

肝吸虫の生理

(2) 組織化学的にみた肝吸虫のラット体内における 発育についての考察

吉 村 裕 之

千葉大学医学部寄生虫学教室 (主任: 横川宗雄教授)

(1965年5月14日受領)

はじめに

著者ら(1965)は、第1報において肝吸虫メタセルカリアをラットに投与すると、虫体は感染直後より急速な形態学的発育をなして略々感染後20日前後で成熟することを明らかにした。この様に肝吸虫が胆管内で短期間に発育するためには、当然虫体内では旺盛な物質代謝が行われていると思われるが、この点についてはほとんど明らかにされていない。ただ Faust & Khaw(1927)や Hsü(1938)は、肝吸虫の腸管内容物および虫体寄生に基づく病変、殊に胆管上皮の分泌物に注目し、本虫の栄養(nutrition)または食物(food)との関連性についての考察をなしている。他方、肝吸虫の組織化学的研究は、これまで多くがなされているが、上述の観点からの研究は未だ見当たらない。著者は、ここに肝吸虫のラット体内における発育期の虫体について2、3の組織化学的検索を行い、同時にそれらに対応する病理組織学的変化、殊に胆管におけるそれと組織化学的な観察所見とから虫体の発育についていささか考察が得られたので、ここに報告したい。

実験材料と方法

肝吸虫メタセルカリアの採集およびラットへの感染方法は、既報(1)と同様であるので仔細は省略する。各群2匹宛のラットにモツゴ(*Pseudorasbora parva*)より分離した肝吸虫メタセルカリアを50コ宛、経口投与し、感染後2日、4日、6日、11日、15日、17日、20日、25日、および30日の各時期に屠殺剖検し、肝内胆管または総輸胆管に虫体が包蔵されているまま、組織切片として各種の組織化学的染色を行うべく適応する固定液で

固定し、脂肪染色を除き、すべて型の如くパラフィン切片として後、染色標本となした。

今回行つた組織化学的染色法は、下記の如くである。

(1) 脂肪染色: (ズダンⅢおよびズダン黒染色)

中性脂肪検出のための川村-矢崎氏法および広義の脂質染色の1%ズダン黒アルコール溶液を用いた。

(2) ヘモグロビン染色 (Ralph 氏法)

ヘモグロビンのペルオキシダーゼ(peroxydase) 能を利用したベンチチン反応である。

(3) Tropaeolin O 染色

アルギニン、ヒスチジン、リジンなどの塩基性蛋白が染色される。

(4) 過沃素酸-Schiff 反応

グリコーゲン、ムチン等、多糖類すべてに陽性に出現するいわゆる PAS 染色法である。

(5) ムチン(mucin)のための Mayer のムチカルミン法

(6) RNA のためのメチル緑-ピロニン染色

(7) DNA のための Feulgen 反応

(8) アルカリ性グリセロフォスファターゼ

(alkaline glycerophosphatase)

(9) 酸性グリセロフォスファターゼ

(acid glycerophosphatase)

実験成績

脂質 (Fig. 4): 中性脂肪を主とした脂質は感染後の経過日数によつて、その消長は必ずしも一様ではない。10日より20日虫体の多くは腸管腔内および腸管壁細胞内には大小不同の顆粒状脂肪滴が充満するものが多くみられた。その他の部位では角皮下層に中等度ズダン嗜好

本研究の一部は昭和39年度文部省科学研究費(各個研究)の補助を受けた事を記し、謝意を表する。

Table 1. Histochemical results of the juvenile and adult worms recovered from the experimentally infected rats in the periods from 4 to 30 days after infection

