

ネズミ糞線虫幼虫のケモタキシス及びラット体内移行の研究

古賀, 正崇
九州大学大学院医学研究院寄生虫学分野

<https://doi.org/10.15017/7183586>

出版情報：福岡醫學雑誌. 93 (2), pp.17-22, 2002-02-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



解 説

ネズミ糞線虫幼虫のケモタキシス及びラット体内移行の研究

九州大学大学院医学研究院寄生虫学分野

古 賀 正 崇

Studies on Chemotactic Behaviors of *Strongyloides Ratti* Infective Larvae in Vitro and Migration Routes of the Larvae in Rat Head

Masataka KOGA

Department of Parasitology, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

Abstract For the purpose of clarifying host-finding mechanisms, the infective larvae of *Strongyloides ratti* were run on an agarose plate which had been placed various attractants around the larvae. They were accumulated at the sites of sodium compounds, serum proteins and albumins. At 20, 30, 40 hours after infection, rats were killed and heads were separated. They were then processed for thin section specimens. Larvae were found in brains, olfactory bulbs and its nerves. These larvae seemed to move along olfactory nerves during descending from the cranial cavity. Another migration study was done by whole body autoradiography after ^{35}S -methionine labeling for clarifying the larval pathway how to invade cranial cavity in the rats. They first crawled under subcutaneous region of rat and then accumulated at the tip of the nose. Next, they began to ascend olfactory nerves. They were in cranial cavity up to 20 hours after infection and then descending same route to nasal cavity. I don't know why they aim the cranial cavity but they had necessity to invade the cranial cavity and stay there for appropriate time to be an adult in the intestine.

Key words: *Strongyloides ratti*, chemotactic behavior, larval migration

はじめに

ネズミ糞線虫は他の糞線虫類と同様に寄生生活世代（雌成虫のみ）と自由生活世代（雌雄両成虫）を有する。ラットの糞便とともに体外へ排出された糞線虫の虫卵あるいは第1期幼虫は第2期から第3期感染幼虫へと発育するグループ（直接発育）と土壤中で4回脱皮して自由生活世代の雌雄両成虫になるグループがある（間接発育）。後者は自然界で交尾後、雌成虫から排出された虫卵は第1期、第2期と進み第3期感染幼虫となる。同幼虫はラットに経皮的に感染し、ラットの皮下に一定時間潜伏後ラットの頭部に向かって体内移行を始める。ラットの頭蓋内侵入後、一定時間潜伏、鼻腔へ出て燕下され小腸上部に至って第4期から成虫となる。

著者らは本幼虫が経皮的に感染する事から感染幼虫の host finding 現象すなわちケモタキシス（化学走性）を検索するため In vitro 系での実験を行った。また本幼虫がラットに感染した場合、いかなるルートを通して頭蓋内へ侵入し、頭蓋内から脱出して行くのかを組織学的及びラジオアイソトープを使った全身オートラジオグラフィ法を用いて検索した。

材料と方法

1. In vitro によるケモタキシス

ネズミ糞線虫感染型幼虫はラットの糞便の濾紙培養法（24℃, 4日間）によって得た。幼虫はポアサイ

ズ 15μ のナイロンメッシュで濾過後、蒸留水中で3回洗浄した。測定系は0.9%のアガロース寒天を直径8 cmのポリスチレンシャーレに5 ml入れて寒天平板とした。シャーレの中心からの距離2 cmの周辺位置に等間隔に4~6個のマーク(正四, 五, 六角形)を施した。周辺マーク部(シャーレエッジ部から2 cmの位置)にアトラクタント(無機, 有機化合物)を浸した円形濾紙(直径0.5 cm, Low ash type)を置き、過剰の溶液は別に用意した濾紙で吸収した。円形濾紙は45~60分間室温に放置し、同濾紙を取り除いた後、中心部に感染幼虫300隻を置き、45分間、 36°C のインキュベーターの中で放置し、自由に幼虫を走らせた。その後シャーレをインキュベーターの中から取り出し、アトラクタント部直径1 cmの円周内に集積した幼虫数を暗視野装置付き実体顕微鏡下で算定した。

