血清の リンガー液稀釈系					対照 各0.3ml 馬加熱非 働性血清		リンガ ー液
	1:1	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1		
分	%	%	%	%	%	%	%	%
15	98	100	2	0	2	0	0	0
30	100	98	4	4	6	10	8	8
60	100	98	4	12	12	10	8	8
90	100	100	12	12	14	12	12	12
120	100	100	10	22	36	10	36	36

第5表 豚正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動(実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml 豚働性血清の リンガー液稀釈系					対照 各0.3ml 豚加熱非 働性血清		リンガ ー液
	1:1	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1		
分	%	%	%	%	%	%	%	%
15	98	6	4	6	0	2	0	0
30	96	32	10	8	8	8	8	8
60	100	20	12	14	8	14	8	8
90	100	20	20	22	25	18	12	12
120	100	18	40	14	42	40	36	36

第6表 羊正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動(実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml 羊働性血清の リンガー液稀釈系					対照 各0.3ml 羊加熱非 働性血清		リンガ ー液
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:1		
分	%	%	%	%	%	%	%	%
15	100	82	0	0	0	0	0	0
30	100	84	0	2	0	0	0	0
45	100	86	2	0	2	0	0	0
60	100	82	0	0	2	0	2	2
90	100	90	0	0	4	2	4	4
120	100	92	4	4	4	2	6	6

第7表 兎正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動(実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml 兎働性血清の リンガー液稀釈系					対照 各0.3ml 兎加熱非 働性血清		リンガ ー液
	1:1	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1		
分	%	%	%	%	%	%	%	%
15	100	51	2	0	0	0	0	0
30	100	57	0	0	0	1	0	0
45	100	72	3	2	0	2	2	2
60	100	80	2	1	0	2	0	0
90	100	96	3	4	2	4	3	3
120	100	95	4	2	1	1	99	99

第8表 モルモット正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動(実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml モルモット働性血清の リンガー液稀釈系					対照 各0.3ml モルモット加熱非 働性血清		リンガ ー液
	1:1	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1		
分	%	%	%	%	%	%	%	%
15	100	77	0	0	1	1	1	1
30	100	86	2	1	2	1	1	1
45	100	94	2	2	1	1	5	5
60	100	95	2	2	1	1	3	3
90	100	96	2	3	4	1	2	2
120	100	98	5	7	2	1	5	5

第9表 ラット正常血清の濃度差による *B. coli* の死虫体数百分率の変動(実験2.)

作用時間	被検血清 各0.3ml ラット働性血清の リンガー液稀釈系					対照 各0.3ml ラット加熱非働 性血清		リンガ ー液
	1:1	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1		
分	%	%	%	%	%	%	%	%
15	100	100	0	0	0	1	0	0
30	100	100	3	1	2	2	1	1
45	100	100	3	2	2	1	1	1
60	100	100	47	3	2	4	4	4
90	100	100	45	3	2	3	3	3
120	100	100	66	4	3	8	7	7

として properdin が関与していないかという点について次に追究した. すなわち人血清に zymosan 処理を行なつて properdin を除いたものに上記の *B. coli* 殺滅作用が認められるか否かを検討した.

properdin は補体と Mg イオンの存在下で zymosan と結合し properdin-zymosan 結合物となるので, zymosan を用いれば血清からこれを除くことが出来る. この結合が進む上には 10°C 以上の温度が必要であり, 完全とす

第10表 人正常血清の zymosan 処理による *B. coli* の死虫体数百分率の変動 (実験3)

作用時間	被検血清 各 0.3 ml		対 照 各 0.3 ml	
	zymosan 処 理			
	zymosan 原末 + 生理食塩水 + 人血清	zymosan 原末 + 生理食塩水 + 人血清	zymosan 原末 + 生理食塩水 + 人血清	生理食塩水 + 人血清
	17±1°C 75分 37±1°C 20分	17±1°C 74分 0~5°C 20分	10±1°C 95分	37±1°C 95分
	zymosan 二次処理 人血清 1:1	zymosan 一次処理 人血清 1:1	zymosan 処理対照 人血清 1:1	zymosan 無処理 人血清 1:1
分	%	%	%	%
15	0	60	98	98
30	0	76	98	100
45	0	72	96	100
60	2	74	98	100