Organs	Lipid	Hemo- globin	Protein (basic)	Polysaccharides		RNA	DNA	Phosphatases	
				Gly- cogen	Mucin			Alka- line	Acid
Cuticle	±	—	+	+	—	—	—	+	+
Subcuticular tissue	+	—	+	++	—	+	+	+	+
Suckers and pharynx	±	—	+	++	—	+	+	+	+
Reticular tissue	±	—	+	+++	—	+	±	+	±
Intestine	++	+	±	+	±	+	+	+	++
The contents of intestine	++	++	++	+	+	+	+	++	+
Vitelline gland	++	—	++	++	—	++	+	++	+
Ovary	—	—	++	+	—	++	+	++	+
Testis	—	—	+	±	—	+	+++	±	+
Uterus	—	—	—	+	—	+	+	+	+

— negative
± weak positive
+ positive
++~+++ Strong positive

性をみとめた。腸管壁および腔内ズダン嗜好性顆粒の量的差違は、必ずしも一樣でない。

ヘモグロビン (Fig. 5) :

感染後6日より15日の虫体の一部腸管内およびその壁に陽性に出現した。しばしば腸管内に無染色標本にても淡黄褐色雲絮状物の存在がみとめられるが、これらの一部は明かにベンチデンによる反応の増強がみられ Ralph の反応が陽性であることから、ヘモグロビンの存在を思わせる。殊に胆管の腺様増殖、出血性滲出性胆管炎をみとめた胆管腔内に寄生する虫体には、鮮明な陽性反応を示し、虫体の腸管腔内に赤血球、白血球および胆管上皮細胞の出現がみとめられることから本反応は、赤血球、白血球を主とする細胞群由来のペルオキシダーゼ活性を思わせる。

塩基性蛋白体 (Fig. 6) :

何れの時期の虫体にも卵黄巣、角皮下組織、腸管上皮およびその内腔、睾丸および卵巣にも中等度または強陽性反応をみとめる。

多糖類 (Fig. 7, 8) :

本反応によつて陽性を呈するものは、一般に多糖類のすべてである。なかんづくグリコゲンおよびムチンを考えさせる陽性物質が、虫体の角皮下筋細胞、網状組織、腸管壁およびその内腔、角皮、両吸盤、卵黄巣にみとめられる。殊に感染後6日虫体より以後においてこれ等の陽性物質の増強が確認される。

ムチン (Fig. 9) :

虫体には腸管腔内に弱陽性にみとめられるが、殊に胆管上皮細胞および胆管腔内に強い増強が感染後10日前後の増殖性滲出性変化のつよいものにみとめられる。

RNA および DNA ;

RNA (Fig. 10) は角皮下組織、卵黄巣、卵巣、子宮内卵細胞および卵黄細胞に、DNA は殊に睾丸、卵巣および卵黄巣の核質内に強い陽性反応がみとめられる。

アルカリ性フォスファターゼ (Fig. 11)

角皮および角皮下層、両吸盤壁、咽頭食道壁、排泄囊壁、腸管壁に中等度陽性に、子宮壁、卵巣、睾丸にも中等度または弱陽性に出現する。

酸性フォスファターゼ (Fig. 12) :

腸管壁、排泄囊壁、卵黄巣、網状組織に中等度に、睾丸、卵巣には弱陽性にみとめられる。

RNA, DNA ならびにアルカリ性および酸性フォスファターゼの反応出現の程度と、発育虫体の時期的消長は必ずしも明らかにはなしえない。ただアルカリフォスファターゼは、増殖性胆管炎の胆管上皮に著明に増強することおよび、かかる時期の虫体内の同酵素の出現または増強には或る程度の並行がみられる。

以上の各種組織化学的反應成績をまとめると Table 1 の如くである。

病理組織学的変化の概要 (Fig. 1, 6, 8, 12)

感染後2日より30日に至る肝吸虫寄生部位を中心とした胆管ならびに肝臓における病的変化は概要次の如くである。

2日後 肝小葉中心静脈の鬱血または充血、肝細胞索の離開と類洞 (sinusoid) の開大が主なる変化である。

4日後胆管炎および胆管周囲炎、殊に終輪胆管における胆管上皮の増殖と周囲性の形質細胞、淋球様単核細胞、好酸球および好中球の浸潤と線維芽細胞の新生、胆管腔内の好エオジン性滲出液と胆管上皮剝離像および炎症細胞の出現がみられる。

