

日本産カンテツ感染ラットにおける再感染阻止の免疫

近 藤 恵 子・橋 口 義 久

(高知大学教育学部生物学教室)

Influence of primary infection with Japanese *Fasciola* metacercariae to superinfection in rats

Keiko KONDO and Yoshihisa HASHIGUCHI

Biological Laboratory, Faculty of Education, Kochi University

Abstract

The present study was designed to examine whether the primary infection would affect the secondary infection of rats with the Japanese species of the genus *Fasciola* (*Fasciola* sp.). The rats of each group (Groups I-VI) received secondary infections with the metacercariae at the weeks, six to 11 after the primary infection, respectively. The animals of Groups VII to IX were of use as the control of second infection, while those of Group X, the 1st infection control.

In the Groups I, II, III and IV, the recovery rates of worms from the second infection were very low, while the rates in Groups V and VI were nearly equal with those in the control (Group X). The size of worms recovered from rats of Groups I, II and III were smaller than those from the control but the worms from Groups IV, V and VI indicated a similar measurement with that from each control. The antibody transition in rats after the 1st infection was investigated with the number of precipitin bands appeared in agar double diffusion plates between each serum from rats infected and whole worm antigens of the adult. The number of bands in the plate had a tendency to reach the peak at six weeks after the 1st infection of rats with the metacercariae, after that, the number decreased gradually. From these results, it was suggested that the rats were highly immune to superinfection with the Japanese species of the genus *Fasciola*.

The experiment was also carried out to ascertain whether the antibody in rats infected with the Japanese *Fasciola* would be able to transfer to their babies. For this purpose, infected female rats were paired with normal male ones. The serum of offsprings of the infected mother rats was examined immunologically. Four cases of the baby rats from a single litter showed clear precipitin bands in agar double diffusion plates, while none of the same litter demonstrated a remarkable resistance against the infection with the metacercariae. The fact that there is a possible existence of transfer immunity in the offsprings of infected mother rats would be of great interesting.

カンテツ *Fasciola hepatica* に感染した動物での免疫学的な研究は、これまでにかかなり多くなされてきている。しかし、カンテツのメタセルカリアによる初感染を受けた動物が、次の再感染に対して阻止効果を示すという事実は、比較的最近明らかにされている。この分野での初期の研究としては、X線照射メタセルカリアを用いて宿主動物をワクチン化し、その後の正常なメタセルカリアによる感染状況を調べた例があげられる (Thorpe and Broome, 1962; Dawes and Hughes, 1964)。近年、*F. hepatica* 感染ラットやマウスにおいて、いわゆる再感染阻止についての実験的研究が活発になり、多くの知見が報告されている。それによると、ラットやマウスでは、*F. hepatica* メタセルカリアの初回投与が、再感染に影響を及ぼすだけでなく、幼成虫の移植、感染動物由来の腹腔内浸出細胞の移植、さらには感染動物血清の移入などにより、その後のメタセルカリアによる感染に対し、影響がみられるという (Lang, 1966, 1967, 1968a, b, 1972, 1974a, b; Lang et al.,

1967; Hughes and Harness, 1972; Goose and MacGregor, 1973; Hayes *et al.*, 1974a, b; Armour and Dargie, 1974; Eriksen and Flagstad, 1974; Anderson *et al.*, 1975). これらの研究成果により、現在では、再感染阻止の免疫に関与していると考えられる因子、すなわち虫令、虫による肝臓内穿入、感染動物の血清あるいは種々の免疫関与細胞などのうち、どの因子が最も機能的かについての検討がなされている。しかし、これらの成績はいずれも *F. hepatica* についてのものであり、分類学的位置が不明瞭な日本産カンテツについては、全く知られていない。そこで、今回は日本産カンテツについての基礎的な実験として、感染ラットにおける再感染阻止の成否について検討した。また、これらの感染ラットで形成された抗体が、胎児へ移行するかどうかについても若干の検討を試みた。

