

ネズミ糞線虫第3期幼虫の温度走性

戸畑 博恵¹⁾ 嶋田 雅暁²⁾

¹⁾産業医科大学産業保健学部衛生学科第2生体情報学,

²⁾産業医科大学医学部寄生虫学・熱帯医学教室,

〒807 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1)

(掲載決定:平成8年9月3日)

要 旨

ネズミ糞線虫 *Strongyloides ratti* の第3期幼虫の温度勾配上における行動を観察したところ, ある条件下で正と負の温度走性を持つことが明らかになった。動物寄生性線虫の感染期仔虫で負の温度走性が観察されたのはこれが初めてである。培養温度25°Cで得られた第3期幼虫は, 22°C以上の温度環境に置いた場合は正の温度走性を, 22°C未満の温度環境に置いた場合は負の温度走性を示す傾向を示した。培養温度20°Cで得られた第3期幼虫の温度走性は正の方向のみで負の方向へはなく, 培養温度30°Cで得られた第3期幼虫では温度走性はまったく認められなかった。これらの観察結果から, ネズミ糞線虫 *S. ratti* 第3期幼虫の温度走性は, 予め暴露された環境温度と, その後幼虫が新たに暴露された環境温度と温度勾配によって決定されると考えられる。

Key words: Nematoda; 3rd stage larva; *Strongyloides ratti*; thermotaxis; temperature gradient.

緒 言

経皮的に感染期仔虫が宿主体内に侵入することにより感染が成立する線虫の感染機転の解明のためには, 仔虫の生態, とりわけ周囲を取り巻く環境条件がその行動に与える影響を明らかにすることが重要である。これまでに環境因子として光, 温度, 湿度, 生体成分, 各種化学物質などについて検討されてきたが, そのうち物理的環境条件のひとつである温度については, アメリカ鉤虫, ズビニ鉤虫, イヌ鉤虫などで平井 (1929), 分島 (1933), 三谷 (1957), 川辺 (1960) が, *Nippostrongylus brasiliensis* で McCue and Thorson (1964) が, *Nippostrongylus muris* で Africa (1931), Boardman (1933), Cunningham (1956), Parker and Haley (1960) が, *Terranova decipiens* では Ronald (1960) が, *Molineus barbatus* で Gupta (1963) が, *Ancylostoma tubaeforme* で Croll and Smith (1972) が, *Strongyloides ratti* では Barrett (1968) が, それぞれ正の温度走性を観察しており, 動物寄生性線虫の感染期仔虫は一般的に正の温度走性を持つと考えられてきた。

一方, 自由生活線虫の行動に関する知見は近年 *Caenorhabditis elegans* を用いた研究で急速に増え

た (Ward, 1973; Hedgecock and Russell, 1975; Dusenbery and Barr, 1980; Golden and Riddle, 1984)。Hedgecock and Russell (1975) は, 線虫の行動を決定する温度条件として, 予め暴露されていた温度が重要な因子であること, また周囲の餌の量など温度以外の環境要因も規定因子であることを明らかにし, 線虫の行動はその置かれた環境温度だけでは単純に理解できないことを示した。寄生性線虫の感染期仔虫は自由生活線虫とは異なり摂食行動, 生殖行動などをしないが, 物理的・化学的刺激に対しては類似的反応行動をとることが考えられる。むしろ, 摂食行動や生殖行動などがなければ行動としては単純で解析しやすい。従って寄生線虫感染期仔虫においても今一度, 周囲の環境条件がその行動に与える影響を詳細に観察する必要があると考えられる。

ネズミ糞線虫 *S. ratti* は実験モデルとして広く用いられる寄生線虫のひとつである。ネズミ糞線虫の第3期幼虫は通常土壌中に生息し, それが経皮感染すると考えられている。しかしながらこの感染期の *Strongyloides* の仔虫についての行動を観察した報告はない。そこで, 著者らは寄生性線虫の感染期仔虫モデルとしてこのネズミ糞線虫 *S. ratti* の第3期幼虫を用い, その行動に対する環境の影響, 特にその物理的要因である温度について検討した。ここでは, ネズミ糞線虫 *S. ratti* 第3期幼虫の温度勾配上の行動について明らかにした点を報告する。

Correspondence: Hiroe Tobata, e-mail: hiroe@med.uoeh-u.ac.jp

材料および方法

材料：ネズミ糞線虫 *S. ratti* は、熊本大学医学部寄生虫病学教室の維持株から1992年1月に分与され、当教室で継代維持しているものを用いた。継代飼育はネズミ糞線虫感染後8日目のWistar系ラット（♂）の糞便を、Tada *et al.* (1979) に準じて25°Cで濾紙培養し、4日目に得られた第3期幼虫約3,000隻を5～9週令のWistar系ラットの腹部に皮下接種する方法で行った。実験には20°C、25°Cまたは30°Cで4～6日間培養して得られた第3期幼虫を供した。

