

抗線虫薬の作用研究用の新しい *in vitro* 実験 モデル系としての *Rhabditis (Rhabditella)*

pseudoelongata Micoletzky, 1913

寺田 護¹⁾ 石井 明¹⁾ 可知茂男¹⁾ 記野秀人¹⁾
皆川 望²⁾ 影井 昇³⁾ 須田久也⁴⁾ 斎藤英夫⁴⁾

¹⁾浜松医科大学寄生虫学教室, 〒431-31 浜松市半田町3600

²⁾農林水産省農業研究センター, プロジェクト研究第2チーム, 〒305 つくば市観音台3-1-1

³⁾国立予防衛生研究所寄生動物部, 〒162 東京都新宿区戸山1-23-1

⁴⁾科研製薬(株)特薬部, 〒245 藤枝市源助301)

(掲載決定: 平成8年10月22日)

要 約

糞線虫症が疑われた患者の糞便を寒天平板上で培養したところ *in vitro* で増殖する桿線虫類の虫体が得られた。虫卵は $51.5\mu\text{m} \times 27.3\mu\text{m}$ で卵殻が極めて薄く、成虫はピン状の尾部を有し、尾端までの体長が雌で1.38mm, 雄は1.14mmであった。口腔, 尾部, 生殖器官などの特徴から *Rhabditis (Rhabditella) pseudoelongata* Micoletzky, 1913と同定された。1.5%寒天平板培地では, 栄養源としてはヒト糞便が最も良好であったが, ネズミ粉末飼料でも代用できた。また, NI medium ほかの液体メディアウムでも培養可能であった。培養温度は25°Cが最適であった。維持には粉末飼料を栄養源とする1.5%寒天平板ないし NI medium で17°Cで培養し, 40日ごとに移植している。

Key words: *Rhabditis (Rhabditella) pseudoelongata* Micoletzky, 1913; facultative parasite; *in vitro* assay model.

緒 言

これまで, 著者らは, 専ら広東住血線虫などの自動運動を指標にして駆虫薬の *in vitro* 作用を検討してきた(寺田, 1989)。最近, 牛, 羊, 豚などの腸管線虫類に由来より用いられてきたベンズイミダゾール誘導体(Mebendazoleなど), マクロサイクリックラクトン誘導体(Ivermectinなど), その他(Pyrantelなど)のいずれに対しても薬剤耐性株が広がりつつあり, 新たな抗線虫薬の開発が求められている(Conder and Campbell, 1995)。一方, 西欧諸国で特に盛んとなった動物愛護運動の高まりとともに, 動物実験代替法の模索が進められている。動物実験代替法としての細胞培養をはじめとする *in vitro* 実験系の開発が求められている(小野, 1995)。そのような時代背景から, 最近, 著者ら(須田ら, 1996)は, 実験動物を用いず, しかも, 従来の抗線虫薬の作用の研究においては考えられていなかっ

た *in vitro* における増殖を指標とできる新たな実験系として *Rhabditis (Rhabditella) pseudoelongata* Micoletzky, 1913を材料とする方法を報告した。

本線虫は, 糞線虫症が疑われた患者の糞便を寒天平板(1.5% agar)で培養したところ, 偶然に入手したものである(寺田ら, 1994)。

本線虫は腐食土や動物の糞から発見され, その形態的特徴などについて, 内外において幾つかの報告がなされている(渡邊, 1927; Levine *et al.*, 1963; 関屋, 1965; 徐, 1975; Sudhaus, 1976; Andrassy, 1983, 1984)。しかし, 今回は抗線虫作用研究のための新たな *in vitro* モデル系の確立を目的とした研究であり, このような観点から本線虫が取上げられた研究は未だない。そこで, この新たな目的の研究を始めるに当たり, 本線虫の由来, 形態学的特徴, 実験室での維持のための *in vitro* 培養条件などについて報告したい。

実験材料と方法

1. 材料

患者は島田市在住の59歳の女性で, 下血を主訴として

島田市民病院を受診した。検査室での糞便検査で糞線虫ラブリチス型と思われる幼虫が認められ、浜松医科大学寄生虫学教室へ糞線虫症の確認の依頼となった（浜松医科大学症例番号：93023）。

