

メタセルカリアのラット体内における発育：X線照射を受けた大平肺吸虫 *Paragonimus ohirai* 外皮層の微細構造

福田孝一 尾熊丈実

(掲載決定：平成5年1月22日)

要 約

大平肺吸虫 *Paragonimus ohirai* の10 Gy と50 Gy の X 線照射を受けたメタセルカリアおよび非照射正常メタセルカリアにおけるラット感染初期の外皮層微細構造の変化を観察した。正常脱嚢メタセルカリアの外皮層と上皮細胞には多くの G 0 顆粒と少数の G 1 顆粒がみられた。ラット感染後 7, 10, 14 日目の正常虫体の外皮層および上皮細胞には少数の G 1 顆粒と多数の G 2 顆粒が見いだされた。一方, 10 Gy の X 線照射を受けたメタセルカリアでは, ラット感染後 7 および 14 日目に, 少数の G 2 顆粒が外皮層に, そして多くの G 2 顆粒が上皮細胞にみられた。上皮細胞数は少なかったが, その微細構造は正常な虫体に類似していた。50 Gy の X 線照射を受けたメタセルカリアのラット感染後 7 日目では, 少数の G 2 顆粒が外皮層内に認められた。上皮細胞数は少なく, その核は核膜が核質内へ陥入する複雑な形態を示し, また細胞質に少数の G 2 顆粒および多数のライゾゾームと共に, 正常な形態を示すミトコンドリアや粗面小胞体などの細胞内小器官を含んでいた。今回の観察においては, X 線照射による G 0 および G 1 顆粒の著しい変化は認められなかった。

Key words : *Paragonimus ohirai*, X-irradiation, Ultrastructure, Tegument, Tegumental granules

緒 論

大平肺吸虫 *Paragonimus ohirai* はメタセルカリアの X 線照射によってラット内での発育が遅延あるいは阻止される (池田・谷, 1984, 1985)。そのような X 線照射メタセルカリアに対して宿主の抗体の推移を調べるなどの免疫学的研究が行なわれている (Ikeda and Fujita, 1982; 池田・谷, 1984, 1985; Ikeda and Tani, 1988)。宿主の寄生虫に対する免疫反応をより深く理解するためには, 寄生虫の微細構造を知ることが必要であろう。しかし, 大平肺吸虫メタセルカリアの終宿主内での発育がメタセルカリアの X 線照射によってどのように影響を受けるかについて微細構造上より追及した報告は現在までなされていない。

吸虫の外皮層は宿主・寄生体関係において免疫学的および生理学的に重要な役目を担っている部分である (Ikeda and Oikawa, 1991)。大平肺吸虫メタセルカリアの X 線照射はこの外皮層やそれに関連する構造に影響を与えていることが考えられる。X 線照射された大平肺吸虫メタセルカリアを感染させたラットでは, メタ

セルカリアの外皮層の体表抗原に対する抗体産生が低下することを池田・谷 (1985) が報告した。そして彼らはメタセルカリアの X 線照射は体表抗原を形成する上皮細胞に何らかの影響を与えていることを示唆している (池田・谷, 1985)。Burden *et al.* (1983) は γ 線を照射された肝蛭 *Fasciola hepatica* メタセルカリアのラットおよびマウス内での発育を電子顕微鏡で観察し, 成長に伴う外皮層微細構造の変化が遅延あるいは阻止されることを述べている。

著者らは, 今回, 大平肺吸虫 X 線照射メタセルカリアのラット感染初期における外皮層と上皮細胞を透過型電子顕微鏡で観察し, それらの微細構造に対するメタセルカリアの X 線照射の影響を明らかにしようと試みた。メタセルカリアの X 線照射には, 肺吸虫の成長を遅延させる線量 10 Gy および肺吸虫を感染後死滅させる線量 50 Gy (池田・谷, 1984) を用いた。

材料および方法

実験に使用した大平肺吸虫 *Paragonimus ohirai* メタセルカリアは, 兵庫県の丸山川河口および愛知県の本曾川河口に生息していたクロベンケイガニ *Sesaruma (Halometopus) dehaani* から採取した。

得られたメタセルカリアの X 線照射にあたっては、Medical linear accelerator (東芝 LMR-15-BC) を使用し、10 Gy と 50 Gy の線量をメタセルカリアに 645 c/kg・min の条件下で照射した。

