

# 放射線照射による食品よりの旋毛虫感染予防に関する研究

奈良県立医科大学寄生虫学教室

島津公隆

## EXPERIMENTAL STUDIES ON PREVENTION OF TRICHINOSIS BY FOOD IRRADIATION (Co60)

KIMITAKA SHIMAZU

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received November 30, 1993

**Abstract:** A systemic study was performed to elucidate the effects of Co60 irradiation on maturation or fecundity of *Trichinella spiralis* by assessing from parasitological, morphological and immunological points of view. Pieces of muscle tissue of mice infected with *T. spiralis* were irradiated with Co60 at doses of 50, 75, 100, 150 and 200Gy. These irradiated tissues (Experimental group) and non-irradiated tissues (Control group) were fed to healthy mice. Half of the mice were sacrificed 6 days after the ingestion. The number of adult worms were counted and subjected to statistical analysis, which disclosed a good correlation between the dose of Co60 irradiation and worm damage; the higher the dose the more damage parasites had, and no adults were recovered if the tissue had been irradiated with more than 150Gy prior to infection. The same tendency was true for the histopathology of the intestines of host mice; the higher the dose the less tissue damage. Circulating antigens of *T. spiralis* and antibodies against *T. spiralis* were detected in every serum examined by means of ELISA. The remaining mice were sacrificed 30 days after the ingestion. The numbers of muscle larvae were counted and subjected to statistical analysis, which disclosed a good correlation between the dose of Co60 irradiation and worm damage, and no larvae were recovered if the tissue had been irradiated with more than 75Gy. Higher concentrations of circulating antigens of *T. spiralis* and antibodies against *T. spiralis* were detected in the serum samples taken with muscle larvae. Thus this study established that Co60 irradiation of more than 150Gy caused complete damage on maturation, and that irradiation of more than 75Gy caused complete damage on the fecundity of *T. spiralis*.

### Index Terms

*Trichinella spiralis*, Co60 irradiation, prevention of trichinosis, circulating antigen, circulating antibody

### 緒 言

現在、我国は世界の各地から生鮮食品を輸入している。それぞれの産地国での感染防止対策や国内での検疫対策にもかかわらず、種々の病原寄生虫が食品と共に輸入され、日本人の生(なま)での摂取と云う食習慣と相まって、

公衆衛生上大きな問題がひき起こされる恐れがある。例えば、中国から輸入されたドジョウより感染した顎口虫症が発症し<sup>1),2)</sup>、その他、流行地での有鉤囊虫感染の豚肉の不完全熱処理から有鉤条虫が感染しさらにその有鉤囊虫症の発症が確認されてきたが、最近感染源不明の有鉤囊虫症も国内で散発している<sup>3),4),5),6)</sup>。また輸入食品のみ

ならず、国内産のクマ肉の生(なま)またはルイベなどから旋毛虫症が集団発症し、また海産魚肉からのアニサキス症は年々その感染数も増加の様相を呈している。さらに牛肉のたたきや生ごしから無鉤条虫症が、サケ・マス の刺身などから広節裂頭条虫の感染が目立って来ている。寄生虫症の一般的な個人予防法は生(なま)食いの禁止か加熱処理であるが、いずれも食習慣上徹底することは困難で、不十分な調理のまま摂取する可能性、調理器具などに付着した病原寄生虫が他の食品と共に人体に入る可能性等がある。

このような状況下で我々は生(なま)食いの習慣にまつわる生鮮食品からの感染の防止対策のひとつとして、コバルト 60 による食品照射の可能性、感染防止に関する有用性と共に、その場合の虫体成分の宿主に対する免疫応答について検討した。実験系としては、発育環がよく知られ分析が比較的簡単な旋毛虫を用いた。旋毛虫感染は、筋肉内に被嚢感染している幼虫を経口摂取する事により始まる。宿主腸管内で筋肉が消化されるに従い、被嚢している幼虫は脱嚢し腸管上皮細胞内に侵入をする<sup>7),8),9)</sup>。2~3日後には性的に成熟し雌成虫は7日後には数千の新生児を腸管組織内に産出する<sup>10),11),12),13)</sup>。新生児は血流により全身に散布され、骨格筋や心筋細胞に侵入し、筋肉細胞にて被嚢し、次の感染の機会を待つ。旋毛虫症は食肉より感染する人畜共通感染症として、欧米、東南アジア諸国では古くから恐れられ食品衛生上、重要な食肉検査の対象とされている。旋毛虫症は高熱、筋肉痛、顔面浮腫などを主症状とするが、急性期における直接死因は心筋炎である<sup>14)</sup>。従来我国には存在しないとされていたが、1974年青森県下<sup>15),16),17),18)</sup>、ついで北海道札幌、1982年三重県下で集団発生を見<sup>19)</sup>、また輸入ブタ肉やクマ肉と共に、我国へ持ち込まれる可能性の高い重要な寄生虫感染症であるので本旋毛虫感染を今回の実験の対象とした。

## 材料ならびに方法

### 材料

#### ① 旋毛虫

弘前大学医学部寄生虫学教室山口富雄教授より分与され、奈良医大寄生虫学教室にてマウスに継代されている *Trichinella spiralis* (Polish 株) を用いた。

#### ② 旋毛虫筋肉幼虫の採集

筋肉幼虫は感染マウス筋肉よりペプシン-塩酸消化法により集めた。すなわち、旋毛虫感染マウスの筋肉を肉切包丁で細かく碎き、0.5%ペプシン(NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)-0.7%塩酸(NACALAI

TESQUE, INC. Kyoto, Japan) を人工胃液とし、この中で37℃にて3時間消化した。消化後の反応液を目の大きさが125 μmの篩で漉し、円錐形容器中に室温で30分間放置し、容器の底に沈んだ幼虫を集めた。採集した幼虫はリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, 以下PBS, pH 7.2)にて繰り返し洗浄した。

#### ③ 粗抗原

筋肉幼虫をPBS中に浮遊させ、超音波破砕器(20 kHz, UR-200 P, TOMY SEIKO Co., Ltd. Tokyo, Japan)にて4℃で20分間破砕後、4℃で24時間攪拌した。さらに4℃にて10,000 gで20分間遠心し(KR/180 B, KUBOTA SEISAKUSYO Co., Ltd, Tokyo, Japan), 上清をセロハンチューブ(Union Carbide Co., USA)に入れ、4℃の蒸留水に対して24時間透析後、凍結乾燥したものを筋肉幼虫粗抗原とした。

