

## トキソプラズマ死虫ワクチンによる免疫が 感染と治療効果に及ぼす影響

中山一郎 青木豊治

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和45年5月20日 受領)

トキソプラズマ(以下Tpと略記)の弱毒株感染に耐えて生残したマウスはその後の強毒株の攻撃接種によく耐えて生残することはわれわれの日常経験しているところである。著者の一人中山(1969)は前報においてTpの死虫ワクチンを頻回注射したマウスでは、その血清の赤血球凝集(HA)値は上記弱毒株感染の場合と同じ程度にまで上昇し、最終ワクチン注射後短期間に強毒株の攻撃接種を行えば $1/3 \sim 1/2$ のマウスはよくそれに耐過生存することを明らかにした。

本報告においては、死虫ワクチンを少数回注射してある程度の免疫を得せしめたマウスに強毒株を感染せしめ、それをAcetyl-spiramycine(Asp)を用いて治療し、免疫保持下におけるこの薬剤の効果を検定した。一般に抗Tp剤の効果は未だ免疫の形成されていない動物に虫体を感染せしめ、同時に投薬を開始する方法によつて検定されているが、実際に人の治療に用いられる場合には、すでに高い抗体値をもっている患者に投薬されるのが一般であり、そのことをも考慮してこの実験は行なわれたものである。

### 材料および方法

実験動物は凡て体重約20gのICRマウスを使用した。

Tp虫体は強毒のRH株及びKM株を使用した。RH株はTp研究の行なわれている各地の研究室で一般に使用されている株でSabin(1941)が6歳の脳炎小児から分離したものでマウスに対する代表的強毒株である。KM株は中山ら(1966)によつて瘧疾を主訴とする女児から分離されたものでRH株と全く同様にマウスに対して強い毒性を有する株である。

死虫ワクチンはRH株感染3日のマウス腹腔内に生食水2mlを注入、吸引し、これを2回繰返して摂取したものを材料とした。この腹腔洗滌液を生食水にて2回洗

滌後、沈渣を再浮遊させ56°C 30分加温して虫体を殺し、所定の虫数に調製したものを使用した。マウスに初回ワクチン注射後、1カ月の間隔をおいて第2回のワクチン注射を行った。更に2~4週後、RH株又はKM株の生虫体3000コを腹腔内接種して、同時にAspを投与しマウス生残率を検した。生残マウスについては脳を摘出、乳剤として健康マウス腹腔内に注入し攻撃虫体の生存の有無を検した。

AspはSpiramycinの構造の一部のhydroxyl基をacetyl化して得られた誘導體でマクロライド系の抗生物質である。N/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を24%添加蒸留水100mlに粉末Aspを1600mgを加え、乳鉢にて乳剤化して調製した。使用の都度よく攪拌して1日量0.5ml(Asp 8mg)をTp虫体接種当日より4週間に亘つて連日胃内に注入投与した。

マウスの抗体値は眼球より採血し、花木、信藤、佐藤法(1963)によつて型の如く一夜室温に放置後、更に37°C フラン器に3~4時間入れた後、凝集値を検した。

### 成績

1. 死虫ワクチン免疫マウスにRH株を感染させた場合のAspによる治療効果

4群のマウスを使用し、第1~3群には第1回ワクチン注射でそれぞれ異つた量の死虫体を注入し、第2回の注射では凡て800万コの死虫体を注入した。各群にワクチン注射だけを同様に投薬しないものを対照群としておいた。第4群はワクチン注射を行わず投薬のみを行つたもので、その対照として投薬を行なわないものをおいた(第1表)。第1群は初回ワクチン内虫数が10~1万コの少数であり、第2回ワクチン注射後1カ月にRH3000コを腹腔内接種して、同時にAspの連続投与を行つた結果、73匹中12匹(16.4%)が4週後元気に生存し、このうち8匹(11%)は脳健康マウスへの再接

Table 1 Effects of Acetylspiramycin on RH strain infection in vaccinated mice

Group no.		No. of killed trophozoites in vaccine		Daily dose of Asp.	No. of mice exam.	No. of surviving mice on weeks				RH-eradicated mice	
		I	II			1	2	3	4	no.	%
1	Exp.	10~10 <sup>4</sup>	8×10 <sup>6</sup>	8 mg	73	72	37	17	12(16.4%)	8	11.0
	Cont.	"	"	—	74	20	0				
2	Exp.	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>6</sup>	"	8 mg	15	15	13	8	6(40.0%)	6	40.0
	Cont.	"	"	—	18	14	0				
3	Exp.	5×10 <sup>6</sup> ~10 <sup>7</sup>	"	8 mg	21	21	20	19	15(71.4%)	6	28.6
	Cont.	"	"	"	16	11	0				
4	Exp.	—	—	8 mg	151	149	93	56	33(21.9%)	27	17.9
	Cont.	—	—	—	68	40	0				

Interval between two vaccinations was 1 month. About 3,000 RH-trophozoites were inoculated intraperitoneally 1 month after the 2nd vaccination, and Acetylspiramycin was given perorally for 4 weeks.