AMS III 法により幼虫を認めたが、食道の形態から桿線虫類のラブリチス型幼虫と同定された。また、培養を試みるため、直径（内径）8.5cm・深さ1.7cmのガラスシャーレに1.5%寒天（一級試薬・寒天末、片山）を平板培地とし、その中央部に患者の糞便（小指頭大）を載せて、37℃と27℃の孵卵器内で培養した。その結果、27℃の条件下でのみ多数の成虫と虫卵および幼虫を認めることができた。

2. 成虫および虫卵の大きさの測定

患者の糞便を1.5%寒天平板培地に載せて、27℃の孵卵器内で3日培養後に、寒天を生食水中で破砕し、成虫および虫卵を集め、3.5%（10倍希釈）ホルマリン液で固定後に撮影した写真について成虫と虫卵の大きさをimage analyzer (Videoplan, Kontron Co., Munich, Federal Republic of Germany) を用いて計測した。また、一部の線虫は65℃で熱殺した後にはTAF固定液で固定を行った。固定された線虫は、Thorneのslow methodの変法で脱水し（Minagawa and Mizukubo, 1994）、グリセリンに封入してプレパラート標本を作成した後、光学顕微鏡下で計測した。

3. 成虫の形態観察

成虫と虫卵の大きさの計測の場合と同様にして成虫体を集め、容量5mlのガラス瓶に集め（約1ml）、60～65℃の湯に30秒程漬けた後、3.5%（10倍希釈）ホルマリン液3mlを加えて固定し、光顕のならばに電顕的（SEM）に形態観察を行った。

4. 実験室内での維持のための培養条件の検討

(1) 定性的な検討

実験室内での維持条件を探すため、まず、栄養源と温度について *in vitro* での増殖の程度を定性的に検討した。

栄養源についての検討では、直径（内径8.5cm）・深さ1.7cmのシャーレに1.5%寒天を平板培地とし、その中央部に栄養源としてヒト、ラットないしマウスの糞便、ネズミ用粉末飼料（クレア、1gに2mlの脱塩水を加えて5分間煮沸したもの、以下「粉末飼料」と略）約1gを載せ、その上に成虫、幼虫ないし虫卵を置き、脱塩水0.5mlを添加し、シャーレを湿潤箱に収めて増殖の有無と程度並びに運動性の持続期間を観察した。さらに、同様のシャーレにリン酸緩衝液（1/15M, pH 7.4）を

20mlを取り、粉末飼料約1gを添加した条件およびフィラリアの幼虫を *in vitro* で培養する目的で用いられているNITC 135とIMDMの混合メディウム（以下、NI medium, Franke *et al.*, 1987）を同様のシャーレに20ml入れた条件についても検討した。

つぎに温度条件については、粉末飼料を栄養源とした1.5%寒天の平板培地で、各種温度条件（37, 29, 25, 22, 17℃）の孵卵器中ないし4℃の冷蔵庫に保った場合の虫体の増殖や運動性と温度の関係を観察した。この場合、運動性については室温（22～25℃）に取り出してからの運動性の有無を検討した。

(2) 定量的な検討

粉末飼料を栄養源として添加したリン酸緩衝液（1/15M, pH 7.4）における増殖の程度を検討した。1.5%寒天の平板培地で粉末飼料を栄養源として25℃で3日間培養した虫体をリン酸緩衝液（1/15M, pH 7.4）で洗浄し、洗浄液を2重ガーゼで濾過し、その濾液を24穴マイクロプレートに200μlずつ分注した。各穴に粉末飼料の約0.01gずつを加え、25℃で6日間培養し、経日的に7%（5倍希釈）ホルマリン液200μlを加えて固定し、成虫、幼虫および虫卵に分けて計数した。

実験結果

1. 線虫の由来

虫体は糞線虫症が疑われた患者（症例番号：93023）の糞便を寒天平板（1.5% agar）による培養で得られたものである。

2. 虫卵および成虫の計測値ならびに線虫の同定

虫卵は直径が $51.5 \pm 3.2 \mu\text{m}$ 、短径が $27.3 \pm 2.0 \mu\text{m}$ で卵殻が極めて薄かった（Fig. 1）。

成虫はピン状の尾部を有していた。雌成虫は尾端までの体長が $1.38 \pm 0.16\text{mm}$ で、尾部は0.23mmであり、雄は $1.14 \pm 0.11\text{mm}$ で、尾部は0.18mmであった（Table 1）。また、本線虫の体形をDe Man's formulaで示した値はTable 1に示した通りであり、これを含めた形態的特徴から本線虫を *Rhabditis (Rhabditella) pseudoelongata* Micoletzky, 1913と同定した。以下、この虫体を *R. pseudoelongata* (93023島田株) と呼ぶ。

