

小形条虫 (*Hymenolepis nana*) 幼若成虫の 感染マウス血清中における沈降物形成

中村文規 松沢和世 浅野和仁
鈴木博子 村越里江 岡本謙一

(昭和56年4月24日 受領)

Key words: *Hymenolepis nana*, *in vitro*, excysted juvenile, precipitates,
infected-mouse serum

はじめに

Bachman (1928) の *Trichinella spiralis* 幼虫を用いた観察以来, ある種の寄生虫感染を受けた宿主の血清中にその寄生虫虫体を浸漬すると, 虫体表面あるいは開口部に沈降物が形成されるという報告は数多くなされてきた. 線虫類における Sarles (1938), Otto (1940) らの報告がその代表的なものであるが, また Manson 住血吸虫における Oliver-González (1954), Papirmeister and Bang (1948) の報告も同様の範ちゅうに入るものと考えられよう. 条虫由来の成分による感作に伴って生ずる *in vitro* における血清内沈降物形成反応は, Heyneman and Welsh (1959), Herd (1976) によつて報告された. そのうち, 前者は小形条虫虫体ホモジェネートで免疫した家兎血清中に脱囊後間もない幼虫を入れるとその虫体周辺部に沈降物が生じ, 虫体は間もなく死に至ることを観察したものである. しかし, これまでのところ, 小形条虫感染マウス血清中では, 虫体の可視的变化は報告されていない (Weinman, 1966). 小形条虫虫体ホモジェネートで免疫した家兎の血清と, 感染を受けたマウスの血清とでは, 抗体としての免疫グロブリンに質的な差があるとする報告もある (Coleman *et al.*, 1968). しかし, 近年, エジプトにおける Phlyctenular eye disease の症状を呈する小児の血清が, *in vitro* で例外なく小形条虫虫体片節周囲に沈降物を形成し, 片節を崩壊させること, さらに, その患児の半数以上に小形条虫の感染がみとめられることが報告された (Khalaf *et al.*, 1979). 著者らは, 小形条虫感染マウスの血清中に, 生体外にとり出した脱囊直後の小形条虫

幼若虫体 (以後「幼若虫」と称す.) を浸漬し, 48時間 にわたつて incubate し, 虫体周囲の泡状沈降物形成の有無を調べた. 更に投与虫卵数, 採血時期を変えて得た血清を用いたときの沈降物形成状態を調べると共に, 宿主マウス腸絨毛由来の幼若虫体と昆虫由来の擬囊尾虫より得た幼若虫体とを用いて沈降物形成の比較も試みた. 以下これらの結果を報告する.

材料と方法

宿主: 血清採取用並びに幼若虫体採取用に用意したマウスは, すべて当教室で生産飼育した7週齢以上の未感染 ICR マウスの雌雄である. また擬囊尾虫採取に用いた昆虫は, 小鳥餌料として市販されている“ミルウォーム” (*Tenebrio* 属甲虫幼虫) を成育させて得た成虫 (以後, 「甲虫」と略称する) である.

寄生虫: この実験で使用した小形条虫は, 当教室でマウスに虫卵を経口投与することにより長年継代維持されているものである. 感染に用いた虫卵は, マウス小腸管腔よりとり出した成虫虫体を碎砕して得たもので, Berntzen and Voge (1965) の方法で脱殻したもの (以後, 「脱殻虫卵」と称する) である.

