

寄生蠕虫症の化学療法に関する研究 (XXXVII)

コスタリカ住血線虫感染マウスにおける虫体の発育経過

寺田 護 記野秀人 佐野基人

(掲載決定:平成3年8月1日)

要 約

従来、コスタリカ住血線虫の実験的感染に主として用いられてきたコットンラットの代りに、ddY系マウスを用いて *in vivo* で治療実験を行なうための基礎的資料を得るために、20虫感染後の虫体の発育経過を追跡検討した。

1. 腸間膜動脈からの虫体の回収は、感染10日後から認められ、15~70日にかけては11虫前後のほぼ一定数が回収された。
2. 腸間膜動脈における虫体の回収部位は、感染後早期には回盲部と腸間膜リンパ節周囲の動脈が主であった。しかし、日数の経過とともに結腸や回腸・空腸へ向う末梢部から回収される虫体が増加した。
3. 回収された雌虫体の平均体長は、10日では5.0mmであったが、30日では23.5mmとなり、70日では30.9mmに達していた。
4. 雄虫体の生殖器系は感染12日後で成熟虫体とほぼ同様の形態を示した。一方、雌虫体については、陰門は感染10日後で開口していたが、子宮内虫卵は15日から認められた。
5. 感染後18日には回盲部組織内に虫卵が認められ、23日には幼虫内蔵卵も多数となった。更に、24日には宿主の糞中への第1期幼虫の排泄も認められた。

以上の結果から、コスタリカ住血線虫感染マウスにおける虫体の発育経過はコットンラットの場合と大差がなく、従って、この面からみる限り、ddY系マウスを治療実験に用いることに問題はないことが明かとなった。

Key words : *Angiostrongylus costaricensis*, ddY mouse, experimental chemotherapy, worm growth

諸 言

コスタリカ住血線虫の実験的感染は、従来、主としてコットンラットを用いて行なわれてきた (Morera *et al.*, 1977; Monge *et al.*, 1978; Ubelaker *et al.*, 1981)。ところが、*in vivo* で本症の治療法を研究しようとしても、この実験動物は我が国では市販ルートから購入できず、従って、性や令を揃えた多数を用いて研究することは困難である。著者らは前報で、ddY系マウスを治療実験用の動物として使用し得ることを確認し、そのための基礎的研究として、好適な感染数および20虫感染後の宿主にみられる幾つかの指標の経日的変化について検討した (寺田ら, 1991a)。

本研究では、ddY系マウスにおける20虫感染後の虫体の発育経過を検討し、宿主にみられた各種指標の経日的変化との関係について考察を加えた。

材料と方法

1. 実験動物と感染方法

本実験ではコスタリカ住血線虫 (*Angiostrongylus costaricensis*, コスタリカ株) の実験的終宿主として5週令のddY系雄マウスを用い、マウスへの感染は Terada *et al.* (1987) と同様に行なった。

2. 動物実験

先ず、前報の研究 (寺田ら, 1991a) で、20虫感染後の宿主における各種指標の経日変化を検討した実験IIのマウスについて、本研究では感染後の虫体の発育経過について検討した。すなわち、感染後15~40日までの5日ごとおよび70日に剖検した各5頭のマウスについて、1) 虫体の回収部位、2) 虫体回収数、3) 回収雌虫体の体長および4) 雌雄虫体の生殖器系の形態について観察した。さらに、本研究では、55頭のマウスに各20虫宛ての第3期幼虫を経口ゾンデを用いて感染させ、次の項目の検討を行なった。すなわち、感染8, 10, 12日後に各

5頭のマウスを剖検し、上記1)～4)の観察を行なった。次に、感染後25日より前の時期における宿主腸管組織中の虫卵の有無とその発育・分裂の状況を詳しく検討するため、感染後16, 18および22日に各2頭, 23および24日には各3頭のマウスを剖検した。また、残りの生存マウスについては、感染後21～25日における糞中への第1期幼虫の排泄状況を検討した。