無機化合物アトラクタントとしては Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} の陽イオンと OH^- , Cl^- , CO_3^{--} を組み合わせた化合物である。コントロールとしては常に蒸留水を用いた。有機化合物アトラクタントにはラットの生体成分を用いた。ラット脳, 皮膚, 肺, 小腸5 gを10 ml蒸留水中でホモジナイズ後, 3,000 rpmで遠心して得られた上清液, 各種哺乳動物血清(ラット, モルモット, 牛, 豚, ハムスター), 市販の牛血清アルブミン, ラットアルブミン, 卵アルブミン(salt free), 市販ペプトン類(ペプトン, トリプトン, トリプトース), 還元型グルタチオン, 16種のアミノ酸及び4種の単糖類である。ラット血清にはNaClなどの無機化合物が含まれるので使用前に透析膜により除去した。さらに血清から蛋白質(retentates)を分離するためCentoricon-10, 30(Amicon)を用いた。市販のペプトン類にも無機化合物が含まれるので透析膜を用いて同様に除去した。

2. In vivoでの幼虫動向の検索

糞線虫幼虫がラット感染後, 頭蓋内から脱出する所見を組織学的に検索した。前記同様にして得られた感染型幼虫5,000隻をWistar rats(150~200 g)の下腹部皮下に感染させ, 感染20, 30, 40時間後にラットを殺処分して, 頭部を分離した。剥皮して, 下顎部, 筋肉部を取り除き, 頭蓋骨部(skull)のみとした。幼虫の脳内での移動を停止するため直ちに -40°C で凍結した。その後 4°C のホルマリンに浸漬し, 徐々に解凍と同時に固定した。1~2週間固定後, 流水中で脱ホルマリンを行って電気脱灰法(5% HCl , 5 V at 25°C , 24時間)で骨組織を脱灰し, Na_2SO_4 で中和してパラフィン標本とした。標本は $10\mu\text{m}$ の厚さで連続切片とした。横断, 縦断, 矢状断の切片を作成し, HE染色を施した。

3. ^{35}S -methionineでラベルした幼虫のラット体内動向

^{35}S -methionineでラベルした糞線虫第3期幼虫5,000隻(幼虫1匹あたりの平均線量200~500 cpm)をラットの下腹部皮下に投与した。感染10, 15, 20, 25, 30, 40時間後にラットを殺処分した。標本は8%CMC内に包埋し, ドライアイス-アセトンに浸漬して凍結した。ブロック標本は -20°C のAutocryotomeで $50\mu\text{m}$ の厚さで薄切し, 凍結乾燥を行った。薄切標本にフィルムを密着させ, ホルダーに入れ2週間 -30°C の冷凍庫内に放置した。フィルムを現像して幼虫のラット体内移行部位を検出した。

結果

1. In vitroでの幼虫のナトリウムイオンに対する反応

まず無機化合物をアトラクタントとして寒天平板上で感染幼虫を走らせた。生体内にもっとも多く存在すると思われるNa化合物について試験を試みた。その結果, 同幼虫はNa化合物である NaOH , Na_2CO_3 , NaCl , NaHCO_3 設置部に集積し, その濃度は0.05 Mが最適であった。化学走性の強さは $\text{Na}_2\text{CO}_3 > \text{NaHCO}_3 > \text{NaOH} > \text{NaCl}$ の順であった。次に5穴法を用いて, 前記金属イオンと OH^- 化合物である NaOH , KOH , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, DWについて試験を試みた。化合物濃度は0.05 Mである。その結果 NaOH 部にはのみ幼虫の集積がみられ, その他の化合物部位には幼虫の集積を認めなかった(Fig. 1)。次に Cl^- 化合物である MgCl_2 , CaCl_2 , KCl , NaCl , DWについて同様の試験を行った。その結果, NaCl 化合物部位にはのみ幼虫は集積した(Fig. 2)。 CO_3 化合物に関しては, Na_2CO_3 , K_2CO_3 は水に易溶性であるが, MgCO_3 , CaCO_3 は水に難溶性であったため, 前2者及びDW間でのみ試験を試みた。その結果 Na_2CO_3 部位には多数の幼虫の集積を認め, 他方 K_2CO_3 部にはほとんど幼虫の集積を認めなかった。

