



Penetration of third-stage larvae of angiostrongylus cantonensis in vitro

荒木, 万嘉

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1075

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001075>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	あら き かず よし 荒 木 万 嘉 (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第920号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和62年3月25日
学位論文題目	Penetration of Third-Stage Larvae of <i>Angiostrongylus cantonensis</i> In Vitro (<i>In vitro</i> における広東住血線虫3期幼虫の穿通について) I. Penetration Apparatus and Its Application (実験装置およびその応用) II. Invasion to and Passage through the Rat Stomach, Duodenal, Rectal Walls and Skin (ラットの胃, 十二指腸, 直腸壁及び皮膚への侵入とこれら組織からの移行)
審査委員	主査 教授 松村 武男 教授 村上 宏 教授 住野 公昭

論文内容の要旨

I 緒言

治療困難な幼虫移行症を起こす寄生虫に広東住血線虫 (*Angiostrongylus cantonensis*)がある。広東住血線虫の3期幼虫(感染幼虫)は非固有宿主であるヒトに感染した場合、好酸球性髄膜脳炎 (Eosinophilic meningoencephalitis) を起こすことが知られている。通常この幼虫は、固有宿主であるラットにより経口摂取された場合、まず消化管壁に侵入し、門脈を経て肝、心、肺と移行し、次いで脳実質で5期幼若成虫となり、最終的に心臓に帰り肺動脈内で成虫になる。それ以外にも3期幼虫は傷の付いた皮膚からも感染することが動物実験で確かめられている。

したがって3期幼虫の穿通、すなわち組織への侵入と組織からの移行について明らかにすることは、この幼虫の感染機構を理解するために重要である。そこで著者は従来ほとんど研究されなかったこの点を解明するため、穿通した幼虫の数を *in vitro* で測定することを可能とする装置を開発し、各組織に対する幼虫の穿通能を定量的に解析した。さらに穿通に必要な物理化学的条件について検討を加えた。

II 材料および方法

1. 3期幼虫

淡水産巻貝である *Biomphalaria glabrata* を中間宿主, ラットを終宿主として広東住血線虫を継代維持した。感染ラットの糞便から採取した1期幼虫を *B. glabrata* に感染させ, 3~4週間後にこの感染貝を室温下で3時間, 攪拌しながら人工消化液 (0.1%ペプシン/1%塩酸) で消化し, 消化残渣から実体解剖顕微鏡下で3期幼虫を採取した。

2. 組織材料

ラットの胃, 十二指腸, 直腸および皮膚を用いた。これらの組織は実験直前にエーテル麻酔死させた雌ラット (Sprague Dawley, 200~300g) から摘出し, 表面積が約1 cm² になるようにした後, 生理食塩水で洗浄後, 1時間以内に使用した。皮膚に関しては, 腹部を剃毛後摘出した皮膚から皮下組織を取り除いただけのもの (無傷の皮膚) とそれをサンドペーパーと安全カミソリで傷を付けたもの (創傷の皮膚) について検討した。

3. 幼虫穿通能の測定

1 ml のディスプレイ注射器の外筒 (テルモ社製, 内径4.5 mm) の先端を水平に切断した。切断面を研磨した後, 胃壁, 十二指腸壁, 直腸壁の内面を, 皮膚の場合には剃毛した外面を注射筒の内側に向くように切断面に取り付け糸で固定した。人工消化法により採取した3期幼虫を蒸留水で十分に洗浄した後, 各注射筒に50匹ずつ入れた。外液を入れた直径16mm, 高さ16mmの容器の上に, 注射筒の先端の組織面が外液の表面と接するようにして垂直にスタンドで固定した。

Table 1 Abbreviation for solutions used as the outer liquid and their constituents

