

フィラリア実験動物としての cotton rat に関する研究

(2) *Litomosoides carinii* の感染経過について

田 中 英 文

東京大学伝染病研究所寄生虫研究部 (指導: 佐々学教授)

(昭和 39 年 9 月 7 日受領)

まえがき

糸状虫科 Superfamily Filarioidea に属するものには広く人および家畜、野獣、鳥類、爬虫類、両棲類に寄生する多くの種類があり、わが国でも人のパンクロフト糸状虫 *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) は北は青森県から南は九州迄の広範囲にわたり分布し、特に九州南部や、南西諸島では多数の患者をみる。また八丈小島にはマレー糸状虫 *Wuchereria malayi* (Brug, 1927) の存在もたしかめられている。また犬、牛、馬、緬、山羊などにも病害著しい種類がみられる。われわれはこれらのフィラリア症に関する基礎的研究に、実験の容易な Cotton rat (以下 CR) を用い、その糸状虫 *Litomosoides carinii* (Travassos, 1909) について実験的感染を行なってきた。先に当研究部では CR を用いた若杉 (1955)、佐藤 (1959) 等の報告があるが、感染方法、感染経過、病変等につき一層詳しい資料を得たのでここにその一部を報告する。

実験材料及び方法

実験に用いた CR は第一報に報告した如く、武田薬品工業株式会社光工場より伝研獣疫研究部を經由して分譲されたものを繁殖し、これに Texas 大学の Dr. J. A. Scott 教授より分与された *Litomosoides carinii* 感染イエダニ *Ornithonyssus bacoti* (Hirst, 1913) を附着させて感染させたものである。

感染方法: 感染型仔虫を確認したイエダニ群を、青梅綿に附着させ、CR のケージ内に入れ、2週間放置した後、イエダニの除去には青梅綿を取除き CR およびケ-

ージに直接 0.1% マラシオン乳剤を噴霧処理し、更に努めてケージを交換するようにした。感染中ケージ外にイエダニが逃亡するのを防止するため、および既感染 CR ケージに再感染を防ぐために感染ダニ附着ケージは下に、ケージ底面積より大きな瀬戸引きパットを設置し、ステンレス製の架台を置きケージをそれにのせ、パットに水を満し逃亡にそなえた。さらに既感染ケージには一定間隔をおいて、希釈マラシオン液を噴霧処理した。

観察法: 流血中の *Microfilaria* (以下 Mf と記す) を検出するために、着ダニ後約 2 ヶ月より尾端を針で刺し尾静脈血を特製のメラングジュールで 2.5 mm 宛採血し、スライドグラスに蛇行状に伸展塗抹した標本を作り、ギムザ氏液で染色後、検鏡した。Mf の数が最高値に近くなると 3,000 隻以上、時には 5,000 隻以上を記録する事もある。また 2.5 mm の血液をスライドグラスに蛇行状に伸展塗抹するのは、実験者の熟練度により、その塗抹標本にかなりの濃淡差が出来、余りに濃いと観察困難となり検鏡時の検出 Mf 数にかなりの影響があると思われた。われわれは出来るだけ、スライドグラスの両 15 mm 宛残し残部いつばいの面積に蛇行させ、染色も比較的短時間に切りあげている。また検血量も検鏡の際上記の如き技術的な影響による Mf 数の誤差を少なくするには採血量はこれ以上は必ずしも好ましくない。

成績

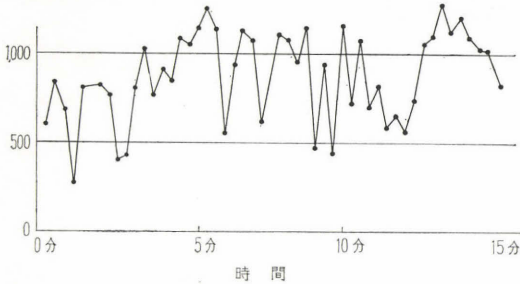
Mf の変動について:

1) 流血中の Mf の分布について。流血中における Mf の分布を見る為に 1 頭の CR の尾端静脈血を 1 回 2.5 mm 宛連続 52 回 15 分間に連続採血し各標本毎に Mf

現在田辺製薬株式会社東京研究所

This investigation was supported in part by a WHO Research Grant on "Experimental Filariasis Studies", and by a Public Health Service Research Grant C-00017-04 from Nihon Kiseichu Yobokai, Report No. 41.