次にあらかじめ寒天内に 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 M 濃度の NaCl を溶解して置いた寒天平板上で 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 M 濃度の NaHCO_3 をアトラクタントとして同様のアッセイを試みた。その結果寒天内に Na イオンがすでに存在する場合は幼虫のナトリウムイオンに対する走性は濃度依存性に阻害された。逆に NaHCO_3 を寒天に溶かした平板では NaCl に対する誘引が阻害された。また 0.05 M の NaHCO_3 や NaOH に HCl を少量加えて pH 7.0 に調整した溶液にも幼虫が集積する事を認めた。以上の結果から本幼虫がナトリウムイオンに対して走性を示す事が分かった。

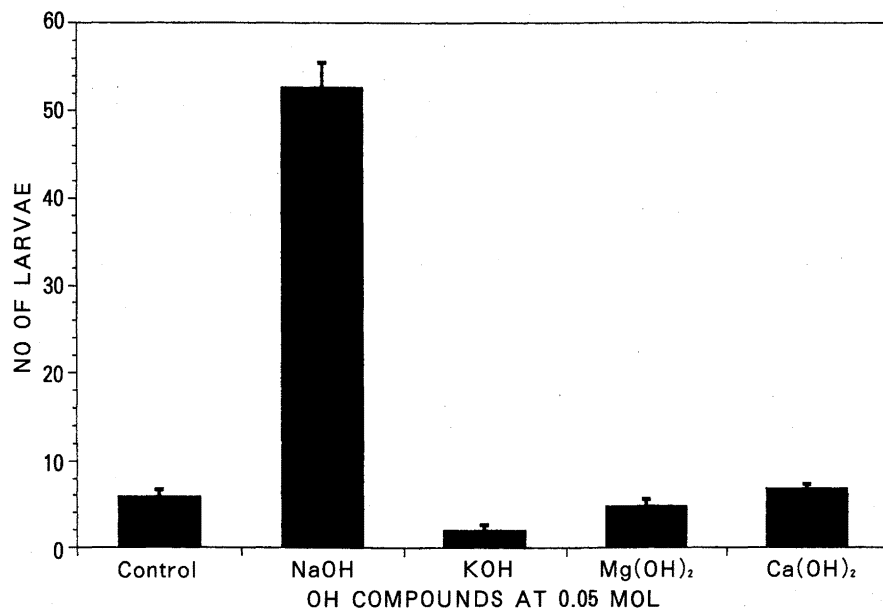


Fig. 1 Accumulative behavior of *S. ratti* infective larvae on various OH compounds (0.05 mol) applied on agarose regions.