方法：Fig. 1に温度勾配を作るための装置の模式図を示す。アルミ板を2つのアルミブロックの上に固定し、それらを温度を5°Cと55°Cに設定した2つの水槽に浸けて温度勾配を作った。アルミ板の上にはグラフ用紙を敷き、ガラス板上に作成した厚さ5mmの寒天ゲル（3.5

%普通寒天培地、日水製薬）を置いた。寒天ゲル表面の温度は実験毎に測定したが、勾配は常に直線的であった。幼虫の行動は、寒天ゲル上に適宜滴下した水滴中から幼虫がゲル上に脱出した時点を基点に、温度勾配のある横方向をX軸、温度勾配のない縦方向をY軸として、軌跡を1分ごとにmm単位で15分間手術用顕微鏡下（×40）に記録した。1回の観察には1～3隻を供した。終了後、寒天ゲル上の温度は熱電対温度計（DELTA SK-2000MC、佐藤計量器製作所）で、水滴を滴下した個所、幼虫が15分後に到着した個所並びに他の4～5点の温度を測定し温度勾配を確認した。

結果

実験1：培養温度25°Cで得られた幼虫の温度走性

温度勾配上で17.8～37.0°Cに置いた幼虫691隻の移動方向と15分後に到着した地点までの距離を Figs.2a, 3

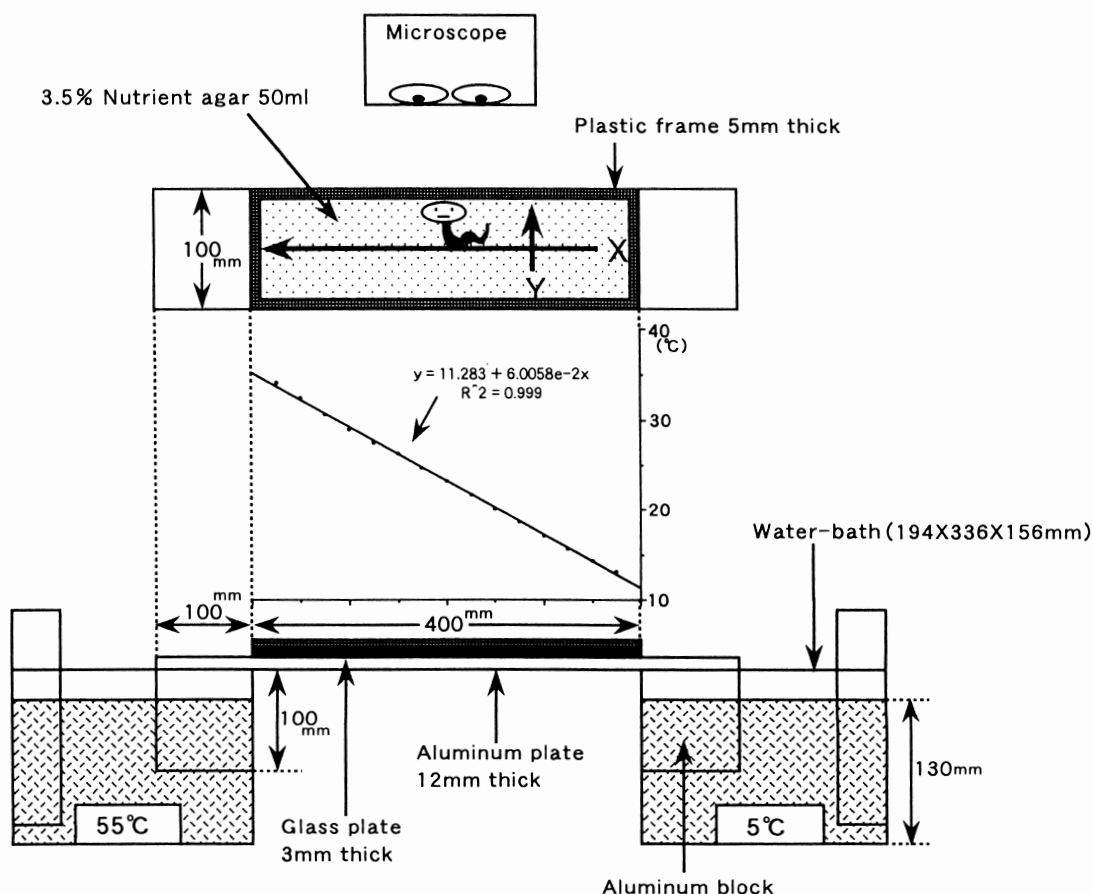


Fig. 1 Diagram of the migration device.