種でRH虫体が根絶されたことを知った。この生残、根絶効果は第4群の無処置の健康マウスにRH3000コを接種し同時にAspの継続投与した成績と比して寧ろ低い。第1群の対照でAspを投与せず、ワクチンの注射だけをうけてRHを感染させられたマウス74匹は凡て2週後迄に死亡し、第4群の対照でワクチン及びAspを使用せずRHだけを注入されたマウス68匹も凡て2週以内に死亡した。第2群は初回ワクチン内死虫数を10万~100万コとしたものでAsp継続投与の結果、15匹中6匹(40%)が4週後まで生残し、生残マウスの凡てにRH虫体の根絶が認められた。第2群対照は第1群対照と同様に凡てRH接種2週後までに死亡した。第3群は初回ワクチン内死虫数を500万~1000万コとしたもので、21匹中15匹(71.4%)の多数に生残が認められ、RH虫体根絶マウスは6匹(28.6%)であった。同群対照としてAspを投与せず、ワクチン注射だけをうけてRHを感染させられたマウス10匹は第1及び第2群の対照と同様に凡て2週以内に死亡している。

死虫ワクチンの注射をうけた上記のマウスについて、RH株接種前のマウスHA値を検した(第2表)。第1, 2, 3群凡て初回ワクチン注射1カ月後の第2回ワクチン注射前のHA値は1:64以下であった。このとき第2回ワクチン注射を行い1, 2及び3週後のHA値を検した。その結果、HA値の上昇が認められた。HA値1:64は非特異性凝集と考え1:256かそれ以上を陽性値として各群の陽性率をみると、第1群は0.7~1.4%と陽性率は極めて低い。第2群の陽性率は0~27.3%を示し、第3群は24.3~54.1%であり、使用した初回ワクチン内死虫数の増加と平行して陽性率は上昇した。

2. 死虫ワクチン免疫マウスにKM株を感染させた場合のAspによる治療効果

前記実験にて2回注射した死虫ワクチン内の虫数が少ない場合はワクチン効果のないことを知ったので、初回ワクチン内のRH死虫数を2000万コ、第2回2200万コとした。またワクチン注射後のHA値が第2回注射2週後は陽性率高く、以後低下することを知ったので強毒KM株3000コの腹腔内接種時期を第2回注射後2週及び4週として両者の成績を比較すべく考えた。

第2回ワクチン注射2週後にKM株の攻撃接種、Asp継続投与の開始された第5群のマウス20匹中16匹(80%)の多数は4週後まで元気に生存し、このうち5匹(25%)にKM虫体の根絶が証明された(第3表)。ワクチンの注射をうけAsp非投与の第5群対照のマウスはKM虫体攻撃接種後2週までに凡て死亡した。第7群に表示したワクチン注射及びAspともに受けなかつた対照マウスも同様2週までに凡て死亡した。第7群に表示したワクチンの前処置なくAspだけ継続投与されたKM株の接種をうけたマウスは90匹中16匹(17.8%)が4週後まで生残し、このうち12匹(13.3%)にKM虫体の根絶が認められた。この第7群の成績とワクチン注射を行った第5, 6群との間に生残率に著明な差異が認められた。

第2回ワクチン注射後4週にKM虫体の攻撃接種をうけ同時にAspの継続投与を開始されたマウス(第6群)は前例と同じく20匹中16匹(80%)が4週後生残し、このうち3匹(15%)にKM虫体の根絶が認められた。ワクチン注射をうけたAsp非投与の同群対照のマウスはKM虫体接種後2週までに凡て死亡した。