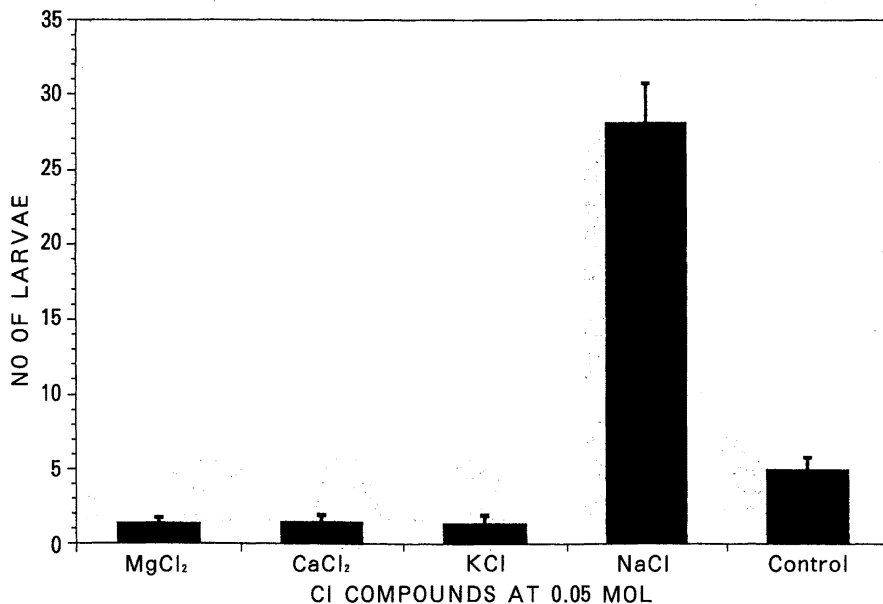


Fig. 2 Accumulative behavior of *S. ratti* infective larvae on various Cl compounds (0.05 mol) applied on agarose regions.

2. In vitro における有機化合物への走性

ラット脳、皮膚、肺、小腸 5 g を 10 ml 蒸留水中でホモジナイズして 3,000 rpm 遠心して得られた上清液をアトラクタントとして同様のアッセイを試みたが、幼虫は誘引されなかった。次に各種哺乳動物血清、牛血清アルブミン、ラットアルブミン、卵アルブミン (salt free)、ペプトン類、還元型グルタチオン、16 種のアミノ酸及び 4 種の単糖類について同様のアッセイを試みた。各種哺乳動物血清に対しては有意に幼虫の集積が見られた (Fig. 3)。血清にはナトリウムイオンが含まれるので、ラット血清を透析膜で透析し無機化合物を除去した後、非透析血清、透析血清、透析血清 + NaCl (0.85% に調整)、0.85% NaCl, DW をアトラクタントとしてアッセイを行った。その結果、非透析血清、透析血清 + NaCl に最も誘引され、ついで透析血清、0.85% NaCl に誘引された。誘引幼虫数は透析血清では非透析血清の半数程度に減少したが、コントロールに比して有意差がみられた。次に血清蛋白を分離するためラット透析血清をセントリコン 10 を用いて 10KDa でカットオフし、retentate と filtrate に分離した。続いて透析血清、その 10KDa retentate, filtrate, 無処置血清, DW 間で幼虫の走性を試みた。その結果無処置血清、透析血清、10KDa retentate には誘引されたが、10KDa filtrate には誘引されなかった。よってこの filtrate に NaCl を加え 0.85% になるように調整して、再度同様の実験を行ったところ、無処置血清と同程度まで誘引された (Fig. 4)。以上のことは血清中のナトリウムを除く小分子には同幼虫は誘引されないが血清蛋白には誘引される事を示唆している。血清蛋白の血中濃度は約 7% で有るため、牛アルブミン (BSA) を用いて次の実験を行った。7%, 3.5%, 1.0%, 0.5% BSA 溶液をアトラクタントとして同様のアッセイを行ったところ dose-dependent に幼虫は誘引された。0.5% BSA においては誘引虫体数が少なかったがコントロールに比して有意差が認められた。ラットアルブミンを用いても同様の結果が得られた。次に蛋白分子としては小さい卵アルブミンを用いて BSA と同様のアッセイを試みたところ dose-dependent に幼虫は誘引された。さらに小さいペプチド分子に誘引されるかを試みた。用いたのはペプトン、トリプトン、トリプトース、還元型グルタチオンである。これらペプトン類はアミノ酸、遊離窒素化合物、ナトリウム等の塩類を含むため (Difco manual)、透析を行って小分子化合物を除去し、Pepton rich 溶液とした。これらアトラクタン