に示した。

X軸方向の移動方向と距離は新たに置かれた場所の温度に依存し、置かれた場所の温度が25.0–29.9℃ではほとんど全ての幼虫(243/245)がより高い方向(正)へ移動し、19.9℃以下では111隻中100隻がより低い方向(負)へと移動した。置かれた場所の温度が20.0–24.9℃では正の方向へ移動したものが315隻中187隻、負の方向へ移動したものが125隻、30.0℃以上では正の方向へ移動したものが20隻中15隻、負の方向へ移動したものが4隻であった(Fig. 2a)。温度勾配のないY軸方向では、

正の方向へ移動したものが338隻、負の方向へ移動したものが339隻で、移動に方向性は認められなかった(Fig. 3)。

Fig. 4aには、幼虫の温度勾配上の平均移動距離を温度差で経時的に示した。平均的な移動方向は、置かれた場所の温度21.5℃付近を境界として正と負に分かれ、15分間の平均移動距離は21.5–22.4℃に置いた幼虫では正の方向に $0.88 \pm 0.36^\circ\text{C}$ 、24.5–25.4℃に置いた幼虫では正の方向に $4.12 \pm 0.29^\circ\text{C}$ 、27.5–28.4℃に置いた幼虫では正の方向に $3.04 \pm 0.29^\circ\text{C}$ 、19.5–20.4℃に置いた幼虫では負の方向に $0.99 \pm 0.12^\circ\text{C}$ であった。

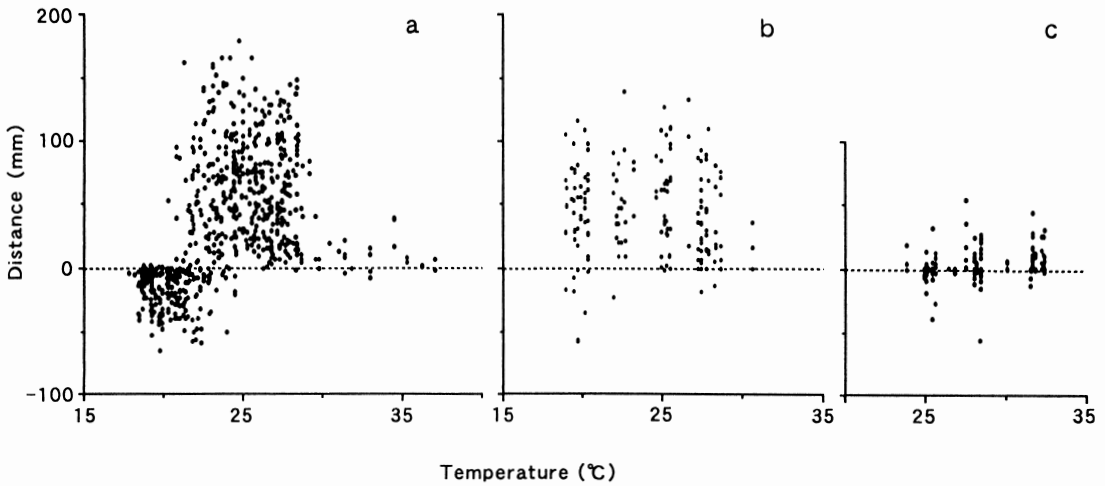


Fig. 2 Relationship between the temperature where larvae were put and migrating distances for 15 minutes along X axis (temperature gradient).
(-: larvae migrate to the low temperature, +: to the high temperature)
a: cultured at 25°C, b: cultured at 20°C, c: cultured at 30°C

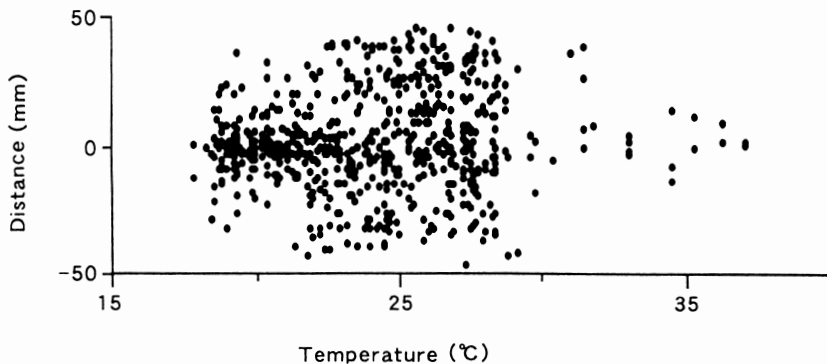


Fig. 3 Relationship between the temperature where larvae put (cultured at 25°C: n=691) and migrating distances for 15 minutes along Y axis (no temperature gradient).
(-: migrate to the left, +: to the right)