材料および方法

使用メタセルカリアは、高知市烏帽子山の牧場で採取されたヒメモノアラガイを飼育してセルカリアを游出させたものであり、被糞後6~7日令にあたる。ラットは Wistar King 株の雄47頭と雌53頭の計100頭が用いられ、すべて本学生物学教室で飼育・繁殖させたものである。メタセルカリアの投与にあたっては、実験計画に従い、少量の水と共に幼虫をビニール管を備えた注射筒で吸い込み、ラットの胃腔内に確実に注入した。メタセルカリアによる再感染の時期や、各群での使用ラット数については Table 1 に示したとおりである。ラットの剖検にあたっては、小形の幼若虫を見落さないように注意し、臓器・腹腔内の洗滌液ならびに細切した臓器、とくに肝臓について、実体顕微鏡下で詳しく調べた。得られた虫体については、すべて2枚のスライドガラスで圧平、70%アルコールで固定し、染色標本とした。その後、鏡下で虫の体長・体幅を計った。剖検時に得られた感染ラットの血清については、辻(1974)の方法に従い、Ouchterlony 法を実施し、種々の感染時期における沈降抗体系を検討した。なお、この際に用いられた抗原としては、日本産カンテツ成虫を10倍量の pH 7.4 リン酸緩衝液でホモジネートし、3,000 r.p.m., 15分間遠沈して得られた上清を使用した(多田, 1967)。

結 果

日本産カンテツのメタセルカリアによる初感染ラットに対し、再感染を試み、剖検の結果、Table 1 に示すような成績が得られた。実験群のうち Group I—VI のラットに対し、初感染後6週から11週の間、メタセルカリアによる再感染を試みた。Group VII, VIII および IX は、それぞれ Group I, II, III の初感染対照群であり、これらのグループのラットは、感染9, 10, 11 週後に剖検された。また、Group X は再感染対照群であり、再感染を受けた実験群のラットは、いずれも再感染後3週目に剖検され、虫体を回収した。

初感染ならびに再感染ともに、1頭あたり5個のメタセルカリアを投与したところ、初感染の虫は、すべての Group で主として胆管と肝実質から見出された。これに対し、感染3週後の再感染の虫は、1例を除き、すべてが肝実質のみから回収された。したがって、肝実質では剖検時に初感染虫と再感染虫が同時に見出されたが、両者は虫の大きさにより容易に区別することができた。再感染を受けた Group I—VI ならびに Group X (再感染対照群) のラット肝臓には、虫の穿入による激しい病変が認められたが、初感染対照群の Group VII, VIII, IX のラット肝臓では、病巣部は修復しつつあった。虫の回収率についてみると、Group I—IX の初感染由来の虫では50%~67%の値を示したのに対し、再感染由来の虫では13%~87%の回収率を示した。なお再感染対照群の Group X では、投与メタセルカリア総数の72%が回収された。またラットの雌雄における初感染と再感染による虫の回収率を比較したところ、雌雄間の差異は全く認められなかった。

Table 1 Recovery rates of the worms from rats receiving 1st and/or 2nd infections with *Fasciola* sp. metacercariae

Group	No. of rat used	No. of MC/rat		Total no. of worms recovered (%)		No. of worms recovered from				
		1st inf.	2nd inf.	1st inf.	2nd inf.	1st inf.		2nd inf.		
						bile duct	paren- chyma	lung	paren- chyma	abdom. cav.
I. Challenged 6 weeks after 1st inf.	5	5	5	15(60)	4(16)	10	5		4	
II. Challenged 7 weeks after 1st inf.	5	5	5	13(52)	4(16)	8	5		4	
III. Challenged 8 weeks after 1st inf.	4	5	5	10(50)	6(30)	8	2		5	
IV. Challenged 9 weeks after 1st inf.	3	5	5	10(67)	2(13)	9	1		2	1
V. Challenged 10 weeks after 1st inf.	3	5	5	8(53)	8(53)	8			8	
VI. Challenged 11 weeks after 1st inf.	3	5	5	8(53)	13(87)	8			13	
VII. First inf. control of Group I	5	5	0	14(56)		13	1			
VIII. First inf. control of Group II	5	5	0	13(52)		9	3	1		
IX. First inf. control of Group III	5	5	0	14(56)		14				
X. Challenge control killed 3 weeks after infection	5	0	5		18(72)		18			