X 線照射したメタセルカリア 20 匹づつを Sprague-Dawley ラットに経口感染させた後、10 Gy 照射虫体を感染後 7 および 14 日目に、50 Gy 照射虫体を感染後 7 日目に腹腔内から取り出した。一方、対照群として、正常脱囊メタセルカリアならびに、感染後 7 日目に腹腔内から、10 および 14 日目に肝臓から取り出した正常虫体を用いた。得られた虫体は 2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジレイト緩衝液, pH 7.4) と 1% 四酸化オスミウム (0.1 M カコジレイト緩衝液, pH 7.4) で二重固定し、Epon 815 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) に包埋した。超薄切片は鉛単染色あるいは酢酸ウラニルと鉛の二重染色を施した後、透過型電子顕微鏡日本電子 JEM 2000 EX により観察した。

結 果

正常脱囊メタセルカリア

外皮層内には、皮棘や少数のミトコンドリアに加えて無数の顆粒がみられた (Fig. 1)。それらの顆粒は形態的差異によって大きく 2 種類に分けられた。一つは基質の電子密度がやや低い円盤状の顆粒 (G 0 顆粒) で、多数認められた。他は基質が電子密度の高い粒子状の球状あるいは円盤状の顆粒 (G 1 顆粒) で、少数であった。

上皮細胞の核は楕円形で、核質中に明確な仁を欠き、ヘテロクロマチンが分散していた (Fig. 2)。細胞質中には、多数の G 0 顆粒と少数の G 1 顆粒が存在し (Fig. 2)、また少数のミトコンドリアと豊富な遊離リボゾームが分散していた。よく発達した粗面小胞体とゴルジ装置、結晶構造物が認められた。

X 線非照射虫体

ラット感染後 7、10 および 14 日目の虫体では、感染日数の増加とともに外皮層が肥厚し、ミトコンドリアの数が増加した (Fig. 3)。外皮層では、脱囊メタセルカリアで観察された G 0 顆粒は消失し、代わりに基質が均質または毛羽状か、あるいは均質および毛羽状の両者の基質を含み中程度の電子密度を示す円盤状顆粒 (G 2 顆粒) が認められた (Fig. 3)。また、図には示されていないが少数の G 1 顆粒がみられた。

上皮細胞の核は丸く、ヘテロクロマチンが少なく、大きな仁が 1 または 2 個みられた。多数の G 2 顆粒と少数の G 1 顆粒が細胞質中に認められた。ミトコンドリアの数はメタセルカリアの場合より増加していた。またリボゾームが豊富にみられた (Fig. 4)。粗面小胞体は脱囊メタセルカリアよりも発達していた。よく発達した

ゴルジ装置や結晶構造物も細胞質中に認められた。

X 線照射虫体

10 Gy X 線照射群の感染 7 日目の幼虫では、正常幼虫と比較して外皮層は薄く、G 2 顆粒が少数認められた (Fig. 5)。大部分の顆粒は外皮層表面部近くに集中し、基質は毛羽状であった (Fig. 5)。図示されていないが、G 1 顆粒がまれにみられた。