Abbreviation for solution	Constituents
S-A	H ₂ O, 1000ml; NaCl, 9.0g
S-B	H ₂ O, 1000ml; NaCl, 8.7g; KCl, 0.4g
S-C	H ₂ O, 1000ml; NaCl, 8.56g; KCl, 0.4g; CaCl ₂ , 0.2g
S-D	H ₂ O, 1000ml; NaCl, 8.54g; KCl, 0.4g; CaCl ₂ , 0.2g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.1g
S-E	H ₂ O, 1000ml; NaCl, 8.49g; KCl, 0.4g; CaCl ₂ , 0.2g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.1g; NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 0.14g
S-F	H ₂ O, 1000ml; NaCl, 7.06g; KCl, 0.4g; CaCl ₂ , 0.2g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.1g; NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 0.14g; NaHCO ₃ , 2.2g
S-G*	H ₂ O, 1000ml; NaCl, 6.88g; KCl, 0.4g; CaCl ₂ , 0.2g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.1g; NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 0.14g; NaHCO ₃ , 2.2g; glucose, 1.0g
S-H	H ₂ O, 1000ml; NaHCO ₃ , 2.2g
S-I	H ₂ O, 1000ml; NaHCO ₃ , 2.2g; NaCl, 7.57g
S-J	H ₂ O, 1000ml; NaHCO ₃ , 2.2g; NaCl, 7.27g; KCl, 0.4g
S-K	H ₂ O, 1000ml; NaHCO ₃ , 2.2g; NaCl, 7.13g; KCl, 0.4g; CaCl ₂ , 0.2g
S-L	H ₂ O, 1000ml; NaHCO ₃ , 2.2g; NaCl, 7.11g; KCl, 0.4g; CaCl ₂ , 0.2g; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.1g

* Modified Earle's BSS.

外液には50% (v/v) ウマ血清添加 NCTC 109 培地 (NCTC-50HS), NCTC 109, ウマ血清および Table 1 に示した各溶液を用いた。S-H 以外の表中の各溶液の浸透圧は食塩価法により生理食塩水 (S-A) に合わせた。またイオン強度は 0.15 ~ 0.16 であった。pH は S-A, S-B, S-C, S-D および S-E では 4.8 ~ 5.0 であり, S-F, S-G, S-H, S-I, S-J, S-K および S-L では 7.6 ~ 7.8 であった。

注射筒を固定した実験装置を 37°C・湿度飽和・5%炭酸ガス濃度の条件下に静置した。一定時間後、注射筒内液に残った幼虫数および外液に出た幼虫数を実体解剖顕微鏡下で調べた。

幼虫の穿通能を評価するため、組織への幼虫の侵入率 (IR) および組織から外液への移行率 (PR) を次式より算出した。

$$IR (\%) = 100 \times (TL - RL) / TL, \quad PR (\%) = 100 \times ML / (TL - RL)$$

TL は最初に内液に入れた幼虫数, RL は一定時間後に内液に残った幼虫数, ML は外液に出現した幼虫数である。

III 結 果

ラットの十二指腸壁を用いて侵入率および移行率の経時変化を、内液を蒸留水、外液を NCTC-50 HS にした場合 (実験-1) と内・外液とも蒸留水にした場合 (実験-2) について検討した。侵入率は、すでに30分後に実験-1で89%, 実験-2で78%に達し以後ほぼ一定であった。しかし移行率は5時間までの観察で、実験-1では17~85%と時間の経過と共に上昇したのに対し、実験-2ではすべて0%であった。そこで実験-2の状態で2時間後に外液を NCTC-50 HS に変えてさらに3時間保温した。その結果、実験-1と同様に幼虫の外液への出現が観察された。このことから組織に侵入した幼虫の外液への出現に NCTC-50 HS が関与していることが明らかになった。

次に NCTC-50 HS のいかなる成分が幼虫の移行に関与しているかを検討した。NCTC-50 HS を構成している NCTC 109, ウマ血清および NCTC 109 の BSS である Earle's BSS を一部変更した S-G を外液として検討した結果、幼虫の移行は外液が S-G でも NCTC-50 HS の場合と同様にみられた。そこで S-G のいかなる成分が幼虫の移行に関与しているかをさらに検討した。その結果、外液に S-F を用いた時に、最も高い幼虫の組織への侵入率および移行率がみられた。このことから幼虫の外液への移行にグルコースは関与していないこと、生理的浸透圧、イオン強度が 0.15 ~ 0.16 の条件下では、外液が弱アルカリ性 (pH 7.6 ~ 7.8) であること、および S-F の成分、特に CaCl_2 , MgSO_4 が必要であることが判明した。