3. 成虫の形態観察

Fig. 2に示したように、雌雄ともに口腔は円筒状で長さは幅の約4倍あり、尾部は長く糸状になるのが本種の大きな特徴である。雌には体の中央部に位置する陰門、一對の卵巣や虫卵を含む子宮、また、雄には精巣や先端

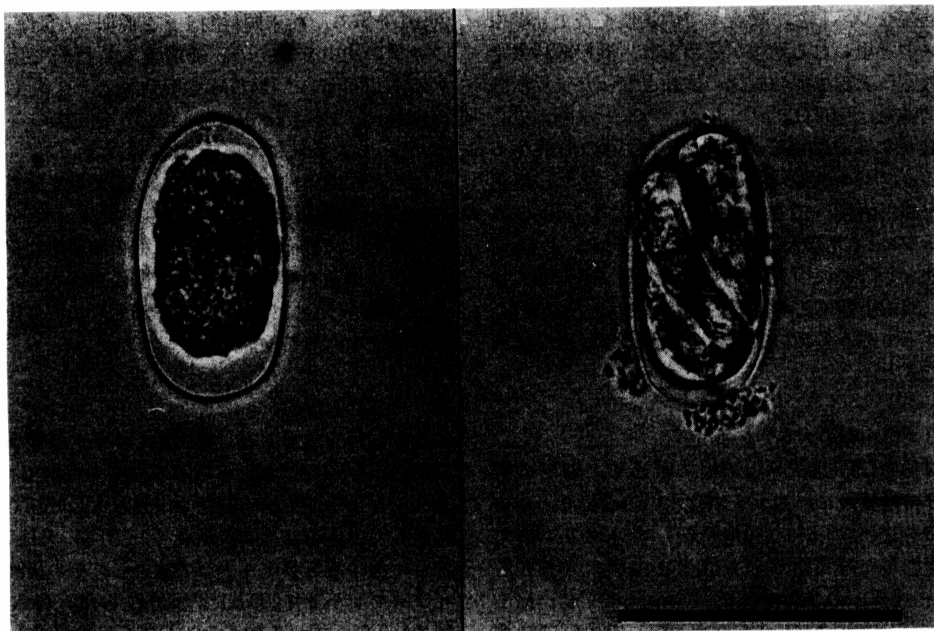


Fig. 1 Eggs of *Rhabditis (Rhabditella) pseudoelongata*.
Left: Undeveloped, Right: Developed egg with larva.
Bar: 50 μ m.

部がわずかに分岐する交接刺が認められた。

成虫の電顕像 (SEM) から明らかなように、雌雄ともに唇乳頭の発達は弱く、口腔開口部は三角形を呈し、体環は一般に不明瞭で、側線は2本であった。雄の尾部には、退化した非常に小さい尾翼 (Bursa) と9対の尾乳頭が認められた (Fig. 3)。

4. 実験室内での維持のための培養条件の検討

まず、定性的な観察については、1.5%寒天平板の中央部に栄養源を載せ、その上に成虫、幼虫ないし虫卵を置くと、温度により速度が異なるが、増殖は栄養源の近傍から始まった。その後、日数の経過とともにシャーレの周辺に虫体に移行し、周辺部での増殖がみられ、やがてシャーレ全面でおびただしい増殖がみられた。

寒天平板の場合、栄養源としてはヒト糞便が最も良好であったが、ラットやマウスの糞、粉末飼料でも代用できた。また、粉末飼料添加リン酸緩衝液 (1/15M, pH 7.4) および NI medium でも同様に増殖がみられた。

粉末飼料を栄養源とした寒天平板で温度と増殖の関係をみると、25°Cが最適で、3日後に著明な増殖がみられ、7日後でも幼虫・成虫に運動性がみられた。29°Cでは同様に増殖がみられたが、7日後では運動性のみられない

虫体が多くなった。37°Cでは虫体の増殖はみられず、1日後に虫体の移動跡がみられたのみであった。一方、温度を低下させると増殖速度は遅くなった。22°Cでは7日後までの増殖はわずかで、14日後の観察で著明な増殖がみられ、産卵と運動性を示す虫体の認められる期間は28日以上であった。17°Cでは増殖速度はさらに遅れるが運動性が見られる虫体が60日以上にわたり認められた。なお、4°Cの冷蔵庫に保存すると、増殖は認められないが、6カ月以上運動性を示す幼虫が認められた。