回収した虫体はアルコール・ホルマリン・酢酸液(AFA固定液)で固定した。雌虫体については、グリセリン・アルコール液に浸漬し、ガラス板にはさんで写真撮影し、その写真をトレースした後、画像診断装置(Nireco image processor-analyzer, Luzex III)により体長を計測した。マウス腸管は10%ホルマリン液で固定し、組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色して観察した。

測定値の統計処理は、Studentの t -testにより行なった。

結 果

1. 虫体の回収数

Fig. 1に20虫感染後8～70日に剖検したマウスの腸間膜動脈から回収された雌雄虫体の総数の消長を示した。

感染後8日では腸間膜動脈から虫体は回収されず、10日で平均1.0虫が、また12日では7.4虫が回収された。15～70日においては11虫前後のほぼ一定数が回収された。

2. 虫体の回収部位

腸間膜の根部には腸間膜リンパ節があるが、このリンパ節を目印として腸間膜動脈はリンパ節周囲の動脈、回盲結合部(回盲部)へ向う動脈分枝、回腸や空腸・結腸の末梢部へ向う動脈分枝などに分けることができる。本研究では、予め作製した腸間膜動脈の模式図上に虫体の

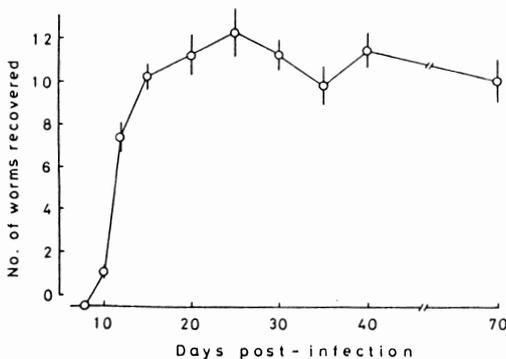


Fig. 1 Number of worms recovered from mice infected with 20 third stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis*.

Each point represents mean \pm SE from five mice.

回収部位を書入れ、回収部位別の回収率を求めた。その結果、回収部位は、大別して、回盲部および腸間膜リンパ節周囲の腸間膜動脈ならびに腸間膜動脈の小腸・大腸へ広がる末梢部の2グループに分けることができた。

実際の回収部位別の回収率をFig. 2に示してある。感染後10および12日には、100%が回盲部と腸間膜リンパ節周囲の動脈から回収され、15～25日では約15%が結腸や回腸・空腸へ向う動脈分枝の末梢部から回収された。一方、30～70日では末梢部に寄生するものが多くなり、30日で25%、70日では70%を示した。

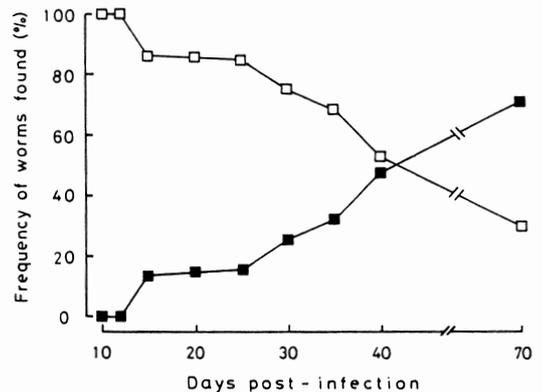


Fig. 2 Rate of worms recovered from the branches of the mesenteric arteries around the ceacum and mesenteric lymph node (□) and worms recovered from peripheral parts of the mesenteric branches extending to the small and large intestines (■) of mice infected with 20 third stage larvae of *A. costaricensis*.

Each point represents mean from five mice.