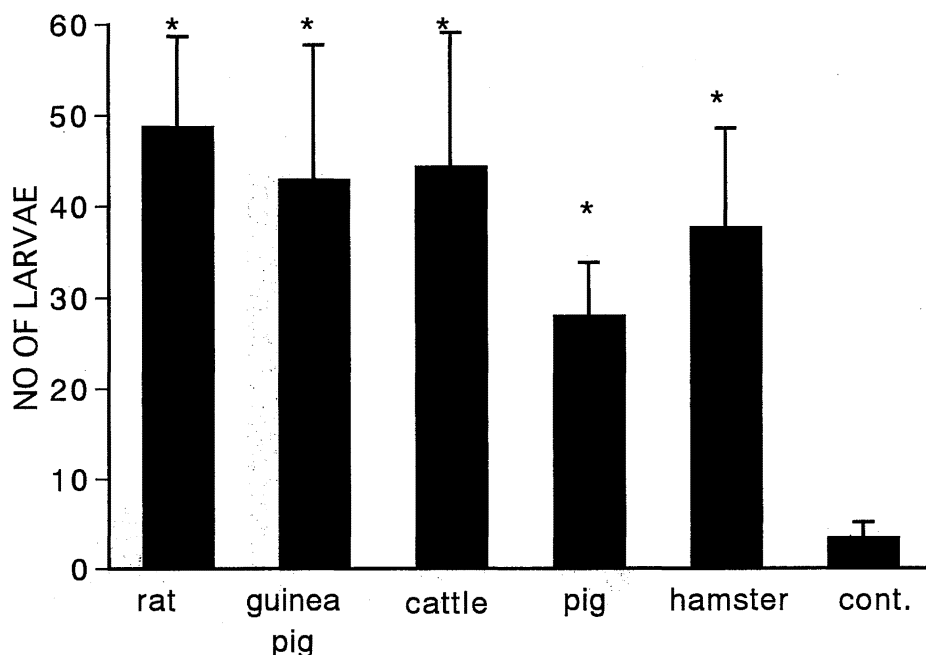


Fig. 3 Chemoattraction of *S. ratti* infective larvae for various sera (50% v/v). Asterisks indicate $P < 0.01$ (test substance vs. control).

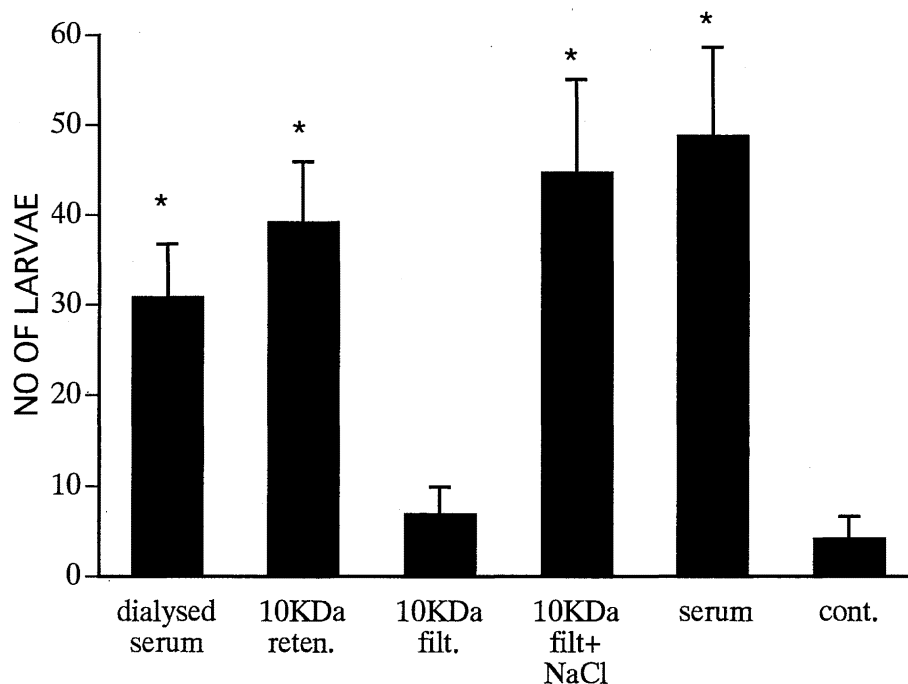


Fig. 4 Chemotactic responses to dialysed rat serum cut-off by 10KDa centricron, and the filtrate added NaCl and adjusted to be 0.85%. Asterisks indicate $P < 0.01$. (test substance vs. control).