つぎに、増殖の定量的変化を知るため、25°Cの条件下、粉末飼料を栄養源として添加したリン酸緩衝液中での培養後の成虫、幼虫および虫卵数の推移を観察した (Table 2)。Fig. 4 はそれぞれの割合をパーセントで示したものである。この図における変化からみると、虫卵から成虫までの生育期間は3日とみなされる。

結局、直径 (内径) 8.5cm・深さ1.7cmのガラスシャーレで粉末飼料を栄養源とする寒天平板ないし NI medium を用いて、17°Cで培養し、40日ごとに移植する方法で容易にこの虫体を実験室で維持できることが明らかになった。本線虫はこの方法で既に3年以上にわたり当研究室で維持されている。

Table 1 Measurements and dimension of *Rhabditis (Rhabditella) pseudoelongata*

	Female adults	Male adults	Eggs
[3.5% formalin solution fixed materials]			
n	20	13	16
Length (μm)	1,383 \pm 161	1,139 \pm 109	51.5 \pm 3.2
Width (μm)	42.1 \pm 9.6	34.2 \pm 5.4	27.3 \pm 2.0
[TAF solution fixed materials]			
n	21	20	
Length (μm)	1,226 \pm 106	1,069 \pm 119	
Width (μm)	46.9 \pm 6.0	37.7 \pm 3.3	
a	26.3 \pm 2.5	28.4 \pm 2.6	
b	6.1 \pm 0.5	10.0 \pm 1.1	
c	4.5 \pm 0.6	6.0 \pm 0.7	
c'	12.8 \pm 1.9	6.7 \pm 0.7	
V (%)	45.1 \pm 1.8		
T (%)		16.8 \pm 2.1	

Figures indicate mean \pm SD.

n = number of specimens

a = body length \div greatest body width

b = body length \div distance from anterior end to junction of esophagus and intestine

c = body length \div tail length (anus or cloaca to tail terminus)

c' = tail length \div body width at anus or cloaca

V = distance of vulva from anterior end \div body length

T = distance from cloaca to anteriormost of testis \div body length

考 案

今回、島田市の患者から検出され、寒天平板上で培養された線虫は、雌雄ともに唇乳頭が小さく口腔が細長い円筒形であり、尾部が細長いこと、雌の卵巣が一對あって陰門が体の中央部に位置すること、雄の尾翼が退化して小さく、尾乳頭が9対あることなどの形態的特徴をもつことから、Rhabditida 目 Rhabditidae 科の *Rhabditis* 属 *Rhabditella* 亜属の種と判断された。本亜属には3種の既知種があるが、口腔、尾部、雄の尾乳頭の配列などの特徴から、今回の線虫は *R. pseudoelongata* Micoletzky, 1913 と同定された (Sudhaus, 1976; Andrassy, 1983, 1984)。

本種はヨーロッパ、アジア、北米、中米、南米、アフリカなどに広く分布しており、土壌中あるいは動物の糞からの検出について内外から報告されている (渡邊, 1927; Levine *et al.*, 1963; 関屋, 1965; Sudhaus, 1976; Andrassy, 1983, 1984)。また、体長やその他の計測値の種内変異は大きい。このようなことから、*Rhabditis*

tenuicaudata Menzal et Stefanski in Stefanski, 1917, *R. usui* Watanabe, 1927 など6ないし7のシノニムが記録されている (渡邊, 1927; Sudhaus, 1976; Andrassy, 1983, 1984)。本種は同属同亜属の *R. leptura* (Cobb, 1929) および *R. octopleura* (Steiner, 1929) に似ているが、前者とは口腔の基部が左右対称であること、後者とは口腔がより細長いことから区別可能である (Andrassy, 1983, 1984)。

この線虫は本来は腐食性の自由生活線虫と思われるが、今回の虫体のように患者からの報告 (渡邊, 1927)、動物の糞からの検出 (Levine *et al.*, 1963)、ウサギ、イヌなどに対する実験的感染 (関屋, 1965) が報告されていることから、条件次第では動物の腸管における寄生生活も可能と考えられる。

今回の虫体は糞線虫症が疑われた患者の糞便を診断の目的で培養中に偶然見出された。糞線虫の診断法として推奨されている Arakaki *et al.* (1988) の方法で、37°C の孵卵器で、普通寒天培地 (一般細菌検査用: E-MC 01, 栄研) を用いて培養を試みた場合は増殖はみられな