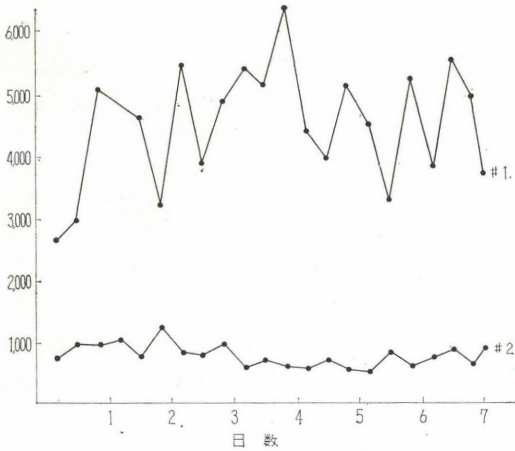
数を記録した。その結果は 257 隻～1,275 隻であり、平均 867.0 隻で、 χ^2 -検定の結果 poisson 分布に非常によく一致した (第 1 図)。



第 1 図 15 分間連続検血における流血中 Mf 密度の変動

2) 検血 Mf 数の日による変異について

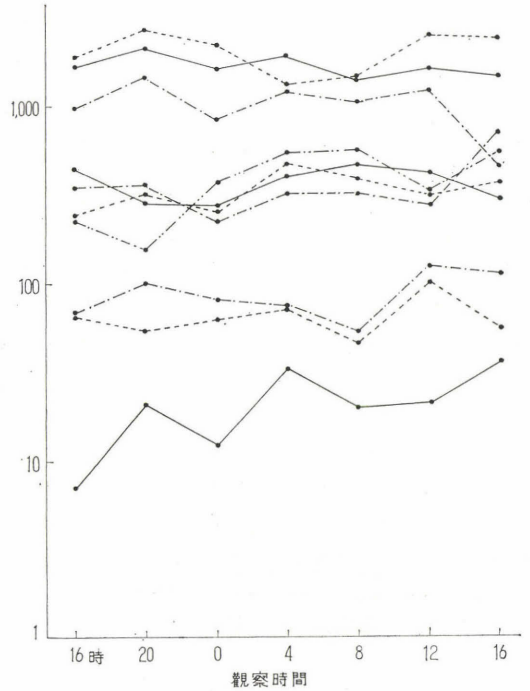
4 頭の感染 CR を使用し毎日、3 時間々隔各 3 回宛尾端静脈より 2.5 mm の採血による Mf 数の記録を 1 週間連続行つた。その結果個体差が著しく、Mf 数 3,000～5,000 隻の CR においては不規則な W 字状を示し、比較的 Mf が少ない (1,000 隻程度) CR においては、その日による変異は認められなかつた (第 2 図)。



第 2 図 検血 Mf 数の日による変異について (1 日 3 回 7 日間連続検血)

3) Mf 数の出現日週性 (Turnus)

尾端静脈より 2.5 mm 宛 4 時間々隔で採血し検出 Mf 数を記録し、これを 10 頭の CR を用いておこなつたところ、第 3 図に示す結果を得た。それによるとこの実験に関する限り特に厳密な日週性はないと思われたので、以後の検血は観察時刻を昼間午前 10 時より午後 2 時迄の間として行つた。