トを3.5%溶液としアッセイを行った。その結果ペプトン、トリプトン、トリプトースには3.5%卵アルブミンと同程度の誘引を認めたが、還元型グルタチオン（未透析）には全く誘引されなかった。

3. In vivo におけるラット頭蓋内幼虫の動向

ラットに幼虫を感染させ20, 30, 40時間後に殺処分して頭蓋部を分離、電気脱灰後、切片標本とした。感染20~30時間後の頭蓋部切片像では大脳皮質、髄質、小脳、橋、嗅球から幼虫を検出したが脊髄からは全く検出しなかった。感染40時間後では嗅神経に沿って篩骨部、鼻甲介、鼻粘膜、鼻腔から多数の幼虫が検出された。この結果同幼虫は頭部侵入後嗅神経に沿って頭蓋内から脱出し、鼻腔へ出て燕下され小腸上部に定着するものと思われた。

4. 全身ラジオオートグラフィ法を用いてのラット体内移行の検索

^{35}S -methionine を用いてラベルした幼虫をラットに投与し10, 15, 20, 25, 30, 40時間後にラットを殺処分して幼虫の動向を検索した。感染10時間目ではほとんどの幼虫は感染部位（下腹部皮下）に留まっていて移行は見られない。感染15時間後幼虫はラット鼻部先端に集まり一部は鼻甲介から脳内侵入も認められた。感染20時間後、幼虫は脳内、篩骨部、鼻甲介、鼻粘膜、鼻腔内に見られた。感染25時間では頭蓋腔内や嗅球に見られるが、鼻部先端に再度集積している像が見られた。感染30時間ではほとんどの幼虫が篩骨部、鼻甲介部に見られたが脳実質には幼虫を認めなかった。感染40時間では嗅球に幼虫を認めるものの、すでに小腸からも幼虫を認めた。このことは同幼虫がラット感染後鼻腔を通して頭蓋内に侵入し、嗅神経に沿って鼻腔内に脱出し消化管へと移行する事を示唆している。

考察

大部分の寄生蠕虫はホストに感染後その体内を移行して最終寄生部位に到達し成虫となる。著者らは幼虫がいかなるセンサーを作動させ、その体内移行を正確に行い、また最終寄生部位へ到達できるかを解明すべく、ネズミ糞線虫をモデルとして実験を行っている。ネズミ糞線虫が小腸で成虫になるためには、そ

の移行途中で必ずラット頭蓋内を通る必要がある。これは感染幼虫を小腸上部へ直接移入した実験から明らかである。最初の host finding に関する In vitro の実験では幼虫は生体内に多く存在する Na^+ に誘引され、また生体物質では血清蛋白に誘引された。このことはネズミ糞線虫幼虫頭部に存在する線虫特有の感覚器官であるアンフィドが Na^+ や血清蛋白を感知する能力を有している事を示唆している。また幼虫体内移行の実験では幼虫アンフィドはラットの鼻粘膜、嗅神経、中枢神経を感知する能力を有して居ることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Koga M, Hung X, Noda K and Tada I: *Strongyloides ratti*: Histological study of the descending route of larvae from the head in experimentally infected rats. Parasitol Intern. 47: 219-224, 1998.
- 2) Koga M, Ning A and Tada I: *Strongyloides ratti*: Migration study of third-stage larvae in rats by whole-body autoradiography after ^{35}S -methionine labeling. J. Parasitol. 85: 405-409, 1999.
- 3) Koga M and Tada I: *Strongyloides ratti*: Chemotactic responses of third-stage larvae to selected serum proteins and albumins. J. Helminthol. 74: 247-252, 2000.
- 4) Tada I, Mimori T and Nakai M: Migration route of *Strongyloides ratti* in albino rats. Jpn. J. Parasitol. 28: 988-990, 1978.
- 5) Tada I, Koga M, Hamano S, Higo H and Tanaka K: *Strongyloides ratti*: Accumulating behavior of the third-stage larvae to sodium ion. Jpn. J. Nematol. 27: 22-29, 1997.