11日後 胆管腔の拡大と腺窩の腺様増殖、胆管炎およ

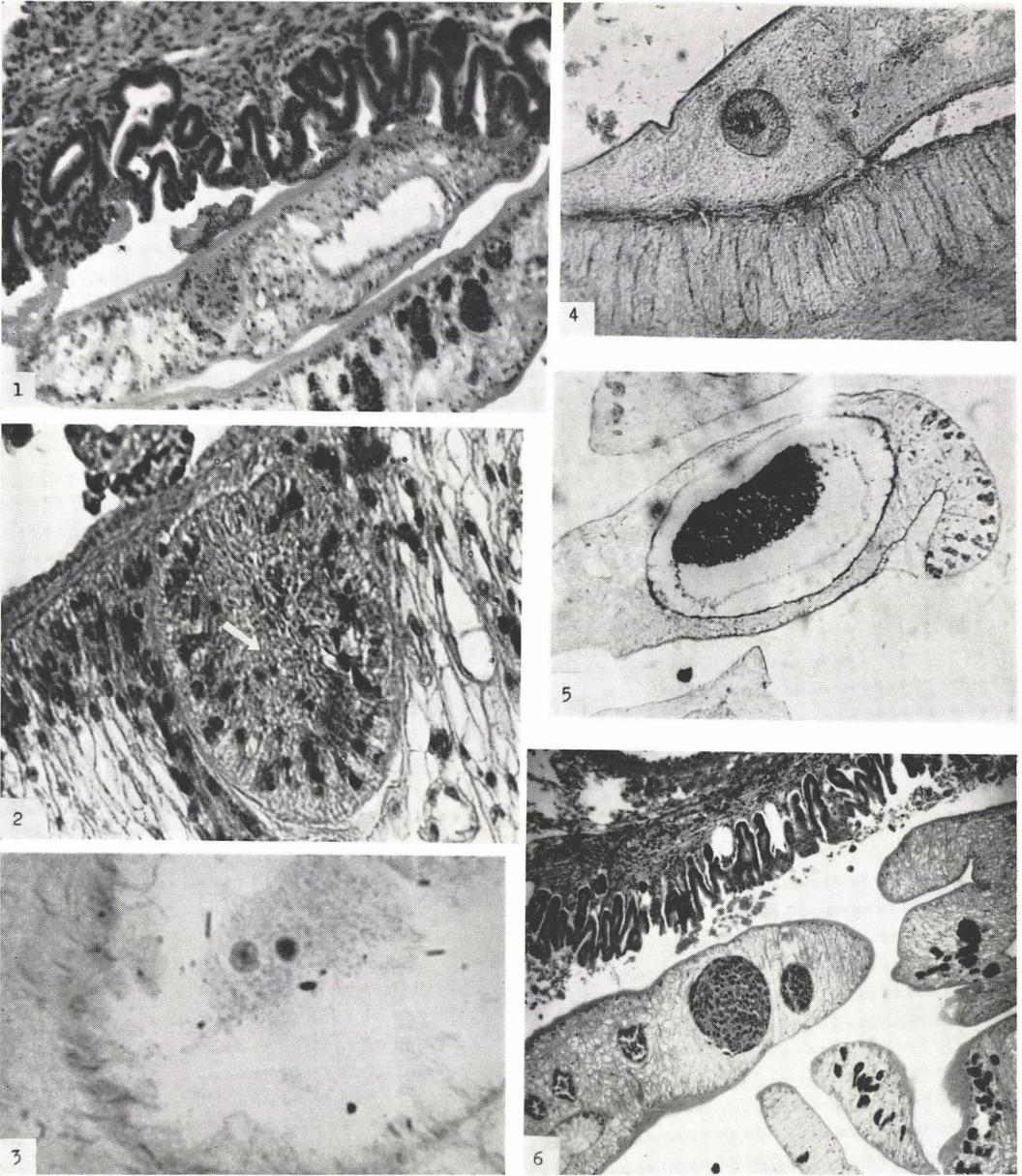


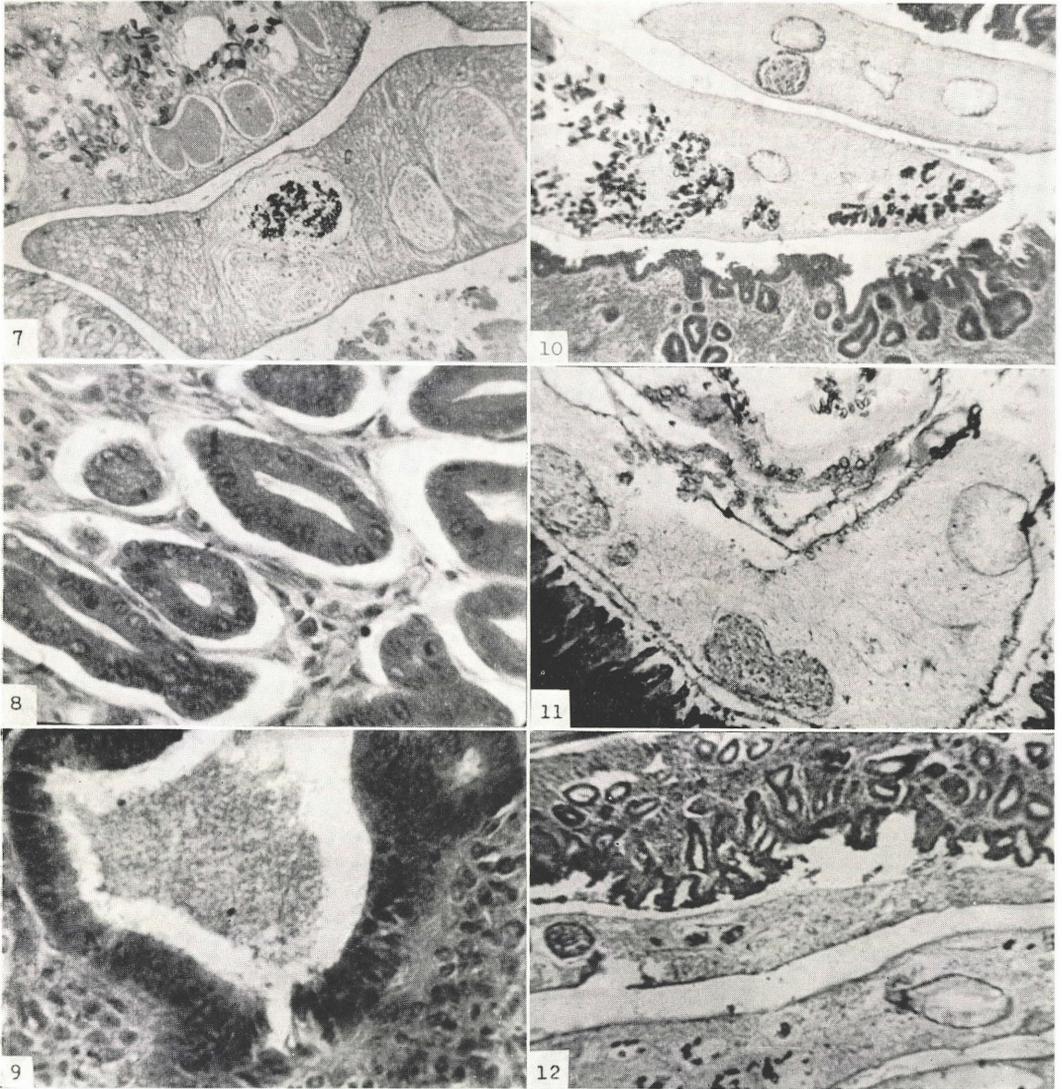
Fig. 1. Adenomatous proliferation of the bile duct and the exsudates mostly composed of mucinous substance, red cells and cellular debris in the lumen of the bile duct harboring the juvenile liver fluke.