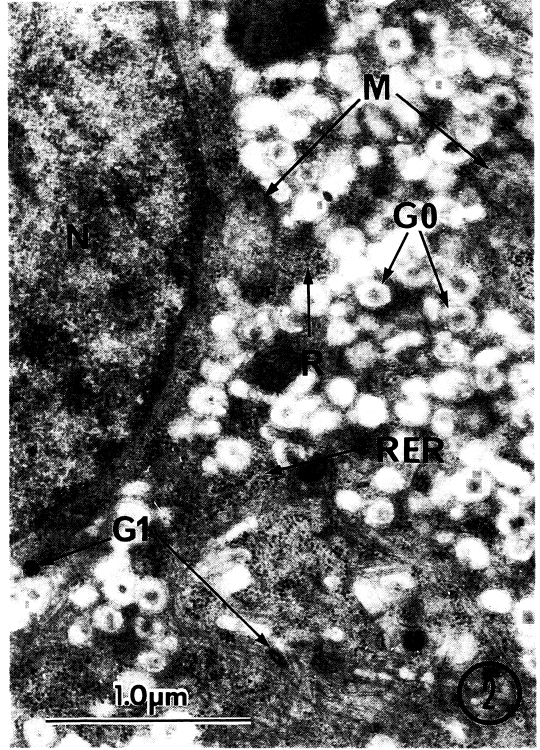
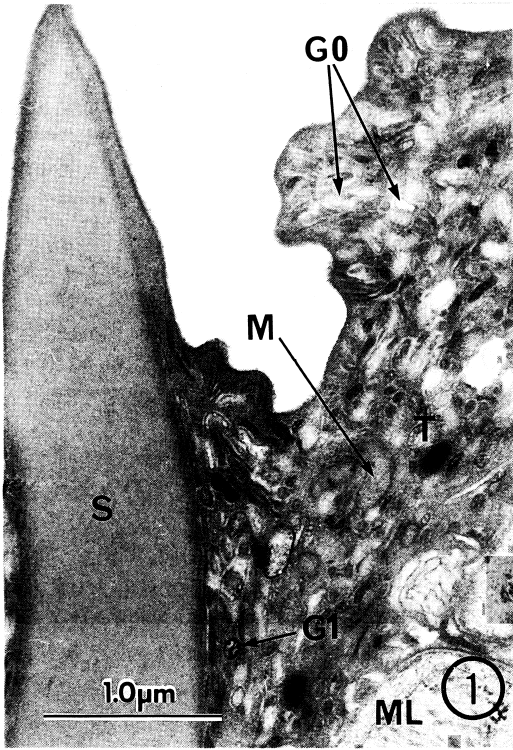
10 Gy X 線照射群のラット感染 7 および 14 日後の虫体では、上皮細胞数は正常メタセルカリアの感染 7 日目虫体と比較して少なかった。上皮細胞の細胞質には、G 0 顆粒はみられず、多数の G 2 顆粒が認められた (Fig. 6)。G 2 顆粒の基質は均質でやや電子密度が低かった。G 1 顆粒は非常に少なかった。

50 Gy X 線照射群の感染 7 日目虫体の外皮層では、G 2 顆粒は外皮層表面部分に集中し (Fig. 7)、顆粒数は 10 Gy 照射群よりも少なかった。図示されていないが、まれに G 1 顆粒がみられた。上皮細胞は少数で、凹凸の多い複雑な外形をした核が認められた (Fig. 8)。その核の仁は電子密度のやや低い顆粒状の基質から成っていた。細胞質には少数の G 2 顆粒が認められた。大部分の G 2 顆粒は基質が毛羽状であった (Fig. 8)。G 1 顆粒がまれにみられた。粗面小胞体やミトコンドリアは正常虫体と比較して少なかったが、形態は正常であった。また多数のライソゾームが認められた (Fig. 8)。

論 議

今回の研究で、10 Gy および 50 Gy の X 線照射を受けた大平肺吸虫メタセルカリアのラット感染後の外皮層や上皮細胞内顆粒の基本的な変化は非照射群と同様であることが示された。すなわち、X 線照射および非照射群のラット感染虫体の外皮層や上皮細胞にはメタセルカリアに特徴的な G 0 顆粒はみられず、成虫型の G 2 顆粒がみられた。これらの結果は、肝蛭メタセルカリアの 30 Gy γ 線照射では成長にともなう外皮層微細構造の変化は遅延するかあるいは正常であったが、40 Gy γ 線照射では成虫の外皮層内顆粒とそれを生産する上皮細胞が出現しなかったという報告 (Burden *et al.*, 1983) と異なっている。

X 線照射の影響は G 2 顆粒の数と上皮細胞の数に現われていた。X 線照射群は非照射群と比べて外皮層内 G 2 顆粒が著しく減少しており、加えて上皮細胞の数が少なかった。外皮層内顆粒は上皮細胞で生産され、外皮層へ輸送される (Bennett and Threadgold, 1975; Burden *et al.*, 1983)。したがって、X 線照射による上皮細胞数の減少が外皮層内 G 2 顆粒の減少となって現れていると考えられる。また 50 Gy 照射群では少数の G 2 顆粒が上皮細胞中に認められたことから、50 Gy 照