小形条虫感染マウス血清: まず, 105 匹の未感染マウスを, 投与虫卵数を変えた3群, A, B, C に分けた. A群には50個/匹, B群には500個/匹, C群には5,000個/匹の脱殻虫卵を経口投与した. 次に, 虫卵投与後それぞれ1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ならびに10週目にA群に属するマウス5~7匹ずつをエーテル麻酔下に開腹開胸し, 腸管内条虫感染を確認の上, 心臓より採血, 更にB群並びにC群のマウスからは, 虫卵投与後各2, 3, 4, 6週後に同じく採血を行ない, 血清を得た (以下, 例えば

50個虫卵投与後3週目に採血して得た血清を50 E・3W血清のように記す)。感染後のマウスは、雌雄を隔離して飼養したが、血清は雌雄の別なくマウスの各群より得たものを混合し、使用時迄-20Cで凍結保存した。また、対照として未感染マウスから同様の方法で採血し保存しておいた血清を用いた。血清は、次項の非働化試験に用いたものを除き、非働化せずに使用した。

血清の非働化：血清中補体の関与の有無を調べるため、50E・4W血清、50E・7W血清、500E・4W血清を、それぞれ56C 30分間加熱した後、少くとも3日間凍結保存したものを用いた。対照としては、同一各群の血清を同一条件で保存したものを用いた。

マウス由来幼若虫採取：未感染マウスに35,000~50,000個/匹の脱殻虫卵を経口投与して約120時間後に、当該マウスの小腸管腔内より、脱囊後間もない幼若虫(未分節の頭節)を生理的食塩水中に遊離させ、時計皿中で洗滌して夾雑物を除いた後、時計皿中央付近に沈んだ虫体を集めた。

甲虫由来擬囊尾虫虫体採取及び脱囊：甲虫1個体あたり1,000個の脱殻虫卵を含むように調製して全容量0.1ml以下とした虫卵浮遊液と小指頭大のリンゴ片とを混じり、1~2日間絶食させた20~30個体の甲虫に摂食せしめた。20分間乃至数時間内に、虫卵を含むリンゴ片は、全量が摂取された。その後、これらの甲虫を7~14日間、通常の飼料を与えて30Cの孵卵器内で飼育した後、発育した擬囊尾虫を甲虫体内より洗い出し、鏡検下でピペットを用い、生理的食塩水中に集めた。このようにして集めた擬囊尾虫を、更にSinha and Hopkins (1967)の方法で人工的に脱囊させた。その後時計皿を用いて生理的食塩水中で虫体以外の囊壁片等を取り除き、時計皿中央付近に沈んだ虫体(以後、「甲虫由来幼若虫」と称す。)を集めた。

虫体の洗滌方法と反応試験法：宿主体外に取り出した幼若虫虫体を数日間にわたり *in vitro* で維持するために、以下のような方法で虫体を無菌化する操作を施した。抗生物質(硫酸ストレプトマイシン300 μ g/ml, ペニシリンGカリウム300U/ml, Amphotericin B 20 μ g/ml)を含むHanksの塩類溶液に虫体を懸濁させ、10ml容蓋付円錐試験管中で30分間(2回目以降15分間)静置し、上清を廃棄後容器を替えて再び新しく抗生物質含有Hanks塩類溶液に虫体を浸漬する操作を計6回繰り返した。次に、抗生物質を含みぬHanks塩類溶液中に浸漬し、同液1滴中に8~15隻の虫体が含まれるような虫体浮遊液を調製した。直径35mmのカレルびん(池本理化

製)に濾過滅菌した被検血清約1mlを入れ、更に上記の虫体浮遊液1滴を添加密栓し、37Cの孵卵器内で48時間静置した後、倒立顕微鏡で虫体を観察した。稀釈血清中において反応試験を行なうには、NCTC 135(GIBCO製・粉末)培地により、被験血清を連続倍数稀釈しその各段階の稀釈血清約1mlと上記の虫体浮遊液1滴とをカレルびんに入れ、ただちに混合ガス(95%N:5%CO₂)を通気して密栓し、37C 48時間 incubate した後、倒立顕微鏡で虫体を観察した。また虫体の撮影にあたっては、位相差装置を併用した。