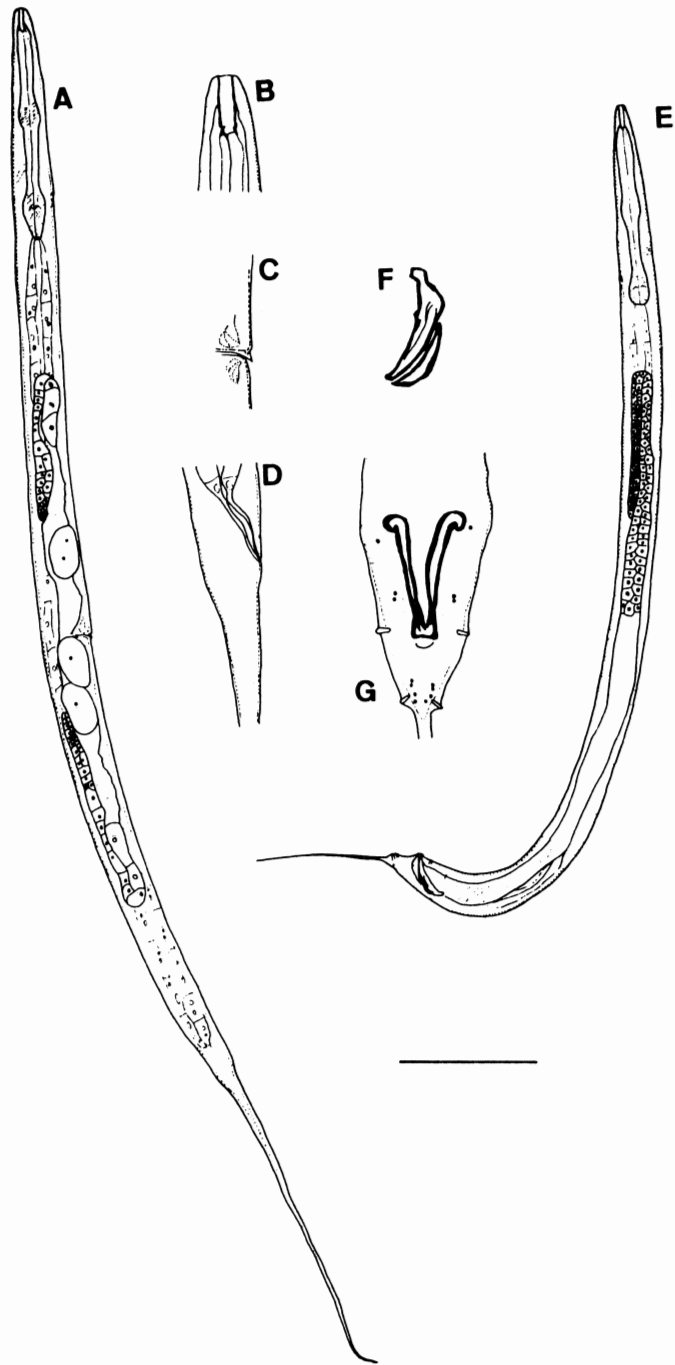


Fig. 2 Morphology of adult worm of *R. pseudoelongata*.
 Female: A, Whole view; B, Anterior end; C, Vulva; D, End of intestine.
 Male: E, Whole view; F, Spicules (lateral view); G, Caudal end (ventral view).
 Scale: A and E, 100 μm ; B–D, F and G, 40 μm .

