

ラット腸管内での *Nippostrongylus brasiliensis* の分布, 発育, 産卵に対する異なる接種幼虫数の影響

藤本和義 堀 栄太郎

(昭和63年5月19日受領)

要 約

異なる数の *N. brasiliensis* の感染幼虫をラットに経皮的に接種し、寄生成虫のラット腸管内での分布、発育ならびに産卵状況を観察した。

接種7日から14日までの間の剖検によると成虫の分布は2000匹以下の接種群では小腸上部に限定されたが、4000匹以上の接種群では小腸下部や盲腸にまで広がった。10匹以下の少数接種群では成虫は接種後20日以上にわたり徐々に腸管から減少した。しかし50匹以上の接種群では接種後11日から15日の間に急速に排虫された。

成虫の産卵数は宿主糞便の濾紙培養によって遊出する次世代感染幼虫数を毎日算定して推定した。10匹以下の接種群では次世代幼虫数は接種後の日数の経過とともに徐々に減少したが、50匹以上の接種群では接種後12日から15日までの間に急速にみられなくなった。接種後7日目における1雌1日あたりの平均次世代幼虫数は100匹の接種群で最大値を示し、4000匹の接種群で最小値を示した。

寄生成虫の体長は雌雄とも50匹から100匹の接種群で最大となった。

これらの結果から *N. brasiliensis* の宿主内における分布、発育、産卵に何らかの形で密度効果が作用しているものと考えられる。

Key words: nematoda, *Nippostrongylus brasiliensis*, rat intestine, expulsion, density effect, oviposition

緒 論

著者らは先にラット腸管内での *Orientostrongylus ezoensis* の分布、発育および産卵における投与幼虫数の影響を調べ、投与幼虫数の増加によって、成虫の回収率の低下、虫体の小型化、次世代幼虫数の低下等がみられることを報告した(藤本・堀, 1988)。しかし同じ腸管寄生線虫類でも *Nippostrongylus brasiliensis* は接種幼虫数の増加によって、寄生成虫の寿命は影響を受けるが、虫体長の小型化はみられないという(Haley and Parker, 1961 a, b)。*N. brasiliensis* と *O. ezoensis* は比較的近縁な関係にあり、野外ではしばしば同時に同じ宿主内(ドブネズミ)に見出されることから(Tada, 1975)、この違いは興味深い。

本報では経皮感染型で肺循環をおこなうことが知られている *N. brasiliensis* (Haley, 1962) を材料に実験的に異なる数の感染幼虫をラットに経皮的に接種して寄生成虫の腸管内での分布、発育ならびに産卵状況(産卵数の代わりに糞便培養により遊出させた感染幼虫数を調べた)を観察した。

材料および方法

感染方法と虫体の回収: 実験に用いた *N. brasiliensis* は慈恵医大、寄生虫学教室より分与されたもので、ラットを宿主として累代飼育してきた系統である。実験には顆粒状の活性炭素で培養した感染幼虫(以下単に幼虫)を使い、およそ7週令の雌ラット(Wistar系)の後足上腿部に皮下接種した。接種は接種数5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, の9段階で行い、実体顕微鏡下でラット一匹宛の接種数を数え、1 mlのツベルクリン用シリンジを使っておこなった。

接種後所定の期間(6日~26日)を経たラットは開腹して胃と腸管を取り出し、それぞれについて寄生数を実体顕微鏡下で調べた。腸管は幽門部より順次3 cmの間隔で切断し、各々切開して生理食塩水の入ったシャーレ(径6 cm)に入れ、約40℃の孵卵器の中で虫体を遊離させて雌雄虫体数を計数した。計数後、腸管粘膜に残っている虫体がないか実体顕微鏡下で精査した。尚、成虫の寄生分布の観察に用いたラットは $n=5\sim 10$ の少数幼虫接種群では接種後9日から17日の間、 $n=50\sim 8000$ の接種群では5日から11日の間に剖検した。剖検ラット数は最低3匹、最高19匹であった。