④ 抗旋毛虫ウサギ IgG ならびに peroxidase 標識抗体

上記手技にて作成した筋肉幼虫粗抗原 0.5 mg を生理食塩水 0.5 ml にて溶解後、ウサギに完全アジュバントと共に繰り返し皮下注射し、さらにブースター注射を行ない抗旋毛虫幼虫免疫血清を作成した。さらにこの血清より DEAE セルロースカラム法で IgG 分画を分離(抗旋毛虫ウサギ IgG) し、Nakane and Kawaoi の方法<sup>20)</sup>に従い peroxidase を標識した。

#### ⑤ 実験動物

日本クレアより購入した ICR マウス(144 匹)を用いた。感染実験に用いる旋毛虫幼虫の供給源としては、上記の旋毛虫に感染 60 日間以上のマウスの被嚢幼虫を用いた。感染実験用マウスとしては 8 週令のマウス(雄雌同数)を用いた。

#### 方法

##### ① コバルト 60 照射

ATOMIC ENERGY OF CANADA LIMITED 社製の THERATRON 60 を用いて、ミンチ肉状に処理した旋毛虫幼虫を含むマウス体幹筋に放射線照射を行なった。照射に際し試料ミンチ肉の厚さを制限し、試料全てが均一の照射を受けるように工夫した。照射量は 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 Gray(以下 Gy)である(Table 1 参照)。

##### ② 感染マウス腸管内の旋毛虫成虫数の算定

感染実験 6 日目にマウスを屠殺し、十二指腸より直腸までの腸管を 37℃生理食塩水中で切開し成虫を遊出させ、実体顕微鏡下でその数を算定した。

##### ③ 感染マウス筋肉中の旋毛虫幼虫数の算定

感染実験 30 日目にマウスを屠殺し、その筋肉をミンチ

Table 1. A summary of dose of Co60 irradiation in each experiment

	Irradiation dose (unit : Gy)	
	Preliminary experiment	Experiment 1 and 2
Control group	0	0
	12.5	
	25	
Experimental group	50	50
		75
	100	100
		150
	200	150
	200	200

肉状にし、人工胃液で消化し、筋肉中の被囊幼虫を遊出させ、筋肉1グラム中に存在する幼虫数を算定した。

#### ④ 循環抗原量・抗体価の測定

マウス屠殺時(感染6日目および30日目)に心臓採血をし、血中の旋毛虫循環抗原をサンドイッチ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定し、抗体価の測定を間接 ELISA 法を用いて行なった。

##### 〈サンドイッチ ELISA 法〉

循環抗原を検出するために ELISA 用 microtiter plate (M 129 A, Dynatech 社製) を使い、well に前述の抗旋毛虫ウサギ IgG を 0.05 M, pH 9.6 の carbonate buffer (coating buffer) で 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように希釈し、それを 100  $\mu\text{l}$  入れ、37°C、3 時間で固相化させた。1% BSA (bovine serum albumin) を含んだ coating buffer を 200  $\mu\text{l}$  入れ、37°C、60 分間で well 表面の蛋白非吸着部を BSA で blocking し、次に検体血清を 1% BSA を含む pH 7.2 の PBS (dilution buffer) で希釈し、その 100  $\mu\text{l}$  を入れ、37°C、60 分間反応させた。最後に前述の方法にて作成した peroxidase 標識抗旋毛虫ウサギ IgG を dilution buffer で 1/300 に希釈し、その 100  $\mu\text{l}$  を入れ 37°C で 60 分間反応させた。以上それぞれのステップの終わりに 0.02% Tween 20 を含む pH 7.2 の PBS (washing buffer) で十分洗浄を繰り返した。基質として *o*-phenylene diamine (OPD, 和光純薬) 10 mg を 0.2 M dibasic sodium phosphate 25 ml と 0.1 M の citric acid 25 ml の混合液に溶解し、使用前に 30% の過酸化水素水を 10  $\mu\text{l}$  加え、OPD を活性化し、well に 100  $\mu\text{l}$  入れ酵素反応を起こさせた。反応は 20°C の暗室内で行ない、ちょうど 30 分後に 100  $\mu\text{l}$  の 3N-sulfuric acid で反応を中止させた。その反応産物を分光光度計(主波長 500 nm, 副波長 610 nm, MTP 12A, Corona 社)

にて吸光度を測定した。

##### 〈間接 ELISA 法〉

旋毛虫幼虫粗抗原を coating buffer にて 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解し、96 穴 microtiter plate の well に 100  $\mu\text{l}$  入れ、37°C、3 時間で固相化させた。さらに、well 表面への蛋白の非特異的吸着を防ぐため、1% BSA を含む coating buffer を 200  $\mu\text{l}$  加え、37°C で 60 分間反応させた。次に検体血清を 1% BSA を含む PBS にて 1/500 に希釈し、これを 100  $\mu\text{l}$  加え 37°C で 60 分間反応させた。最後に、peroxidase 標識抗マウス IgG を 1% BSA を含む PBS にて 1/200 に希釈したものを 100  $\mu\text{l}$  加え 37°C で 60 分間反応させた。以上それぞれの反応段階の終わりに washing buffer で十分洗浄を繰り返した。基質として OPD, 10 mg を 0.2 M dibasic sodium phosphate 25 ml と 0.1 M の citric acid 25 ml の混合液に溶解し、使用前に 30% の過酸化水素水を 10  $\mu\text{l}$  加え、OPD を活性化し、well に 100  $\mu\text{l}$  入れ酵素反応を起こさせた。反応は 20°C の暗室内で行ない、ちょうど 30 分後に 100  $\mu\text{l}$  の 3N-sulfuric acid で反応を中止させた。その反応産物の吸光度を分光光度計にて測定した。

#### ⑤ 腸管組織観察

旋毛虫感染 6 日目のマウス腸管を組織学的に検討するため、空腸の一部を切除し、4°C の 1/2 カルノフスキー固定液で固定、脱水包埋後、切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。

## 予備実験

放射線照射の旋毛虫への影響を検討するため、至適な照射量を定めるべく予備実験を行った。コバルト 60 照射量は 0 (コントロール群)、12.5, 25, 50, 100, 200 Gy と便宜的に決め、後述の実験 1 と実験 2 の方法に従って、感染実験とその結果判定を行なった(但し、予備実験における投与旋毛虫の数はマウス  $\langle n = 8 \rangle$  一匹当たり 600 隻)。

その結果、コントロールと 12.5 Gy および 25 Gy とでは旋毛虫成虫数及びその幼虫数に本質的な差がなく、50 Gy と 200 Gy との間の照射量で旋毛虫の成長が阻害され、また生殖能力が阻害されることを見出した。それ故に 50, 75, 100, 150, 200 Gy の照射量が我々の実験目的に合致するものと判断し、この線量を照射した旋毛虫幼虫を用い、実験 1 と実験 2 を行なった。