死虫ワクチンの注射をうけた上記実験マウスについ

Table 2 Hemagglutination titer after vaccination

Group no.	No. of killed trophozoites in vaccine		HA titer	No. of mice			
	I	II		after 1 st. vacc. 1 month	1 wk.	after 2 nd vacc. 2	3
1	10~10 <sup>4</sup>	8 × 10 <sup>6</sup>	<64	147	142	137	128
			64	0	4	9	17
			256	0	1	0	2
			1024	0	0	1	0
			Posi. %	0	0.7	0.7	1.4
2	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>6</sup>	8 × 10 <sup>6</sup>	<64	33	19	22	30
			64	0	6	2	3
			256	0	3	7	0
			1024	0	3	2	0
			4096	0	2	0	0
Posi. %	0	24.2	27.3	0			
3	5 × 10 <sup>6</sup> ~10 <sup>7</sup>	8 × 10 <sup>6</sup>	<64	37	10	15	26
			64	0	7	3	2
			256	0	8	8	8
			1024	0	6	8	1
			4096	0	6	3	0
Posi. %	0	54.1	51.4	24.3			

Interval between two vaccinations was 1 month. HA titer  $\geq 1 : 256$  was considered to be positive.

Table 3 Effects of Acetylspiramycin on KM strain infection in vaccinated mice

Group no.	No. of killed trophozoites in vaccine		Time of KM-inocul. after 2 nd vacc.	Daily dose of Asp.	No. of mice exam.	No. of surviving mice on weeks				KM-eradicated mice	
	I	II				1	2	3	4	no.	%
5	Exp.	20 × 10 <sup>6</sup>	2 wks.	8 mg	20	20	20	17	16(80.0%)	5	25.0
	Cont.	"				"	4	4	0		
6	Exp.	"	4 wks.	8 mg	20	20	18	17	16(80.0%)	3	15.0
	Cont.	"				"	4	1	0		
7	Exp.	—	—	8 mg	90	89	51	25	16(17.8%)	12	13.3
	Cont.	—				—	15	7	0		

Interval between two vaccinations was 1 month. About 3,000 KM-trophozoites were inoculated intraperitoneally 2 or 4 weeks after the 2nd vaccination, and acetylspiramycin was given perorally for 4 weeks.

Table 4 Hemagglutination titer after vaccination

I	No. of killed trophozoites in vaccine		HA titer	No. of mice				
	I	II		after 1 st. vacc. 1 month	1 wk	2	3	4
20 × 10 <sup>6</sup>	22 × 10 <sup>6</sup>	<64	47	2	0	4	5	
		64	1	8	3	2	9	
		256	0	15	17	17	6	
		1024	0	15	22	1	4	
		4096	0	8	6	0	0	
Posi. %	0	79.2	93.3	75.0	41.7			

Interval between two vaccinations was 1 month. HA titer  $\geq 1 : 256$  was considered to be positive.

て、KM株接種前のマウスHA値を検した(第4表)。初回2000万コの多数の死虫体を含むワクチンを注射しても注射後1カ月の検査では48匹中1匹だけが1:64を示し、他は凡て1:64以下であった。この時、第2回2200万コの死虫体を含むワクチンを注射し、1,2,3及び4週後にHA値を検したところ、その陽性率は2週時に93.3%の最高値を示した。以後漸次低下して4週時の検査では陽性率41.7%であった。

### 考 察

臨床上Tp症の診断は免疫血清学的検査の成績でなされ、その結果、治療が開始されることが多い。ヒトと動物では宿主、寄生虫相互関係上に差異のあることは当然であるが、本実験においてはマウスを用いて1カ月間隔で2回の死虫ワクチン注射を行い、抗体値の陽転をはかり、其後強毒Tp株の感染をおこさせ、同時に抗Tp剤としてAspの投与を行つて、宿主が免疫を保持している状況下における薬剤の効果を検した。第2回ワクチン内死虫数を800万コと規定して、第1回ワクチン内虫数が1万コ以下の少数の場合には抗原刺激をおこさず生残率も16.4%であり、ワクチン前処置の効果は認められなかった。著者の一人青木(1969)は前処置せずRH感染と同時にAspを同量、同期間継続投与した生残率は28.8%であり、同様にワクチン注射の前処置なしにRH株を感染せしめAspで治療した今回の成績は21.9%であった。これらの成績に比較してワクチン注射を行つた本実験例において寧ろ生残率低下の傾向を示した。本実験にて第2回ワクチン内死虫数を800万コの多数にしても上述の成績であることは唯1回のワクチン注射によつては免疫効果は期待出来ないことを示す。なお、この場合2回の死虫ワクチン注射後におけるHA値陽性率も極めて低率であった。随つて、この場合、前処置として施行されたワクチン注射の効果は全く認められず免疫記憶もおこし得ずマウスの生残はAspによるものであると考える。