第 3 図 *L. carinii* の microfilaria の turnus に関する観察

感染実験成績：1) 感染率—*L. carinii* の CR への感染率について第 1 表に示す結果をえた。CR は生後 2 ヶ月令以上の成獣以外に 2 ヶ月令以下の幼獣も一部に見られた。合計 209 頭 (雄 69 頭、雌 140 頭) のうち、雄 52 頭 75.4%、雌 94 頭 67.2% に感染がみられ、未感染例は雄 6 頭 8.7%、雌 24 頭 17.1% であつた。また *L. carinii* の感染後 Mf 陽性となる迄の (約 2 ヶ月) うちに死亡した

第 1 表 *L. carinii* の cotton rat への感染成功率の観察

検査動物数	<i>L. carinii</i> Mf 陽性動物数	Mf 陰性動物数	潜伏期間内斃死動物数
♂ 69 頭	52 頭 (75.4%)	6 頭 (8.7%)	11 頭 (15.9%)
♀ 140 頭	94 頭 (67.2%)	24 頭 (17.1%)	22 頭 (15.7%)
計 209 頭	146 頭 (69.9%)	30 頭 (14.3%)	33 頭 (15.8%)

第 2 表 潜 伏 期 間*

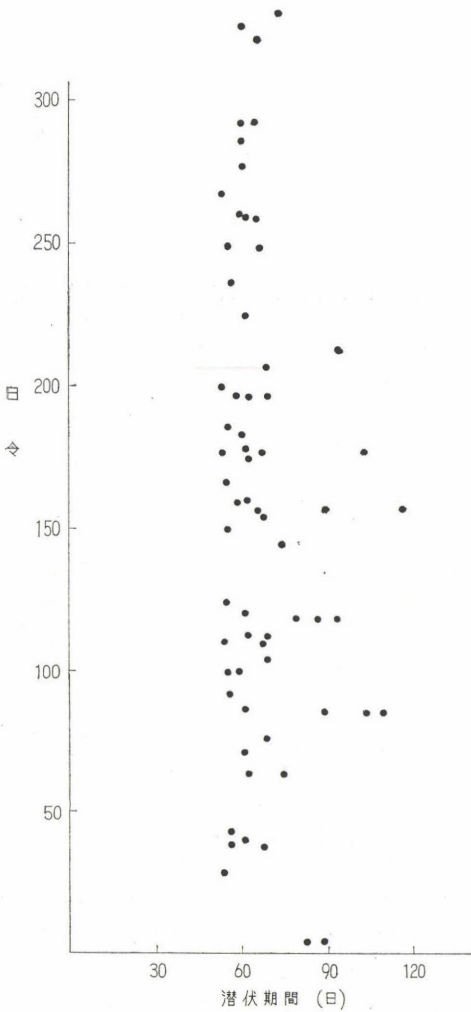
着ダニ後の 経過日数	週	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	不 明	計
Mf 陽性頭数		0	14	35	46	9	22	8	6	0	3	1	1	0	1	146

* 感染(着ダニ)より Mf が流血中陽性となる迄の期間

CR は雄 11 頭 15.9%，雌 22 頭 15.7%であつた。この結果上記の方法で平均 70%は感染した。

感染率(Mf 陽性)は雄獣の場合がやや高い成績を示した。

2) 潜伏期—感染(着ダニ)より Mf 流血中陽性となる迄の期間について(以下潜伏期間と便宜上記す)感染させた 146 頭の CR につき調査した結果は第 2 表の如くで

