

サキシマハブ (*Trimeresurus elegans*)に 対する *Entamoeba invadens* の実験的経口 感染について

疫学室 仲宗根 民男
徳 村 勝昌
ハブ支所 香 村 昂男

はじめに

1971年、*Entamoeba invadens* がハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) に対して病原性を発揮して死に至らしめることが、石井らによって確認された (A. Ishii and Y. Noboru, 1971)。このアメーバは、1933年 Ratcliff と Geimann がフィラデルフィア動物園の蛇について報告し (H. L. Ratcliff and Q. M. Geimann, 1933) 1934年、アントクープ動物園のものを Rodhain が *Entamoeba invadens* と名付けた (Rodhain, J. 1934) ものである。その後、ハ虫類・両棲類に寄生するアメーバとして興味を持たれている。

石井らは、奄美大島で捕獲され名瀬保健所に集められたハブ (*Trimeresurus flavoviridis*)、ヒメハブ (*Trimeresurus okinawensis*)、アカマタ (*Dinoda semicarinatum*)、ガラスヒバア (*Amphiesma pryeri*)、アオヘビ (*Ophedrys semicarinata*) などの毒蛇、無毒蛇を用いて *Entamoeba invadens* の実験的経口感染による病原性を確認している (A. Ishii and Y. Noboru, 1971)。

今回、私共は、このアメーバがサキシマハブに対しても病原性を発揮して死に至らしめるかについて実験的経口感染を実施したので

結果を報告する。

材料と方法

アメーバ：使用したアメーバは、1976年10月東京大学医科学研究所寄生虫研究部石井明助教授より分与され、以後 in-vitro により当衛研で継代培養を行なって来た *Entamoeba invadens* BAH 株である。

Robinson 培地：アメーバ培養のための維持培地で、Robinson の方法 (G. L. Robinson, 1964) に基き、アメーバの維持、検出に用いた。培養瓶は5～12日間25℃で培養してアメーバの存在を調べ、維持のためには2週間毎に継代した。アメーバの数の算定には白血球計算盤 (Neubauer 改良型) を用いて行なったが概算である。

サキシマハブ：サキシマハブは八重山本島で捕獲され、八重山保健所よりハブ支所に集められた66匹中、12匹を実験に供した。

感染方法：蛇を1人が保持して、頭を上尾を下にして垂し、一方の手で頭を固定し、他方の手でピンセットを用いて口を大きく開き、他の1人がマウス・ラット等の経口投与に用いる先端の丸まった管の付いた注射器を口から押し込みアメーバ液を注入した。10匹

の蛇に確率的に割付けられた投与量をフタル酸カリ液で段階希釈して全量を3mlずつ注入した。又、2匹の蛇には、対照として培養液だけを3mlずつ注入した。

アメーバの検出：蛇は死亡したもの、又は実験期間中生存していたものはクロロホルムで殺した後、それぞれの解剖を行なった。体腔を開いて各臓器の肉眼的病変を調べてから記録し、ピンセットとハサミを毎回良く70%消毒用アルコールで消毒して、肝臓、小腸、大腸の一部を取り、切りきざんで培養瓶の中に入れ培養した後、パスツールピペットで沈澱物を少量取りスライドガラス上に、生のままとヨードカリ液を1滴たらしたものをカバーガラスで覆い鏡検した。栄養型、シスト型いずれも存在すればその屈折性、運動性により容易に判定される。

結果

実験に供したサキシマハブの全長、体重について表-1に示した。全長、体重は実験開始前に測定した。本実験は9月の秋口から翌

表-1

実験に供したサキシマハブの全長・体重

ハブ No.	全長 ^{**} (cm)	体重(g)
No.1	64.0+13.0	130
No.2	66.0+15.0	120
No.3	66.0+13.0	95
No.4	72.0+16.5	130
No.5	76.5+15.0	190
No.6	74.2+17.0	200
No.7	87.0+14.0	240
No.8	66.6+13.5	110
No.9	92.8+20.2	350
No.10	78.7+15.8	200
No.11	72.4+15.6	160
No.12	97.3+20.2	310

*：サキシマハブは1978年7月～8月にかけて八重山保健所よりハブ支所に集められた66匹の中から12匹を実験に供した。

**：全長＝頭部～総排泄腔＋総排泄腔～尾端

年の2月まで実施したが、秋口といっても沖縄では日中は暑く実験室内はクーラーを入れ24～28℃に保ち、12月からはクーラーを切りそのままの状態でも20～22℃で行なった。