るには 15°C 以上でなければならぬ。また 20°C 以上では補体の C'3 に働きこれを不活化することも知られているので、血清に zymosan を加え温度を操作することによって properdin の減量、properdin の除去と補体の不活化等を適当に行ない得るわけである。すなわち 15~18°C の温度処理により大部分の properdin を除くことを第1次処理 (single treatment) と呼び、これでもなお残った properdin を引続き 37°C の温度で除くことを第2次処理 (second treatment) という。第2次処理を終わったものでは properdin は完全に失われるが、この処理によってもなお補体成分の不活化される割合は僅少であり、補体としての作用は活性に保たれる。従つてこれらの様に種々に操作した血清を用いれば作用因子が血清の何れの因子にあるかを知り得るわけである。

材料及び方法 人血清の zymosan 処理の方法は次に述べるごとく Pillemer *et al.* (1954, 1956) の原法に従つた。この zymosan 処理血清を被検血清として、以下前実験と同じ方法で実験を進めた。

zymosan 処理: zymosan 処理の操作は 25~30°C の室温において行なつた。zymosan は Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland, Ohio) の製品を用いた。第10表に見られるごとく、小試験管4本を用意し、生理食塩水 0.16 ml あてを3本の小試験管に分注し、これに zymosan 2 mg あてを入れてよく混和浮游させ、人血清 2/3 ml あてを加えて、綿栓し、その作用を抑えるために一旦 0~5°C に冷却する。次いで第1管 (zymosan 二次処理) は氷水浴で 17±1°C に 20 分間保つた後、引

続き恒温槽で 37±1°C に 20 分間保つ。第2管 (zymosan 一次処理) は先ず第1管と同じく氷水浴で 17±1°C に 75 分間保つた後、引続き 0~5°C に 20 分間冷蔵する。第3管 (zymosan 処理対照) は氷水浴で 10±1°C に 95 分間保つ。第4管 (zymosan 無処理) は上記の各管に用いたと同じ人血清 0.3 ml に、zymosan を浮游させるのに用いたと同じ生理食塩水 0.03 ml を混和したものを第1管の後処理温度と同じ 37±1°C に 95 分間保つ。以上の温度処理の間において、zymosan は沈澱するので時々各管を振つて浮游させる。所定の時間作用させた後、zymosan の作用を止めるために各管とも直ちに 0~5°C の温度に下げる。次いで第1, 2, 3管の内容を3本のスピッツグラスにそれぞれ手早く移して、氷水で冷却しつゝ 3,000 r.p.m. 15 分間遠心沈澱して血清に浮游した zymosan を管底に沈め、上清の血清だけを別の3本の小試験管にそれぞれ 0.3 ml あて手早く移す。

次に第11表に見られるように上記の zymosan 処理における zymosan 原末と生理食塩水の代わりに、次に述べるごとく zymosan 浮游液を用いて上記と同じ操作で zymosan 処理を行なつた。

zymosan 浮游液: zymosan 50 mg を生理食塩水 5 ml に浮かべて、ホモゲナイザーで均一となす。これを試験管に移して、重湯煎で 30~60 分間加温の後、とり出して冷却する。次いで 3,000 r.p.m. 15 分間遠心沈澱して zymosan を沈め、上清を捨てる。以上のごとく洗滌処理を行なつて沈澱となつた zymosan に、次に述べるバルビタール緩衝液 (または生理食塩水) 4 ml を加えて浮游

第11表 人正常血清の zymosan 処理による *B. coli* の死虫体数百分率の変動 (実験3)

作用時間	被検血清 各 0.3 ml		対 照 各 0.3 ml	
	zymosan 処 理			
	洗滌 zymosan + バルビタール緩衝液 + 人 血 清	洗滌 zymosan + バルビタール緩衝液 + 人 血 清	洗滌 zymosan + バルビタール緩衝液 + 人 血 清	洗滌 zymosan + バルビタール緩衝液 + 人 血 清
	17±1°C 75分 37±1°C 20分	17±1°C 75分 0~5°C 20分	10±1°C 95分	37±1°C 95分
	zymosan 二次処理 人 血 清 1:1	zymosan 一次処理 人 血 清 1:1	zymosan 処理対照 人 血 清 1:1	zymosan 無処理 人 血 清 1:1
分	%	%	%	%
15	0	40	98	100
30	2	68	98	100
45	0	80	98	100
60	2	68	100	100

させる。

バルビタール緩衝液：下記処方ものを 2l 入りのメスコルベンに入れて、熱した蒸留水約 1,500 ml を加えて重湯煎にて溶解させた後、冷却する。次いで更に蒸留水を加えて全量 2,000 ml となす。この濃厚溶液（またはこれを 0~5°C に冷蔵したもの）を、使用に際して更に蒸留水を加えて 1:4 に稀釈する。