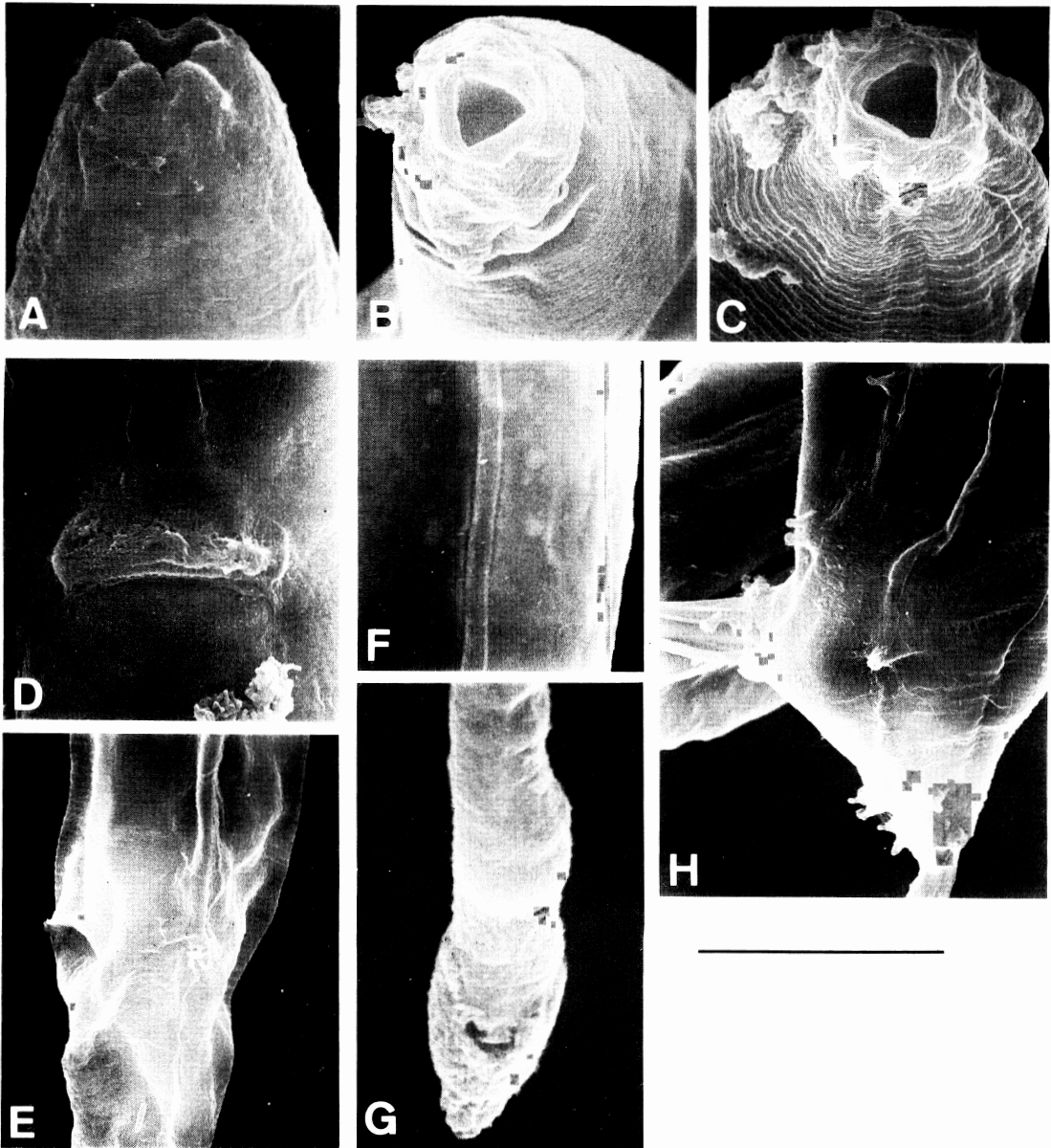


Fig. 3 SEM of *R. pseudoelongata*.

Female: A, Anterior end (lateral view); B, Anterior end (frontal view); D, Vulva; E, Anus; F, Lateral cord.
 Male: C, Anterior end (frontal view); G, Caudal end; H, Caudal papillae and cloaca (lateral view).
 Scale: A-C, 20 μ m; D-F and H, 10 μ m; G, 40 μ m.

かった。偶然、同時に検討したオクテロニー用の一級試薬・寒天末による平板培地でも37°Cで培養した場合にも増殖はみられなかった。しかし、この培地を用いて、27

°Cの孵卵器に保ったシャーレで増殖が見られ、多数の成虫と幼虫が観察された。その後の温度条件についての検討でも、37°Cでは1日程度、虫体の生存は認められたも

Table 2 Changes of numbers of adults, larvae, eggs and total numbers of *R. pseudoelongata* on various incubation days

Incubation days	No. of nematodes			
	Adults	Larvae	Eggs	Total
0	144±102	1,908±358	2,160±585	4,212±570
1	288±0	3,060±836	324±62	3,672±830
2	1,440±176	4,140±778	4,644±1,911	10,224±2,109
3	3,060±1,131	8,388±3,047	13,680±5,475	25,128±9,337
4	3,384±581	22,248±31,235	16,596±13,099	42,228±44,307
5	8,820±3,235	134,640±72,135	20,880±8,412	164,340±72,596
6	14,489±9,663	83,554±35,555	23,058±20,283	118,304±30,379

Figures indicate mean±SD of 4 experiments.