Table 2 Measurements of the worms recovered from rats receiving 1st and/or 2nd infections with *Fasciola* sp. metacercariae

Group	Days after 1st inf.	Days after 2nd inf.	Average size in mm (range) of worms recovered from			
			1st infection		2nd infection	
			bile duct	parenchyma	lung	parenchyma
I.	63	21	11.7×5.4 [10]* (6.2-17.4×3.2-8.1)	5.2×2.4 [1]		1.9×0.9 [3] (1.1-3.0×0.5-1.6)
II.	70	21	13.6×5.8 [8] (8.0-17.6×4.0-7.5)			2.7×1.1 [3] (2.0-3.3×0.7-1.3)
III.	77	21	15.0×7.7 [5] (10.9-18.3×5.8-9.1)			2.7×1.5 [4] (2.5-2.8×1.3-1.6)
IV.	84	21	26.1×10.4 [9] (18.3-31.6×8.1-13.4)			3.4×1.4 [2] (3.0-3.8×1.4)
V.	91	21	28.5×10.8 [8] (21.5-33.0×8.5-13.1)			3.4×1.5 [8] (2.6-4.4×1.2-1.7)
VI.	98	21	33.3×13.7 [8] (27.4-43.1×11.2-15.6)			4.2×1.5 [13] (3.4-5.1×1.2-1.9)
VII.	63		14.1×6.5 [10] (8.2-22.4×4.2-10.1)	5.8×2.9 [1]		
VIII.	77		14.6×7.3 [9] (7.1-19.6×4.6-11.5)	5.5×2.7 [3] (4.4-7.0×1.7-3.7)	10.5×3.2 [1]	
IX.	70		18.4×8.5 [14] (12.4-21.8×4.7-10.0)			
X.	21					3.6×1.6 [16] (2.2-4.6×1.0-1.9)

* Number of the worms measured.

Table 3 Number of precipitin bands by agar double diffusion between each serum from rats infected with *Fasciola* sp. and whole worm antigen of adults

Infection with metacercariae	Weeks after the first infection														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
First inf. only	0, 0 0, 0	1, 1* 1*, 1* 1*, 2*	1*, 1* 1*, 1* 2*, 2*	2*, 2* 2*, 2* 3*, 4*	3*, 4* 5*, 5* 5*, 6*	4*, 5* 6*, 6* 6*	3, 4* 4*, 5*	3*, 3* 3*, 4*	2, 3 3*, 4*	2, 3 3*, 4*	2, 3 3*, 4*	1, 2 3, 3*			
Challenged 6 w. after 1st inf.							3*, 3* 0, 1*	1, 4* 2*, 0	0, 4* 0, 0						
Challenged 7 w. after 1st inf.								1*, 3* 2*, 2*	0, 4* 2, 2	1, 1 1, 3					
Challenged 8 w. after 1st inf.									1*, 2* 2*, 0	2*, 0 1*, 0	3*, 0 3*, 2*				
Challenged 9 w. after 1st inf.										1*, 2* 1*	1, 2* 1	1, 3* 2*			
Challenged 10 w. after 1st inf.											1*, 4* 2*, 2*	2*, 3* 2*, 5*	2*, 5* 4*		
Challenged 11 w. after 1st inf.												3*, 2* 2*	2*, 3* 2*	2*, 3* 2*	

* Clear bands.