内液を蒸留水、外液を S-F にした場合のラットの各組織に対する侵入率は胃壁 (95%), 十二指腸壁 (82%), 直腸壁 (89%), 創傷の腹部皮膚 (74%) および無傷の皮膚 (60%) であった。各組織に侵入した幼虫の外液への移行率は胃壁 (76%), 十二指腸壁 (91%), 直腸壁 (72%), 創傷の皮膚 (50%) および無傷の皮膚 (0%) であった。

IV 考 察

広東住血線虫 3 期幼虫は経口感染および創傷の皮膚から感染することが知られている。ラットへ

の経口感染実験では感染1時間後には大部分の幼虫が胃および腸壁に認められている。*In vitro*における本実験においても大部分の幼虫が胃・腸壁および創傷の皮膚を穿通することが示された。明らかにされた穿通に必要な各因子が *in vivo*での感染にも関与していると考えられる。実験終了時に内液に残る少数の幼虫は組織に侵入できなかったもので、幼虫にとって穿通段階が *in vivo*での感染初期における大きな関門であろう。さらに、種々の内液および外液における幼虫の穿通能を検討することにより幼虫の体内移行に関する知見が得られるものと考ええる。

V 結 論

広東住血線虫3期幼虫（感染幼虫）の穿通について *in vitro*で検討するための実験方法を確立した。すなわち、注射筒の先端に固定された各種組織片に対する注射筒内液中の幼虫の侵入と組織面に接した外液への移行をみる方法である。実験の結果、3期幼虫は *in vitro*でも内液が蒸留水、外液がS-F（ H_2O , 1000ml; NaCl, 7.06g; KCl, 0.4g; CaCl_2 , 0.2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.14g; NaHCO_3 , 2.2g）の場合、ラットの胃・腸壁および創傷皮膚を穿通することが明らかになった。幼虫の外液への移行には外液が生理的浸透圧、イオン強度0.15～0.16の条件下では弱アルカリ性（pH 7.6～7.8）であること、およびS-Fの各成分、特に CaCl_2 、 MgSO_4 が必要であることが明らかになった。本実験に用いた実験装置は、他の寄生線虫の組織侵入機構を解明するうえでも有用である。

論文審査の結果の要旨

蠕虫の幼虫移行症は、日本を含む先進諸国における寄生虫疾患の重要課題の一つである。本研究者は、治療困難な幼虫移行症の一つである好酸球性髄膜脳炎を惹起する広東住血線虫の3期幼虫（感染幼虫）の感染機構を明らかにするために本研究を行った。

まず、広東住血線虫3期幼虫の穿通について *in vitro*で検討するための実験方法を確立した。すなわち、注射筒の先端に固定された各種組織片（ラットの胃壁・十二指腸壁・直腸壁・創傷の腹部皮膚および無傷の皮膚など）に対する注射筒内液中の幼虫の侵入と組織面に接した外液への移行をみる方法である。

実験の結果、3期幼虫は *in vitro*でも内液が蒸留水、外液が H_2O , 1000ml; NaCl, 7.06g; KCl, 0.4g; CaCl_2 , 0.2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.14g; NaHCO_3 , 2.2g の組成の場合、ラットの胃・腸壁および創傷皮膚を穿通することが明らかになった。幼虫の外液への移行には、外液が生理的浸透圧、イオン強度0.15～0.16の条件下では弱アルカリ性（pH 7.6～7.8）であること、および外液中の成分、特に CaCl_2 、 MgSO_4 が必要であることが明らかになった。

本実験に用いた前述の実験方法とその装置は、他の寄生蠕虫の幼虫による組織侵入機構を解明するうえでも有用であると考えられる。

以上、本研究は、治療困難な幼虫移行症である好酸球性髄膜脳炎の発症原因である3期幼虫の感

染機構の初段階について研究したものであるが、従来ほとんど研究されなかった3期幼虫の各種組織の穿通、すなわち組織への侵入と組織からの移行について明らかにするための装置を開発し、各組織に対する幼虫の穿通能を定量的に解析し、穿通に必要な物理化学的条件について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。