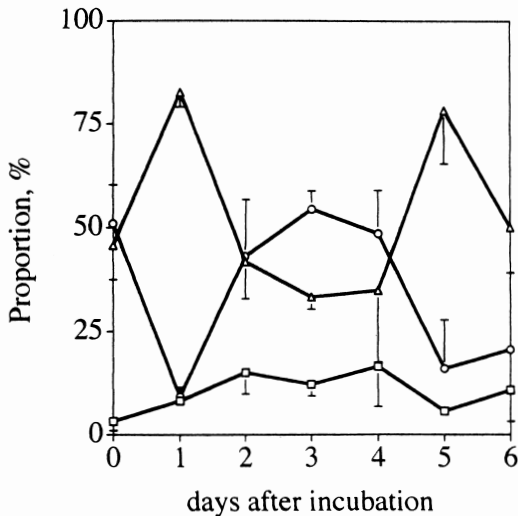


Fig. 4 Changes of proportion in adult (□), larvae (△) and eggs (○) of *R. pseudoelongata* on various incubation days (Mean±SD of 4 replications).

の増殖は観察されなかった。この結果からはこの患者の糞便から多数の幼虫が検出されたという事実を説明できない。しかし、5℃に保った虫体を急に高い温度に移すと、30℃までは影響がみられないが、32℃を越える温度に移すと温度ショックを受けて急激に死亡するとの報告(関屋, 1966)などがあるので、ヒトや動物の消化管への寄生には何らかの微妙な条件が関与しているものと考えられる。

R. pseudoelongata と同様に *in vitro* で増殖し、しかも抗線虫薬の作用の研究に使用されている自由生活線

虫としては *Caenorhabditis elegans* がある。この線虫については遺伝学的ないし分子生物学的に多くの研究がなされているし、実際に Avermectin 誘導体の分子薬理学的作用機序の研究のモデル系として用いられている(Prichard, 1993; Arena, 1994)。しかし、完全な自由生活性の *C. elegans* と異なり、*R. pseudoelongata* は条件次第では寄生性と考えられ、しかも、今回の定量的培養条件の検討で、*C. elegans* 同様に極めて短いライフサイクル(25℃で約3日間)が推測されている。しかも、この虫種については Ivermectin(寺田ら, 1994) および Levamisole と Thiabendazole に対する感受性(須田ら, 1996)が認められている。従って、抗寄生線虫薬の研究に関する限り、*R. pseudoelongata* の方がより合理的なモデルとなる可能性が考えられる。また、今後、寄生線虫に関連した遺伝学的・分子生物学的研究の新たなモデルになるかもしれない。

この線虫が抗線虫薬の作用研究用のモデル実験系として確立されるためには、生活環についての詳細、動物の腸管における寄生生活の成立条件の解明が重要と考えられる。また、実験指標について、これまで著者らが専ら指標としてきた自動運動(寺田, 1989)はもちろん、虫卵、幼虫および成虫からの増殖・分化に対する作用を生化学的ないし分子生物学的など多様な指標について研究されるならば、実験動物代用系としての有用性が高まるものと思われる。

引用文献

- 1) Andrassy, I. (1983): A taxonomic review of the suborder Rhabditina (Nematoda: Secernentia). ORSTOM, Paris, 241 pp.
- 2) Andrassy, I. (1984): Klasse Nematoda (Ordnungen Monhystirida, Desmoscolecida, Arae-