次世代幼虫の計数: 感染ラット内での *N. brasiliensis*

の産卵状況を虫卵の代わりに糞便の試験管内濾紙培養法により遊出させた感染幼虫で観察した。感染ラットの糞便を接種後5日目より毎日採取し、全量あるいはその一部を濾紙培養した。糞便の一部を培養した場合、その重量から比例計算により糞便全量の幼虫数を算定した。培養期間は27~28℃の孵卵器で約1週間とし、試験管の底面に集まった幼虫を実体顕微鏡下で数えた。尚、一部の幼虫は試験管壁や濾紙の先端部に移動しているので、管壁の幼虫は水で洗い落とし、濾紙上の幼虫は実体顕微鏡下で毛筆を使って掃き取り、その数を数えた。

1雌1日あたりの次世代幼虫数は接種後7日目のラッ

トを剖検して得られた寄生雌成虫の数から算定した。

虫体長の計測：接種後6日から16日の間に回収した寄生成虫の体長を実体顕微鏡下で計測した。計測はHaley and Parker (1961 b)の方法に準じ、生理食塩水を含ませた濾紙上で毛筆を使って虫体をまっすぐのばしてから、接眼マイクロメーター（ニコン製）を用いて行なった。

結果

1. 成虫の寄生部位と回収率

寄生部位：ラット腸管内での *N. brasiliensis* の寄生分

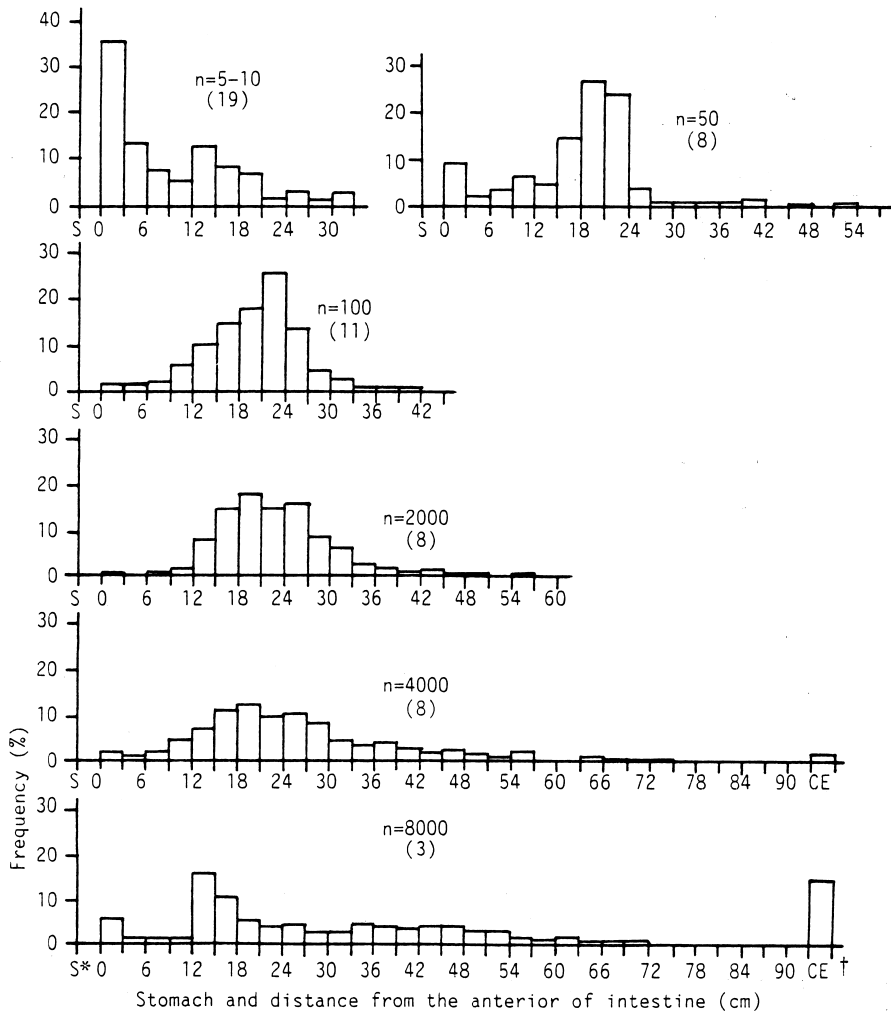


Fig. 1 Distribution of adult *N. brasiliensis* in the stomach and intestine of rats inoculated with different numbers of infective larvae.