処方：NaCl 85.0 g
 バルビタール 5.75 g
 溶性バルビタール 3.75 g
 mMgCl₂ (MgCl₂ · 6H₂O) 5.0 g (10.6 g)
 mCaCl₂ (CaCl₂ · 2H₂O) 1.5 g (1.9 g)

結果 実験の結果は第 10, 11 表に示した。表に見られる通り、zymosan 二次処理血清は *B. coli* を殺す作用が全くなく、zymosan 一次処理血清はこの作用がかなり弱い。一方対照血清においては前実験の被検血清と同じくこの作用が見られた。つまり人正常血清は zymosan 処理によって properdin を除くと *B. coli* を殺す作用能を失うことが分かった。従つて人正常血清の *B. coli* 殺滅作用において properdin は不可欠の因子である。言い換えると本作用因子の本態は properdin の系であるとみなされる。なお zymosan を原木のまま生理食塩水に浮游させて用いた場合と（第 10 表）、洗滌処理をしたものをバルビタール緩衝液に浮游させて用いた場合とで（第 11 表）、結果は表に見られるように差異は認められなかった。

〔補遺〕 原虫に対する正常血清の作用因子として、

properdin の系のほかに正常抗体の系も存在すると考えられる。この正常抗体系が *B. coli* に対して何らかの障害力をもつかを追求するために次のごとき実験を試みた。

人の正常血清を 56°C 30 分間の加熱により非働性とするることによつて properdin は不活性となるが、正常抗体は活性に保たれる。この非働性血清 0.15 ml に、補体として生理食塩水で 1:10 稀釈したモルモット血清 0.15 ml を添加して再働化したものを被検血清として、これに *B. coli* 浮游液 0.03 ml を加えて、37°C で虫体像を追求してみた。その結果、何らの障害作用も認められなかつた。また、添加する補体としてモルモット血清の代わりに人血清を同じく 1:10 稀釈したものを用いても結果は同じことであつた。

総括及び考察

諸動物の正常血清中に易熱性の殺菌因子のあることは Buchner (1889) によつて古くに発見されており、これを彼は Alexine と名付けたが、その後類似のものとして正常抗体、補体等が見出され、最近 Pillemer *et al.* (1954) により properdin という上の諸因子と相似した作用をもつ因子が発見されている。properdin は補体及び Mg イオンの共在下で非特異的に殺菌、ビールス中和、溶血等の諸作用を現わすものである。またこれと温度との関係及び精製品を用いての補体構成成分の分析等の研究により、上記の Alexine 作用の本態は主に properdin と補体との協同作用であることも知られている。この解釈から Buchner (1889b) の動物種によつて血清中に Alexine 作

用を欠くものがあるという実験を考察すると、補体系がその種の動物では不完全であるためとみることが出来るよう (Hegedüs & Greiner, 1938; Rice & Crowson, 1950).

properdin は、酵母の細胞膜から抽出される zymosan と結合する性質を有しているためにこれを利用して properdin の血清からの除去や分離が可能である。その結果分かった性質としては人の精製 properdin は巨大分子状オイグロブリンであり、66°C, 30 分間加温では安定であるが、血清中では 56°C, 30 分処理で不活性となるものであるという。つまり一面では、或種の抗体 (Pillemer *et al.* 1954) に、一面では補体に似ている。この点から Wedgwood & Pillemer (1958) は properdin を特殊な型の抗体と呼んでいるのであろう。

また、一つの特異な免疫反応としてのトキソプラズマ症のための Sabin-Feldman 試験に関与する accessory factor という補体様因子は Grönroos (1955) によると properdin と補体成分の C'2, C'3, C'4 とからなる物質とみなされている。

また一方所謂正常抗体と properdin との異同に関しても近年目新しい論議がある。Nelson (1958) は zymosan を利用した詳細な実験によつて、Pillemer *et al.* の示した properdin 作用は結局従来の古典的な考えによる正常抗体作用として説明され得るものであるとしているが、この考え方も全ての点で理解出来るものではない。properdin は抗体と補体との中間的存在であり、これが産生される場所は正常抗体や免疫抗体のそれと異なるものと考えるのが妥当であろうと思われる。