Table 2 には虫の発育状況が示されている。まず再感染の虫についてみると、Group X の対照群で得られた 3 週令の虫は平均 3.6×1.6 mm であり、これは Group I, II, III の虫に比べると、かなり大きい。一方、Group IV, V, VI の虫は対照群とほぼ同大であった。初感染由来の虫につき、Group I—III とそれらの対照群である Group VII—IX とで、それぞれ比較してみると、再感染を受けた Group I—III の虫は、いずれも小さい傾向を示した。このように、再感染を受けたラットでの日本産カンテツの発育においては、初感染と再感染の虫の双方に対し、拮抗作用がみられることが示唆された。また同時期の虫であっても、回収部位が肝実質と胆管の違いにより、虫の発育に顕著な差異が認められた。

寒天ゲル内沈降反応によって、日本産カンテツ感染ラットにおける沈降抗体系の推移について、調べた結果は Table 3 に示されている。表中には、比較のために 4～6 頭のラットでの沈降線 (precipitin band) 数が、感染 1 週後から 11 週まで示されている。これによると、初感染のみを受けたラットでは、5～6 週後に沈降抗体系の出現が盛んであり、7 週以降は沈降線が少なくなる傾向を示した。一方、初感染から 6 週～11 週後に再感染したラットでは、再感染後 1 週から剖検までの沈降反応の結果が示されている。この場合、沈降線のみを限り、再感染によって沈降抗体系が刺激されるようなことはなく、むしろ対照群よりも少ない band がみられた。初感染後 6 週、7 週、8 週目に再感染を受けたグループでは、沈降線数 0 のラットがみられるが、これらのいずれにおいても初感染が成立していたことは、剖検時に確認された。

次に、感染母親ラットから胎児への抗体の移行の有無を調べるため、雌ラットに日本産カンテツのメタセルカリア 5 個ずつを経口投与した。その後、これらのラットを雄ラットと交配させ、妊娠・出産そして授乳せざるようにした。この場合、いずれのラットも、メタセルカリア投与後 23 日から 28 日に出産した。そこで、授乳中の仔ラット 4 頭について、生後 3 週目に採血し、沈降抗体系を調べたところ、4 例のすべてにおいて沈降線が出現した。また、これらのラットと同腹の仔ラット 5 頭に対し、生後 3 週目にメタセルカリア 5 個ずつを経口投与した。得られた虫の回収率は 52% であり、対照群 (正常仔ラット 3 週令を使用) の回収率 67% と大差を示さなかった。しかし、この実験により、日本産カンテツに対して産生された母親ラットの沈降抗体系は、その胎児に移行することが、はじめて明らかにされた。しかしながら、これらの抗体系が経胎盤によるものか、あるいは授乳によるものか、という点については、さらに詳細な研究が必要である。

考 察

ラットにおける日本産カンテツ初感染による虫の回収率は、Group I—IX で 50%～67% (平均 55%) の値を示し、各グループでほぼ一定していた。同様な値 (56.2%) は、*F. hepatica* 感染ラットでも得られている (Hayes *et al.*, 1972)。次に、再感染の虫の回収率は、初感染後 6 週～9 週に再感染した Group I—IV のラットで低く (13%～30%)、Group V で 53%、Group VI で 87% であった。したがって、初感染後 6～9 週目の時期では、再感染に対し阻止効果がみられるが、10 週以降ではこの傾向が消失していくようである。Hayes *et al.* (1972) によれば、*F. hepatica* 感染ラットの場合、再感染に対する阻止効果は、初感染後 7 週目に最も強く現れたという。本実験においては、メタセルカリアの 1 回感染ラットでの沈降抗体系は、感染 5 週から 6 週後にピークに達した。この成績と虫の回収結果とを考え合わせると、日本産カンテツ感染ラットでの最も強い阻止能力は、Hayes *et al.* (1972) の成績 (初感染後 7 週) とほぼ一致するものといえる。なお今後は初感染後 6 週以前の時期についても、再感染を試み、阻止効果が最も強い時期を検討していく必要がある。また Hayes *et al.* (1973) は、初感染あるいは再感染での感染量 (メタセルカリア数) と阻止効果の間にも密接な関係のあることを指摘している。