## 実験 1

コバルト 60 照射による幼虫から成虫への成長阻害についての検索：

コバルト 60 照射を被囊幼虫の時期に受けた旋毛虫幼虫が、新しい宿主の腸管内で成虫に成長するのが、どの程度阻害されるかを調べるのが目的である。旋毛虫感染 60 日以上の感染マウス（材料② 参照）を 4～5 匹屠殺し、その体幹筋肉を混じて細切、ミンチ肉状とし、コバルト 60 を照射し（方法① 参照）、その照射量は無照射群（コントロール群）、50, 75, 100, 150, 200 Gy とした（Table 1 参照）。それぞれの照射を受けた旋毛虫幼虫を含むミンチ肉を、24 時間絶食状態においたマウスに投与した。ミンチ肉が乾燥するのを防ぐためと、マウスが好んで食べるようにするためミンチ肉を等張の蔗糖液にひ

たした。その投与量はマウス一匹当たり 250 隻であり対象群、各照射群に各 16 匹のマウス（雌雄それぞれ 8 匹ずつ）を用いた。投与された感染幼虫が腸管内で成虫に達すると思われる感染実験 6 日目に、それぞれの群の半数 8 匹（雌雄各 4 匹）のマウスを屠殺し、次の測定および観察を行なった（Fig. 1 参照）

- ① マウス腸管内の旋毛虫成虫数を算定（方法② 参照）
- ② マウス血清中の循環抗原量及び抗体価の測定（方法④ 参照）
- ③ マウス腸管の組織学的観察（方法⑤ 参照）

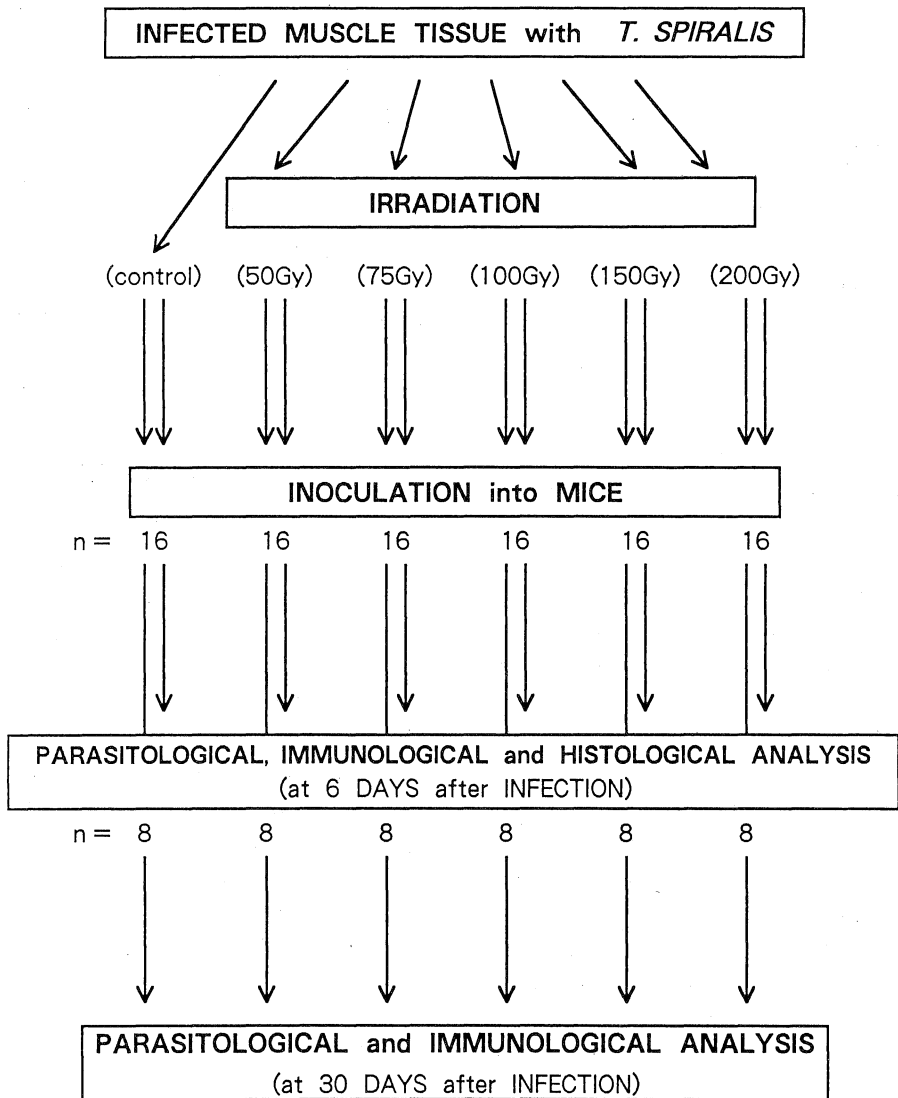


Fig. 1. Schematic summaries of experiment 1 and 2.

実験1の残り半数の8匹マウスは実験2のため生きさせた。④参照)

## 実 験 2

コバルト 60 照射による旋毛虫第2世代への影響：

これはコバルト 60 照射を被囊幼虫の時期に受けた旋毛虫幼虫が、新しいマウス腸管内で成虫に達したときの生殖能力が、どの程度阻害されるかを調べるのが目的である。コバルト 60 照射、マウスへの感染などは前述の実験1と全く同様に行ない、感染30日目に残りの全てのマウス（各群雌雄各々4匹）を屠殺し、次の算定および測定を行なった。（Fig. 1参照）

- ① マウス筋肉内の被囊幼虫数の算定（方法③参照）
- ② マウス血清中循環抗原量及び抗体価の測定（方法

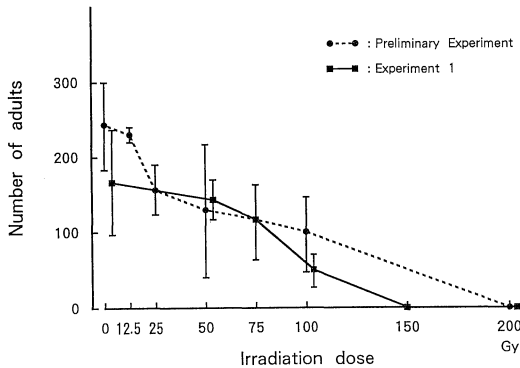


Fig. 2. The effect of Co60 irradiation on the maturation of *T. spiralis* was assessed by counting the number of adults recovered from mice.