射群では、上皮細胞での G 2 顆粒生産の減少も外皮層内 G 2 顆粒の減少に関係していることが示唆される。

大平肺吸虫では、肝蛭 (Bennett and Threadgold, 1975; Hanna, 1980 a, b) と同様に、外皮層内顆粒は糖衣 glycoalyx となる物質を外皮層表面へ供給することが示唆されている (Fujino *et al.*, 1989)。それ故、X 線照射による G 2 顆粒の減少によって糖衣を形成する物質の供給が減少すると考えられる。そして、顆粒には抗原性があることが知られているので (Hanna, 1980 a, b; Fujino *et al.*, 1989)、G 2 顆粒の減少が抗原性物質の減少を引き起こすことは十分考えられる。X 線照射メタセルカリアを感染させたラットでは、正常メタセルカリアの体表抗原に対する抗体の産生が減少することを池田・谷 (1985) が報告している。この抗体産生減少は、今回観察されたメタセルカリア時の X 線照射による G 2 顆粒減少に起因しているのであろう。Fujino *et al.* (1989) はモノクローナル抗体を使用して、大平肺吸虫の G 2 顆粒を抗原性の差異から G 2 D 顆粒と G 2 L 顆粒の 2 つに分け、このうち G 2 L 顆粒がメタセルカリアの糖衣や G 0 顆粒と同一抗原を持つことを報告している。X 線照射によるこのような G 2 顆粒の減少が外皮層表面の糖衣の機能にどのように関わっているかについては現在のところ明確ではない。しかし、正常な外皮層では糖衣は連続的に新しく入れ替わるが (Hanna, 1980 a)、外皮層内顆粒の減少によってこの入れ替わりが遅くなることが考えられる。糖衣の機能として、免疫エフェクター細胞の攻撃から寄生虫自身を保護すること (Hanna, 1980 a; Glauert *et al.*, 1985; Ikeda and Oikawa, 1991) や、イオンや水分の調節に関与すること (Threadgold, 1984) などが考えられている。

50 Gy X 線照射群の上皮細胞では、ミトコンドリアや粗面小胞体は正常であるが、核は凹凸が多く、また多数のライソゾームがみられた。このような上皮細胞の形

態は、Fukuda (1986) が報告した肺吸虫成虫上皮細胞の細胞自滅 apoptosis 時の形態と類似している。また Walker *et al.* (1988) は、放射線照射がほ乳類の胸腺細胞や腸上皮細胞に細胞自滅を起こし得ることを報告している。上皮細胞の今回観察された変化が X 線照射による肺吸虫の死滅 (池田・谷, 1984) に関与している可能性が考えられる。

謝 辞

終わりに、種々ご教示頂きました防衛医科大学校寄生虫学講座浜島房則教授ならびにご教示・ご校閲を頂きました九州大学医学部寄生虫学講座藤野隆博博士、X 線照射に協力して頂いた防衛医科大学校病院放射線部福井利治氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Bennett, C. E. and Threadgold, L. T. (1975): *Fasciola hepatica*: Development of tegument during migration in mouse. *Exp. Parasitol.*, 38, 38–55.
- 2) Burden, D. J., Bland, A. P., Hughes, D. L. and Hammet, N. C. (1983): *Fasciola hepatica*: development of the tegument of normal and X-irradiated flukes during infection in rats and mice. *Parasitology*, 86, 137–145.
- 3) Fujino, T., Ikeda, T., Oikawa, Y., Fukuda, K. and Ishii, Y. (1989): Expression of a tegumental antigen during the development of *Paragonimus ohirai*. *Jpn. J. Parasitol.*, 38, 263–270.
- 4) Fukuda, K. (1986): Differentiation and degeneration of tegumental cells in adult lung flukes, *Paragonimus* species (Trematoda: Troglotrematidae). *Int. J. Parasitol.*, 16,

Fig. 1 Tegument of a newly excysted juvenile showing a large number of ovoid, moderately electron-dense G0 granules and a small number of electron-dense, round G1 granules.