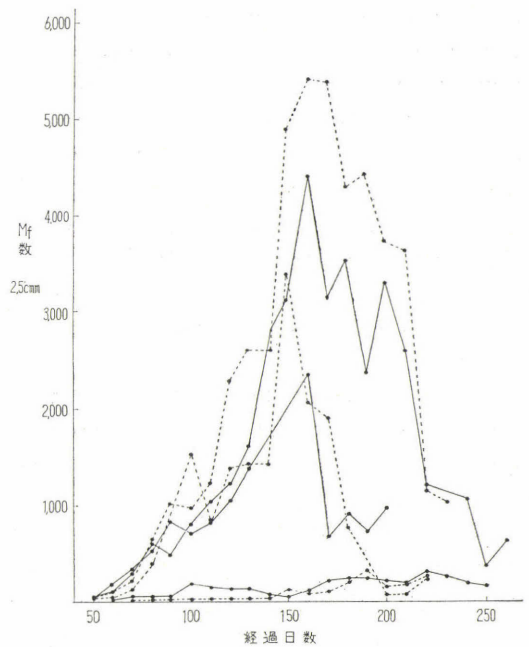


第 4 図 供試 cotton rat の日令と潜伏期間の関係

ある。着ダニ(着ダニ第一日目以後流血中 Mf 陽性迄)後 Mf 流血中陽性迄の最短日数は 49 日で最長は 116 日、平均日数は雌雄とも約 65 日であつた。

3) 供試 CR の感染時の週令と潜伏期間の関係—上記の CR 146 頭について感染時の週令と潜伏期間を調べた結果は、第 4 図に示す通りである。この図より CR の週令は 1 週令以下より 47 週令迄と広範囲にわたっているが、潜伏期間は着ダニ時の CR の週令には関係がなく一様に約 65 日で Mf 陽性となつた。

4) 実験的感染に成功した前記 146 頭中事故死や早期解剖例を除き可及的長期間観察し得た 91 頭につき、その流血中 Mf 数の消長をみると、Mf が出現し始めてから、急激に上昇して最高値に達し、以後徐々に減少する型のもの、急激に上昇した急激に減少するものと、低いレベルに終始して著明な増加を見ないものがあるようである。その概略は第 5 図に示したサンプルでよくうかがえる。



第 5 図 *L. carinii* 感染 cotton rat の Mf の消長

この経過の型は、最高時に達した Mf 数とある程度の関係があるもののように思われる。すなわち第 3 表に示した如く潜伏期間は最高 Mf 数の多い群に短い傾向があり、逆に Mf 最高数に達する期間は、最多 Mf 数の多い群に長く、第 5 図からもうかがわれる如く、最高 Mf 数の多い群では、他よりも経過が長い。換言すると、最高 Mf 数の多い群では、潜伏期が短かく、Mf が早くあらわれ初め、Mf の最高値に達する時期が遅れ、その後も緩徐減少を示して全体の経過が長い傾向にある事が知られた

第 3 表 流血中 Mf 最高値と潜伏期間、最高 Mf 密度に達する期間の関係

最高 Mf 数 (2.5cm)	Cotton rat 例数	潜伏期間	Mf 最高に達 する日数
1~1,000	33	66.6±12.5	116.8±13.9
1,001~2,000	33	67.5±11.7	144.3±15.8
2,001~3,000	9	63.6± 9.5	164.8±18.3
3,001~4,000	10	61.6± 5.5	159.5±14.4
4,001~5,000	2	64.5± 8.5	179.5±13.4
5,001~6,000	4	60.0± 8.8	159.8±10.4
計	91	65.8±11.3	138.3±16.0

5) 流血中 Mf 数の経時的消長—流血中に Mf が出現し、Mf 数が maxium に達して、それから減少した経過を追って完全に観察を続ける事の出来た 14 例についてその経過日数、Mf 数等の平均を下に記す。

(カッコ内は前記 91 頭の平均)

- a 潜伏期間 62.4 日(65.8日)
 - b 出現時の Mf 数(2.5 cm) 76.2 隻(73.0隻)
 - c Max. に達する期間(着ダニより) 150.3日(138.3日)
 - d Max. の Mf 数 2,595 隻(1581.2隻)
 - c-a 出現後 Max. になる期間 88.0日(73.9日)
 - e Max. の 20%以下に減少した時の Mf 数 330.6 隻
 - e/d 同上時点における Mf 数の Max. 時に
対する% 11.5%
 - f 着ダニより最高時の 20%以下に達する
期間 207.3日
 - f-c Max. より 20%以下に達する期間 65.9日
 - f-a 出現より 20%以下に達する期間 144.4日
- (なお e 以下は Max. の 20%以下にならなかつた 4 例は含んでない。)