結 果

投与虫卵数と、虫卵投与後の経過日数を変えたマウスより得た種々の血清中での沈降物形成反応の現われ方の違いをTable 1に示した。同Tableでは、虫体周囲の沈降物出現程度の違いを、「-」、「±」、「+」、「++」の4段階に分けて示してある。「-」は、虫体体側に沈降物形成を全く認めなかったもの(Plate 1-a)、「±」は、吸盤周辺部のみに僅かに沈降物を認めたもの(Plate 1-b)、「+」は、虫体前半部体側に沿って沈降物の現われたもの(Plate 1-c)、「++」は、虫体体側に沿って、その尾端にまで達する沈降物が一層あるいは数層形成されたもの(Plate 1-d)であることを示している。なお、未感染血清を含め、実験に用いた全てのマウス血清中での幼若虫の可視的反応は、実験時間中では沈降物形成の有無のみであり、その他の溶解反応及び虫体の運動停止等の変化は認められなかった。

マウス由来幼若虫は、各正常補体感染血清中で以下の反応を示した。虫卵投与時より2週経過後に得た血清では、5,000E・2W血清中においてのみ沈降物を形成した。また、3週目に採血して得た血清のうち、500E・3W血清5,000E・3W血清中では、虫体は明らかな沈降物を形成したが、50E・3W血清中で形成した沈降物は微量(±)であった。50個虫卵投与群マウスより得た血清のうち、4~7週及び10週目に採取された全ての血清中で、虫体は明瞭な沈降物を形成した。

甲虫由来幼若虫を用いた反応試験は、50個虫卵投与群マウスより得た血清のうち、1~5週、7週及び10週を経過してから採取された血清を用いて行なった。その結果とマウス由来幼若虫を用いて行なった反応試験の結果とを比較したが、両者の間に著しい反応の相異を認めることはできなかった。

一方、沈降物形成をもたらす血清で、前述の指標で「+」の反応を生ずるに充分な最大稀釈倍数を、Table 1

Table 1 Precipitate formation around the juveniles of *Hymenolepis nana* in infected mouse serum

Serum pool No.	Infecting dose of eggs/mouse	Serum collected (weeks postinfection)	Precipitate formation* around the juveniles from mouse and beetle	
1(controls)	0	—	—	—
2	50	1	—	—
3	50	2	—	—
4	50	3	±	±
5	50	4	+(4)†	+
6	50	5	+	+
7	50	6	+(8)	nt‡
8	50	7	‡	‡
9	50	10	‡	‡
10	500	2	±	nt
11	500	3	+	nt
12	500	4	+(8)	nt
13	500	6	‡	nt
14	5,000	2	+	nt
15	5,000	3	+	nt
16	5,000	4	+(16)	nt
17	5,000	6	‡(64)	nt

* — : non-reactive

± : weakly reactive only around the sucker

± : reactive on the anterior half of the body surface

‡ : extensively reactive all around the body surface

† Figures in the parentheses show the highest dilution in which the "±" reaction was observed

‡ not tested

中の () 内に併記してあるが、投与虫卵数が等しい場合は、虫卵投与後4週目に得た血清よりも、同6週目に得た血清で、沈降物形成の起こる稀釈倍数は大きい。また、50E・6W 血清よりも5,000E・6W 血清の方が、その稀釈倍数は大となっている。しかし、虫卵投与後4週を経たマウスより得た血清では、投与虫卵数による差異は明らかではない。

血清の非働化による沈降物形成反応への影響は、50E・4W 血清、50E・7W 血清及び500E・4W 血清のそれぞれを2分し、その各一方を加熱非働化して調べたが、正常補体血清と同様の沈降物形成反応が認められた。

考 察

今回、著者らは、小形条虫感染後一定期間を経たマウス血清中に本条虫幼若虫(片節未形成虫体)を浸漬すると、虫体側縁に泡状の沈降物が生ずる反応を認めた(Plate 1-b, c, d)。この感染マウス血清中に浸漬した幼若虫