表-2 サキシマハブの糞便検査結果

ハブ No.	線虫様虫体	未同定虫卵 [*]	鞭毛様原虫	アメーバ性原虫 ^{**}
No.1	(+)	(+)	無数	(-)
No.2	(+)	(+)	(-)	(-)
No.3	(+)	(+)	無数	(-)
No.4	(+)	(+)	(+)	(-)
No.5	(+)	(+)	(+)	(-)
No.6	(+)	(+)	(+)	(-)
No.7	(+)	(+)	無数	(-)
No.8	(+)	(+)	無数	(-)
No.9	(+)	(+)	無数	(-)
No.10	(+)	(+)	無数	(-)
No.11	(+)	(+)	無数	(-)
No.12	(+)	(+)	無数	(-)

*：未同定虫卵の中には、鞭虫様虫卵、蛔虫様虫卵、鉤虫様虫卵などが見られた。

**：アメーバ性原虫についてはRobinson培養結果。

(-)：なし (+)：1～2個 (+)：10個まで (+)：10個以上(10×10倍野)

サキシマハブの糞便検査結果を表-2に示した。これはアメーバ投与前にサキシマハブがアメーバ性原虫を保持しているかを検討するために行なったが、12匹ともアメーバ性原虫は保持していなかった。実験に供したすべてのサキシマハブが特に線虫様虫体、虫卵及

びNo.2以外は腸トリコモナスに似た鞭毛様原虫を保持していた。未同定虫卵の中には、鞭虫様虫卵、回虫様虫卵、釣虫様虫卵等が見られた。又、解剖にあたっては胃、小腸より十数匹の親虫を見たこともあった。

サキシマハブに対するアメーバの経口投与

表-3 実験に供したサキシマハブに対するアメーバの実験的経口感染結果

ハブ No.	アメーバ投与量	糞便中のアメーバ		各臓器のRobinson培養			死亡日数
		Robinson培養前	Robinson培養後	肝臓	小腸	大腸	
No.1	10 ⁵	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	61日目
No.2	10 ⁵	(-)	(+)	(-)	(#)	(+)	生存***
No.3	10 ⁵	*	*	(+)	(#)	(#)	13日目
No.4	10 ⁵	(-)	(#)	(-)	(#)	(#)	45日目
No.5	10 ⁴	(-)	(+)	(#)	(#)	(-)	82日目
No.6	10 ⁴	(-)	(#)	(-)	(#)	(-)	生存***
No.7	10 ³	(-)	(+)	(-)	(#)	(#)	31日目
No.8	10 ³	(-)	(+)	(-)	(#)	(+)	45日目
No.9	10 ²	(-)	(+)	(#)	(#)	(+)	94日目
No.10	10 ²	(-)	(-)	(+)	(+)	(#)	90日目
No.11	Control	**	**	(-)	(-)	(-)	生存***
No.12	Control	**	**	(-)	(-)	(-)	生存***

* : 糞便採取前にハブが死亡したのでアメーバの有無が確認できなかった。

** : ControlとしてNo.11、No.12はアメーバを投与していない。

*** : 生存とは実験期間中 133日間サキシマハブが生存していたことの意味。

(-) : なし (+) : 1~2個 (#) : 10個まで (##) : 10個以上 (10×10倍視野)

実験の結果について表-3に示した。アメーバの投与量は10⁵、10⁴、10³、10²個と確率的に割付け投与した。10⁵個を投与したものはNo.2を除いて、それぞれ61日目、13日目、45日目で死亡した。No.3は死亡が早く糞便を採取することが出来なかった。小腸と大腸は明らかに異常で特に大腸は大きく膨れ上がり、どす黒くなっていた。No.1は肝臓に赤い出血斑が認められ部分的壊死を起こしていた。No.4もNo.1、No.3と同様、特に大腸と小腸に異常を認めた。No.2は実験期間中生存していたので133日目にクロロホルムで殺した後、解剖してみた処、大腸に異常を認めた。

10⁴個投与した内1匹は、85日目で死亡し他の1匹は、生存していた。No.5は肉眼的にも肝臓に病変が認められたが、小腸大腸は比較的良かった。No.6は薬殺後、小腸に異常を認めた。

10³個投与したものは、それぞれ31日目と45日目で死亡した。小腸、大腸に明らかな病変(出血、腫脹、変色、浮腫状、その他)を認めた。特にNo.7の死亡3日前の糞便は血液の混ったタール様のものであった。

10²個投与した内、2匹共に94日、90日目で死亡した。No.9の肝実質は異常に大きく膨れ上がり深血色をしていた。大腸(直腸)周辺

部はどろどろに溶けていた。死亡の5日前に血液の混った糞便を認めた。No.10は肝實質に出血斑が有り、大腸が異常に大きく、小腸から大腸にかけて、血液痕が認められた。死亡の2~3日前は、かなり弱っているのが分かり刺激を与えても頭部を一定の方向に固定できなかった。

