

多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析

IV. 補体による多包虫原頭節・多包条虫の 溶解現象の走査電子顕微鏡による観察

神谷晴夫* 福本真一郎† 奥祐三郎†

(昭和57年5月31日 受領)

Key words: *Echinococcus multilocularis*, complement, lytic effect, scanning electron microscope

多包虫 (*Echinococcus multilocularis*) 感染に対する宿主の抵抗性因子として、動物種、系統、年齢、性別、胸腺、補体が関係することが明らかになった (Yamashita *et al.*, 1958; Kamiya, 1972; 神谷, 1973; 神谷ら, 1980 a, b; 神谷・大林, 1981). そのうち、特に補体は、単独で alternative pathway を介し、*in vitro* で多包虫原頭節ならびに多包条虫を溶解 (殺滅) することが示唆された。その溶解現象は光学顕微鏡的には、外皮の膨化 (tegumental bubbling), 次いでこの外皮の破裂にともなつて、虫体原形質様物質が流出し、その後しだいに虫体は沈降物様物質でとり囲まれ、鉤の脱落、運動の停止で溶解が完了する (神谷ら, 1980b). 同様の現象は Kassis and Tanner (1976), Herd (1976), Rickard *et al.* (1977) によつて、多包虫、単包虫・単包条虫 (*Echinococcus granulosus*) で観察されている。また、Kassis *et al.* (1976) は透過電子顕微鏡学的観察を主体にして、若干の走査電子顕微鏡による観察を行つている。今回、多包虫原頭節のみならず、感染後 3, 15, 23日目のイヌより得た多包条虫に対する補体による溶解現象を走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。

材料と方法

使用多包虫・多包条虫: 1956年以来実験動物を用いて継代しているアラスカ株を使用した。多包虫原頭節; スナネズミ、マウスの二次多包虫より採取した。包虫組織をできるだけ宿主成分を含まない状態で採取し、生理食

本研究は文部省科学研究費、一般研究 C (課題番号 56570157) の補助を受けて行われた。記して謝意を表す。

* 秋田大学医学部寄生虫学教室

† 北海道大学獣医学部家畜寄生虫病学教室

塩水またはハンクス液で、補体による溶解作用を防止するためによく洗浄した。その後、100メッシュの金網ですりつぶして、濾過し、同様によく洗浄し、沈殿をくりかえすことによつて原頭節のみを得た。採取原頭節は、ピペッティングをくりかえすことによつて翻転させた。血清と反応前、原頭節はその採集過程において溶解作用をうけていないことを確認して使用した。多包条虫; 感染ラットよりの原頭節を実験的にイヌに経口投与し、感染後 3, 15, 23日目に解剖して採取した虫体を使用した。

溶解作用の手技と観察: 虫体は使用前、リン酸緩衝生理食塩水 (0.15M, pH 7.2; 以下 PBS) で3回よく洗浄して使用した。浅いホールグラスに洗浄した虫体を容れ、補体による強い溶解作用を有するモルモット (JY-1系) の正常補体血清原液 (神谷ら, 1980b) を加え、反応させた。一定時間、血清と反応後の虫体を PBS で静かに洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド液または10% 熱ホルマリン液で固定し、アルコール系列により脱水し、臨界点乾燥 (日立 HCP-1型) 後、金属被覆 (エコー IB-2型) を行い、SEM (明石 MSM-4T型) を用い、15kV で観察した。また、血清無処置虫体も、同様に試料を作製し、観察した。

成績

1. 血清無処置虫体

a. 多包条虫: イヌに感染させて得た正常幼若多包条虫 (感染後3日目) では、虫体のほぼ全面にわたつてマイクロトリックス (microtriches) が認められたが (Fig. 1), その長さは一様ではなく、頭頂部において長く、体後部にゆくにしたがつて短くなつた。また、吸盤は長