Rats were killed between the 5th and 17th day after inoculation.

Values in parentheses show the number of rats killed. *S: stomach. †CE: cecum. n: no. of infective larvae inoculated.

布を幼虫接種群別に Fig. 1 に示す。

$n = 5 \sim 10$ の少数幼虫接種群では寄生成虫は小腸起始部（幽門部より 6 cm まで）にもっとも多くみられ（全体の 50%），続いて幽門部より 12 から 18 cm のところに多かった。しかし $n = 50$ の幼虫接種群では幽門部より 18 から 24 cm のところにもっとも多くの虫体がみられ（全体の 51%），小腸起始部には比較的少なかった。この $n = 50$ の分布傾向は $n = 2000$ の幼虫接種群までみられたが（Fig. 1 では $n = 100, 2000$ のみを示す）， $n = 4000, 8000$ の多数幼虫接種群では虫体の分布はしだいに小腸下部に広がっていき，盲腸まで分布するようになった。

回収率：接種後の日数と虫体の回収率の関係を幼虫接種群別に Fig. 2 に示す。

$n = 5 \sim 10$ の少数幼虫接種群では感染初期（接種後 4 ～ 7 日）に 50 ～ 90% の高い回収率が得られ，その後漸減的ではあるが，接種後 20 日を過ぎても比較的高い回収率（20 ～ 70%）が維持された。しかし $n = 50 \sim 100$ の幼虫接種群では感染初期の高い回収率は接種後 15 日頃までみられたものの，17 日を過ぎる頃より急激に回収率は低下し，わずか数% となった。 $n = 500 \sim 8000$ までの幼虫接種群では感染初期（接種後 4 ～ 10 日）の回収率は $n = 100$ 以下の幼虫接種群と変わらなかったが，接種後 11 日から 13 日頃より急激な回収率の低下がみられた。ただし

$n = 500$ 以上の幼虫接種群でも接種後 20 日を過ぎても回収率は完全にゼロとならず常に数% の虫体，とくに雄成虫が回収された。

2. 幼虫接種数と次世代遊出幼虫数

次世代遊出幼虫数の経日的変化：寄生雌成虫からの産卵数の代わりに濾紙培養法で得られた次世代遊出幼虫数の経日的変化を幼虫接種群別に Fig. 3 に示す。

$n = 5, 10$ の少数幼虫接種群では接種後 6 日目より幼虫がみられ，それぞれ 7 日目および 11 日目に幼虫数のピークがあった。そして幼虫数はその後漸減的ではあったが感染後 20 日を過ぎても $n = 5$ の接種群で 100 から 300， $n = 10$ の接種群で 400 から 500 の比較的高い値を示した。一方， $n = 50 \sim 8000$ の幼虫接種群では（Fig. 3 では $n = 50, 4000, 8000$ のみを示す）感染後 5 日ないし 6 日目から幼虫がみられ，7 日目から 9 日目に幼虫数のピークがあった。しかしその後急激に幼虫数は減少し，12 日目から 15 日目にはゼロとなった。

1 雌 1 日あたりの次世代遊出幼虫数：本感染実験において多数の幼虫接種群で，次世代幼虫数のピークがみられた接種後 7 日目における 1 雌 1 日あたりの遊出幼虫数を Table 1 に示す。