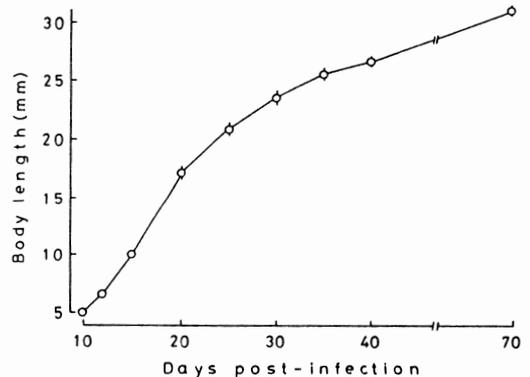


Fig. 3 Body length of female worms recovered from mice infected with 20 third stage larvae of *A. costaricensis*.

Each point represents mean \pm SE from five mice.

3. 雌虫体の体長

回収された雌虫体の平均体長は、10日では5.0mmであったが、25日までは急速に成長し、30日では23.5mmとなった。25日以降は成長速度はやや低下したが、その後も成長し続け、70日では30.9mmに達していた (Fig. 3)。

4. 虫体生殖器官の形態

雄虫体の交接囊、交接囊の肋と交接刺は感染12日後の虫体で、成熟虫体とほぼ同様の形態を示した (Fig. 4A~C)。

一方、雌虫体では、陰門は感染10日後で開口していたが、子宮内虫卵は10日および12日では認められず、15日から認められた (Fig. 4D~F)。

5. 虫体生殖器官の機能

宿主腸管組織内虫卵は、感染後16日については、今回

剖検し作製した2頭のマウスの回盲部標本では認められなかったが、18日では回盲部に僅かに認められた。一方、22日では虫卵数が増加し、しかも、各種の分裂段階の虫卵が認められた。ついで、23日になると幼虫内蔵卵も多数認められるようになった。(Fig. 5A, B)。

Fig. 5 (C, D) は感染後24日に剖検したマウスの回盲部の切片標本である。腸管組織における多数の虫卵とともに、腸間膜動脈に寄生している虫体の断端もみられる。

つぎに、宿主の糞中への第1期幼虫の排泄についてみると、感染後23日では検査した20頭のマウスの全例が陰性であり、24日では20頭中のうち7頭が陽性となった。更に、25日になると生存していた18頭中の13頭の糞中に認められた。