移動方向とは無関係に、幼虫が置かれた地点の温度から15分間に移動した地点までの直線距離 ($\sqrt{X^2+Y^2}$) を求め幼虫の移動速度 (mm/min) を Fig.5a に示した。22.0–29.9°Cに置いた幼虫では1分間に平均4.44 ± 0.39mm 移動するのにに対し、21.9°C以下または30.0°C以

上に置いた幼虫ではそれぞれ平均1.32 ± 0.24mm/min、1.02 ± 0.30mm/minであり、移動速度は置かれた場所の温度に依存していた。

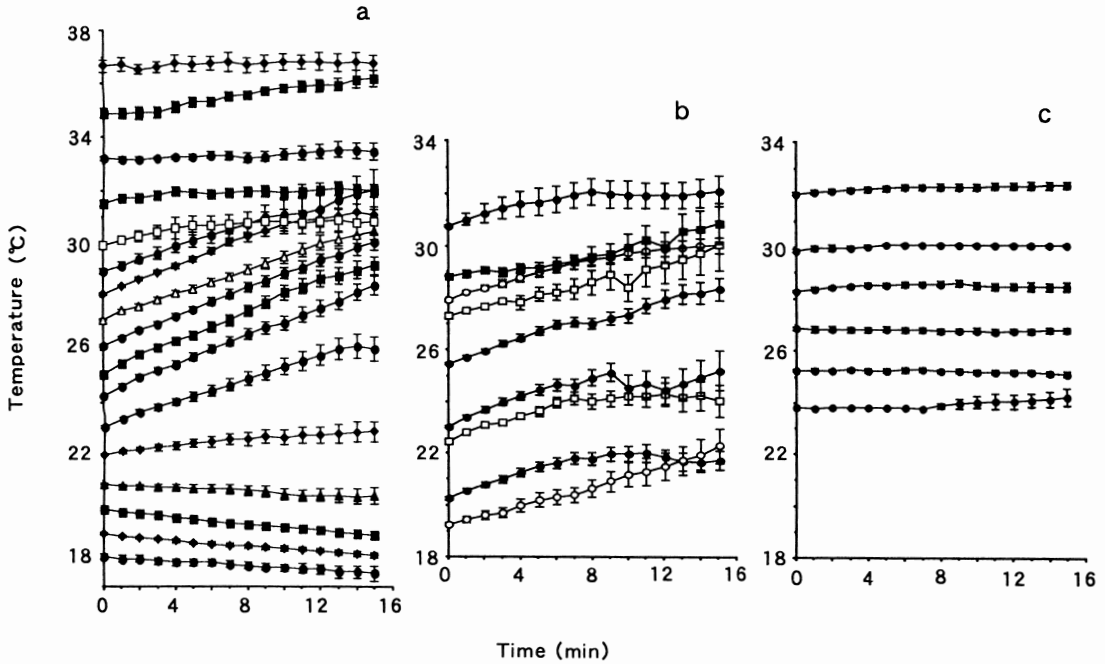


Fig. 4 Migration of larvae for 15 minutes along the temperature gradient.
a: cultured at 25°C, b: cultured at 20°C, c: cultured at 30°C