- olaimida, Chromadorida, Rhabditida).
Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Euro-
pas. Gustav Fischer, Stuttgart, 509 pp.
- 3) Arakaki, T., Hasegawa, H., Asato, R., Ike-
shiro, T., Kinjo, F., Saito, A. and Iwanaga,
M. (1988): A new method to detect *Stron-
gyloides stercoralis* from human stool. Jpn.
J. Trop. Med. Hyg., 16, 11-17.
 - 4) Arena, J. P. (1994): Expression of *Caenor-
habditis elegans* mRNA in *Xenopus* oocytes:
A model system to study the mechanism of
action of avermectins. Parasitol. Today, 10,
35-37.
 - 5) Conder, G. A. and Campbell, W. C. (1995):
Chemotherapy of nematode infections of veter-
inary importance, with special reference to
drug resistance. Adv. Parasitol., 35, 1-84.
 - 6) Franke, E. D., Riberu, W. and Wiady, I.
(1987): *In vitro* cultivation of third stage larvae
of *Wuchereria bancrofti* to the fourth stage.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 37, 370-375.
 - 7) 徐 南 (1975): 劫物寄生虫学. 科学出版社, 北京,
380pp.
 - 8) Levine, N. D., Birch, C. L., Dolowy, W. C.
and McKinney, R. E. (1963): *Rhabditis axei*,
a pseudoparasitic nematode of the dog. J.
Am. Vet. Med. Assoc., 142, 1404-1406.
 - 9) Minagawa, N. and Mizukubo, T. (1994): A
simplified procedure for transferring nema-
todes to glycerol for permanent mounts. Jpn.
J. Nematol. 25, 75.
 - 10) 小野 宏 (1995): 動物実験代替法の現状. 静岡実
験動物研究会会報, 22, 7-11.
 - 11) Princhard, R. (1993): Molecular biology of
free-living and parasitic helminths. Parasitol.
Today, 9, 273-275.
 - 12) 関谷竜吉 (1965): *Rhabditis elongata* に関する
研究(1). 寄生虫誌, 14, 83-89.
 - 13) 関谷竜吉 (1966): *Rhabditis elongata* に関する
研究(3). 寄生虫誌, 15, 475-483.
 - 14) 須田久也・藤巻 司・寺田 護 (1996): ヒト糞便
由来の *Rhabditis pseudoelongata* を用いた抗線
虫薬の *in vitro* スクリーニング法に関する基礎的
検討. 第122回日本獣医学会講演要旨集 p115.
 - 15) Sudhaus, W. (1976): Vergleichende Untersuch-
ungen zur Phylogenie, Systematik, Ökologie,
Biologie und Ethologie der Rhabditidae
(Nematoda). Zoologica, 125, 1-229.
 - 16) 寺田 護 (1989): 寄生蠕虫症治療剤への神経薬理
学的アプローチ. 感染・炎症・免疫, 19, 97-110.
 - 17) 寺田 護・石井 明・可知茂男・記野秀人・佐野基
人 (1994): 駆虫活性検定を目的とした
Stomachorhabditis 属新線虫の *in vitro* 培養に
ついて. 寄生虫誌, 43 (Suppl.), 82.
 - 18) 渡邊 弘 (1927): 人體に寄生せる *Rhabditis* 属
の一新種に就て. 日本病理学会会報, 17, 215-216.

Abstract

RHABDITIS (RHABDITELLA) PSEUDOELONGATA MICOLETZKY, 1913 AS A NEW
IN VITRO MODEL FOR STUDYING THE MODE OF ACTION OF
ANTI-NEMATODAL ANTHELMINTICS

MAMORU TERADA¹⁾, AKIRA ISHII¹⁾, SHIGEO KACHI¹⁾, HIDETO KINO¹⁾,
NOZOMU MINAGAWA²⁾, NOBORU KAGEI³⁾, KYUYA SUDA⁴⁾ AND HIDEO SAITO⁴⁾

¹⁾Department of Parasitology, Hamamatsu University School of Medicine,
Handa-cho 3600, Hamamatsu 431-31, Japan.

²⁾National Agriculture Research Center, Kannondai 3-1-1, Tsukuba 305, Japan.

³⁾Department of Parasitology, National Institute of Health,
Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan.

⁴⁾Kaken Pharmaceutica Co., Ltd. R&D Department of Agrochemical and Animal Health Products Division,
Gensuke 301, Fujieda 245, Japan.

Agar-plate incubation method detected *Rhabditis*-like nematodes in the patient's feces who was suspected of strongyloidiasis *stercoralis*, and this nematode could propagate in this system. Oval eggs, measuring 51.5 μm by 27.3 μm on average, had a single thin transparent shell. Males were 1.14 mm long and females were 1.38 mm long on average. Both sexes had the posterior end extended into long, slender point. This nematode was identified as *Rhabditis (Rhabditella) pseudoelongata* Micoletzky, 1913 by morphological characteristics. In agar-plate incubation human feces was the best nutrient, although a commercial mouse diet acting as a substitute. This nematode also propagated in medium such as NI medium. Optimal temperature was 25°C in the agar (1.5%)-plate incubation system. We are now maintaining this nematode using the agar (1.5%)-plate with mouse diet and NI medium at 17°C by changing them every 40 days.