なお補体の協力を必要としない耐熱性の殺菌物質も二三知られているが、このものは自然免疫の因子としてはあまり大きな役割を果すものではないと考えられている。

以上は *in vitro* での一般的な寄生微生物に対する正常血清中の作用因子であるが、原虫類に対する同様の作用も種々の実験報告がある。

Trypanosoma 類について Laveran & Mesnil (1902), Goebel (1907) は人血清には *in vitro* では家畜の *T. brucei* に対して殺トリパノソマ作用が認められないと発表し、斉藤 (1927) は馬の *T. equiperdum* が人血清により少しく障害される事実を見ている。York *et al.* (1929, 1930) は人の血清が人の *T. gambiense* は殺さぬが、人の *T. rhodesiense* や馬の *T. equiperdum* や家畜の *T. congolense* を殺すことを報告している。また Levaditi & Sevin (1905) は鳥の *Trypanosoma* に対する哺乳動

物血清の作用をみて、動物種により差異のあることを見ている。一方 Adams (1931) は諸種動物血清が *T. gambiense*, *T. rhodesiense* の消化管型のものを殺すが、唾液腺型のものでは同じ作用が認められないと報告している。Taliaferro によると Laveran & Mesnil (1909) は *T. evansi* に対する血清の自然免疫の点から血清を 3 群に分け、それらの血清に温度処理を行なつた結果を観察している。同様のことを小川 (1916) は *T. lewisi* 及び *T. cruzi* についてイモリ、蛙、鰻の血清で、斉藤 (1927) は *T. gambiense*, *T. equiperdum* について蛙、鰻、山羊、牛、馬、兎、モルモット、鶏、鳩等の血清で実験し、温血、冷血両種の血清によつてトリパノソマに対する態度に明らかな差のあることを見ている。小野 (1937 a) も温血冷血両動物寄生トリパノソマに種々の冷血温血動物血清を作用させ、虫体の崩壊が動物種及び温度操作により異なることをみている。

Trypanoplasma に対して各種の血清が凝塊作用を有しているが、この点については Schindera (1922) の温度処理の影響に関する発表がある。

馬場 (1957) は *Trichomonas vaginalis*, *T. gallinae*, *T. foetus* の 3 種についてモルモット血清の 1:4~1:64 稀釈までは溶解及び運動阻止作用を受けることを観察しており、登倉 (1935) も *T. hominis* について少しく観察している。

また赤痢アメーバもラッテ血清によつて軽度の障害を受けるといふ (Menendez, 1932)。

自由生活性のゾウリムシ (*Paramecium*) に対する諸種動物血清の作用については Rössle (1905), Takenouchi (1918), Masugi (1927) 等々の実験があり、運動停止から虫体の崩壊に至る種々の反応が起り、これは 55~56°C 加温処理によつて消失する性質のものであることを認めている。その他 Bodo に対する兎、モルモット血清の溶解作用については Robertson (1934) の発表があるし、*Galucoma* に対するモルモット血清の麻痺作用については Rössle (1905) の報告がみられる。

以上の諸報告を総括してみると、正常血清の障害作用による虫体像には原虫ないしは血清の種類によつてかなりの変化が見られるが、その本質はいずれも殺原虫作用として説明のつくものとみなされる。また *Tripanosoma* のごとく血液・組織に寄生する原虫は血清の障害作用に対する耐性が比較的強いのであるが、これに反して *Trichomonas* のごとく腸管、腔腔に寄生する原虫の血清耐性が弱いという成績は、原虫の血清耐性が寄生部

位と多少の関係をもつことを示すものとして注目される。同様な意味合いで *Paramecium*, *Bodo*, *Glaucoma* のごとく非寄生性の原虫の血清耐性が弱い点も理解出来る。なお赤痢アメーバは人の腸壁に寄生し、血行その他の径路を介して肝臓内に到達して膿瘍を形成し得ることが知られている。このような原虫はその宿主である人の血清に対してかなりの耐性を得ていると考えられる。原虫の種類による以上のごとき血清耐性の差異は、寄生性の原虫が自由生活性の原虫から変化して来た過程において宿主の体内での生活に適應するために宿主の血清の障害作用に馴れて耐性を獲得して来たことを示すものであろう。

以上の報告から *in vitro* での正常血清中の殺原虫因子について考察すると次のごとくになる。

Adams(1931)は血清の物理化学的処理による補体の不活化によつて殺トリパノソマ作用が失われることから殺トリパノソマ物質を補体とみなし、一方 Culbertson & Strong(1935)は血清の菌体吸着並びに各種物理化学的処理に対する態度から殺トリパノソマ物質はおそらく殺菌系因子と類似した正常抗体であろうという。また鳥の *Trypanosoma* を用いた小野(1937 a, b)の実験で、小野は虫体溶解作用は正常抗体(Trypanolysin)と補体との協働に基づくものであるといっている。なお山口(1956)は Cohn の方法による人血清の精細な分画を行ない、Fract. IV-1 に殺トリパノソマ作用が認められると報告している。これらの諸報告について検討してみると殺トリパノソマ物質は properdin の系か正常抗体の系のいずれかであろう。