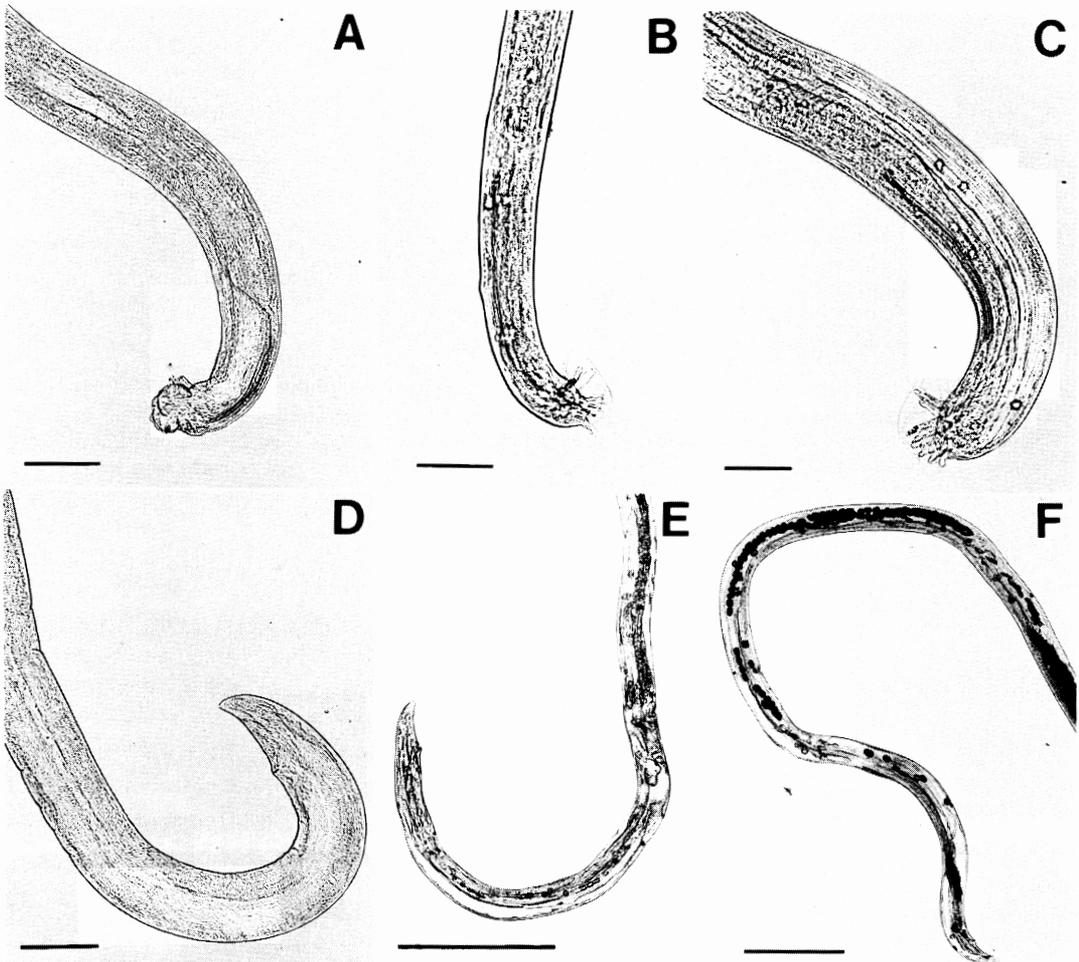


Fig. 4 Caudal end of male worms (A~C) and female worms (D~F) of *A. costaricensis* recovered 10 (A, D), 12 (B, E) and 15 (C, F) days post infection.

Scale bars are 1.4 mm (A and B), 1.2 mm (C), 1.4 mm (D), 2.8 mm (E) and 1.8 mm (F), respectively.