体辺縁に認められる反応は、少なくとも実験時間(48時間)中には虫体そのものの崩壊や運動停止をもたらすものではない。このような小形条虫感染宿主血清と本条虫虫体との関連を調べた報告はすでに Weinman (1966) によつてなされているが、彼の示し得た結果は、感染マウス血清中に虫体を浸漬しても虫体の崩壊死滅には至らない、ということにとどまるのみで、沈降物の形成される反応については言及されていない。今回示された感染マウス血清による虫体周辺部の沈降物形成、特に投与虫卵数や感染経過日数に依存してその程度に差を示すような反応は、著者らが認める範囲では、これまでに報告されたことのない現象である。

Echinococcus 属の成虫及び原頭節を用いた各種動物正常補体血清中での溶解反応は、Herd (1976)、神谷ら(1980)によつて報告された。特に条虫成虫体の体外培養上清内物質を抗原として感作して得た犬正常補体血清中では、成虫体の溶解及び沈降物形成の両反応が認めら

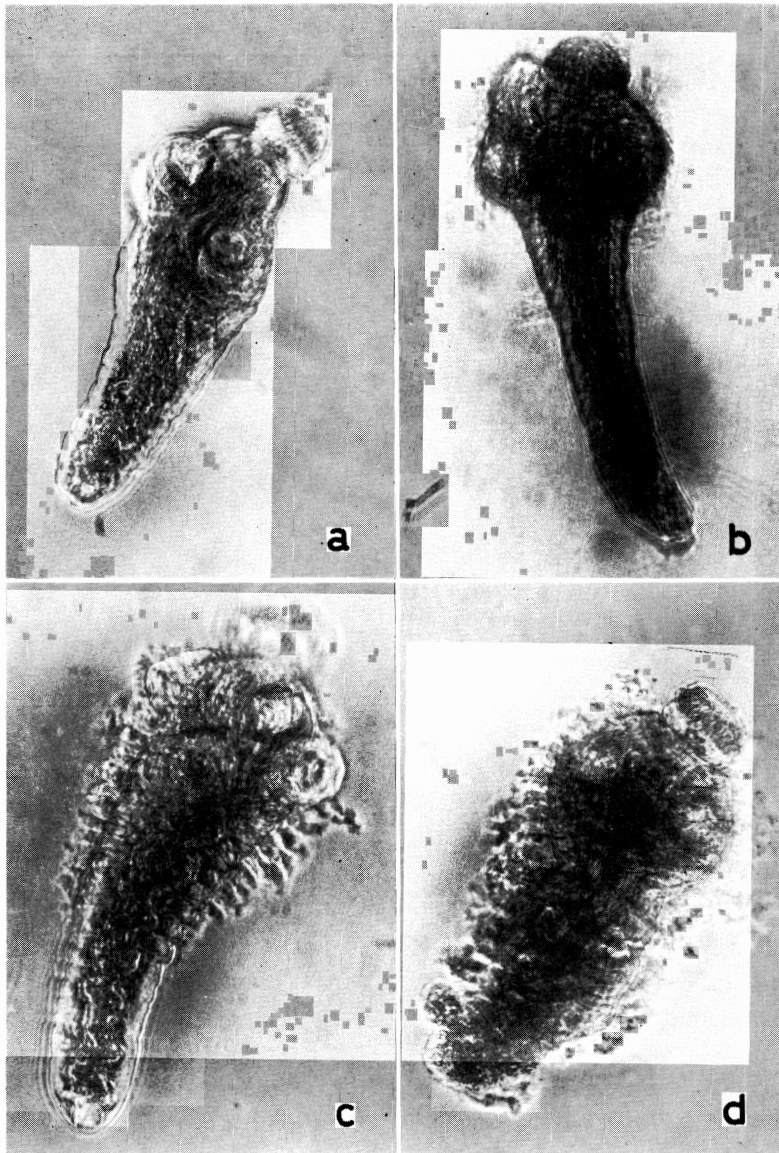


Plate 1 Phase-contrast photomicrographs of precipitate formation around the juveniles of *Hymenolepis nana* incubated for 48 hours at 37 C in

- a, serum from non-infected mice, non-reactive ;
- b, serum obtained from mice 3 weeks after infection with 50 *H. nana* eggs per mouse, weakly reactive ;
- c, serum obtained from mice 4 weeks after infection with 500 *H. nana* eggs per mouse, reactive on the anterior half of the body surface ;
- d, serum obtained from mice 6 weeks after infection with 5,000 *H. nana* eggs per mouse, extensively reactive all around the body surface.