1 雌 1 日あたりの幼虫数は各幼虫接種群とも相当ばらつきがみられたが，平均値でみると $n = 100$ の幼虫接種群でもっとも多く，1200 以上の幼虫数を示した。しかし接種幼虫数がそれより増加（ $n = 500 \sim 4000$ ）しても減少（ $n = 5 \sim 50$ ）しても幼虫数は逆に少なくなった。例えば $n = 500$ の幼虫接種群では， $n = 100$ の場合のおよそ 2 分の 1， $n = 4000$ の接種群では，およそ 4 分の 1 の幼虫数であった。また $n = 5$ の少数幼虫接種群では， $n = 100$ の場合のおよそ 3 分の 1 の幼虫数であった。尚， $n = 8000$ の多数幼虫接種群は宿主であるラットが激しい下痢症状を呈したため，1 雌 1 日あたりの幼虫数を計数出来なかった。

3. 接種幼虫数と寄生成虫の大きさ

各幼虫接種群別の寄生成虫の体長を Table 2 に示す。雌虫では平均値でみると $n = 50, 100$ の幼虫接種群でもっとも大きく，4.54 mm の虫体長を示し，それより接種幼虫数が増加（ $n = 500 \sim 8000$ ）しても減少（ $n = 5 \sim 10$ ）しても虫体長は小さくなった。もっとも虫体長が小さかったのは $n = 8000$ の多数幼虫接種群で 4.14 mm の虫体長を示した。雄虫も雌虫とはほぼ同様の傾向を示し， $n = 50, 100$ の幼虫接種群でもっとも大きく，それぞれ，3.25 mm，3.13 mm の虫体長を示した。しかしもっとも虫体長が小さかったのは $n = 500$ の幼虫接種群で 2.84 mm であった。

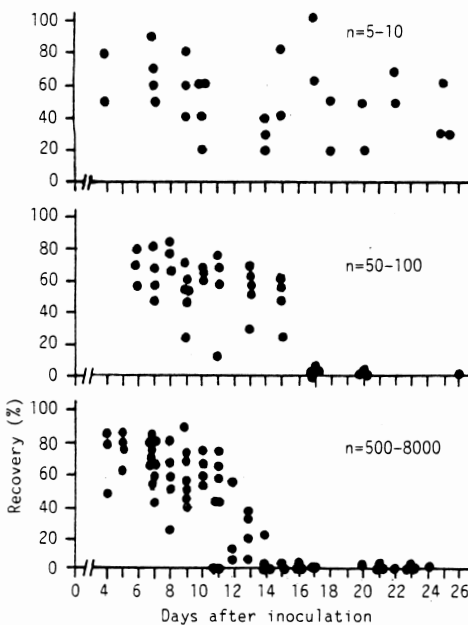


Fig. 2 Relation between the number of infective-larvae inoculated and the recovery-rate of adult *N. brasiliensis* from rats at various times.
n: no. of infective larvae inoculated.