Paramecium を用いた Takenouchi(1918)はその作用を正常抗体と補体との協働作用としているが、一方 Masugi(1929)はこれを否定し補体単独の作用としている。その根拠として、麻痺作用復活に対して補体量が充分量を上廻る程大量に必要であること及び補体作用の強いモルモット血清において麻痺作用が強い点を挙げている。しかしながらこの両者の実験結果上の差異を検討してみると温度処理による properdin の不活性化の度合いの差が原因している様である。

Trypanoplasma を用いた Schindera(1922)の実験では凝塊反応因子はおそらく正常抗体単独のものであろう。

以上に紹介し考察したことを基本として私の本実験結果について考按を加えると次のごとくになる。

(1) 正常血清の *B. coli* 殺滅作用について

B. coli は人、牛、馬、豚、羊、兎、モルモット、ラットの各新鮮正常血清によつて *in vitro* で非特異的に殺されることが分かった(実験1)。この *B. coli* 殺滅作用について次の諸点を検討してみる。

虫体像：*B. coli* は正常血清の作用により運動障害、変形、溶解の三型の像を現わして死亡する。この三型の像は単独または混合して現われる。また一部には虫体の運動が全く停止して死亡したと思われる状態から時間の経過と共に運動が回復して来るとき変化も認められた(第1表)。このような変化は Masugi が *Paramecium* において観察した一過性麻痺に相当するものであろう。この一過性運動麻痺をも含めた4型の像は作用因子の強さと虫体の抵抗力との差異に基づく変化を示すものと考えられる。

B. coli が properdin と補体の協働作用により溶解する機序については明らかでないが、おそらく細菌、血球におけると同じことと考えられる。守山は殺菌、溶血作用における補体の作用を次のごとく説明している。補体はグロブリンのビールズ様の重合体であるからその構造影響力はビールズの様に大きいと考えられ、補体が抗体の力をかりて細菌、血球に結合すると、その蛋白重合体から出る強大な力によつてこれらの細胞の原形質の構造に著しい伝染性の動揺を与えるので血球や或種の細菌は溶け、溶けにくい細菌では溶菌なしに死滅することもあるという。

被検正常血清：豚には *B. coli* の自然感染がしばしば見られるので、本実験で正常血清として用いた豚血清が、*B. coli* に対する特異抗体をもつた免疫血清でないことを証明する必要がある。これを実験的に追究することは省略したが、次の点から見てこの豚血清は正常血清とみなし得ると考えられる。すなわち第1及び5表に見られるごとく、豚血清における作用の完了が比較的短時間である点と、また作用の強さが他の動物血清とはほぼ同様で特に免疫抗体の存在を思わせるような作用の増強が見られない点とである。

作用時間：人血清による *B. coli* 殺滅作用は 37°C においては10分ごろから現われ始めて20分ごろに完了する。すなわち15分前後である(第2~9表)。しかし稀釈した血清においては作用の開始ないし完了が遅れるものも見られた(第3, 7, 9表)。これは血清の稀釈によつてその作用因子の力が量的に弱くなるためと考えられる。

作用温度：リンガー液に浮遊させた *B. coli* が、各温度に対していかなる態度を示すかをみた結果は次のご

とくである。45°C以上ではすべての虫体が死亡する。2°C以下では大部分の虫体が死亡し、正常血清の作用におけると同じく溶解する像も一部に認められた。従つて *B. coli* が比較的温度的影響を受けないと考えられる。5-42°Cの範囲において人血清に対していかなる作用を受けるかを追求してみた。その結果、この範囲の温度ではいずれも *B. coli* 殺滅作用が陽性に現われることを確かめた。つまり本作用は室温において現われ得ることが分かる。この点、同じく properdin の系による殺菌作用が 15°C以上において現われる (Pillemer *et al.*, 1956) のと趣を異にする。ただし低温においては作用の開始ないし完了が遅れる傾向が見られ、例えば 10°C では開始が 40 分ごろ、完了が 50 分ごろとなる。すなわち 45 分前後であり、37°C における場合のほぼ 3 倍の遅れが見られた。