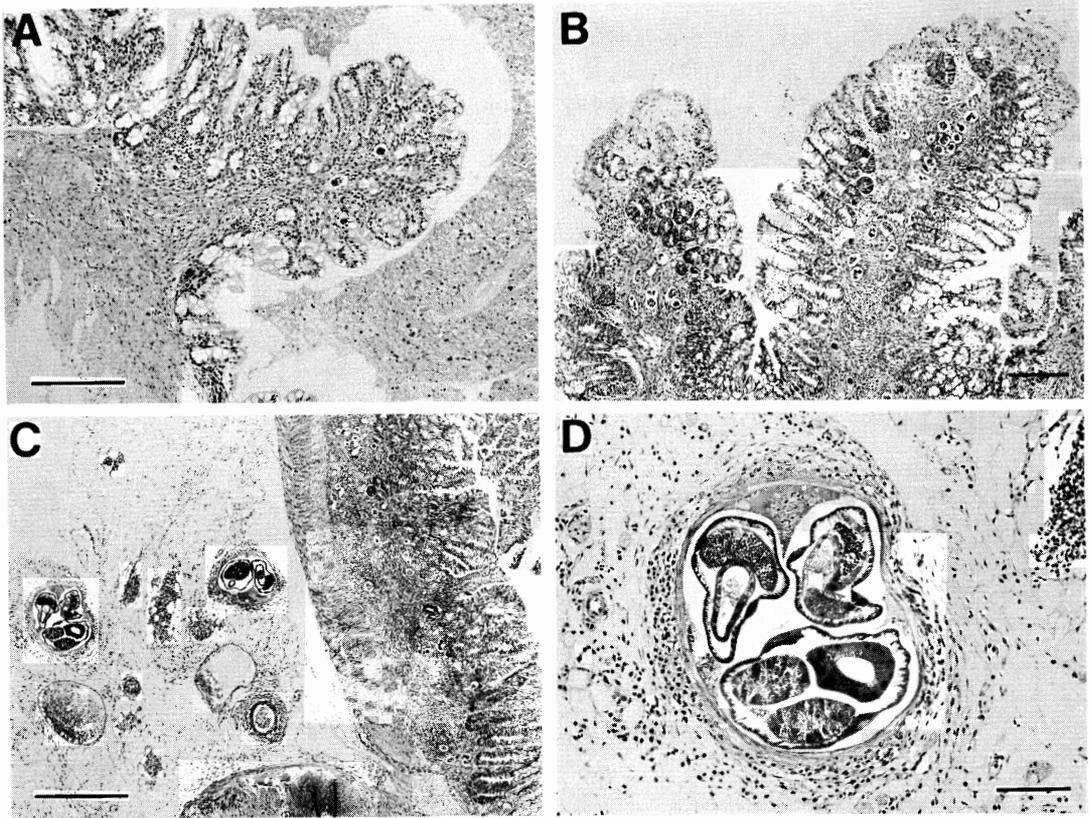


Fig. 5 Eggs, larvae and sections of adult worms found in the ileocaecal region of mice infected with 20 third stage larvae of *A. costaricensis*. A small number of eggs were detected 18 days post infection (A), and many eggs with various stages of embryonation including larvae were found scattered in the tissues 23 days post infection (B) and several sections of adult worms in the mesenteric arteries were shown as well as many eggs with various stages of embryonation 24 days post infection (C and D). Scale bars are 0.2 mm (A and B), 0.5 mm (C) and 0.1 mm (D), respectively.

考 察

コスタリカ住血線虫感染マウスを実験動物として、治療法の研究を行なうためには、幾つかの基礎的検討が必要である。そこで、前報の研究では、実験を実施する上で基本的な好適な感染数と治療効果を判定するために必要な感染宿主における実験指標の経日的変化について検討した(寺田ら, 1991a)。一方、感染後の虫体がどのような発育経過を辿るかを明らかにしておくことも重要である。

実験的感染のコットンラットについては、感染2時間から7日後までは約2500虫を、また10日から60日にかけては200~500虫を感染させた各1頭の動物を剖検して、宿主体内における虫体の体内移行と発育を詳細に検討したMorera(1973)の報告がある。しかし、この報告でも回収率などについての記載はなく、一方その他の実験感

染では回収率などが報告されているにすぎない。

ddY系マウスにおける発育経過の検討の第1は腸間膜動脈からの虫体回収数である。虫体は感染10日後には腸間膜動脈に出現しはじめ、感染幼虫の少なくとも50~60%が腸間膜動脈系で成熟する事が明かとなった。

経口感染後20~30日のコットンラットでは腸間膜動脈からの回収率は43~59%である(Morera *et al.*, 1977; Monge *et al.*, 1978; Ubelaker *et al.*, 1981; Ishii and Sano, 1989)。また、マウスについては、ICR系に経口感染し18日後で82.3%が(松岡ら, 1985)、一方、DBA/2やC3H/He系などのマウスでは感染28日後で41.5~69.5%の回収率が報告されている(Ishii and Sano, 1989)。従って、この指標についてはコットンラットとマウス間に大差はないように思われる。

第2に、回収部位についてみると、自然感染のヒト患者では、通常、虫体は回盲部の腸間膜動脈前行枝から回

収されている (Morera, 1985)。また、自然感染の野生のコットンラットでも、少数感染ではほとんどが回盲部の前行枝から発見され、多数感染の場合には空腸側の分枝からも見出されている (Tesh *et al.*, 1973)。しかし、マウスについては詳細な部位の記載はない。今回の ddY 系マウスでは、感染後の経過日数が少ない場合には回盲部と腸間膜リンパ節部から回収される虫体が多く、日数が経過するにつれて小腸・大腸へ広がる末梢部からの回収率が高くなった。従って、ヒト患者や野生のコットンラットでは感染後の時期が不明であるが、少なくとも感染後の経過日数が少ない場合のマウスでは同じ部位から回収された。