## 結 果

(1) 感染実験6日目のマウスに関する成績（実験1）

① マウス腸管内の旋毛虫成虫（Table 2, Fig. 2）

250隻の正常の旋毛虫幼虫を経口投与されたマウスの腸管より、コントロール群（無照射群）では $168 \pm 70.8$ 隻の旋毛虫成虫が回収された。50 Gy照射の旋毛虫幼虫を経口投与されたマウスの腸管より（50 Gy照射群では） $146.2 \pm 25.0$ 隻の旋毛虫成虫が回収された。75 Gy照射群で $114.8 \pm 49.5$ 、100 Gy照射群で $50.7 \pm 21.5$ 隻となり、照射量が多くなると暫時回収される成虫数が減少し、150 Gy以上照射群では、全く成虫が回収されなかった。100 Gy以下照射群のマウス腸管内より回収された旋毛虫雌成虫を圧平標本にし、光学顕微鏡で観察すると、コントロール群では生殖器内に糸状の子宮内仔虫、丸型の胎芽が見られたが<sup>21)</sup>、75 Gy照射群では子宮内仔虫・胎芽の数の減少、形態の不整が著明で、さらに100 Gy照射群では小果粒が散在するのみであった（Fig. 3）。

② ELISA法による循環抗原量および抗体価の測定結果

マウス血清中の旋毛虫幼虫循環抗原量をサンドイッチELISA法で測定した。500 nmの可視光線による吸光度（O. D.）はコントロール群で $0.211 \pm 0.080$ 、50 Gy照射群で $0.281 \pm 0.060$ 、75 Gy照射群で $0.237 \pm 0.049$ 、100 Gy照射群で $0.250 \pm 0.114$ 、150 Gy照射群で $0.232 \pm 0.094$ および200 Gy照射群で $0.217 \pm 0.122$ であり、コントロール群を含めて各実験群間において有意の差を認めなかった（Table 2, Fig. 5）。

Table 2. A summary of results of parasitological and immunological examination at 6 and 30 days after infection

	6 days after infection			30 days after infection		
	No. of adults recovered from intestines	Circulating antigen	Antibody titer	No. of larvae recovered from muscles (lg)	Circulating antigen	Antibody titer
Control group (0 Gy) (n=16)	$168.8 \pm 70.8$	$0.211 \pm 0.080$	$0.084 \pm 0.028$	$2931.2 \pm 1090.3$	$0.457 \pm 0.129$	$0.539 \pm 0.091$
50Gy-group (n=16)	$146.2 \pm 25.0$	$0.281 \pm 0.060$	$0.109 \pm 0.058$	$716.3 \pm 521.7$	$0.409 \pm 0.114$	$0.619 \pm 0.331$
75Gy group (n=16)	$114.8 \pm 49.5$	$0.237 \pm 0.049$	$0.098 \pm 0.014$	0	$0.247 \pm 0.058$	$0.278 \pm 0.166$
100Gy-group (n=16)	$50.7 \pm 21.5$	$0.250 \pm 0.114$	$0.082 \pm 0.031$	0	$0.265 \pm 0.062$	$0.139 \pm 0.042$
150Gy-group (n=16)	0	$0.232 \pm 0.094$	$0.082 \pm 0.008$	0	$0.219 \pm 0.092$	$0.100 \pm 0.036$
200Gy-group (n=16)	0	$0.217 \pm 0.122$	$0.074 \pm 0.010$	0	$0.211 \pm 0.140$	$0.125 \pm 0.073$

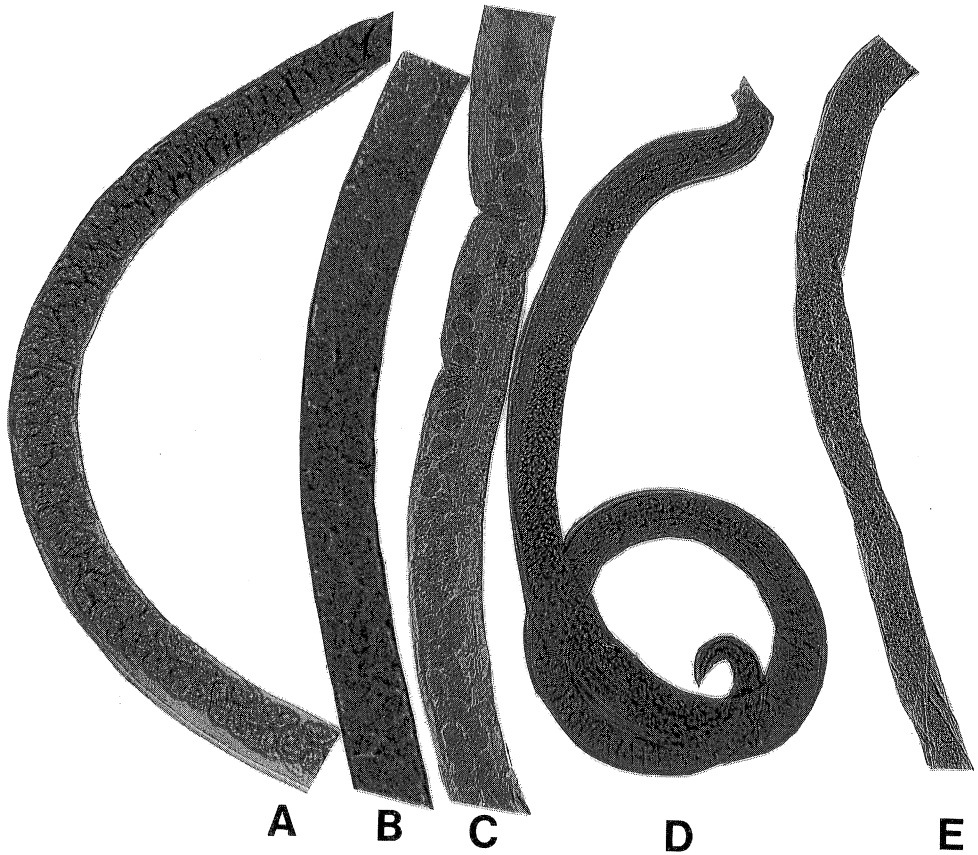


Fig. 3. Light micrographes of worms recovered from intestines at 6 days after infection.

A : A female adult worm recovered from the control group mouse. Numerous embryos were seen in the uterus with normal appearance of female reproductive organ of *T. spiralis*.

B : A female adult worm recovered from the 50Gy-group. The uterus contains embryos, but their morphology is different from that of normal ones. Each embryo exhibited irregular shape.