(2) 正常血清における *B. coli* 殺滅作用の因子について

正常血清における *B. coli* 殺菌作用の因子として properdin が必要であることが分かった(実験 3.)。properdin が働くためには補体の協力が必要であるから、本作用はこの両因子が協同して虫体に作用するものとみなされる。この点について次に検討を加えてみる。

properdin: 実験 3. で、zymosan 二次処理血清は *B. coli* を殺す作用能を失い、一次処理血清は作用能の低下が認められた(第 10, 11 表)。一次処理血清は先に述べたごとく properdin は減少しているが、補体は活性に保たれているとみなしてよい。従つて一次処理血清における作用能の低下は properdin が減少したためであつて、補体が不活性になつたためではないと判断される。言い換えると properdin は本作用の因子として不可欠であることが分かる。このように考えると、zymosan 処理血清の補体が活性に保たれているかを検べるための溶血系による後試験は必要がないので省略した。

リンガー液によつて稀釈した正常血清において *B. coli* 殺滅作用が陽性に現われる濃度の限界は、血清の動物種によつて大差がなく、1:2 ないし 1:8 稀釈までの比較的高濃度である(第 2-9 表)。この限界は血清の補体価よりはむしろ properdin 量によつて規定せられている面が強いと思われる。

正常抗体: 実験(3)の附属として行なつた正常抗体系の反応についての実験によつて、正常血清における *B. coli* 殺滅作用の因子は properdin の系だけであることが分り、正常抗体の系は本作用の因子としては全く関与

しないとみなされる。

補体: マウス血清は *B. coli* に対する障害力をもたないことが分つた(実験 1, 第 1 表)。その理由について考察してみると次のごとくになる。マウス血清には properdin は十分に含まれている (Pillemer *et al.* 1954)。一方マウス血清は *in vitro* で溶血系補体作用、殺菌作用等を欠除しており、その原因は補体成分の欠損 (Ritz, 1911; Brown, 1943; Muschel & Muto, 1956) ないしは採血操作による抗補体過程 (Rosenthal, 1913; 川島, 1957) にあるとみられている。つまりマウス血清が *B. coli* に対して障害力をもたないのは補体の作用が不完全なためか、その成分が欠けているためとみられる。この点を確かめるためにマウス血清に他種動物の補体を添加したものを被検血清として *B. coli* に対する作用を追求した。その結果は上記の考えが正しいことを認めることが出来、それと共に本作用において補体も properdin との協力因子として不可欠の因子であることが分つた。その詳細については後の報告にゆずる。

牛、馬、羊の血清についても溶血系補体作用の欠除ないしはそれに近い成績が得られており (Hdgedüs & Greiner 1938; Rice & Crowson 1950)、これらの血清は *B. coli* に対して障害力をもたないと予想したが、実験の結果はいずれもこの予想に反した。この点、先に述べた Buchner (1889 b) の動物種によつて血清中に Alexine 作用を欠くものがあるという実験結果と趣を異にする。しかしながら私が本実験に用いた牛、馬、羊の補体成分の保有状況が上記諸家の報告のものと果して一致しているかは明らかでない。また仮に一致していても、*B. coli* 殺滅作用で properdin との協力因子として必要な補体成分が、properdin 系の殺菌作用 (Wardlaw & Pillemer, 1956) におけるごとく C₁, C₂, C₃, C₄ の 4 成分すべてであるかは分からない。これらの諸点はなお追究を要する問題である。

(3) 他種原虫における正常血清の *in vitro* の障害作用との比較

B. coli は人、豚の腸管に寄生する原虫であり、その血清耐性は口腔、腸管、腹腔に寄生する *Trichomonas* や自由生活性の *Paramecium*, *Bodo*, *Glaucoma* 等と同じく弱いものであることが分つた。この点は血液・組織に寄生する *Trypanosoma* における血清耐性が比較的強いのと相違する所である。

B. coli 以外の原虫における正常血清の障害作用がやはり properdin の系に基づくものか、あるいは原虫の種

類によつて正常抗体の系に基づくものもあるのか、この点いまだ明確でない。properdin の系が原虫学の分野で自然免疫の因子としての役割をもつ範囲に関しては将来の研究を俟つて解明されよう。

結 論

数種動物の新鮮正常血清が *Balantidium coli* (培養虫体) に対して *in vitro* でいかなる作用をもつかを、またその作用因子の本態を追求した結果を要約すると次のごとくになる。