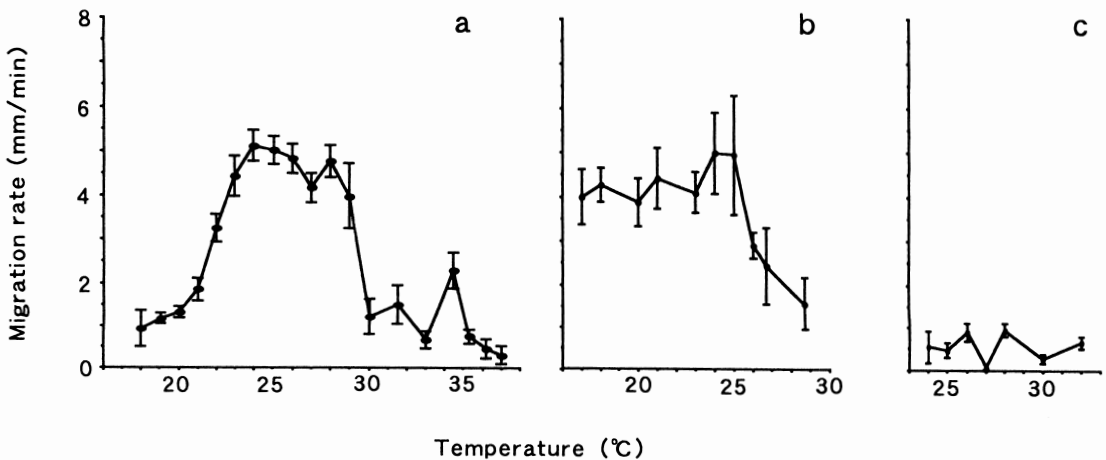


Fig. 5 Migration rate at the temperature where larvae put.
Migration rate (mm/min) = $\sqrt{X^2+Y^2}/15$
a: cultured at 25°C, b: cultured at 20°C, c: cultured at 30°C

実験2：培養温度20℃または30℃で得られた幼虫の温度走性

Fig. 2b と2c に、温度勾配上での幼虫（20℃で培養：178隻、30℃で培養：147隻）の移動方向と距離を、Fig. 4b と4c には、幼虫の温度勾配上の平均移動距離を温度差で経時的に示し、Fig. 5b と5c には移動速度（mm/min）を示した。

20℃で培養したものは温度勾配上の19.0–30.7℃に置かれたが、そのうち負の方向に移動したものは178隻中12隻のみで他はすべて正の方向に移動した（Fig. 2b）。また、15分間の平均移動距離は19.5–20.4℃に置いた幼虫では正の方向に $1.50 \pm 0.32^\circ\text{C}$ 、24.7–25.6℃に置いた幼虫では正の方向に $2.91 \pm 0.39^\circ\text{C}$ であった（Fig. 4b）。移動速度は27.9℃以下と28.0℃以上では大きく異なり、それぞれ平均 $4.36 \pm 0.70\text{mm/min}$ 、 $2.29 \pm 0.60\text{mm/min}$ であった（Fig. 5b）。

一方、30℃で培養して温度勾配上の23.8–32.4℃に置いたものは、正の方向に移動したものの68隻、負の方向に移動したものの41隻で温度走性は認められなかった（Fig. 2c）。15分間の平均移動距離も24.9–26.4℃に置いた幼虫では負の方向に $0.11 \pm 0.05^\circ\text{C}$ 、27.5–28.4℃に置いた幼虫で正の方向に $0.21 \pm 0.12^\circ\text{C}$ とわずかであった

（Fig. 4c）。また移動速度はどの温度に置いても低く平均 $0.55 \pm 0.18\text{mm/min}$ であった（Fig. 5c）。

なお20℃、25℃、30℃の培養で得られた幼虫のラットへの感染はどの温度でも成立し、培養温度による感染率の有意な差は認められなかった。

考 察

今回著者が観察したネズミ糞線虫 *S. ratti* 第3期幼虫の温度走性の結果をフローチャートに示すと Fig. 6 のようになる。25℃で培養して得られた幼虫は、22℃以上30℃未満に置いた場合、温度の高い方（30℃付近）へと移動する傾向を示した。また30℃以上に置いたときはそのまま移動せず、22℃未満に置いたときは低い温度の方へ移動する傾向を示した。20℃で培養した幼虫を温度勾配上に置いたときには、どの温度に置いても温度の高い方へと移動し、30℃で培養した幼虫ではどの温度に置いても温度に対する方向性がなかった。ネズミ糞線虫 *S. ratti* 第3期幼虫の温度走性は予め長時間暴露された環境の温度と、その後新たに置かれた幼虫の環境の温度によって決定され、しかも必ずしも正の方向だけの温度走性ではなく、負の温度走性も持つことが明らかである。