C : A female adult worm recovered from the 75Gy-group mouse. The number of embryos are decreasing, and each embryo exhibited more irregular shape.

D : A male adult worm recovered from the 100Gy-group mouse. At light microscopical level, male worms generally exhibited no prominent morphological damage even after 100Gy irradiation.

E : A female adult worm recovered from the 100Gy-group mouse. The uterus collapsed after Co60 irradiation of 100Gy. No embryos were seen in the uterus.

同じく間接 ELISA 法を用いてマウス血清中の抗旋毛虫抗体価を測定した。その値はコントロール群では  $0.084 \pm 0.028$ , 50 Gy 照射群で  $0.109 \pm 0.058$ , 75 Gy 照射群で  $0.098 \pm 0.014$ , 100 Gy 照射群で  $0.082 \pm 0.031$ , 150 Gy 照射群で  $0.082 \pm 0.008$  および 200 Gy 照射群で  $0.074 \pm 0.010$  であり、いずれの群も低く、その各群間における有意の差は認めなかった (Table 2)。

③ マウス腸管の組織学的所見 (Fig. 4)

コントロール群の旋毛虫感染幼虫を投与されたマウスは、前述の如く旋毛虫感染が成立し、その空腸上皮は腫大し、エオジンの染色が不均一である。粘膜固有層は浮腫状となり、好酸球及び小円形細胞の浸潤が観察される。このような病理学的変化は投与された旋毛虫幼虫に対する照射量が多くなるにつれて軽微となる。特に成虫が見つからなかった 150 Gy および 200 Gy 照射群の旋毛虫幼虫を投与されたマウスは、これらの著明な炎症所見は

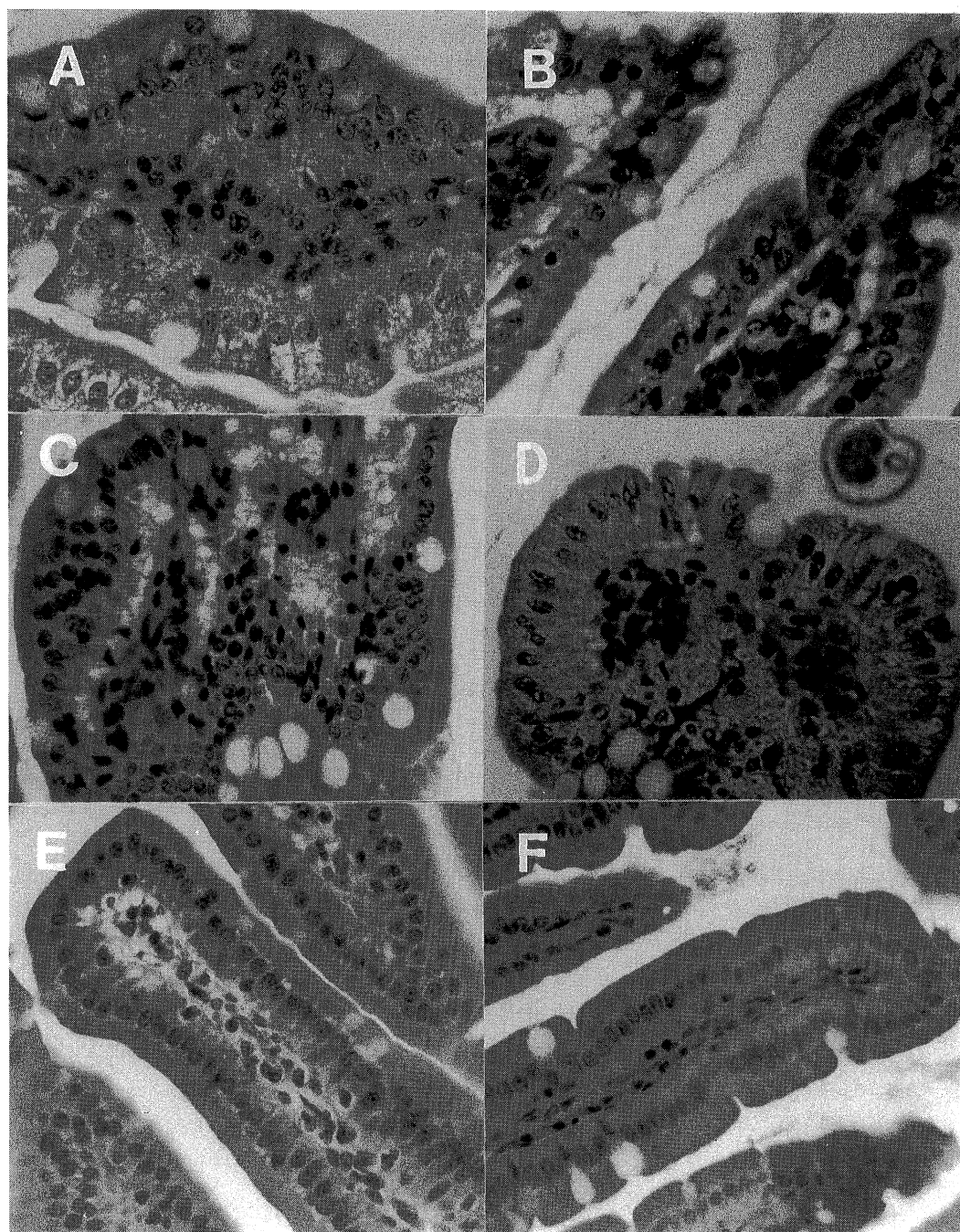


Fig. 4. Histopathology of small intestines infected with *T. spiralis*.

Figs. A, B, C, D, E and F show H&E sections taken from small intestines 6 days after inoculation of irradiated larvae at doses of 0(control), 50, 75, 100, 150, 200Gy, respectively.

IRRADIATION DOSE	0	50 Gy	75 Gy	100 Gy	150 Gy	200 Gy
6 DAYS after INFECTION	Adults in the intestines					
	0.211	0.281	0.237	0.250	0.232	0.217
30 DAYS after INFECTION	Larvae in the muscles					
	0.457	0.409	0.247	0.265	0.219	0.211

Fig. 5. Circulating antigen obtained from experiment 1 and 2.