これにより実験的に感染せしめた CR において、平均 60 数日の潜伏期間を経て Mf が出現し、更に約 70~80 日を経て流血中の Mf 数は最高に達し、以後減少して最高時より 60~70 日を経ると最高時の 20%以下に低下してしまう事が分つた。

6) 感染確認から死亡迄の生存日数—146 頭の CR のうち実験による屠殺処分を除き 91 頭について生存日数を調べた。感染時の日令が、まちまちであるが一応最短は 1 日、最長は 298 日(10ヶ月)と広範囲にわたっている。平均 90 日前後の成績を得た。

寄生 *L. carinii* 成虫および Mf の体内における分布について一部検 50 例の調査結果成虫の寄生部位は胸腔のみ寄生が 39 例(78%)、胸腹腔混合寄生が 11 例(22%)であつたが、その寄生数もみると、胸腔寄生数が圧倒的に多くその総数は 3,527 隻を記録し、一方腹腔寄生例は 25 隻であつた。また寄生 *L. carinii* 成虫の性比をみると雄：雌 = 1 : 1.4 で最多寄生数は雄 166 隻、雌 185 隻、平均雄 32 隻、雌 44 隻であつた。

L. carinii 寄生の宿主におよぼす影響について (CR 糸状虫症の症状) :

1) 感染 CR の寿命—感染に使用した CR が繁殖飼育に用いている CR に比較して、その寿命にどの様な変化があるかを 146 頭の感染獣中、事故死、実験による屠殺処分を除き 91 頭について観察した。その結果を第 4 表

第 4 表 Cotton rat の生存日数

	性	検査動物数	最短	最長	平均
* 感染	♂	29 頭	83日	472日	251.3日
	♀	62 頭	90日	513日	297.2日
	計	91 頭	83日	513日	282.9日
非感染	♂	113 頭	60日	438日	162.6日
	♀	146 頭	65日	468日	245.6日
	計	259 頭	60日	468日	209.6日

* *L. carinii* 感染 cotton rat

に示す。繁殖飼育している非感染 CR の生後 3 ヶ月以上を経過したものの平均寿命は雄 162 日、雌 245 日であるのに比較し、感染 CR では雄 90 日、雌 50 日余上記平均より長く生存を記録している。これは繁殖飼育の場合その条件は必ずしも好ましくなく 1 ケージ内に 10 頭程度入れ、密度の高い状態で飼育しているのに反し感染実験の際には 1 ケージ当り 5 頭程度の収容状態にしているためとも思われる。

また繁殖ケージは雄 1 頭以上混入飼育されているが、感染実験の際には 1 ケージ当り、雄 1 頭とし、従つて雄相互間の闘争はみられない。この結果上記の寿命の差はむしろその飼育条件、主として 1 ケージ内の飼育密度が大きく関係していると思われた。

2) 感染 CR と非感染 CR の体重について：*L. carinii* の感染が CR の体重にどの様な関係があるか知るため、

23頭のCRを用いて計量し、既に非感染CRで調査した体重曲線と比較した。その結果感染10週頃から(着ダニ第1日目より)上昇していた体重の減少がみられ80g前後で停滞する。また週令の割にその体重の軽いものにMf数が多く観察された。したがって*L. carinii*の寄生はCRの生長に悪い影響を与えるものと思う。

考 察

*L. carinii*のCRへの感染率についてはD. S. Bertram(1953)は165頭感染させたうち85.5%が感染したと報告しているが著者は209頭感染させたうち70%に感染を認めた。