動物寄生以外の寄生性線虫の温度走性については、植

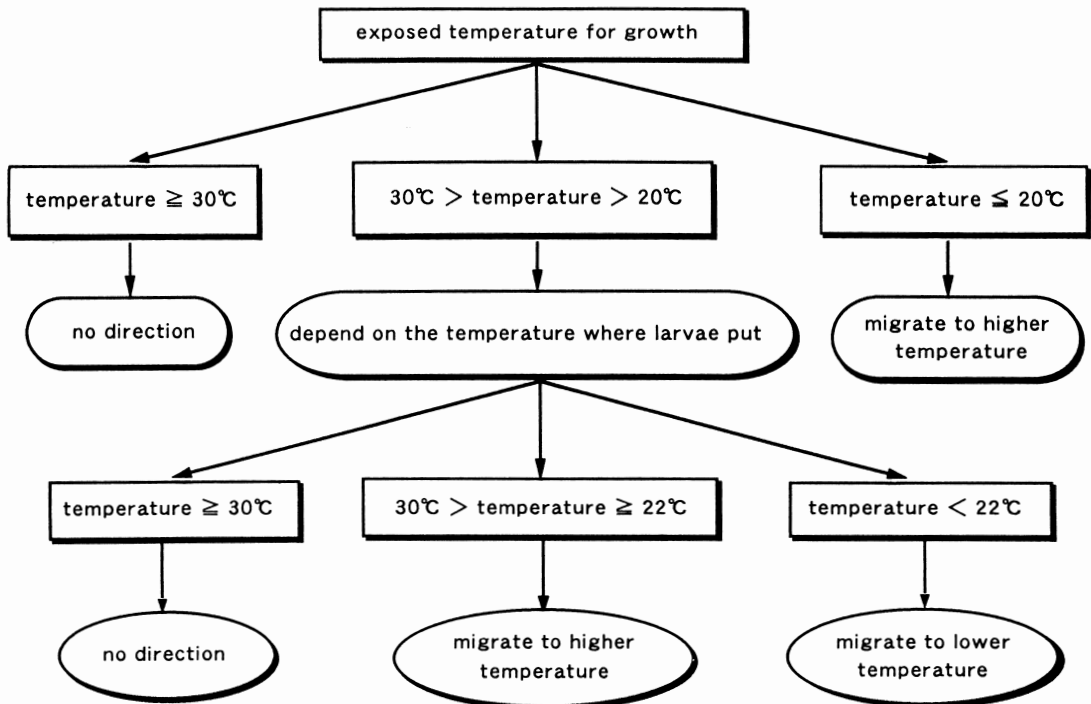


Fig. 6 Reaction of the third-stage larvae of *S. ratti* on the temperature gradient.

物寄生性線虫 *Tylenchorhynchus claytoni*, *Pratylenchus penetrans*, *Aphelenchus avenae* の成虫と自由生活線虫 *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans* の成虫で Hitcho and Thorson (1972) がそれぞれ正の温度走性を観察しているが、植物寄生性線虫の *Ditylenchus dipsaci* の成虫と (Wallace, 1961; Croll, 1967; El-Sherif and Mai, 1969), 昆虫寄生性線虫の *Neoaplectana carpocapsae* の感染型幼虫 (ダウエル第3期幼虫) (Burman and Pye, 1980) では、幼虫が温度勾配上に置かれた場合発育した環境温度へと幼虫が集まる傾向を示し、その際に負の温度走性を観察している。しかしながら、動物寄生性線虫の感染期仔虫で今までに報告された温度走性はすべて正の温度走性であり、正と負の両方の温度走性が観察されたのはこの報告が初めてである。ネズミ糞線虫 *S. ratti* では以前に Barrett (1968) が、直接発育世代株の感染型幼虫で正の温度走性を報告しているが、我々の結果と異なる理由は不明である。幼虫が予め暴露されていた温度が考慮されていないためかも知れない。

線虫の温度に対する感受性がそれまでに線虫が暴露されていた環境温度に依存し、正と負の両方の温度走性を示すことは、自由生活線虫の *C. elegans* の成虫では既に明らかにされている (Hedgecock and Russell, 1975; 森・大島, 1991, 1993)。 *C. elegans* 成虫を16~25°Cのある温度下で大腸菌を餌として4時間以上飼育後、餌のない温度勾配上に置くと、まず飼育温度の方向へ移動し、飼育温度付近で等温線に沿って移動する。しかし、ある温度下で4時間程度飢餓状態を経験させると、温度勾配上で今度はその温度から分散するように一部は正、一部は負の方向へ移動する。

最近 Mori and Ohshima (1995) はこの *C. elegans* の温度走性の神経機構について検討し、amphid が温度感覚器として重要であることを示唆している。 *C. elegans* の dauer larvae の温度走性を見たものはないが、 *C. elegans* の amphid の機能が成虫と幼虫で著しく異なるとは考えにくく、dauer larvae でも同様の温度走性を示すことが考えられる。Ashton and Schad (1996) は、 *S. stercoraris* 第3期幼虫の amphid を *C. elegans* の dauer larvae の amphid と形態学的に比較し、極めて良く似た構造であることを示している。ネズミ糞線虫 *S. ratti* の第3期幼虫においても正と負の両方の温度走性が観察されたことは、自由生活線虫の amphid と寄生性線虫感染期仔虫の amphid が機能的にも同等のものである可能性を示唆している。今後、糞線虫では第3期幼虫の、 *C. elegans* では dauer larvae の amphid の機能、神経機構について詳細な検討が必要であろう。