第3に、回収された雌虫体の成長についてみると、感染後25日までの成長が比較的急速で、30日で体長は23.5mmであった。各種系統のマウスとコットンラットに20虫感染後28日における体長を計測した Ishii and Sano (1989) の値と比較すると、BALB/C で20.2mm, C3H/He では22.4mmであり大差はなく、一方、コットンラットでは25.3mmであり、ddY 系マウスにおける成長がやや劣るという結果であった。

第4に、虫体の成熟の時期を生殖器系の形態と機能の両面から観察したが、この項目は治療実験を進める上で特に重要と考えられる。コットンラットでは、感染7日後までに4回目の最後の脱皮を終え、すべての虫体が幼若成虫になること、しかし、7日後ではほとんどの虫体が未だリンパ管に在るが、10日後には虫体が腸間膜動脈に移行、18日後には産卵を開始し、24日後には宿主の糞中に第1期幼虫の排泄が認められることが報告されている (Morera, 1973)。

今回の実験では腸間膜動脈以外からの虫体回収を行なわなかったため10日より前の時期の虫体の形態を観察できなかった。しかし、マウスでの観察でも、雌雄虫体の生殖器系の形態から、虫体は感染後10日で幼若成虫になっており、15日には成熟していること、また、虫体の成熟は回盲部や腸間膜リンパ節周囲の腸間膜動脈に移行した後には生ずることが明かとなった。また、糞中への第1期幼虫の排泄開始時期については、各種系統のマウスやコットンラットでも、いずれも24日前後であり (Ishii and Sano, 1989), ddY 系マウスと特に差は認められていない。

以上の諸項目にわたる観察結果から、コスタリカ住血線虫感染 ddY マウスにおける虫体の体内移行と発育は Morera (1973) がコットンラットについて報告している知見と大差ないことが明かとなった。従って、この面からみる限りでは、コットンラットの代わりに ddY 系マウスを用いて治療実験を進めても本質的な問題はないものと考えられる。

ところで、コスタリカ住血線虫の20虫を感染させた

ddY 系マウスにおいては、感染後20~30日にかけての急性期に宿主の死亡や体重減少、貧血、回腸下部の漿膜面の点状出血、腸間膜リンパ節と脾臓の肥大などが著明であった。ところが感染後40日および70日の慢性期には、これらの変化がむしろ回復傾向にあり、一方、腸管における虫卵結節性的変化、例えば腸管の相対重量比や病理組織学的所見は一層著しくなっていた (寺田ら, 1991a)。この場合、急性期の変化が特に著明となる感染後20~25日の時期には、虫体の成長とともに、産卵や第1期幼虫への孵化も盛んとなる。従って、死亡や貧血などの発現機序を明らかにするためには、更に詳細な研究が必要であるが、つぎのような因子の関与がうかがわれた。すなわち、第1は虫体の成長に伴う機械的障害やES抗原などであり、第2は虫卵や第1期幼虫、その分泌物などの関連因子である。ところが、感染マウスに駆虫薬の mebendazole を投与し、その投与条件、例えば投与量と投与間隔を変えて、主として産卵を抑制すると、急性期の宿主の死亡や貧血などの変化がかなり抑制された (寺田ら, 1991b)。従って、急性期の諸変化にも、慢性期の虫卵結節性変化の場合と同様に、虫卵や第1期幼虫およびその関連因子がかかわっている可能性が考えられる。

以上の如く、今回の研究で、コスタリカ住血線虫感染マウスにおける感染後の虫体の発育経過がほぼ明らかになった。従って、今後の治療実験では、虫体の成熟前とか産卵開始後などの時期を考慮に入れながら、駆虫薬の殺幼虫作用とか産卵抑制作用など具体的な目標を定めた研究を進めることが可能となった。