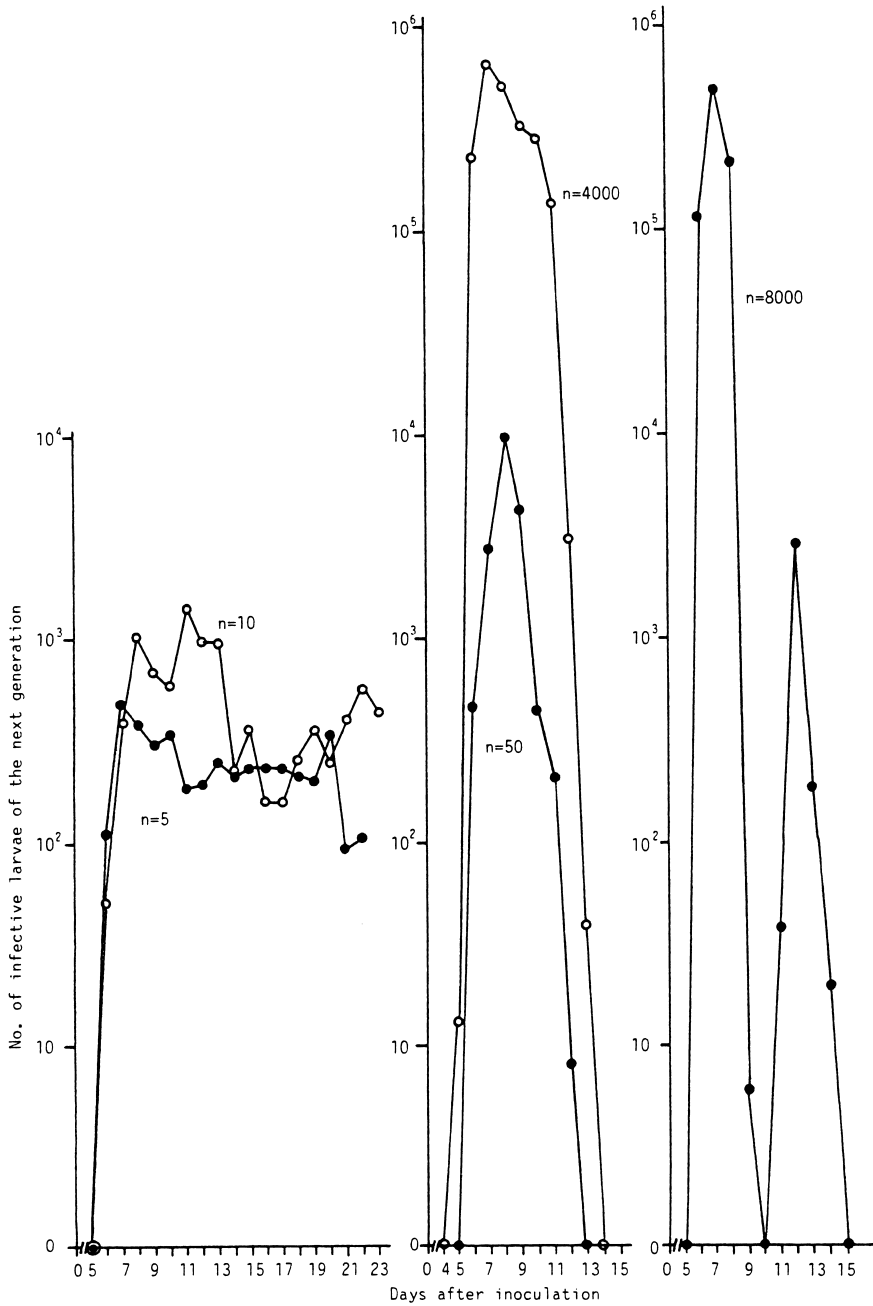


Fig. 3 Daily changes in the number of infective larvae of the next generation obtained from rats inoculated with different numbers of infective larvae.

The infective larvae of the next generation were obtained from the filter paper cultivation technique. n: no. of infective larvae inoculated.

Table 1 Number of infective larvae of the next generation per day per female obtained from the faeces of rats inoculated with different numbers of infective larvae

No. of infective larvae given	No. of rats examined	*No. of infective larvae of the next generation per day per female(LPDPF)	
		Range	Mean
5	4	254- 615	423
10	5	515-1239	868
50	4	835-1429	1093
100	4	548-1814	1203
500	6	409-1098	632
1000	4	641- 892	771
2000	5	291- 983	519
4000	5	120- 449	308
8000	3	†ND	ND

* The number of infective larvae of the next generation is indicated by the mean value per day per female at the 7th day after inoculation.

† ND: not determined.

Table 2 Body length of adult male and female *N. brasiliensis* recovered from rats inoculated with different numbers of infective larvae

No. of infective larvae given	Body length (mm)							
	Male worms				Female worms			
	No. of worms examined	Range	Mean	S. D	No. of worms examined	Range	Mean	S. D
5	15	2.6-3.2	2.93	0.29	17	3.7-4.8	4.18	0.30
10	26	2.5-3.6	3.07	0.22	10	3.8-4.6	4.26	0.31
50	113	2.6-3.7	3.25	0.19	80	3.7-5.3	4.54	0.24
100	479	2.1-3.9	3.13	0.28	443	3.1-5.6	4.54	0.35
500	670	2.1-3.8	2.84	0.28	535	2.9-5.2	4.23	0.43
1000	455	2.2-4.1	2.91	0.20	312	3.2-5.2	4.28	0.30
2000	569	2.3-3.7	3.02	0.18	442	3.3-5.1	4.36	0.28
4000	591	2.2-3.7	2.92	0.20	572	3.5-5.0	4.19	0.30
8000	363	2.5-3.8	2.98	0.18	398	3.4-5.0	4.14	0.30

Adults worms were recovered from rats after 6 to 17 days of inoculation.