潜伏期間についてはScott(1946), Bertram(1947), Howking & Sewell(1948), Williams(1948), Kershaw(1949a)は約50日と報告し、また、その後Howking(1950)は約8週間とも報告している。われわれの観察結果では146例中最短で49日最長116日、平均65日とはほぼ一致した。

尾端静脈中のMfの消長についてD. S. Bertram(1953)は、われわれと同じ様な報告をしているが1cmm中のMf数については、われわれの結果の方がはるかに多かった。

感染確認から死亡迄若杉1958年は120日と報告しているが、われわれの結果も同じであった。

なお、短時間内に連続検血した成績では流血中のMf数の度数分布はpoisson分布をなしている事が確かめられたが、これは流血中にMfが均等に分布しているものと考えて差支えない。大森(1958)はバククロフト糸状虫について蚊に取込まれるMf数の分布が不均一な事から、流血中の分布も不均一であろうと推定したが、蚊の取込み方の影響を受けない方法、すなわち直接血液について調べる方がより適当であろう。

イエダニに取込まれるcotton rat糸状虫のMf数も、大森の蚊の場合と同じくPoisson分布に従わない事が、先に著者ら(田中・千葉・田中, 1963)により報告されたが、それにもかかわらず、今回直接血液についてみると流血中ではMfが均一に分布していると考えて差支えないと思われるので、媒介者によるMfの取込みの段階に将来検討を要する問題を含む事が考えられる。

要 約

1) Cotton ratに*Litomosoides carinii*感染イエダニをつけて実験的に感染せしめた場合の感染の経過を追

求した。

2) 流血中の*Microfilaria*の検出には着ダニ後約2ヶ月より尾端静脈より2.5cmmの定量採血をして溶血後ギームザ染色して検鏡した。流血中のMf数は15分間位の短時間でも変動があるが、日週性は特に認められず定期出現性はない。またMfの流血中の分布は均一と考えて差支えないことが分つた。

3) 着ダニによる*Litomosoides carinii*のcotton ratへの感染成功率は209頭中約70%であった。潜伏期間は最短7週間、最長17週間で感染時の週令に関係なく雌雄共平均65日であった。後に到達するMfの最高値が多い程潜伏期間は短い。また最高Mf数の多い程最高に達する期間が長く、以後の経過も長い。

4) 約65日の潜伏期間を経てMf出現後70~80日を経てMf数が最高の値に達し、更に60~70日を経ると最高時の20%以下に低下する。

5) *L. carinii*成虫の体内分布は胸腔内寄生が50例中80%近くを占め、また*L. carinii*成虫最多寄生は雌雄共で350隻を越えた。重感染の場合宿主が斃死する事もあるが、われわれの飼育条件下で感染獣の寿命はむしろ繁殖の寿命より雌で50日、雄で90日余長かつた。これは1ケージ内の飼育密度に関係があると思われた。しかし*L. carinii*の感染はcotton ratの体重増加を抑制し、ある時は減少を来たした。

稿を終るに当り、御指導賜わつた当研究部部長佐々学教授、林滋生助教授、福井正信博士、神田鍊蔵博士、三井源蔵博士、田中寛博士、実験に協力を得た掛川征支、山田喜生、松永秀子、ほか寄生虫研究部の諸氏に感謝の意を表する。

この報告の一部は第32回日本寄生虫学会総会(昭和38年4月)において発表した。

文 献

- 1) Bertram, D. S. (1947): The period required by *L. carinii* to reach the infective stage in *Liponyssus bacoti* and the duration of the mites infectivity. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 41, 253-261.
- 2) Bertram, D. S. (1953): Laboratory studies on filariasis in the cotton rat. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 47 (1), 85-106.
- 3) Hawking, F. & P. Sewell (1948): The maintenance of a filarial infection (*L. carinii*) for the motherapeutic investigations. *Brit. J. Pharmacol.*, 3, 285-296.
- 4) Hawking, F. (1950): Some recent work on fila-