C. elegans 成虫の正と負の両方向への温度走性は、ある温度環境に生存に不利な条件下で置かれた場合は、新しい環境下でその温度から遠ざかり、ある温度環境が生存に有利な場合は、新しい環境下でもその温度に集合するために必要な機能と解釈されており (Hedgecock and Russell, 1975), *S. ratti* の第3期幼虫の場合も同じ様な解釈が可能である。

寄生線虫である *S. ratti* の第3期幼虫の場合、生存に有利な環境とは宿主との遭遇機会に恵まれた環境、または、遭遇機会が期待できなければ、次に感染に適した環境に恵まれるときまで長期間生存することが可能な環境である。我々が培養温度として用いた20°Cと25°Cの環境は、宿主への感染可能性あるいは長期生存可能性という視点から見た場合には不利な環境条件かもしれない。Barrett (1968) は、直接発育世代株のネズミ糞線虫 *S. ratti* の自由生活世代の感染型幼虫の発育について、感染型幼虫の長期生存に適した環境の温度は15°Cであるが、活動性 (waves/min) は37°Cで最大であると述べている。田邊 (1938) によれば、発育に最も適した温度範囲は24°Cから28°Cである。従って、培養温度20°Cと25°Cの場合、幼虫の温度勾配に対する行動が順応した環境温度から離れる傾向を示すのは、その温度が発育のためには有利でも宿主への感染または長期生存のためには不利なため、飢餓状態という不利な状態に置かれた場合の *C. elegans* が温度勾配に対して分散する反応と同様に理解することが出来る。

一方で土壤中で感染期である第3期幼虫にまで発育した幼虫にとっては、宿主へとたどり着くことが次の最大の目標となる。そのためには土壤表面近くに生息する必要がある。Dusenbery (1988) は、絶えず変化している環境温度によって土壤中の温度の勾配方向が1日の中でも逆転し、土壤中の生物がその置かれた場所の温度変化やその温度勾配方向の変化に回答しながら刻々と移動の方向を変え土壤表面へ出ていくためには、正の温度走性だけでは不十分で正と負の両方の温度走性が必要であることを数学的にシミュレートしている。25°Cで得られた第3期幼虫で観察された正と負の温度走性は、宿主に遭遇するため幼虫を土壤表面の方向へ向かわせるために必要な機構かも知れない。

寄生線虫の感染期仔虫が次の発育段階へと進むためには宿主へ感染しなければならない。ネズミ糞線虫第3期幼虫で観察された正と負の温度走性が宿主への感染へと繋がる宿主発見行動に作用する因子のひとつとして重要な役割を果たすか否かを明らかにすることが、今後の課題であろう。