(1) 人、牛、馬、豚、羊、兎、モルモット、ラットの各血清は室温において *B. coli* を殺す作用をもち、各血清を 56°C 30 分間の加熱により非働性としたものはこの作用を失う。本作用は各血清のリンガー液による 1:2 ないし 1:8 稀釈までに認められる。本作用は、*B. coli* が血清の障害作用に対してきわめて弱い耐性をもち、宿主の血液・組織内においては生存し得ないことを示すものとみなされる。

(2) 上記の *B. coli* 殺滅作用には血清中に自然免疫の因子として存在する properdin が関与しており、この作用において *B. coli* を殺す因子は properdin の系であるとみなされる。なお正常抗体の系は本作用に関与しない。

(3) マウス血清には *B. coli* に対する障害作用が認められない。これはマウス血清の補体が不完全なためとみなされる。

(4) 原虫学の分野における自然免疫の機構が properdin 系だけによつて形成されているのか、他に正常抗体系等も関与しているのか、この点明確でなく将来の検討に待つ。

なお原虫学の領域における正常血清の *in vitro* の作用について考察すると共に properdin の本質についても若干考察した。

稿を終るに臨み、御指導御校閲下さった松林久吉教授並びに浅見敬三助教授に深く感謝する。また伝染病研究所の山本正助教授並びに当医学部細菌学教室の齊藤和久講師の御助言に感謝する。

本論文の要旨は第 19 回日本寄生虫学会東日本支部大会において発表した。

文 献

1) Adams, A. R. D. (1931): The action of various sera, *in vitro*, on the gut and salivary gland forms of *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Ann. Trop. Med.*, 25, 299-311.

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, 昭 32.

3) Brown, G. C. (1943): The complementary activity of mouse-serum. *J. Immunol.*, 46, 319-323.

4) Buchner, H. (1889 a): Ueber die bakterientödtende Wirkung des zellenfreien Blutserums. *Cbl. Bakt.*, 5, 817-823.

5) Buchner, H. (1889 b): Ueber die bakterientödtende Wirkung des zellenfreien Blutserums. *Cbl. Bakt.*, 6, 1-11.

6) Culbertson, J. T. & Strong, P. S. (1935): The trypanocidal action of normal human serum. The nature of the substance responsible for the trypanocidal effect and its relationship with the bactericidal activity of normal human serum. *Amer. J. Hyg.*, 21, 1-17.

7) Goebel, O. (1907): Pouvoir préventif et pouvoir curatif du sérum humain dans l'infection due au Trypanosome du Nagana. *Ann. Inst. Pasteur*, 21, 882-910.

8) Grönroos, P. (1955): The action of properdin on *Toxoplasma gondii*. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 33, 310-315.

9) Hegedüs, A. & Greiner, H. (1938): Quantitative Bestimmung der Komplementbestandteile. *Zschr. Immunit. forsch.*, 92, 1-9.

10) 川島荘平 (1957): マウス血清の補体に関する研究 (第 4 報), 補体成分に就いての検討, *日大医学雑誌*, 16(2), 375-383, 昭 32.

11) Laveran, A. & Mesnil, F. (1902): Recherches sur le traitement et la prévention du Nagana. *Ann. Inst. Pasteur*, 16, 785-817.

12) Laveran, A. & Mesnil, F. (1909): *Taliaferro, W. H.*: The immunology of parasitic infections. 1929, The century Co., New York, London による。

13) Levaditi & Sevin (1905): L'influence des sérums normaux des mammifères et des oïdées sur le *Trypanosoma pādāe*. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 48, 694-695.

14) Masugi, M. (1927): Über die Wirkung des normal-sowie des spezifischen Immunsérum auf die Paramāzīen. Über die Immunität derselben gegen die beiden Serumwirkungen. *Krkh. forschung*, 5, 375-402.

15) Menendez, P. E. (1932): Serological relationships of *Entamoeba histolytica*. *Amer. J. Hyg.*, 15, 785-808.

16) 守山英雄: 免疫及び免疫反応, 第 1 版, 医学書院, 1958.

17) Muschel, L. H. & Muto, T. (1956): Bactericidal reaction of mouse serum. *Science*, 123, 62-64.