いマイクロトリックスに被われ、それ以後、急に短くなった (Figs. 2-5). 体末端部に近い部分では短い未発達のマクロトリックスが認められた (Fig. 6). また、感染後15, 23日目の虫体では、片節形成 (strobilation) により第2, 第3片節が形成され、その体表には同様にマイクロトリックスが認められた。

b. 多包虫原頭節: 正常原頭節の陥入した頭部では、よく発達したマイクロトリックスが認められたが、それ以降の後体部ではマイクロトリックスの発達は極めて貧弱であった (Fig. 7). したがって、陥入した頭部以外のマイクロトリックスは終宿主に感染後、短時間のうちに発達するものと考えられる。

2. 正常補体血清処置虫体

a. 多包虫原頭節: 血清と反応1分後、体表には顕著な皺が出現した。体はそれにとまって著しく収縮した (Fig. 8). 5分後では、体表は沈降物様物質につつまれ、溶解作用によるクレーター状の孔が多数認められた (Fig. 9). マイクロトリックスは不整かつ融解不明瞭となり、体表には無数の蜂巢状の数ミクロンの小孔一頭部、頸部に顕著一が出現した (Figs. 10, 11).

b. 多包条虫: 原頭節の場合と原則的には同様の溶解経過をたどった。血清と反応30分後の虫体では、体は著しく収縮し、片節間の境界が不明瞭となり、マイクロトリックスは融解し、ほぼ全面に沈降物様物質の付着が、原頭節の場合と同様に認められた (Fig. 12). 反応後6時間では、体表はさらに収縮し、不整となり、ほぼ全面にわたって外皮 (tegument) が消失し、多数の小孔が認められ、鉤は脱落した (Figs. 13, 14).

考 察

最近、赤血球や細菌等と異なり、高度に分化した多細胞動物である蠕虫類の中で、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) のセルカリアやシストソミュール (Machado *et al.*, 1975; Ouaisi *et al.*, 1980), 多包虫原頭節, 多包条虫 (Kassis and Tanner, 1976; 神谷ら, 1980b), 単包虫原頭節, 単包条虫 (Herd, 1976; Rickard *et al.*, 1977) が補体により溶解し、死滅することが報告された。しかも、*in vitro* での各種動物の正常補体血清中の多包虫原頭節の溶解現象と *in vivo* での本虫に対する宿主抵抗性の差異との間にほぼ相関々係があることが、系統マウス等を用いた実験から明らかになった (神谷ら, 1980b). また、このことは、補体が、本虫に対する感染初期の宿主抵抗性の発現 (Yamashita *et al.*, 1957, 1960; Baron *et al.*, 1974) に関与していること

を示唆しており、寄生虫感染と補体とのかかわりあいの一端を推測することが出来る。

今回の、補体による多包虫原頭節, 多包条虫の溶解過程の SEM による観察では Kassis *et al.* (1976) のそれと類似していた。多包条虫の溶解過程も、形態的には原頭節の場合と似ており、その作用は両者の場合と同じであることが推測される。このことは、神谷ら (1980b) により、多包虫原頭節, 多包条虫は、ともに alternative pathway を介する補体の活性化により溶解現象が惹起される事実からも裏付けられる。

今回の、補体により形成された体表の多数の小孔は、細菌や赤血球などに対する補体の溶解作用による小孔と比べ (Humphrey and Douramshkin, 1969), 著しく大きかったことは、それらが単細胞であり、多細胞動物である蠕虫類との違いに一因があるかもしれない。しかし、多包虫原頭節, 多包条虫の場合、マイクロトリックスの融解, 原形質膜, tegumental cytoplasm (Sakamoto and Sugimura, 1969), 基底膜 (basement membrane) の破損 (Kassis *et al.*, 1976) 等により、体内の原形質様物質が、虫体の運動につれて、破裂孔よりおしだされ、孔がさらに大きくなったことも考えられよう。特に、このようなマイクロトリックス等虫体体表構造の変化は Conder *et al.* (1981) が報告した、プラジカンテル (praziquantel) の単包条虫に対する作用と形態学的に類似している点は興味深い。