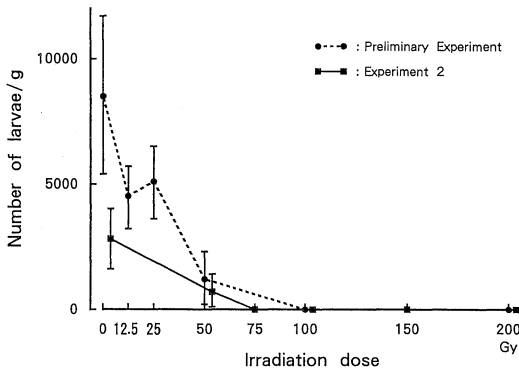


Fig. 6. The effect of Co60 irradiation on the fecundity of *T. spiralis* was assessed by counting the number of muscle larvae recovered from host mice.

示さなかった。

(2) 感染30日目のマウスに関する成績(実験2)

① 筋肉中被囊幼虫数 (Table 2, Fig. 6)

250 隻の正常の旋毛虫幼虫の投与を受けたコントロール群のマウス筋肉1グラム中より、2931.2±1090.3 隻の幼虫が回収された。この数は50 Gy 照射群では716.3±521.7 に減少し75 Gy 以上照射を受けた実験群では、幼虫が全く回収できず第2世代が育たなかった事実が示された。

② ELISA 法による循環抗原量および抗体価の測定結果 (Table 2, Fig. 5)

ELISA 法によりマウス血清中における循環抗原量の測定を行った。筋肉中に被囊幼虫が検出されたコントロール群のマウスの血清と50 Gy 照射群のマウスの血清

において、それぞれ0.457±0.129 および0.409±0.114 の吸光度 (O. D.) が得られた。この値は幼虫が検出されなかった他の実験群に比べ、有意に高値であった。

抗旋毛虫抗体価についての測定をした。コントロール群と50 Gy 照射群では、それぞれ0.539±0.091 および0.619±0.331 であり、他の実験群 (75 Gy 照射群では0.278±0.166, 100 Gy 照射群では0.139±0.042, 150 Gy 照射群で0.100±0.036, 200 Gy 照射群で0.125±0.073) にくらべ有意に高値を示し (Table 2), 抗体価においても循環抗原量と同じ傾向が見られた。

考 察

コバルト 60 照射を受けた被囊幼虫は、照射線量に応じて種々の程度に成長および生殖能に関して障害を受ける事が本研究により明らかにされた。照射量を増加させると、それに従い感染6日目の小腸内で回収される成虫数は減少し、150 Gy 以上照射群になると、照射を受けた幼虫自身が成虫に達することができなくなる (成熟障害)。また感染30日目の宿主筋肉中に検出される第2世代の被囊幼虫数も50 Gy では減少し、75 Gy 以上照射されると第2世代である新生幼虫産生能を失う (幼虫産出障害)。この照射量と成熟障害、照射量と幼虫産出障害との量的関係を統計学的に考察してみるため、それぞれ成熟障害率、幼虫産出障害率として量的に表現した。

成熟障害率 =  $\{(C_1 - E_1) / C_1\} \times 100$

C<sub>1</sub> : コントロール群の腸管中より検出される成虫数

E<sub>1</sub> : 実験群の腸管中より検出される成虫数

幼虫産出障害率 =  $\{(C_2 - E_2) / C_2\} \times 100$



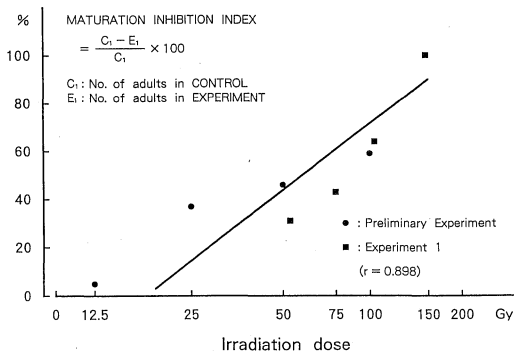


Fig. 7. The effect of Co60 irradiation on the maturation of *T. spiralis* was expressed as maturation inhibition index, and plotted on the diagram.

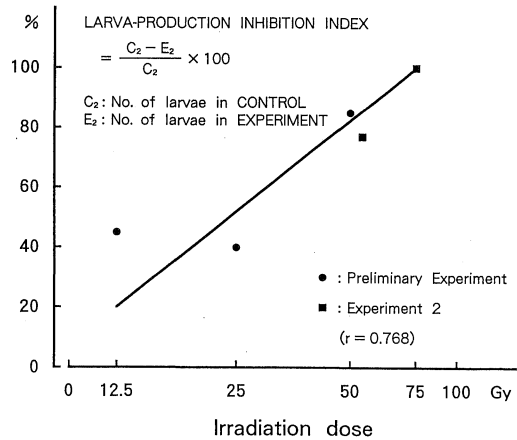


Fig. 8. The effect of Co60 irradiation on the production of larvae was expressed as larva-production inhibition index, and plotted on the diagram.

$C_2$ : コントロール群の筋肉より検出される幼虫数

$E_2$ : 実験群の筋肉より検出される幼虫数

の数式に換算し、プロットしてみると、Fig. 7 と Fig. 8 の如く両者共照射量に対数值に対して、成熟障害率では相関係数 0.898 および幼虫産出障害率では 0.768 の高い相関関係が得られた。Wilcoxon 検定を用いて実験成績を検定してみると、成熟障害率に関しては、100 Gy 以上照射群がコントロール群に対して  $P < 0.005$  の確率で有意差があり、幼虫産出障害率では、50 Gy 以上照射群がコントロール群に対して同じく  $P < 0.005$  の確率で有意差がある事が示され、コバルト 60 照射は旋毛虫の発育を阻害している事が確信された。更に重要な事は、150 Gy 以上照射された場合、感染幼虫が全く成虫へ成長できなくなる事と、75 Gy 以上照射された場合、第 2 世代の旋毛虫幼虫が全く育たない事である。これは極めて明確な照射の影響を意味している。75 Gy 以上照射で第 2 世代の旋毛虫幼虫が全く育たなかった事は、75 Gy および 100 Gy 照射された感染幼虫がマウス腸管内で成虫に達した時、成虫内に正常の子宮内仔虫・胎芽が確認できなかった事 (Fig. 3) より判断すると、照射を受けた感染幼虫の原始生殖細胞が障害を受けたことを裏付けている。感染幼虫が腸管内で成虫に達し得なかったのは、幼虫を形成する体細胞が照射により分裂増殖能力が障害されたため、この障害をもたらすのに旋毛虫の場合、150 Gy 以上照射が必要であることを立証した。

これは一般に生殖細胞の方が、体細胞より放射線障害を受けやすいという従来の考えに全く一致する実験結果である。文献によると、旋毛虫幼虫の放射線致死量は 750 Gy であり<sup>22)</sup>、200 Gy では旋毛虫幼虫は即死状態ではな