- 18) Nelson, R. A., Jr. (1958): An alternative mechanism for the properdin system. *J. Exp. Med.*, 108, 515-535.
- 19) 小川政修 (1916): トリパノゾーマの感染及び免疫について, *日本微生物学雑誌*, 3, 348-359, 大5.
- 20) 小野蘇牧 (1937 a): 培養 *Trypanosoma* に対する冷血動物血清の作用に関する研究, 第1篇 冷血動物血清による Trypanolysin 及び Agglomeration の観察, *福岡医科大学雑誌*, 30(7), 1460-1487.
- 21) 小野蘇牧 (1937 b): 培養 *Trypanosoma* に対する冷血動物血清の作用に関する研究, 第2篇 いしがめ血清の Trypanolysin 及び Agglomeratinin の性状に関する実験, *福岡医科大学雑誌*, 30(9), 1746-1771.
- 22) 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.
- 23) Pillemer, L. *et al.* (1956): The properdin system and immunity, III. The zymosan assay of properdin. *J. Exp. Med.*, 103, 1-13.
- 24) 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 antibody. *J. Immunol.*, 65, 201-210.
- 25) Ritz, H. (1911): Ueber Antikörperbildung und Anaphylaxie bei weitzen Mäusen. *Zschr. Immunittforsch.*, 9, 321-344.
- 26) 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 protozoon *Bodo caudatus*. *J. Path. Bact.*, 38, 363-390.
- 27) Rössle, R. (1905): Spezifische Sera gegen Infusorien. *Arch. Hyg.*, 54, 1-31.
- 28) Rosenthal, F. (1913): Untersuchungen über die Genese des Rezidivs bei der experimentellen Trypanosomeninfektion. *Zschr. Hyg.*, 74, 489-538.
- 29) 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, 昭2.
- 30) Schindera, M. (1922): Beiträge zur Biologie, Agglomeration und Züchtung von *Trypanoplasma helicis* Leidy. *Arch. Protistenk.*, 45, 200-240.
- 31) Takehouchi, M. (1918): Cytolytic action of normal and immune serum on infusoria. *J. Infect. Dis.*, 23, 396-414.
- 32) 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, 昭10.
- 33) Wardlaw, A. C. & Pillemer, L. (1956): The properdin system and immunity, V. The bactericidal activity of the properdin system. *J. Exp. Med.*, 103, 553-575.
- 34) Wedgwood, R. J. & Pillemer, L. (1958): The nature and interactions of the properdin system. *Acta Haemat.*, 20, 253-259.
- 35) 山口康夫 (1956): 正常人血清に含まれる殺トリパノゾーマ物質の本態に関する研究, *日大医学雑誌*, 15(6), 900-911, 昭31.
- 36) Yorke, W., Adams, A. R. D. & Murgatroyd, F. (1929): Studies in chemotherapy, I. A method for maintaining pathogenic trypanosomes alive *in vitro* at 37°C for 24 hours. *Ann. Trop. Med.*, 23, 501-518.
- 37) Yorke, W., Adams, A. R. D. & Murgatroyd, F. (1930): Studies on chemotherapy, II. The action *in vitro* of normal human serum on the pathogenic trypanosomes, and its significance. *Ann. Trop. Med.*, 24, 115-163.

ON THE DELETERIOUS EFFECT OF ANIMAL SERA
UPON *BALANTIDIUM COLI*

SHIKO FUJIOKA

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

Balantidium coli growing in Balamuth's medium were put into sera of man and animals and their movements and morphological changes were investigated. Sera used in the experiments were obtained from man, cattle, horse, pig, sheep, rabbit, guinea pig, rat and mouse. In these sera, except the serum of mouse, *Balantidium* became inactive and were even broken down, the protoplasm flowing out of the body wall. In other cases, the break down of the protozoa did not occur, but they only became immotile or a part of the body wall swelled out. These stand-still and morphological changes leading to death occurred immediately after putting the protozoa into sera and finished within 15 minutes. There was no difference in these effects between sera of different animals. Only the serum of mouse had no effect of this kind at all. All sera inactivated by keeping at 56°C for 30 minutes lost the effect. When the sera were diluted with normal saline, the effect was recognized only in the higher concentration; 1:2 or 1:8 were the limit of the dilution in which the changes occurred.

As the effect was naturally supposed to be due to properdin, zymosan treatment was tried. By the single treatment (treatment at 15–18°C) the effect remained in a limited extent, 60–70% of *Balantidium* remained alive. By the second treatment (keeping the medium at 37°C after the single treatment) none of the *Balantidium* was killed. These results indicated that the effects mainly due to the properdin system contained in the serum.

Mouse serum did not show the effects upon *Balantidium*. This can be explained by the fact that mouse serum has only insufficient complement activity. The complement is inevitable for the activity of the properdin.