また、陥入した正常原頭節では陥入頭部にのみ、顕著なマイクロトリックスが存在し、露出部 (後体部) ではその発達が極めて貧弱であった (Fig. 7). この形態的な特徴が、Kassis and Tanner (1976), 神谷ら (1980b) が報告した、陥入原頭節では、露出した陥入部の一部から溶解が進行することとの関係—マイクロトリックスとの関係—が考えられよう。また、単包虫原頭節など条虫類の最外層の原形質膜 (external plasma membrane of tegument) には粘液多糖類 (mucopolysaccharide) あるいは、粘性蛋白質 (mucoprotein) で構成された、PAS陽性の “glycocalyx” と呼ばれる層が存在することが知られている (Morseth, 1967; Smyth, 1972). したがって、この “glycocalyx” が、多包虫原頭節, 多包条虫の場合においても、補体活性化の “trigger”, あるいは “receptor” として作用していることが推測される。Williams (1979) は、その総説の中で、条虫感染と補体の役割に言及し、種々の条虫が、補体活性化物質を有していることを指摘しているが、このような物質が、寄生虫側にとつて有利に作用するのか、あるいは今回のよう

に不利に作用するのか、*in vitro*, *in vivo* での宿主-寄生虫相互関係において今後興味の持たれる問題であろう。

また、正常原頭節、多包条虫の観察では、マイクロトリックスが、終宿主感染後、急速に発達することが明らかになった。このような観察が、特異な発育様式を有する包条虫に於いて、幼虫形と成虫形との形態的、機能的関連性を検討するうえからも多くの示唆を与えてくれるものと考えられる。

一方、本虫に対する駆虫薬の開発等で包虫原頭節を用いて実験を計画する場合、補体による溶解作用が短時間で進行することを考慮しておかなければならない。このことは、Swilenov *et al.* (1976) が正常多包虫原頭節のSEMによる観察を行つているが、その中には虫体採取過程で、明らかに補体による溶解作用を受けていると考えられる像があり、使用虫体の採取方法には十分な注意を払う必要がある。

さらに、人臨床面への応用として、今回の観察でも明らかのように補体が短時間で作用する殺条虫効果を有していることから、包虫症手術時、殺条虫・転移(二次包虫症)防止の点から、副作用の強いホルモリンやアルコール等を包虫内に注入する処置がとられているが、これらの薬物のかわりに、補体血清を利用できることが考えられる。

補体は最もプリミティブな包虫感染防御因子であると考えられるが、虫体々表で演じられる宿主-寄生虫相互関係の解明には、*in vitro*, *in vivo* での形態学的、機能学的な今後の研究に待たなければならぬ多くの興味深い問題を含んでいる。

要 約

多包虫原頭節、多包条虫に対する補体による溶解現象をSEMを用いて観察した。

正常原頭節では陥入頭部にマイクロトリックスが認められ、露出後体部では、その発達は極めて貧弱であった。一方、イヌに原頭節を感染させて得た、感染後3, 15, 23日目の多包条虫では、ほぼ体全面にわたつてマイクロトリックスの発達が認められたが、後体部にむかつて短くなつた。

モルモット正常補体血清中の多包虫原頭節では、血清と反応1分後には既に体表は顕著な皺状を呈し、5分後では、体表は沈降物様物質につつまれ、溶解作用による大型のクレーター状の流出孔が出現した。マイクロトリックスは不整となり融解し不明瞭となつた。また、多包

条虫の場合もほぼ同様に溶解現象は推移したが、片節間の境界は不明瞭となつた。反応6時間後では、ほぼ全面にわたつて、外皮が消失し、多数の小孔が出現し、鉤は脱落した。

今回の観察から、補体による溶解作用は当初マイクロトリックスのよく発達した部位で惹起されることが示唆され、補体により虫体体表に形成された小孔は、虫体の自動運動により、虫体原形質様物質が流出し、流出孔が大きくなることが推測された。