れるという (Herd, 1976). しかし, 小形条虫について今回調べたところによれば, 感染マウス正常補体血清中でも, 同非働化血清中でも, 同程度の沈降物形成反応のみが観察された. 一方, 虫体の溶解反応は, ラット正常補体血清中で認められた (中村ら, 未発表). しかしこの反応は血清を加熱非働化すると起こらなくなる. また, その際ラット非働化血清中の虫体は沈降物を形成しない. 従つて, 小形条虫幼若虫体に対する感染宿主 (マウス) 血清の作用は, 補体が関与せずに生ずる沈降物形成反応として, またラット正常補体血清の作用は, 補体が関与する溶解反応として現われるものと示唆される. しかし, これらの反応の機序に関しては, 今後の検討を要する.

感染によつて宿主血清成分に変化が生ずるとすれば, 第一に考えられるものはその成分である抗体であろう. すでに, 小形条虫成虫体表に宿主抗体が付着する現象 (Coleman and Fotorny, 1962) や, 宿主血清中に成虫体成分に対する抗体を間接赤血球凝集反応及び補体結合反応を用いて検出できること (Coleman and DeSa, 1964, Coleman *et al.*, 1968) は報告されている. しかし, 感染宿主体内で産生される抗体成分が成虫虫体に対してどのような影響を与えるかについては, 詳らかにされていない. 小形条虫成虫体ホモジェネートで感作された家兎血清中に幼若虫体を浸漬すると間もなく沈降物が形成され, 虫体は20分後に死に至るという報告 (Heyneman and Welsh, 1959) があるが, 家兎を虫体成分で人為的に感作して得られる血中抗体は主に IgG であり, また虫卵で感染を受けたマウスより得た血清中の抗体は大部分が IgM であると考えられている (Coleman *et al.*, 1968). 著者らが本論文で示した感染マウス血清中の虫体周囲沈降物形成反応をひき起こす物質を決定することは, 感染持続期間等の感染状態とも関連して今後の検討を要する課題である.

要 約

小形条虫虫卵を経口投与した宿主マウスより得た血清が, 宿主体外にとり出した幼若虫体に及ぼす影響を調べ, 次の結果を得た.

1) 小形条虫感染マウス血清中に, 脱囊直後の本条虫幼若虫体を浸漬すると, 37°C で48時間以内に虫体周縁に沿つて泡状の沈降物が形成される. しかし, 未感染マウス正常補体血清中では, 虫体の可視的変化は起きない.

2) この反応の程度は, 血清を提供する宿主における

投与虫卵数と, 虫卵投与後の経過日数により左右され, 明らかに感染による宿主血清の変化を反映している.

3) マウス腸管由来の虫体と, 甲虫 (中間宿主) 由来の虫体とを用いたときの反応の間には相異が認められない.

4) 非働化した感染マウス血清を用いても, この反応は認められる.

この沈降物形成反応の意義について若干の考察を試みた.

謝 辞

本研究にあたり, 培養びん内で運動中の虫体のストロボ写真撮影を可能にして下さつたモデルン写真光房店主・中島崇次氏に深謝致します.