初回使用のワクチン内虫数10万~100万コの場合、ワクチン効果を認め始め、その数500万~1000万コとする71.4%の高率の生残率を示し、対照例と比して明らかにワクチン効果のあることが証明された。また、ワクチン2回注射後のHA値陽性率は初回ワクチン内死虫数の増加と平行して上昇することを知つた。Eichenwald(1949)はマウスTp症にSulfadiazineと抗血清をそれぞれ使用した場合、効果はあるが、これらを併用すると単独使用の場合より一層高い効果があると述べてい

る。Cutchins & Warren(1956)は死虫のAdjuvantを作り、これを抗体と共に使用した時、色素試験値及び補体結合反応の抗体値は上昇し可成りの免疫効果を認め、虫体の抽出物より死虫体そのものを抗原とした場合、より高度の免疫効果を期待し得ると述べている。これらの成績も今回の成績と同様に死虫体注射による抗体産生がAspの効果を高め試験動物の延命をきたした一因をなす点で一致している。

ワクチン内RH株死虫数を更に増加して初回2000万コ、第2回2200万コとした時には異なる株KM感染に対しても強い免疫性を示した。即ち前記同様Aspの継続投与を続けた結果、第2回ワクチン注射後2週及び4週に行つたKM株攻撃に対して何れも80%の生残率を認めた。ワクチンのみ注射例及び無処置例は攻撃後死亡し、4週生存マウスは皆無であった。またAspのみ投与例の生残率は17.8%で実験例に比して明らかに低率であった。なお、HA値陽性率もワクチン注射2週後93.3%の高率を示した。ここで注意すべきことはワクチン注射4週後の攻撃で80%の生残率をみたが、攻撃時のマウスHA値陽性率は41.7%であった。この事実は宿主体内に残存した免疫記憶が攻撃に使用した生虫体、即ち抗原のため抗体の急激な産生を来たし上述の結果を示したものと考える。

死虫ワクチンの攻撃虫体に対する根絶効果については本実験成績からみて期待できない。中山(1969)はAspを投与させず死虫ワクチン頻回注射マウスの生虫体攻撃に対する耐過性を検したところ、最終注射終了後4週までの検査で1/3~1/2のマウスに耐過生存が認められた。其後最終注射終了後10週までの検査で69匹中2匹に耐過生存が認められたに過ぎなかった。これらの耐過生存したマウスは凡て攻撃株を潜有し、しかも元気に生存を続けたことを証明している。これらの成績からワクチンにより産生された抗体又は免疫記憶は宿主内で虫体の増殖を抑圧する能力はあるが、根絶するほど強力なものではない。死虫ワクチンとAspの併用によつてそれぞれを単独に使用した時よりもTp虫体の増殖を強力に抑圧する結果を得た。清水ら(1969)はHA値1:1024を示し虫体の分離されたTp性中心性網膜炎に同じマクロライド系抗生物質Spiramycinを使用して病状の改善された例を詳細に報告している。Castrén(1962)も2例の眼Tp症患者にSpiramycinを使用して著効を認めている。これらの場合、既にTp感染による免疫が形成されていて抗体値は陽性を示し薬剤の投与によつて両者の協調効果をきたし、Tpの増殖が抑圧された結果、

病状の著しい改善が認められたものであろう。既に述べたようにヒトの Tp 症治療は主として抗体値を検したうえで開始されるもので、感染と同時に治療を開始する実験的研究の多くのものによって得られた成績より治療効果は大であらうことは上記の成績から当然考えられる。併し Tp 根絶効果については期待出来ない。

本実験成績から、死虫ワクチンを使用して流血中の抗体値を陽転せしめるか、免疫記憶を遺させたマウスに抗 Tp 剤を併用すると協調効果を示し、強力にマウス体内の虫体の増殖をおさえ、その結果マウス生残率は著明に上昇をきたすものである。

### 結 語

マウスに死虫ワクチンを1カ月間隔で2回注射して抗体値の陽転をはかり、その後 Tp 強毒株虫体の攻撃接種を行い、同時に Asp の継続投与を開始し、Asp と死虫ワクチン注射による免疫との協調効果を検して次の成績を得た。

1. 初回ワクチン内死虫数500万~1000万コ、1カ月の間隔をおいて次回800万コ注射し、更に1カ月後強毒 Tp 感染と同時に Asp の継続投与を開始した。感染4週後のマウス生残率は71.4%を示した。第2回ワクチン内の虫数を同数として、初回ワクチン内虫数10万~100万コでは40%の生残率を示し、初回1万コ以下では僅かに16.4%の生残率を示したにすぎなかった。感染株のマウス体内の根絶については、これらの処理で期待すべき成績は得られなかった。