考 察

1. 成虫の寄生部位と回収率

寄生部位：*N. brasiliensis*の成虫は極端な少数幼虫接種群（n = 5～10）では小腸起始部に多かった。しかしn = 50から2000までの幼虫接種群では小腸起始部には比較的少なく、それより下部に分布のピークがあった。そして極端な多数幼虫接種群（n = 4000～8000）では成虫

の分布は小腸起始部から小腸下部にまで広がり、一部盲腸内にもみられた。Brambell (1965), Alphey (1970)によると本種は主にラットの空腸中間部に分布するという。またJenkins (1974)によれば少数幼虫接種では最初空腸部にみられ、一定時間後十二指腸に移動するという。そして多数幼虫接種では成虫の寄生は最初十二指腸から空腸にかけてみられ、成虫の大量排虫後は十二指腸にのみ寄生するようになるという。本実験ではラットの腸管を

詳細に区分しなかったが、ほぼこれらと同様の寄生分布を示しているものと思われる。多数幼虫接種群で小腸下部や盲腸内に虫体がみられたが、これは本来の寄生部位とは異なるものと思われる。また少数幼虫接種群 ($n = 5 \sim 10$) では他の接種群 ($n = 50$ 以上) と異なり、小腸起始部に多くの虫体がみられた。これはおそらく空腸部からの移動によるものと推定されるが、その要因は明らかでない。Jenkins (1974) は小腸起始部 (十二指腸) は空腸部と比較して免疫反応が弱い事をあげている。

回収率：成虫の回収率は $n = 5 \sim 10$ の少数幼虫接種群では接種後20日を過ぎても比較的高い値を示したが、 $n = 50 \sim 100$ の接種群では17日頃より急激に回収率が低下した。そして $n = 500$ から8000の接種群では接種幼虫数に関係なく接種後11日から13日頃に回収率が急減した (Fig. 2)。本実験と同様の実験を行なった Haley and Parker (1961 a) は本種成虫の回収率は接種幼虫数によって影響されると述べている。本実験でも成虫の回収率は接種幼虫数によって異なったが、 $n = 500$ 以上の接種群では接種幼虫数の増加による回収率の違いは認められなかった。先に報告した *O. ezoensis* の感染実験では接種幼虫数の増加に伴う成虫の回収率の低下がみられ (藤本・堀, 1988)、本種とは明らかに異なった。本種の寄生でみられる急激な排虫は宿主の免疫反応によると考えられており (Ogilvie and Jones, 1971)、本種の再感染の実験では腸管粘膜の粘液が虫体の排除に重要な役割を果たしていると報告されている (Miller, et al 1981)。本実験の $n = 5 \sim 10$ の少数幼虫接種群で長期間高い回収率が得られたり、 $n = 500 \sim 8000$ の幼虫接種群で寄生成虫の大量排虫後も少数の雌成虫が回収され続けるのはこの免疫機構が働く閾値以下の寄生数であるためと考えられるが、その他に Jenkins (1974) が述べているようにこれらの寄生成虫が免疫反応の比較的弱い十二指腸部に寄生していることが関係すると思われる。