日本産カンテツのメタセルカリアによる初感染が、再感染に及ぼす影響を虫の発育という点から検討した。初感染後6週から8週に再感染したラットから得られた虫体は、同時期の対照群(3週令)に比較し、かなり小さい傾向を示した。このことは、これらのグループにおける初感染が、再感染の虫の回収率だけでなく、虫の発育に対しても、阻止効果があることを示唆している。一方、再感染が初感染に及ぼす影響についてみると、虫の回収率では影響がないといえるが、虫の発育面では対照群よりも劣る傾向が、とくに Group I, II, IIIのラットから得られた虫で認められた。このような虫の発育抑制に対しては、宿主ラット体内に産生された免疫が強く作用しているものと推測され、この免疫は再感染阻止の免疫と密接に関係しているであろう。同様な影響について、*F. hepatica* で虫の回収率を調べてみると、初感染に対する再感染の作用はなかったという(Hayes *et al.*, 1972)。

日本産カンテツのメタセルカリア5個を、ラットに経口投与し、7週間後に剖検すると、回収された虫の80%は肝臓実質から見出され、8週後には、回収虫体の60%が胆管に認められた(島崎, 未発表)。このことから、日本産カンテツのラット胆管への移行時期は、ラットでは感染7週から8週後であろうと推定される。このような虫の胆管への移動時期と、再感染阻止の免疫が最も強くなる時期との間に、何らかの関係が存在するか否かについては、今のところ全く不明である。日本産カンテツのラット肝臓実質から胆管への移行と、虫の発育との間には密接な関係があるものと考えられ、今回の初感染で肝臓実質から回収された虫は、同時期の胆管からのものに比べて、著しく小さく、発育が抑制されていた。

次に、日本産カンテツ感染母親ラットから、胎児又は新生児へのいわゆる移行抗体について、若干、言及したい。今回の実験では、感染母親ラットから産まれた仔ラットにおいて、寒天ゲル内沈降反応を試みたところ、沈降線が観察され、移行抗体の存在が示唆された。*Fasciola* 属の吸虫において、母親から子供への移行抗体の存在する可能性が示されたのは、今回がはじめてであり、注目すべき成績といえる。しかし、この種の実験では、実験計画そのものが非常に重要である。すなわち、妊娠ラットの感染時期あるいは出産時期などが複雑に関与し合ってくるのが推測される。感染阻止の免疫という点からみれば、これに関与する抗体系が最も効率よく移行する時期を選定し、実験を行なうべきである。また仔ラットで認められた抗体系が、経胎盤か、あるいは授乳によるかを、早急に解決すべく実験を計画中である。

要 約

カンテツ *Fasciola hepatica* 感染ラットやマウスにおいては、初感染に続く再感染に対し、阻止効果がみられることが明らかにされ、免疫学的な面から種々の研究がなされている。今回は、日本産カンテツについて、同様な阻止効果がみられるかどうかを、寄生虫学的、免疫学的な側面から検討した。その結果、日本産カンテツ感染ラットにおいても、初感染後6週から9週間目に再感染阻止が強く起ることが明らかにされた。また、この阻止効果は初感染から10週以降になると、次第に低下していく傾向がみられた。再感染阻止が強く認められた実験群では、虫の発育においても影響が認められ、初感染ならびに再感染由来の両方の虫の発育抑制がみられた。感染ラットの沈降抗体系について調べてみると、感染後5週から6週目に、多くの沈降線が出現し、この時期に抗体産生が盛んであることが示唆された。一方、これらのラットに対し、初感染から6~11週に再感染を試みても、沈降抗体系が刺激されることはなく、むしろ1回感染の対照群に比べ、band 数はいくぶん少なくなる傾向を示した。感染母親ラットから仔ラットに対する、いわゆる移行抗体の有無を調べたところ、寒天ゲル内沈降反応により、明瞭な band が認められた。これらと同腹の仔ラットに対し、生後3週目にメタセルカリアによる感染を試みたが、阻止効果はみられなかった。また仔