文 献

- 1) Bachman, G. W. (1928) : A precipitin test in experimental trichiniasis. *Jour. Prev. Med.*, 2, 35-48.
- 2) Berntzen, A. K. and Voge, M. (1965) : *In vitro* hatching of oncospheres of four Hymenolepidid cestodes, *J. Parasitol.*, 50, 235-242.
- 3) Coleman, R. M. and Fotorny, N. M. (1962) : *In vivo* isolation of *Hymenolepis nana* and antibody-binding sites. *Nature*, 195, 920-921.
- 4) Coleman, R. M. and Lauretta, M. deSa. (1964) : Host response to implanted adult *Hymenolepis nana*. *J. Parasitol.*, 50 (Suppl.), Sec. 2, 17.
- 5) Coleman, R. M., Carty, J. M. and Graziadei, W. D. (1968) : Immunogenicity and phylogenetic relationship of tapeworm antigen produced by *Hymenolepis nana* and *Hymenolepis diminuta*. *Immunol.* 15, 297-304.
- 6) Herd, R. P. (1976) : The cestocidal effect of complement in normal and immune sera *in vitro*. *Parasitol.*, 72, 325-334.
- 7) Heyneman, D. and Welsh, J. F. (1959) : Action of homologous antiserum *in vitro* against life-cycle stages of *Hymenolepis nana*, the dwarf mouse tapeworm. *Expl. Parasitol.*, 8, 119-128.
- 8) 神谷晴夫・神谷正男・大林正士 (1980) : 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析 2. 寄生虫誌, 29, 169-179.
- 9) Khalaf, M., Al-Hussaini, Khalifa, R., Al-Ansary, A. T. A., Hussain, G. H. and Moustafa, A. K. M. (1979) : Phlyctenular

- eye disease in association with *Hymenolepis nana* in Egypt. Br. J. Ophthalmol., 63, 627-631.
- 10) Oliver-Gonzalez, J. (1965) : Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. J. Inf. Dis., 95, 86-91.
 - 11) Otto, G. F. (1940) : A serum antibody in dogs actively immunized against the hookworm *Ancylostoma caninum*. Am. J. Hyg., 31, 23-27.
 - 12) Papirmeister, B. and Bang, F. B. (1948) : The *in vitro* action of immune serum on cercariae of *S. mansoni*. Am. J. Hyg., 48, 74-80.
 - 13) Sarles, M. P. (1938) : The *in vitro* action of immune rat serum on the Nematode, *Nippostrongylus muris*. J. Inf. Dis., 62, 337-348.
 - 14) Sinha, D. P. and Hopkins, C. A. (1967) : *In vitro* cultivation of the tapeworm *Hymenolepis nana* from larva to adult. Nature, 215, 1275-1276.
 - 15) Weinman, C. J. (1966) : Immunity mechanisms in Cestoda infections. In Biology of Parasites, ed. by J. L. Soulsby, Academic Press, London and New York, 301-320.

Abstract

THE *IN VITRO* PRECIPITATION AROUND THE JUVENILES OF
HYMENOLEPIS NANA IN THE SERA FROM INFECTED MICE

FUMINORI NAKAMURA, KAZUYO MATSUZAWA,
KAZUHITO ASANO, HIROKO SUZUKI,
SATOE MURAKOSHI AND KENICHI OKAMOTO
(*Department of Medical Biology, School of Medicine,
Showa University, Tokyo Japan*)

Formation of precipitates was observed around living excysted-juveniles (scolex) of *Hymenolepis nana* when they were placed in serum from infected mice and incubated at 37 C for 48 hours. Sera obtained from non-infected controls had no reactivity to develop such precipitates around juveniles. In the present study, such precipitation reactions scored according to the degree of precipitation and the titers of some serum pools were assayed by using twofold serial dilutions. The serum pool obtained from about 5 - 7 mice, each administered orally with 50 shell-free eggs of *H. nana* and bled out 3 weeks after infection, was weakly reactive with both the juveniles derived from mice and those from beetles. Such reactivity retained even in mouse serum pool obtained 10 weeks after infection with 50 eggs. The serum pools from mice infected with 5,000 eggs became reactive as early as the second week of infection. In the serum pool obtained 6 weeks after 5,000-egg administration, precipitates formation was positive at the highest dilution, 1 : 64. Heat-inactivated serum from infected mice retained activity to form precipitates around the worm.