- riasis, Trans. Roy. Soc. Trop. Med., 43, 204-207.
- 5) Kershaw, W. E. (1949a) : Ann. Trop. Med. Parasit., 43, 96.
 - 6) 大森南三郎 (1958) : パンクロフト糸状虫症の伝搬に関するアカイエカの役割に関する実験的研究第2報. 人末梢血液中のマイクロフィラリアの分布様式. 長崎医学会誌, 33(8), 1045-1053.
 - 7) Scott, J. A. & J. B. Cross (1946) : A Laboratory infection of the rat with filarial Worms. Amer. J. Trop. Med., 26, 849-855.
 - 8) 田中英文 (1964) : フィラリア実験動物としての Cotton rat に関する研究, (1) 飼育繁殖成績について. 実験動物, (印刷中).
 - 9) 田中寛・千葉日美・田中英文 (1963) : コトンラット糸状虫マイクロフィラリアの中間宿主イエダニによる吸入量の定量的観察. 寄生虫学雑誌, 12(3), 191-195.
 - 10) Williams, R. W. (1948) : Studies on the life cycle of *L. carinii*. J. Parasitol., 34, 24-43.

OBSERVATIONS ON THE COTTON RAT AS A LABORATORY
ANIMAL FOR EXPERIMENTAL FILARIASIS STUDIES
II. THE COURSE OF INFECTIONS WITH
LITOMOSOIDES CARINII

HIDEBUMI TANAKA

(Department of Parasitology, the Institute for Infectious Diseases,
University of Tokyo)

1) Observations were made on the course of infections of the filaria *Litomosoides carinii* experimentally transmitted into cotton rats with the tropical rat mite *Ornithonyssus bacoti*. The diagnosis as well as measurements of microfilarial density were made by taking a blood smear of 2.5 cmm. from the tail.

2) Microfilarial levels in the blood was found to vary greatly with repeated counts within 15 minutes, or with the days in a week, and no significant results were obtained for the diurnal rhythms.

3) With our present technics of mass infections by bite of the infected mites, 146 out of 209 animals (69.9%) were successfully brought to the microfilarial carriers and the rests either remained negative or died during the incubation period. Distribution of the incubation period by weeks from infection to the first positive blood survey was investigated for 146 cases, which was found to vary from 7 to 17 weeks with the average of 65 days independent of sex and ages.

4) In most animals carefully observed, the microfilarial densities in blood samples were found to increase as the days elapsed from after the incubation period, and reached to the maximum level on about 121 to 150 days after the infection, and then gradually decreased or stayed on similar levels until the animals died. They could roughly be classified into the three groups, those which showed rapid increase of the density to over 4,000 per 2.5 c.mm. within 4 months after the infection, those which were slower in the rise of densities and lower in the maximum levels, and those with slightest infections staying on lower levels than 500 without showing such a peak. The days required for the animals to reach to the highest level were between 121 to 150 days for 28 cases and 91 to 120 days for 19 cases in the observations made with 91 animals. The distributions of days required for an infected animal to reach to the maximum level, the densities at the maximum level and their correlation were investigated.

5) Results of dissections of 50 infected cotton rats have shown that the adult worms are the parasite in pleural cavities, but 11 animals were also parasitised in abdominal cavity. The total numbers of adults recovered from pleural cavity were 3,527 and were much higher than those of 25 from the abdominal cavity, and the average number per animal was 32 males and 44 females (sex ratio 1:1.4). The largest number of adults recovered from a rat was 166 males and 185 females.

6) The parasite was found to cause illness of the host, especially in heavy infections, and a number of animals died in our laboratory due to the filariasis. The observations on the growth curve as measured from the increase in body weight showed that those infected by the parasite lost their weights or were smaller in increase as compared with the healthy control. Under our laboratory conditions, however, the life span of the infected animals was longer in average than the uninfected due to better cares applied to the infected groups.