2. 接種幼虫数と次世代遊出幼虫数

濾紙培養法による次世代幼虫の出現は $n = 5 \sim 10$ の少数幼虫接種群を除けば $n = 50 \sim 8000$ の各幼虫接種群とも接種後5～6日に始まり、15日以内にみられなくなった (Fig. 3)。幼虫の出現パターンはほぼ実際の産卵パターンを示していると考えられるので、本種の産卵期間は極めて短いといえよう。Haley (1962) は本種の産卵期間を約1週間と報告しているが本実験の観察でもほぼ同様であった。しかし本実験の少数幼虫接種群 ($n = 5 \sim 10$) では接種後20日以上にわたり幼虫の遊出がみられたことから、実験条件、とくに接種幼虫数等によって産卵期間は変化するものと思われる。先に報告した *O. ezoensis* では少数接種群 ($n = 10$) から多数接種群 ($n = 8000$) までどの幼虫接種群でも極めて長期間 (接種後50日以上)、幼虫の遊出がみられ (藤本・堀, 1988)、本種とは著しく

異なった。これは *O. ezoensis* では一部の寄生雌虫によって長期間産卵が維持されるのに対して、本種の寄生成虫では少数寄生例や一部の雌虫を除いて接種後短期間に腸管から排虫されるためと考えられる。

接種後7日目における1雌1日あたりの次世代幼虫数は $n = 100$ の幼虫接種群で最高値を示し、それより接種数が多くても少なくとも幼虫数は少なくなった (Table 1)。先に報告した *O. ezoensis* では接種幼虫数が少ないほど1雌1日あたりの次世代幼虫数は多くなり (藤本・堀, 1988)、本種とは明らかに異なった。一方、矢島・町田 (1958) は犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* での産卵数は成虫の寄生密度がまばらすぎてもこみあいすぎても少なくなると報告している。本種において $n = 500$ 以上の幼虫接種群で次世代幼虫数が減少したのは過密による影響と考えられるが、少数幼虫接種群 ($n = 5, 10$) で減少した理由は明らかではない。矢島・町田は犬鉤虫の少数寄生では性比に歪みが生じやすい点をあげているが、本種の場合もそれが雌成虫の交尾や産卵に影響しているのかも知れない。

3. 接種幼虫数と寄生成虫の体長

寄生後の成虫の体長を計測した結果、本種では雌雄とも $n = 50 \sim 100$ の幼虫接種群で最大体長を示した。本実験と同様の実験をおこなった Haley and Parker (1961 b) は本種の成虫の体長は接種幼虫数によって影響されないと述べている。一方、先に報告した *O. ezoensis* では接種幼虫数の増加に伴って寄生成虫 (雌雄共) の小型化がみられた (藤本・堀, 1988)。また犬鉤虫、ズビニ鉤虫 *Ancylostoma duodenale*、アメリカ鉤虫 *Necator americanus* では少数寄生と多数寄生の中間の寄生数で寄生成虫の体長が最大になったと報告されている (永吉・牟田口, 1956; 永吉ら, 1956)。このように同じ腸管寄生線虫類でも種によって寄生成虫の体長に及ぼす接種幼虫数 (または寄生虫数) の影響は異なるが、一般的にみれば接種幼虫数の増加によって虫体長は小型化するものと考えられる。本種では $n = 50 \sim 100$ の接種群で最大体長を示し、 $n = 5 \sim 10$ の少数接種群では逆に小さくなったが、これは前述した1雌1日あたりの遊出幼虫数でもみられた。本種が少数接種群で最大値を示さない理由は明らかではないが、成虫は腸管内では常に集合した状態で寄生していることから (Africa, 1931; Alphey, 1970)、ある程度以上の寄生数があった方がかえって発育や産卵に好影響をもたらすのかも知れない。ただ、成虫の回収率からみると少数寄生の方が長命であり、かつ長期間の産卵がみられるので、今後更に詳細な少数寄生と多数寄生の比較研究が必要であろう。