2. 2回に亘るワクチン注射液内の死虫数を増して2000万コと2200万コを注射し、Asp を同様投与した場合の生残率は更に上昇した。即ち第2回ワクチン注射後2及び4週に検した生残率はいずれも80%を示した。

3. 死虫体ワクチン2回注射後攻撃接種した場合、Asp を投与しなければマウスは凡て2週間以内に死亡し何等の延命効果は認められなかったが、Asp を投与することによって多数のマウスが攻撃接種によく耐過した。この場合、ワクチン注射なしに Asp を投与した

ものより、Asp の効果は一層高く現われた。しかし、虫体の根絶については期待すべき成績は得られなかった。

終りに適切なる御助言と御校閲を賜わった慶応義塾大学医学部松林久吉教授に深謝す。なお、本研究の要旨は昭和44年4月5日の第38回日本寄生虫学会総会にて発表した。

### 文 献

- 1) 青木豊治(1969) : マウスの実験的急性トキソプラズマ症に対する Acetyl-spiramycin の治療効果について。寄生虫誌, 18, 190-195.
- 2) Castrén, J. A. (1962) : Toxoplasmosis and spiramycin. Acta Ophth. 40, 515-519.
- 3) Cutchins, E. C. and Warren, J. (1956) : Immunity patherns in guinea pig following *Toxoplasma* infection and vaccination with killed *Toxoplasma*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5, 197-209.
- 4) Eichenwald, H. (1949) : Experimental toxoplasmosis. II. Effect of sulfadiazine and antiserum on congenital toxoplasmosis in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 45-49.
- 5) 花木琢磨・信藤謙蔵・佐藤卯三郎(1963) : トキソプラズマ血球凝集反応の BOB 結合、凍結乾燥感作血球(B抗原)の創製について。第23回日本寄生虫東日本支部大会記事, 10.
- 6) 中山一郎・伊東俊一・田仲基宏(1966) : 虫体分離により確認したトキソプラズマ症の2例。慶応医学, 43, 469-494.
- 7) 中山一郎(1969) : トキソプラズマ死虫ワクチン注射動物における感作血球凝集反応抗体値の持続性と強毒株攻撃に対する抵抗性。寄生虫誌, 18, 539-549.
- 8) Sabin, A. B. (1941) : Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Ass. 116, 801-807.
- 9) 深水敬一郎・中山一郎・佐野豊子(1969) : 脳脊髄液より原虫の証明された後天性眼トキソプラズマ症の長期観察例(初期症状及び再発について)。日本眼科誌, 73, 172-176.

**Abstract**

EFFECT OF ACETYLSPIRAMYCIN ON *TOXOPLASMA* INFECTION  
IN VACCINATED MICE

ICHIRO NAKAYAMA AND TOYOHARU AOKI

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

As the diagnosis of human toxoplasmosis usually depends upon positive serologic tests, the treatment is mostly started in the presence of antibody in the host. A synergistic effect of the antibody and acetylspiramycin upon murine toxoplasmosis is dealt with this paper. Mice were inoculated with heat-killed *Toxoplasma* organisms twice with an interval of one month (Table 1). The number of the parasites in the first vaccination was less than  $1 \times 10^4$  in the group 1,  $1 \times 10^5$ — $1 \times 10^6$  in the group 2 and  $5 \times 10^6$ — $10 \times 10^6$  in the group 3. All mice received  $8 \times 10^6$  parasites in the second vaccination. Most of the mice showed HA-titer less than 1:64 after the first vaccination and 1:64 or higher after the second vaccination (Table 2). All mice were challenged with highly virulent RH strain 4 weeks after the second vaccination and the daily administration of acetylspiramycin (8 mg) was started at the same time. The survival rates of the mice of the group 1, 2 and 3 were 16.4%, 40% and 71.4% respectively. In the control group in which only the acetylspiramycin was given without previous vaccination, the survival rate was 21.9%. In another control groups which received the vaccination only, all mice died of the challenge infection. Thus the increase of the effect of acetylspiramycin upon *Toxoplasma* in the presence of antibody was clearly demonstrated in the groups 2 and 3 in which the amount of vaccination was much higher than that of the group 1. The same experiment was carried out with KM strain in which much higher dose of killed *Toxoplasma* organisms (RH strain) was given in the first and second vaccination (Table 3). The results were similar to the previous experiments and acetylspiramycin exerted much higher effect upon the survival of the challenged mice.