文 献

- 1) Africa, C. M. (1931) : Studies on the activity

- of the infective larvae of the rat strongyloid, *Nippostrongylus muris*. J. Parasitol., 17, 196-206.
- 2) Ashton, F. T. and Schad, G. A. (1996) : Amphids in *Strongyloides stercoralis* and other parasitic nematodes. Parasitology Today, 12, 187-194.
 - 3) Barrett, J. (1968) : The effect of temperature on the development and survival of the infective larvae of *Strongyloides ratti* Sandground, 1925. Parasitology, 58, 641-651.
 - 4) Boardman, E. T. (1933) : A comparative study of the behaviour of the preparasitic larvae of four bursate nematodes. Unpublished dissertation, Welch Medical Library, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA.
 - 5) Burman, M. and Pye, A. E. (1980) : *Neoapectana carpocapsae*: Movements of nematode populations on a thermal gradient. Exp. Parasitol., 49, 258-265.
 - 6) Croll, N. A. (1967) : Acclimatization in the ecritic thermal response of *Ditylenchus dipsaci*. Nematologica, 13, 385-389.
 - 7) Croll, N. A. and Smith, J. M. (1972) : Mechanism of thermopositive behavior in larval hookworms. J. Parasitol., 58, 891-896.
 - 8) Cunningham, F. C. (1956) : A comparative study of tropisms exhibited by different stages of *Nippostrongylus muris* (Nematoda: Trichostrongylidae). Catholic University of America, Biological Studies, 36, 1-24.
 - 9) Dusenbery, D. B. (1988) : Avoided temperature leads to the surface: computer modeling of slime mold and nematode thermotaxis. Behav. Ecol. Sociobiol., 22, 219-223.
 - 10) Dusenbery, D. B. and Barr, J. (1980) : Thermal limits and chemotaxis in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* defective in thermotaxis. J. Comp. Physiol. A, 137, 353-356.
 - 11) El-Sherif, M. and Mai, W. F. (1969) : Thermotactic response of some plant parasitic nematodes. J. Nematol., 1, 43-48.
 - 12) Golden, J. W. and Riddle, D. L. (1984) : The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. Dev. Biol., 102, 368-378.
 - 13) Gupta, S. P. (1963) : Mode of infection and biology of infective larvae of *Molineus barbatus* Chandler, 1942. Exp. Parasitol., 13, 252-255.
 - 14) Hedgecock, E. M. and Russell, R. L. (1975) : Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4061-4065.
 - 15) 平井正就 (1929) : 十二指腸虫被胞仔虫の向性(とろびすむす)に就ての研究並に其他の生物学的知見補遺. 慶応医学, 9, 281-328.
 - 16) Hitcho, P. J. and Thorson, R. E. (1972) : Behavior of free-living and plant-parasitic nematodes in a thermal gradient. J. Parasitol., 58, 599.
 - 17) 川辺光丸 (1960) : 鉤虫感染仔虫の趨向性と皮膚侵入機転. 横濱医学, 11, 648-674.
 - 18) MuCue, J. F. and Thorson, R. E. (1964) : Behavior of parasitic stages of helminths in a thermal gradient. J. Parasitol., 50, 67-71.
 - 19) 三谷和合 (1957) : 鉤虫仔虫の生態学的研究(3) 実験的塵芥処理場に於ける鉤虫卵及び鉤虫仔虫の運命. 寄生虫学雑誌, 6, 122-126.
 - 20) 森 郁恵・大島靖美 (1991) : 線虫の温度走性. 細胞工学, 10, No.9, 695-702.
 - 21) 森 郁恵・大島靖美 (1993) : C.エレガンスの神経系解析-温度走性に関する情報伝達系の分子および細胞生物学的理解を目指して-. 実験医学, 11, No.12 (増刊), 1577-1584.
 - 22) Mori, I. and Ohshima, Y. (1995) : Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. Nature, Vol. 376, 344-348.
 - 23) Parker, J. C. and Haley, A. J. (1960) : Phototactic and thermotactic responses of the filariform larvae of the rat nematode *Nippostrongylus muris*. Exp. Parasitol., 9, 92-97.
 - 24) Ronald, K. (1960) : The effects of physical stimuli on the larval stage of *Terranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda, Anasakidae). I. Temperature., Can. J. Zool., 38, 623-642.
 - 25) Tada, I., Mimori, T. and Nakai, M. (1979) : Migration route of *Strongyloides ratti* in albino rats. Jpn. J. Parasitol., 28, 219-227.
 - 26) 田邊是憲 (1938) : 外因の *Strongyloides ratti* 仔虫の發育機構に及ぼす影響に就て. 慶応医誌, 18, 987-999.
 - 27) 分島 整 (1933) : 鉤虫科 Ancylostomidae の成熟仔虫の趨向性 Tropism に関する実験的研究(4), 鉤虫科 Ancylostomidae の成熟仔虫の向光性 Phototropism, 向温性 Thermotropism 並に向地性 Barytropism. 台湾医学会雑誌, 32, 1533-1548.
 - 28) Wallace, H. R. (1961) : The orientation of *Ditylenchus dipsaci* to physical stimuli. Nematologica, 6, 222-236.
 - 29) Ward, S. (1973) : Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans* : Identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 817-821.

Abstract

THERMOTAXIS IN THE THIRD-STAGE LARVAE OF *STRONGYLOIDES RATTI*

HIROE TOBATA¹⁾ AND MASAOKI SHIMADA²⁾

¹⁾Department of Medical Technology, School of Health Sciences,

²⁾Department of Parasitology and Tropical Public Health, School of Medicine,
University of Occupational and Environmental Health, Japan, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan.

We observed that the behavior of the third-stage larvae of *Strongyloides ratti* had both positive and negative thermotaxis on a temperature gradient. This is the first finding reported on animal parasitic nematodes. When the larvae cultured at 25°C were placed at the temperature of or above 22°C on the gradient, they tended to migrate to approximately 30°C. However, when they were placed at the temperature below 22°C, they tended to migrate to the lower temperature range of <22°C, and when they were placed at the temperature of 30°C or more, they did not show thermotaxis. The third-stage larvae cultured at 20°C had only the positive thermotaxis, but those cultured at 30°C did not migrate either positively or negatively along the temperature gradient. From these observations, we concluded that the thermotaxis in the third-stage larvae of *S. ratti* is affected initially by the temperature exposed during growth, and then by the temperature and its gradient in a given environment.