稿を終るにあたり、貴重な御助言をいただいた北海道大学獣医学部大林正士教授、神谷正男助教授に深謝致します。

文 献

- 1) Baron, R. W., Rau, M. E. and Tanner, C. E. (1974): Growth of secondary *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected hosts. *Can. J. Zool.*, 52, 587-589.
- 2) Conder, G. A., Marchiondo, A. A. and Andersen, F. L. (1981): Effect of praziquantel on adult *Echinococcus granulosus in vitro*: Scanning electron microscopy. *Z. Parasitenkd.*, 66, 191-199.
- 3) Herd, R. P. (1976): The cestocidal effect of complement in normal and immune sera *in vitro*. *Parasitology*, 72, 325-334.
- 4) Humphrey, J. H. and Douramshkin, R. R. (1969): The lesions in cell membranes caused by complement. *Adv. Immunol.*, 11, 75-115.
- 5) Kamiya, H. (1972): Studies on echinococcosis. XXIV. Age difference in resistance to infection with *Echinococcus multilocularis* in AKR strain of mouse. *Jap. J. Vet. Res.*, 20, 69-76.
- 6) 神谷晴夫(1973): 多包虫感染に対する系統マウスの感受性について. *寄生虫誌*, 22, 294-299.
- 7) 神谷晴夫・神谷正男・大林正士・野村達次(1980 a): 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析. I. 各種げっ歯類, 特にヌードマウスの感受性. *寄生虫誌*, 29, 87-100.
- 8) 神谷晴夫・神谷正男・大林正士(1980 b): 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析. II. 補体による多包虫・多包条虫に対する溶解作用とその作用機序. *寄生虫誌*, 29, 169-179.
- 9) 神谷晴夫・大林正士(1981): 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析. III. 去勢の影響. *寄生虫誌*, 30, 73-79.
- 10) Kassis, A. T. and Tanner, C. E. (1976): The role of complement in hydatid diseases: *In vitro* studies. *Internat. J. Parasit.*, 6, 25-35.

- 11) Kassis, A. T., Goh, S. L. and Tanner, C. E. (1976): Lesions induced by complement *in vitro* on the protoscolexes of *Echinococcus multilocularis*: A study by electron microscopy. *Internat. J. Parasit.*, 6, 199-211.
- 12) Machado, A. J., Gazzinelli, G., Pellegrino, J. and Dias da Silva, W. (1975): *Schistosoma mansoni*: The role of complement C3-activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Exp. Parasit.*, 38, 20-29.
- 13) Moresth, D. J. (1967): The fine structure of the hydatid cyst and the protoscolex of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasit.*, 53, 312-325.
- 14) Ouaisi, M. A., Santoro, F. and Capron, A. (1980): *Schistosoma mansoni*: Ultrastructural damages due to complement on schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasit.*, 50, 74-82.
- 15) Rickard, M. D., Mackinlay, L. M., Kane, G. J., Matossian, R. M. and Smyth, J. D. (1977): Studies on the mechanism of lysis of *Echinococcus granulosus* protoscolexes incubated in normal serum. *J. Helminth.*, 51, 221-228.
- 16) Sakamoto, T. and Sugimura, M. (1969): Studies on echinococcosis. XXI. Electron microscopical observations on general structure of larval tissue of multicellular echinococcus. *Jap. J. Vet. Res.*, 17, 67-80.
- 17) Smyth, J. D. (1972): Changes in the digestive-absorptive surface of cestodes during larval/adult differentiation. *Sym. Br. Soc. Parasit.*, 10, 41-70.
- 18) Swilenov, B., Heymer, B. and Haferkamp, O. (1976): Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Cysten von *Echinococcus multilocularis*. *Z. Parasitenkd.*, 51, 25-29.
- 19) Williams, J. F. (1979): Recent advances in the immunology of cestode infections. *J. Parasit.*, 65, 337-349.
- 20) Yamashita, J., Ohbayashi, M. and Konno, S. (1957): Studies on echinococcosis. VI. Secondary echinococcosis multilocularis in mice. *Jap. J. Vet. Res.*, 5, 197-202.
- 21) Yamashita, J., Ohbayashi, M., Kitamura, Y., Suzuki, K. and Okugi, M. (1958): Studies on echinococcosis. VIII. Experimental echinococcosis multilocularis in various rodents; especially on the difference of susceptibility among uniform strains of the mouse. *Jap. J. Vet. Res.*, 6, 135-155.
- 22) Yamashita, J., Ohbayashi, M. and Sakamoto, T. (1960): Studies on echinococcosis. XI. Observations on secondary echinococcosis. *Jap. J. Vet. Res.*, 8, 315-322.