No.11、No.12はアメーバを除いた大腸菌 B-stroin の入った培養液だけを同様に投与したが、実験期間中生存していた。クロロホルムで薬殺した後、解剖を行なったが、各臓器に異常はなかった。

考 察

今回の実験に供したアメーバは、石井らの使用した *Entamoeba invadens* BAH株で分与していただいた株をさらに長期に亘って当衛研で in-vitro で継代培養したものを使用した。サキシマハブに対しても病原性を有することが判った。最も早いものでアメーバ投与後13日目まで死亡したことは、多量接種による人為的な個体に対する損傷を思わせたが、解剖所見によってもそのようなことはなかった。12匹中、2匹は対照として観察し、10匹に対してはアメーバを投与したが、その内8匹が94日目までに死亡したことは、アメーバによる病原性を示唆するものと思われる。死亡した全個体の平均死亡日数は57.6日であり 10^5 個投与群は、39.6日でやはり投与量が多いと当然ながら感染の進行も早くなることが伺える。又、 10^2 個を投与したハブが94日目と90日目まで死亡したこと及び、各臓器のRobinson培養でアメーバが見つかったことはこのアメーバの持つサキシマハブに対する病原性の強さを認識させるものと思われる。死亡した8例については、肝臓、小腸、大腸に対して肉眼的病変を認め、特に小腸と大腸はアメーバ性潰瘍の形成が疑われ病理学的にも興味を持たれる。各臓器別のRobinson培養

によるアメーバの存在は、小腸と大腸に多くまた、肉眼的病変も認めたことは、これらの部位がアメーバによる侵襲部位ではないかと考えられる。死亡後、直ちに病理解剖を行なうことは、サキシマハブの死亡時刻を合せて考えると死後、数時間から翌朝まで経過している場合もあり、腐敗が進んでいるのもあった。12匹中、11匹に腸トリコモナスのような鞭毛原虫を見たが、これは、石井らの指摘した *Trichomonas.sp* (A.Ishii and Y.Noboru 1971) の一種ではないかと考える。

今回、サキシマハブ10匹に対して経口投与を実施してその病原性を確認したが、 10^5 個投与した1匹と 10^4 個投与した1匹が実験期間中死亡しなかったことは、アメーバによる感染が成立しなかったのではなく、臓器のRobinson培養によってアメーバが確認されているので、さらに長期に亘って実験を続けると死亡したのではないかと考える。サキシマハブが持っている内部寄生虫は当初予想はされていたがそれよりもはるかに多数の虫体、虫卵を保持していたことは、これらサキシマハブの自然界における徘徊場所及び食性等を考えると興味深いことである。

最後に、今回の実験によって死亡したサキシマハブから分離した *Entamoeba invadens* をその後も継代を実施しているので、次回の本島ハブに対してはこの株を使用してみたいと思う。

まとめ

サキシマハブ10匹に対してアメーバ *Entamoeba invadens* を強制的に経口投与した。 10^5 から 10^2 個まで4段階に分けて投与したところ、13~94日の間に死亡し、その内 10^5 個投与した1匹と 10^4 個投与した1匹は実験期間中生存していた。

解剖後の各臓器のRobinson培養によっていずれのサキシマハブからもアメーバを検出

した。また、小腸と大腸には肉眼的病変を認め、病原性を確認した。

謝辞

本実験に対してアメーバ *Entamoeba invadens* BAH株を分与していただいた当時東京大学医科学研究所寄生虫研究部の石井明助教授（現在、宮崎医科大学）に感謝いたします。

参考文献

- 1) Ishii, A. and Noboru, Y. Attempts to infect laboratory rats and mice and the snake Habu, *Trimeresurus flavoviridis*, with *Entamoeba invadens*. Snake, 3: 24-29.
- 2) 石井 明・鼻 善久・小野継男・沢井芳男 (1971) : 奄美大島産の数種の蛇に対する *Entamoeba invadens* の実験的経口感染について、Snake, 3 : 30-34.
- 3) 石井 明 (1973) : 南西諸島の毒蛇ハブの内部寄生虫について、Snake, 5 : 133-140
- 4) 仲宗根民男・徳村勝昌 (1978) : *Entamoeba invadens* (ヘビアメーバ) の基礎的実験、沖縄県公害衛生研究所報、12 : 95-101.
- 5) Robinson, G. L. (1968) : The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg., 62 : 285-294.