い。更にこの 200 Gy 照射旋毛虫幼虫は宿主腸管上皮細胞の中に侵入する能力も保持していると思われる。何故なら本実験で、感染 6 日目の宿主血中の旋毛虫幼虫循環抗原量をみると、200 Gy 照射群でもコントロール群とほぼ同等の抗原量が検出されているからである (Table 2, Fig. 5)。

旋毛虫感染により、一般に宿主は強い免疫反応を示す<sup>23),24),25)</sup>。液性免疫に関しては G, M, E, A クラスの抗体価の上昇が報告されている<sup>26),27)</sup>。IgG クラスの反応は一般に二相性であり、感染初期と更に数週間遅れて抗体価の上昇がみられる<sup>27),28)</sup>。それぞれの時期に上昇する抗体に反応する抗原は免疫生化学の実験に基づき Wassorme 等により Group I, Group II と命名され<sup>28)</sup>、また一方、免疫組織化学の実験に基づき Takahashi 等により rapid responding group (RRG) 抗原, slow responding group (SRG) 抗原と報告されている<sup>27)</sup>。この二者が旋毛虫の抗原の大部分を占める。本実験により感染 6 日目に検出された抗旋毛虫抗体は抗 RRG 抗体 (Group I) に相当し、感染 30 日目に検出された抗旋毛虫抗体は抗 SRG 抗体 (Group II) に相当するものと思われる。

SRG 抗原は種特異性に富み、RRG 抗原は逆に非特異的であり種々の蠕虫抗原と交差反応を有する<sup>10)</sup>。免疫電顕的研究によれば、RRG 抗原のかなりの部分は phosphoryl choline が抗原決定基になっているものと報告されている<sup>29)</sup>。RRG 抗原は種々の蠕虫と交差反応をするため実験にはマウスの嚴重な飼育環境設定が重要である。旋毛虫幼虫感染初期に SRG 抗原の主要成分である食道

腺の果粒が虫体よりほぼ全量放出される。食道腺は旋毛虫幼虫の虫体前半部を占める外分泌腺である<sup>30)</sup>。これに対する抗体の免疫応答が幼虫感染後遅れて出現する事より、第1世代の果粒分泌単独では抗体産生に至らず、第2世代が宿主筋肉中に育ちその旋毛虫が食道腺の果粒を分泌(いわゆるES抗原)し始めたところにSRG抗原に対する抗体産生となるものと考えられる。

旋毛虫は同一宿主の中で发育史を完了する事と、虫体自身が多細胞生物である故に、多種多様な抗原物質を持つ。このうち感染第1世代の幼虫由来の抗原がどの程度有効な抗原刺激となるかは従来不明であったが、本研究において成虫が検出できたグループ(コントロール群, 50 Gy群, 75 Gy群, 100 Gy群)にも、成虫が育たなかったグループ(150 Gy群, 200 Gy群)にも、感染6日目においてほぼ同量の循環抗原量が検出できた事(Table 2, Fig. 5)は少なくとも感染初期においては、感染第1世代の幼虫由来の抗原が循環抗原のかなりの部分を占めるものと思われる。

感染30日目の宿主血中の旋毛虫幼虫循環抗原量は50 Gy照射群, コントロール群において他の群よりも有意に高い(Table 2, Fig. 8参照)。これは50 Gy照射群, コントロール群のマウス筋肉中には被囊幼虫が存在するため、その幼虫の食道腺に由来する循環抗原と推定できる。この場合の循環抗原とは被囊幼虫が産出するいわゆるES抗原であるが、旋毛虫幼虫のES抗原は抗原性が強くさらに種特異性が高いため免疫診断上注目を浴びている<sup>31),32),33)</sup>。このES抗原は $\alpha$ 果粒と呼ばれる<sup>34)</sup>果粒由来であるが、分泌された後に一部は虫体表面に付着するものと思われる<sup>35)</sup>。抗ES抗体が認識するのはpI 4.0と5.4の抗原物質である<sup>36)</sup>が、西山<sup>37)</sup>, Nishiyama *et al.*<sup>38)</sup>および荒木ら<sup>39)</sup>はヒト旋毛虫患者からもこの循環抗原の検出に成功している。また、被囊幼虫が存在しない、75, 100, 150, 200 Gy照射群において、マウス血中の循環幼虫抗原量が感染6日目も30日目もほぼ同量であり、その間に減少していない事は、マウスにおける旋毛虫抗原のクリアランスの機序を考える上で興味深い。実験マウス血中の抗旋毛虫幼虫抗体に関しても、筋肉中に幼虫が検出されるコントロール群と50 Gy照射群において、他の実験群よりも明らかに高い値が得られている。これは低照射群においては、より多量の抗原刺激にさらされたためと判断できる。

食品に混入している病原寄生体を放射線照射により不活性化するという方法は、旋毛虫の場合特に有効であると考えられる。何故ならば旋毛虫感染幼虫は他の宿主に経口摂取され、その宿主の腸管に入り、生殖活動を行な

い第2世代を爆発的に増やし、その第2世代の幼虫が宿主筋肉中に散布され、重篤な感染症状を示す。この发育史を考えれば自明の如く、旋毛虫幼虫を致死せしめるような大量の放射線の照射する必要はなく、150 Gy照射で感染幼虫から成虫への成長を阻止し感染を防御できる。更に、たとえ75 Gy照射であっても宿主の腸管上皮細胞が、経口摂取した旋毛虫自身による軽い障害を受けるだけで第2世代の新生幼虫産出がなく、宿主筋肉内に旋毛虫幼虫が散布される事はない。つまり、旋毛虫の場合は第2世代の幼虫が宿主に強い障害を与えるので、それを阻止するのに感染後の发育過程において生殖細胞に障害を与える比較的少量の放射線照射で十分な効果を上げる事ができる。

我が国が輸入する生鮮食品の種類ならびに量は拡大増加し、輸入原産地はますます多様化しつつある。このような状況下で、国民が思わぬ感染症にさらされる危険は無視しえない。食品の放射線照射は食品の味覚を変化させる事なしに、病原寄生体(特に寄生蠕虫)を不活性化させる有益な技術として完成させられるべきものである事が実証された。