Abstract

STUDIES ON THE HOST RESISTANCE TO INFECTION WITH
ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS
IV. OBSERVATION OF LESIONS DUE TO THE LYTIC EFFECT OF
COMPLEMENT ON THE PROTOSCOLECES AND PRE-ADULTS
IN VITRO BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

HARUO KAMIYA

(Department of Parasitology, Akita University School of Medicine,
Akita 010, Japan)

SHIN-ICHIRO FUKUMOTO AND YUZABURO OKU

(Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University,
Sapporo 060, Japan)

The lesions induced by complement on the protoscoleces and pre-adults of *Echinococcus multilocularis* in vitro were observed by scanning electron microscope.

Evaginated portion of normal protoscoleces showed well developed microtriches on their surface but these microtriches were almost undeveloped at the posterior portion. Microtriches were also observed on the surface of normal pre-adults collected from dogs at 3, 15 and 23 days after the infection. However, these microtriches became shorter towards the posterior portion of the parasite.

Protoscoleces incubated for 1 minute in normal guinea pig serum contracted distinctly. After 5 minutes of contact with the serum, the surface of the protoscoleces was covered with cytoplasmic materials which leaked out through the many minute as well as the larger crater-shaped pits that were formed on the tegumental surface. The microtriches became disorganized, followed by fusion and can no longer be distinguished anymore. The pre-adults also basically underwent the same lytic process of the complement. The boundary of proglottids became indistinct due to the contraction of their surface after incubation in the guinea pig serum. After 6 hours incubation, the pre-adults lost most of their tegumental structure and many pits were observed on their surface. Their hooks were shed completely.

These observations suggest that the lesions were first induced at the tegument with microtriches, followed by the formation of pits due to complement attack and finally the cytoplasmic materials were forced out through these pits by auto-movement of the worm.

Explanation of Figures

- Figs. 1-6 Scanning electron micrographs of the normal and unsegmented pre-adult of *Echinococcus multilocularis*, collected from a dog at 3 days after the infection.
- Fig. 1 General view.
- Fig. 2 Long microtriches and hooks at the anterior portion.
- Fig. 3 Microtriches of suckers.
- Fig. 4 Higher magnification of the long microtriches of sucker shown in Fig. 3.
- Fig. 5 Relatively short microtriches at the posterior portion.
- Fig. 6 Short undeveloped microtriches at the posterior-most portion.
- Fig. 7 Evaginated protoscolex, showing microtriches at the evaginated portion.
- Figs. 8-14 Scanning electron micrographs of the protoscolex (Figs 8-11) and pre-adult collected from a dog at 15 days after infection (Figs. 12-14), incubated in normal guinea pig serum.
- Fig. 8 Distinct contraction of tegumental surface, after one minute incubation.
- Fig. 9 Cytoplasmic materials and the numerous crater-shaped pits on surface of the protoscolex, after 5 minutes' incubation.
- Fig. 10 Fused and entangled microtriches, after 5 minutes' incubation.
- Fig. 11 Numerous pits on the tegumental surface, after 5 minutes' incubation.
- Fig. 12 Pre-adult covered by cytoplasmic materials, after 30 minutes' incubation. Note the indistinct boundary of the proglottids.
- Fig. 13 Many small pits at the posterior portion, after 6 hours' incubation. Note the disruption of the tegumental structure.
- Fig. 14 Pre-adult shed their hooks and show distinct contraction of the surface, after 6 hours' incubation.