文 献

- 1) Africa, C. M. (1931): Studies on the host relations of *Nippostrongylus muris* with special reference of age resistance and acquired immunity. J. Parasitol., 18, 1-13.
- 2) Alphey, T. J. W. (1970): Studies on the distribution and site location of *Nippostrongylus brasiliensis* within the small intestine of laboratory rats. Parasitology, 61, 449-460.
- 3) Brambell, M. R. (1965): The distribution of a primary infestation of *Nippostrongylus brasiliensis* in the small intestine of laboratory rats. Parasitology, 55, 313-324.
- 4) 藤本和義・堀栄太郎 (1988) : *Orientostrongylus ezoensis* のラット腸管内における寄生分布, 発育並びに産卵——異なる投与幼虫数での実験的感染. 寄生虫誌, 37, 139-146.
- 5) Haley, A. J. and Parker, J. C. (1961 a): Effect of population density on adult worm survival in primary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in the rat. Pro. Helm. Soc. Wash., 28, 176-180.
- 6) Haley, A. J. and Parker, J. C. (1961 b): Size of adult *Nippostrongylus brasiliensis* from light and heavy infections in laboratory rats. J. Parasitol., 47, 461.
- 7) Haley, A. J. (1962): Biology of the rat nematode, *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914). II. Preparasitic stage and development in the laboratory rat. J. Parasitol., 48, 13-23.
- 8) Jenkins, D. C. (1974): *Nippostrongylus brasiliensis*: the distribution of primary worm population within the small intestine of neonatal rats. Parasitology, 68, 339-345.
- 9) Miller, H. R. P., Huntley, J. F. and Wallace, G. R. (1981): Immune exclusion and mucus trapping during the rapid expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from primed rats. Immunology, 44, 149-429.
- 10) 永吉康祐・牟田口利幸 (1956) : 鉤虫の生態に関する研究 (第1報) 寄生数と虫体長の関係について. 東京医事新誌, 73, 367-368.
- 11) 永吉康祐・牟田口利幸・山下正文 (1956) : 鉤虫の生態に関する研究 (第4報) 犬鉤虫の寄生生態について. 東京医事新誌, 73, 525-528.
- 12) Ogilvie, B. M. and Jones, V. E. (1971): *Nippostrongylus brasiliensis*: A review of immunity and host parasite relationship in the rat. Exp. Parasitol., 29, 138-177.
- 13) Tada, Y. (1975): *Orientostrongylus ezoensis* n. sp. (Nematoda: Heligmosomidae) from brown rat, *Rattus norvegicus* Berkenhout. Jap. J. Vet. Res., 23, 41-44.
- 14) 矢島ふき・町田喜一 (1958) : 犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* の寄生生態に就いて, 特に棲息密度効果について. 寄生虫誌, 7, 631-640.

THE EFFECTS OF THE NUMBER OF INFECTIVE LARVAE INOCULATED
ON THE DISTRIBUTION, DEVELOPMENT AND OVIPOSITION OF
NIPPOSTRONGYLUS BRASILIENSIS IN THE RAT INTESTINE

KAZUYOSHI FUJIMOTO AND EITARO HORI

(Department of Parasitology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama-cho,
Iruma-gun, 350-04, Japan)

The distribution, development and oviposition of *Nippostrongylus brasiliensis* in the rat intestine were observed when variable number of infective larvae were inoculated subcutaneously. Dissection after 7 to 14 days of inoculation revealed that the distribution of adult worms was limited to the upper part of small intestine in the groups of less than 2000 inoculants, while it was extended to the lower part of small intestine and cecum in those of more than 4000 inoculants. In the groups of less than 10 inoculants, the loss of adult worms was gradual through 20 days after inoculation, whereas in those of more than 50 inoculants, there was an abrupt loss of adult worms after 11 to 15 days of inoculation. Daily counting of the progeny, infective larvae reared from the hosts' faeces by filter paper technique, was evaluated as a parameter of the parasitic adults' egg production. The number of progeny of less than 10 inoculants was gradually decreasing with the passage of days after inoculation, whereas those of more than 50 inoculants abruptly disappeared after 12 to 15 days of inoculation. The average number of progeny produced by a female per day at 7 days after inoculation was maximum in 100 inoculants and minimum in 4000 inoculants. The body length of both the parasitic females and males was the greatest in 50 to 100 inoculants.

These results suggest that density effects might work to some extent upon the distribution, development and egg production of *N. brasiliensis*.