Fig. 2. Oral sucker and its vicinity of the young fluke 15 days after infection. Note the mucous and cell elements near by the fluke and the feature of ingestion of the cellular elements (arrow) through the oral sucker.

Fig. 3. Enlargement of the intestine and its contents of the worm 11 days after infection. Note the cellular elements or fragments presumable epithel of bile duct or blood cells.

Fig. 4. Lipid-staining: Sudanophilic granules detected in the lumen and the wall of the intestine of mature worm. Also the bile duct epithels have the sudanophilic granules.

Fig. 5. Hemoglobin-reaction: The epithels and the masses in the lumen of the digestive canal of



- the fluke are strongly positive for hemoglobin staining by Ralph.
- Fig. 6. Tropaeolin O-staining for the basic protein: Vitelline glands, ovary and intestinal wall give the strong positive reaction.
- Fig. 7. PAS-staining for polysaccharides: The fluke eggs, subcuticular layer, reticular tissue, reproductive organs and intestinal epithels indicate the moderate positive reaction.
- Fig. 8. PAS-staining: Adenomatous hyperplasia of the bile duct showing strongly positive reaction for polysaccharides.
- Fig. 9. Mucin-staining (Mayer's): The mucin substances detected richly in the epithels and also the lumen of the bile duct showing the proliferation.
- Fig. 10. Methylgreen and pylonin staining for RNA: Note the positive reaction in the vitellin glands, genital organs and intestinal wall of the adult worm.
- Fig. 11. Alkaline-phosphatase: Cuticle, subcuticular layer, reproductive organs and intestinal wall give the positive reaction. Note the strong reaction is seen in the epithels of the bile duct and its vicinity with the inflammatory responses.
- Fig. 12. Acid-phosphatase: Intestinal epithels, reproductive organs and eggs indicate the positive reaction.

び周囲炎の増強、胆管内出血像、胆管上皮の剝離と好中球の滲出、胆管上皮の重層扁平化、肝細胞索の胆管腔拡大による圧排性萎縮がみとめられる。

15日後 11日病変と略々同様であるが、更に胆管におけるカタル性炎症像の増強がみとめられる。腔内にコロイド様または無構造ムチン様物質の集積が多い。総輸胆管内虫体は、明らかに虫卵を包蔵する。腺様増殖または乳嘴状増殖像は更に増強する。

20日後 主として胆管を中心とした上記病変は更に増強し、胆管腔の著しい拡大と上皮の増殖が著明となり滲出性カタル性病変である。

30日後 胆管周囲の炎症像はより慢性化し増殖性線維性胆管周囲炎となり、間質組織の増殖は、肝硬変の過程にある。滲出性変化はかなりすくなくなり出血像もみとめない。腺様増殖の像は典型化する。

考 察

肝吸虫の終宿主としては人以外に、犬、猫、家兎、モルモット、マウスおよびラット等があげられ、何れもこれ等宿主内では略々1カ月前後で成熟産卵することが明らかにされている。この様な終宿主体内における急速な発育または成熟には当然、虫体は宿主内において一定の規則性のもとに旺盛な生化学的、組織化学的あるいは酵素化学的物質代謝の過程が進展すると考えられるがこの点についての研究は甚だすくない。殊に本吸虫が胆汁という特殊な生活メデウムの中に寄生して発育産卵を長年月にわたって営む生物学的機構については、未だ全く不明といつてよい。Faust & Khaw(1927)は、すでに肝吸虫の食物として、通常胆管からの分泌が役立つのであろうと推察し、殊に多数の肝吸虫寄生に基づく胆管の増殖性変化は、虫体の要求する栄養物の提供に合目的性であると述べ、Hsü (1938)もまたこの説に同意し肝吸虫の腸管内に鉄反応陽性物質の存在をみとめ、その由来を赤血球にもとめ、同時に多核白血球等、滲出細胞の混在する場合のあることから、肝吸虫の食物としての意義を論じている。最近 Ben Dawes(1962, 1964)は、肝蛭について、その幼虫の肝組織内穿通の時期における病理学的変化や、侵入虫体の腸管壁の細胞形態学変化ならびに、腸管内容物について仔細に観察し、本吸虫の栄養(nutrition) あるいは食物(food)について興味ある考察を行っている。著者らは、ここにラット体内の肝吸虫の発育虫体について各種の組織化学的検索を行うとともに、寄生部位における病理組織学的変化をも感染後2日より