ラットで観察された沈降抗体系が経胎盤なのか、授乳によるものか、については今のところ明らかでない。今後より詳細な実験を試み、移行抗体についての問題を追究していく必要がある。

稿を終るにあたり、種々ご協力いただいた渡辺和志、日向一雄、伴田 聡、山口昌弘、ならびに岡林悦子の諸兄姉に対し、心から感謝の意を表したい。

文 献

- Anderson, J. C., Hughes, D. L., and Harness, E. (1975): The immune response of rats to subcutaneous implantation with *Fasciola hepatica*. *British Veterinary Journal*, 131, 509-518.
- Armour, J., and Dargie, J. D. (1974): Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Experimental Parasitology*, 35, 381-388.
- Dawes, B., and Hughes, D. L. (1964): Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Advances in Parasitology*, 2, 97-168, ed. by Dawes, Ben. Academic Press, Inc. London and New York.
- Eriksen, L., and Flagstad, T. (1974): *Fasciola hepatica*: Influence of extra-hepatic adult flukes on infections and immunity in rats. *Experimental Parasitology*, 35, 411-417.
- Goose, J., and MacGregor, M. (1973): Naturally acquired immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. *British Veterinary Journal*, 129, xlix.
- Hayes, T. J., Bailer, J., and Mitrovic, M. (1972): Immunity in rats to superinfection with *Fasciola hepatica*. *J. Parasit.*, 58, 1103-1105.
- Hayes, T. J., Bailer, J., and Mitrovic, M. (1973): Immunity to *Fasciola hepatica* in rats: the effect of two different levels of primary exposure on superinfection. *J. Parasit.*, 59, 810-812.
- Hayes, T. J., Bailer, J., and Mitrovic, M. (1974a): Serum transfer of immunity to *Fasciola hepatica* in rats. *J. Parasit.*, 60, 722-723.
- Hayes, T. J., Bailer, J., and Mitrovic, M. (1974b): Studies on the serum transfer of immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. *J. Parasit.*, 60, 930-934.
- Hughes, D. L., and Harness, E. (1972): The experimental transfer of adult *Fasciola hepatica* between various mammalian hosts. *Research in Veterinary Science*, 13, 422-426.
- Lang, B. Z. (1966): Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. I. Response to a primary infection. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 82, 195-203.
- Lang, B. Z. (1967): Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. II. Studies on acquired immunity. *J. Parasit.*, 53, 21-30.
- Lang, B. Z. (1968a): Acquired immunity to *Fasciola hepatica* in the laboratory white mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 17, 561-567.
- Lang, B. Z. (1968b): Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. III. Worm transfer. *Proc. Okla. Acad. Sci.*, 47, 81-84.
- Lang, B. Z. (1972): Experimental infections with *Fasciola hepatica* from eastern Washington and northern California. *Northwest Sci.*, 46, 190-193.
- Lang, B. Z. (1974a): Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. V. Age of fluke responsible for the induction of acquired immunity. *J. Parasit.*, 60, 90-92.
- Lang, B. Z. (1974b): Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. VI. Studies on the effects of immune and normal sera on the viability of young worms transferred to normal recipients. *J. Parasit.*, 60, 925-929.
- Lang, B. Z., Larsh, J. E., JR., Weatherly, N. F., and Goulson, H. T. (1967): Demonstration of immunity to *Fasciola hepatica* in recipient mice given peritoneal exudate cells. *J. Parasit.*, 53, 208-209.

多田 功 (1967): ダイコクネズミにおける肺吸虫感染におよぼす感染量とコーチゾンの影響. 寄生虫誌, 16, 51-57.

Thorpe, E., and Broome, A. W. J. (1962): Immunity to *Fasciola hepatica* infection in albino rats vaccinated with irradiated metacercariae. *Vet. Res.*, 74, 755-756.

辻 守康 (1974): 寄生蠕虫症の免疫学的診断法. 検査と技術, 2, 33-36.

(昭和54年9月25日受理)

(昭和55年1月17日発行)