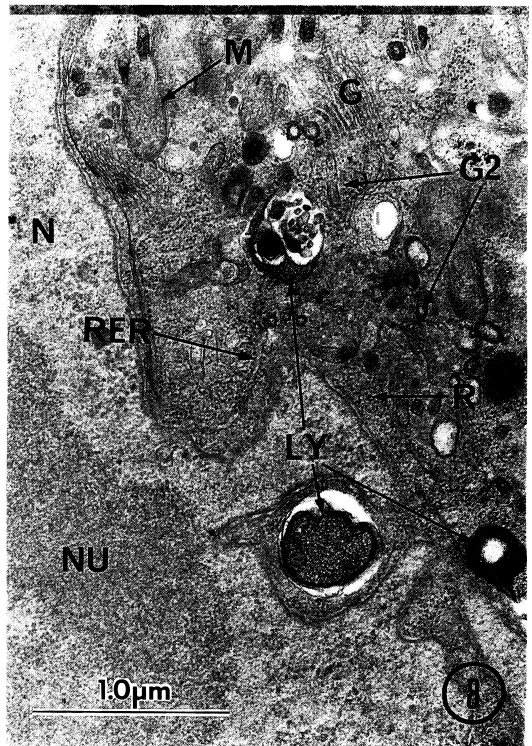
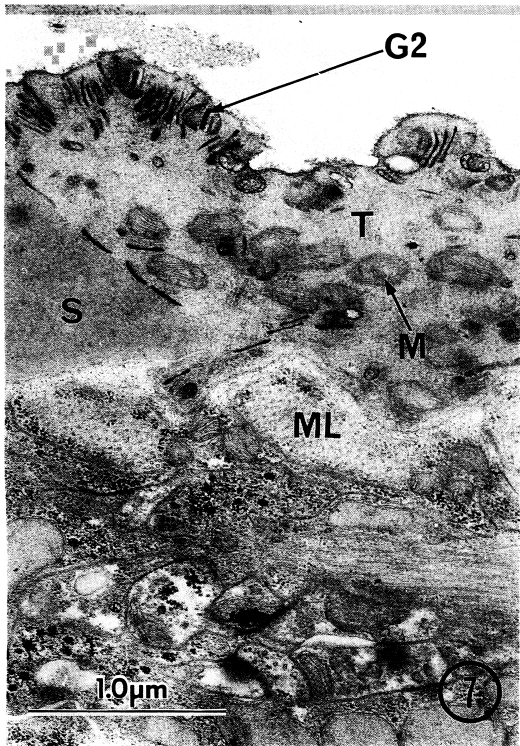
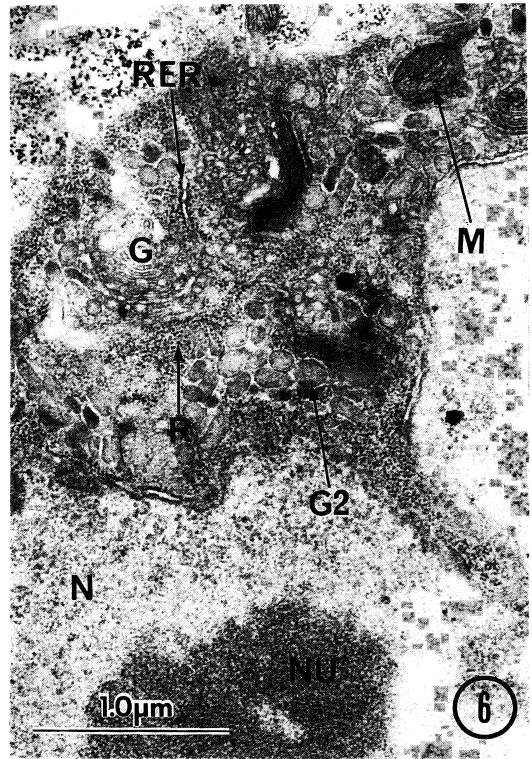
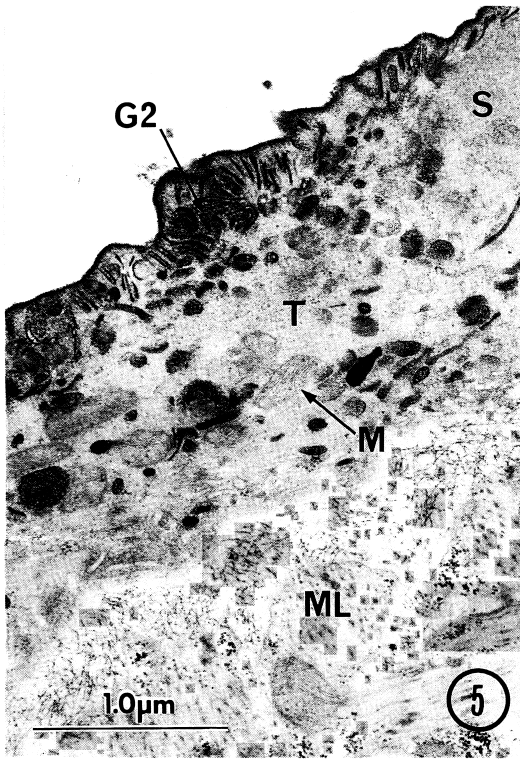
Fig. 2 Tegumental cell of a newly excysted juvenile.

Fig. 3 Tegument of a normal control worm on day 7 PI, showing oval-shaped electron dense G2 granules.