文 献

- 1) Ishii, A. I. and Sano, M. (1989) : Strain-dependent differences in susceptibility of mice to experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection. *J. Helminthol.*, 63, 302-306.
- 2) 松岡友美・水野文夫・奥祐三郎・神谷正男・大林正士 (1985) : 各種感染経路によるコスタリカ住血線虫およびタイ住血線虫の最終寄生部位の差異. *寄生虫誌*, 34 (2) Suppl. 40.
- 3) Morera, P. (1973) : Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 613-621.
- 4) Morera, P., Arroyo, R. and Solano, E. (1977) : Infección de ratas salvajes con *Angiostrongylus costaricensis* por vía subcutánea intraperitoneal. *Rev. Biol. Trop.*, 25, 257-261.
- 5) Morera, P. (1985) : Abdominal angiostron-

- gyliasis : A problem of public health. Parasitol. Today, 1, 173-175.
- 6) Monge, E., Arroyo, R. and Salano, E. (1978) : A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes 1971). J. Parasitol., 64, 34.
- 7) Terada, M., Ishii, A. I., Dharejo, A. M., Hayashi, M. and Sano, M. (1987) : Studies on chemotherapy of parasitic helminths (XXVIII). *In vivo* efficacy of milbemycin D against *Angiostrongylus cantonensis* and *A. costaricensis*. Jpn. J. Parasitol., 36, 24-29.
- 8) 寺田護・石井明・佐野基人 (1991a) : 寄生蠕虫症の化学療法に関する研究 (XXXVI) コスタリカ住血線虫感染マウスにおける実験的治療指標の検討. 寄生虫誌, 40, 415-423.
- 9) 寺田護・石井明・李秀雄・佐野基人 (1991b) : コスタリカ住血線虫感染マウスに対して虫体成熟後に投与された mebendazole の影響. 寄生虫誌, 40 Suppl. 82.
- 10) Tesh, R. B., Ackerman, L. J., Dietz, W. H. and Williams J. A. (1973) : *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. Am. J. Trop. Med. Hyg., 22, 348-356.
- 11) Ubelaker, J. E., Caruso, J. and Peña, A. (1981) : Experimental infection of *Sigmodon hispidus* with third-stage larvae of *Angiostongylus costaricensis*. J. Parasitol., 67, 219-221.

Abstract

STUDIES ON CHEMOTHERAPY OF PARASITIC HELMINTHS (XXXVII)
GROWTH OF *ANGIOSTRONGYLUS COSTARICENSIS* IN DDY MICE

MAMORU TERADA, HIDETO KINO AND MOTOHITO SANO

*Department of Parasitology, Hamamatsu University School of Medicine,
Hamamatsu 431-31, Japan*

Growth of *Angiostrongylus costaricensis* in ddY mice was observed after infection with 20 infective larvae to obtain some basic findings for experimental chemotherapy against the parasitic disease *in vivo* using the mice instead of cotton rats which have been mainly used as an experimental final host. 1. From the mesenteric arteries, worms were first found 10 days post-infection (pi) and about 11 worms were constantly recovered 15 to 70 days pi. 2. In earlier time such as 10 to 25 days pi, many worms were recovered from the mesenteric arteries around the ileocaecal region and mesenteric lymph node. On the other hand, in later days such as 40 and 70 days pi, more worms were found in peripheral parts of the arteries extending to the ileum, jejunum and colon. 3. Body length of female worms was 5.0 mm, 23.5 mm and 30.9 mm, 10, 30 and 70 days pi, respectively. 4. Morphological features of the reproductive system in the male worms recovered 12 days pi were similar to those observed in adult worms. Although the vulva was open in the female worms at 10 days pi, eggs were not found in the uteri of the females at 12 days pi, but found at 15 days pi. 5. Many eggs with various stages of embryonation including larvae occurred in the tissues of the ileocaecal region 23 days pi, and the first stage larvae were found excreted in faeces of the host 24 days pi.

From these results, it is suggested that there are few differences in growth of *A. costaricensis* in ddY mice and cotton rats and that few problems occur in doing experimental chemotherapy using the mice from this standpoint.