30日に至る期間において観察した。その結果は組織化学的所見の中では発育期にある虫体、殊に感染後6日より15日の虫体において腸管内及び腸管壁には強い脂質反応がみとめられ、時にそれらにはヘモグロビン反応が陽性にみとめられた。多糖類の分布は広くみられたが、ことに腸管内容物にムチン物質の存在が明らかに推察され、蛋白反応も陽性を示し、腸壁にはアルカリおよび酸性フォスファターゼが証明された。これ等の反応の強弱または量的変動については、感染時期とかなり密接な関係がうかがわれたが、ことに胆管におけるカタル性、出血性、或いは滲出性炎症の惹起された時期において上述の虫体の腸管内容物の組織化学的反応がよく一致して出現した。腸管内容物は明らかに寄生胆管およびその周囲組織からの細胞または液状成分に由来するものであろうと推察された。

肝吸虫体内に分布する糖質、殊にグリコゲンを中心とし、更に胆管上皮細胞の機能的昂進を思わせるムチン物質の虫体内摂取の生機的意義やその過程についてはなお推測の域を出ないが、横川・吉村(1957)、吉村・横川(1958)等が、肺吸虫について考察した様に、肝吸虫においてもまたこれが腸管壁や角皮を通して組織内にとりこまれ、或いは肝吸虫が胆管内滲出細胞成分である赤血球、好中球或いは胆管上皮細胞の如くグリコゲン含有細胞成分を利用して栄養源として活用しうることも容易に推察される。脂質の生機的意義についてはなお不明な点が多いが、含水炭素の代謝に直接または間接的な意義を有するものと思われる。本吸虫の生活環境である胆汁、すなわち胆汁酸、コレステリンおよびレチンを中心とするメデウム内に生活をいとむ点から、脂肪殊に胆汁内脂質の発育生存への関与が充分推察される。ヘモグロビンについては、先述の如く、主として出血性病変の際に消化管にとりこまれた血球由来のものと思われるが、その栄養素としての意義や、ペルオキシダーゼ活性との関連性においても興味がある。その他、RNA、DNA、蛋白体やフォスファターゼの各組織分布から考察して、そこには糖質、および脂肪代謝、更には蛋白合成等の生化学的過程が、フォスファターゼの如き磷酸関与の酵素系とからみ合つて、複雑な動きがあるものと思われる。尚、本実験から示された様に、虫体の各種の組織化学的反応は、胆管における病理学的変化と密接な関係を有し、肝吸虫の発育または成熟に必要な栄養素の供給または摂取に因果的な役割を充分察知しうる。

むすび

肝吸虫をラットに感染せしめ、感染後2日より30日の種々の期間に屠殺剖見し、組織内殊に胆管内寄生虫体について各種の組織化学的反應を行つた。その結果、發育期にある幼虫または幼成虫の腸管内およびその上皮細胞には、豊富な脂質がみつめられ、時にヘモグロビン反應、グリコゲン及びムチン反應に陽性の物質の他に胆管上皮細胞、その他、炎症細胞がみつめられた。その他、RNA, DNA, 塩基性蛋白体、フォスファターゼ等の虫体内分布も同時に明らかにされた。しかもこれらの組織化学的反應の出現程度は、寄生部位、殊に胆管における病変と密接な関連性がうかがわれ、肝吸虫の發育または栄養という観点から考察がなされた。