Fig. 4 Tegumental cell of a control worm on day 10 PI.

Abbreviations

CI:	Crystalline inclusion	ML:	Muscle Layer
G:	Golgi complex	N:	Nucleus
G0:	G0 granule	NU:	Nucleolus
G1:	G1 granule	R:	Ribosome
G2:	G2 granule	RER:	Rough endoplasmic reticulum
LY:	Lysosome	S:	Spine
M:	Mitochondrion	T:	Tegument



- 147–156.
- 5) Glauert, A. M., Lammas, D. A. and Duffs, W. P. H. (1985) : Ultrastructural observations on the interaction *in vitro* between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 91, 459–470.
 - 6) Hanna, R. E. B. (1980 a) : *Fasciola hepatica* : glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.*, 50, 103–114.
 - 7) Hanna, R. E. B. (1980 b) : *Fasciola hepatica* : Autoradiography of protein synthesis, transport, and secretion by the tegument. *Exp. Parasitol.*, 50, 297–304.
 - 8) Ikeda, T. and Fujita, T. (1982) : IgE in *Paragonimus ohirai*-infected rats : effect of X-irradiation. *J. Parasitol.*, 68, 955–957.
 - 9) 池田照明・谷荘吉 (1984) : X線照射による大平肺吸虫メタセルカリアのラット寄生への影響について. *寄生虫誌*, 33, 377–384.
 - 10) 池田照明・谷荘吉 (1985) : ラットにおける大平肺吸虫感染 : 間接免疫蛍光法でみた抗脱囊幼虫 IgG 抗体産生. *寄生虫誌*, 34, 127–132.
 - 11) Ikeda, T. and Tani, S. (1988) : Induction of secondary IgE antibody response in rats immunized with X-irradiated metacercariae of *Paragonimus ohirai*. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 85, 213–218.
 - 12) Ikeda, T. and Oikawa, T. (1991) : *Paragonimus ohirai* : Immunobiochemical characterization on the tegumental glycocalyx of excysted juvenile recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.*, 72, 252–261.
 - 13) Threadgold, L. T. (1984) : Parasitic plathyhelminths. In *Biology of the integument*, Vol. 1, Beriter-Hahn, J., Matolotsy, A. G., and Richards, K. S., ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York and Tokyo, 132–191.
 - 14) Walker, N. I., Harmon, B. V. Gobe, G. C. and Kerr, J. E. R. (1988) : Patterns of cell death. In *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, Vol. 13. Jasmin, G., ed., Karger, Basel, 18–54.

Fig. 5 Tegument of a X-irradiated worm at a dose of 10 Gy on 7 days PI. G0 granules are seen lying close to the apical plasma membrane.

Fig. 6 Tegumental cell of a X-irradiated worm at a dose of 10 Gy on 7 days PI.

Fig. 7 Tegument of a X-irradiated worm at a dose of 50 Gy on 7 days PI.

Fig. 8 Tegumental cell of a X-irradiated worm at a dose of 50 Gy on day 7 days PI.

Abstract

ULTRASTRUCTURE OF THE TEGUMENT OF NORMAL AND
X-IRRADIATED LUNG FLUKE, *PARAGONIMUS OHIRAI*,
DURING EARLY DEVELOPMENT IN RATS

KOICHI FUKUDA AND TAKEMI OGUMA

Department of Parasitology, National Defence Medical College, Tokorozawa 359, Japan

Rats were infected with either normal or X-irradiated metacercariae of the lung fluke, *Paragonimus ohirai*. X-irradiation doses were 10 Gy or 50 Gy. X-irradiated worms were recovered at 7 and 14 days PI, and their tegument was examined by electron microscopy in comparison with those of the normal control worms. Three types of secretory granules were observed during early development; G0 granules were characteristically seen in newly excysted juveniles, G1 granules were seen in all worms and G2 granules were only observed in worms from rats. X-irradiation decreased the number of G2 granules in the tegument and also the number of tegumental cells in which the granules were synthesized. In X-irradiated worms at a dose of 10 Gy on days 7 and 14 PI, the number of G2 granules of tegumental cells were almost the same as those of the normal control worms. Whereas in X-irradiated ones at a dose of 50 Gy on day 7 PI, the number of G2 granules decreased in tegumental cells. These cells contained a convoluted nucleus, many lysosomes and fewer G2 granules, together with normal mitochondria and endoplasmic reticulum. Morphologically the G0 and G1 granules were not affected by X-irradiation.