終りに本研究に終始御懇篤な御指導と御鞭撻を戴いた横川宗雄教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Ben Dawes (1962): A histological study of the caecal epithelium of *Fasciola hepatica*. Parasit., 52, 403-493.
- 2) Ben Dawes (1964): Fascioliasis. The invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. Advances in Parasitology, 2, 97-164. Academic Press, London and New York.
- 3) Faust, E. C. & Khaw, O. K. (1927): Studies on *Clonorchis sinensis* (Cobbold). Am. J. Hyg. Monogr. Ser., No. 8, 289 pp.
- 4) Hsü, H. F. (1938): Studies on certain problems of *Clonorchis sinensis*. V. On the food of *Clonorchis sinensis*. Compt. Rend. d. Congress de la F.E.A.T.M. Hanoi, 637-641.
- 5) 小林晴治郎(1912): 肝臓ダストマの研究(本報). 細菌学雑誌, 202, 597-662.
- 6) Kamiya Y. & Kawana-Tajimi T. The development of the excretory system of *Clonorchis sinensis* in its definitive host. Jap. J. Med. Sci & Biol., 6(6), 571-575.
- 7) 桑田猛(1958): 実験的肝吸虫症の研究, とくに肝における組織化学的变化について. 四国医誌, 12(1), 28-57.
- 8) Rogers, W. P. (1947): Histochemical distribution of alkaline phosphatase in helminthic parasites. Nature, 159, 374-375.
- 9) 沢田卓(1925): 吸虫類發育各階梯における糖原質及び脂肪の顕微化学的研究. 愛知医誌, 32, 801-856, 1088-1133.
- 10) 高木一孝(1962): 肝吸虫症の治療に関する研究—アンチモン及び沃化チアザニン投与による虫体の変化について. 四国医誌, 18(1), 1-37.
- 11) Wykoff, D. E. (1958): Studies on *Clonorchis sinensis*. III. The host-parasite relations in the rabbit and observation on the relative susceptibility of certain laboratory hosts. J. Parasit., 44(5), 461-466.
- 12) 横川宗雄・吉村裕之(1957): 肺吸虫の生理(II). 組織化学的にみた肺吸虫卵卵殻とその形成機転に関する考察. 寄生虫誌, 6(6), 48-56.
- 13) 吉村裕之・横川宗雄(1958): 肺吸虫の生理(III). ウェステルマン肺吸虫(*Pargonimus mestermani* Kerbert, 1878)の組織化学—特に糖質, 核酸及びフォスファターゼの分布. 寄生虫誌, 7(4), 363-369.
- 14) 吉村裕之・荒木国興・蔡昭雄(1965): 肝吸虫の生理(1). 肝吸虫のラット体内における發育について. 寄生虫誌, 14(4), 437-444.

PHYSIOLOGICAL STUDY OF *CLONORCHIS SINENSIS*
II. HISTOCHEMICAL ASPECT OF THE DEVELOPMENT OF THE
LIVER FLUKE IN THE EXPERIMENTALLY INFECTED RATS

HIROYUKI YOSHIMURA

(*Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba
University, Chiba, Japan*)

Histochemical study on the liver fluke, *Clonorchis sinensis*, living in the bile duct of the experimentally infected rats was carried out in the various periods from 2 to 30 days after infection.

Sudanophilic granules which might be possibly considered as lipid substances were abundantly found in the intestinal lumen and epithels of the juvenile flukes.

Hemoglobin reaction was occasionally proved in the contents of the intestinal cavity of the young flukes.

Glycogen, mucine, the desquamative epithels of the bile duct and inflammatory cells were seen in the intestinal lumen of the some juvenile or adult worms.

Alkaline and acid phosphatases closely relating to the distribution of polysaccharides, lipids, RNA, DNA and basic protein were found in the various tissues of the worms as shown in Table I and microphotographs.

The rapid development of the liver fluke in the rat was illustrated and discussed histochemically.