## 結 語

1. 旋毛虫は被囊幼虫時に75 Gy以上のコバルト照射を受けると、成虫に達しても第2世代の幼虫産生能を失う。
2. 旋毛虫は被囊幼虫時に150 Gy以上のコバルト照射を受けると、成虫に成長する能力を失う。
3. 食品を経口摂取することによる旋毛虫感染は、汚染食品をコバルト60で照射する事により予防可能であり、特に被囊幼虫時に75 Gy照射で充分その目的が達せられることが実証された。
4. 放射線照射を用いて実験的に自然感染、成虫が育たない感染、産出幼虫が育たない感染を作り出し免疫応答を比較することにより、それぞれの段階の抗原の関与を検討し得た。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った恩師荒木恒治教授ならびにご助言、ご校閲を賜った細菌学教室榎葉周三教授、放射線医学教室打田日出夫教授に深甚なる謝意を表しますとともに、ご助言を賜った教室の諸兄に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 山口富雄: 顎口虫症および旋毛虫症、とくに最近における発症を中心に。寄生虫誌。32(補): 2, 1983。

- 2) 荒木恒治, 辻 守康, 山口富雄, 森田, 博, 瀬川武彦, 西山利正, 山田祥次, 八木 純, 陳 維章, 島津公隆, 宇野貴子, 天野博之, 高橋優三: 輸入ドジョウより感染した顎口虫症—最近経験した8症例5病型について, 輸入食品による寄生虫病の研究—特に最近多発せる顎口虫症および旋毛虫症を中心に. 昭和60年度科学研究費補助金(総合研究A)研究成果報告書. p17, 1986.
- 3) 西山利正: 条虫症の幼虫移行症—有鉤囊虫症及びマソンソン孤虫症について. 寄生虫誌. 41(2補): 135, 1992.
- 4) 宮下 琢, 宮司厚子, 西谷 肇, 真野健次, 国井乙彦, 宮下英夫, 渋谷敏明, 陳 榮棟: 肺病変を伴った有鉤囊虫症の一例. C. Parasitol. 3: 140, 1992.
- 5) 柿崎俊雄, 川合省三, 竹村 潔, 田中祥弘, 物部健彦, 金 永進, 流田智史, 虎頭 廉, 西山利正, 荒木恒治: 脳有鉤囊虫症の1手術例. C. Parasitol. 3: 143, 1992.
- 6) 杉山悦朗, 島本佳憲, 山田 史, 稲葉 真: 脳有鉤囊虫症(*Cysticercosis racemosus*)の1例. C. Parasitol. 3: 146, 1992.
- 7) Gursch, O. F.: Intestinal Phase of *Trichinella spiralis* (OWEN, 1885) RAILLIET, 1895. J. Parasitol. 35: 19, 1949.
- 8) Larsh, J. E., Race, G. J. and Jefferies, W. B.: The association in young mice of intestinal inflammation and the loss of adult worms following an initial infection with *Trichinella spiralis*. J. Inf. Dis. 99: 63, 1954.
- 9) Wright, K. A.: *Trichinella spiralis*: An intracellular parasite in the intestinal phase. J. Parasitol. 65: 441, 1979.
- 10) Stryker, W. A.: The intestinal phase of human trichinosis. Am. J. Pathol. 23: 819, 1947.
- 11) Carter, J. R.: Plasma cell hyperplasia and hyperglobulinemia in trichinosis; the duration of larviposition. Am. J. Pathol. 25: 309, 1949.
- 12) Larsh, J. E. and Race, G. J.: A histopathologic study of the anterior small intestine of immunized and nonimmunized mice infected with *Trichinella spiralis*. J. Inf. Dis. 94: 262, 1954.
- 13) Gardiner, J. E.: Habitat and reproductive behavior of *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 62: 856, 1962.
- 14) Gordon, M. B., Cars, R. and Kaufman, B.: Encephalitis and myocarditis in a fatal case of trichinosis. Report of a case in a fourteen-year-old girl. J. Pediat. 6: 667, 1935.
- 15) 山口富雄: わが国においてはじめて発症をみた旋毛虫症. 寄生虫誌. 24(2補): 57, 1975.
- 16) 大淵宏道, 遠藤尚和, 山下純一, 武藤純一, 及川慶一, 照井良彦: 我が国で初めて発症を見た旋毛虫症. 特に臨床像を中心にして. 秋田農村医学会誌. 21: 30, 1975.
- 17) 山口富雄, 高田伸弘, 八木沢誠, 稲葉孝志, 小内はるみ, 黄 文雄: わが国においてはじめて見出された旋毛虫症. I. 臨床的観察. 寄生虫誌. 24(増): 41, 1975.
- 18) 山口富雄, 高田伸弘, 八木沢誠, 稲葉孝志, 小内はるみ, 花田勝美, 村山芳郎, 佐々木義楼, 後藤昭平, 大淵宏道, 遠藤尚和, 照井良彦: わが国で初めて発症をみた旋毛虫症について. 日本医事新報 No. 2668: 16, 1975.
- 19) 山口富雄: 日本における旋毛虫症の発症状況. 寄生虫誌. 32(補): 82, 1983.
- 20) Nakane, P. K. and Kawaoi, A.: Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084, 1974.
- 21) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Tokuda, C. and Araki, T.: Heratoxylin and eosin staining profile of adult worms of *Trichinella spiralis*. Jpn. J. Parasitol. 38: 285, 1989.
- 22) Gombert, H. J. and Gould, S. E.: Effect of irradiation with Cobalt-60 on *Trichina* Larvae. Science 118: 75, 1953.
- 23) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Yamada, S. and Araki, T.: Ultrastructural localization of antigenic substances in *Trichinella spiralis*. Parasitol. Res. 75: 316, 1989.
- 24) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Shimazu, K. and Araki, T.: *Trichinella spiralis*; the in situ localization of muscle larvae antigens recognized by human. Exp. Parasitol. 70: 107, 1990.
- 25) 荒木恒治, 宇野貴子, 高橋優三, 西山利正: 旋毛虫症における宿主の免疫応答に関する研究—宿主が認識する抗原局在部位, 輸入食品による寄生虫病の研究—特に最近多発せる顎口虫症および旋毛虫症を中心に. 昭和60年度科学研究費補助金(総合研究A)研究成果報告書. p121, 1986.

- 26) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Tokuda, C., Shimazu, K. and Araki, T. : An immunocytochemical analysis of a class-specific antibody response against *Trichinella spiralis* in humans. J. Electron Microsc. 40 : 136, 1991.
- 27) Takahashi, Y., Mizuno, N., Uno, T., Aisaka, A. and Araki, T. : A spectrum of antibody response with time after *Trichinella spiralis* infection in rats. J. Parasitol. 76 : 230, 1990.
- 28) Denkers, E. Y., Hayes, C. E. and Wasson, D. L. : *Trichinella spiralis*; Influence of an immunodominant, carbohydrate-associated determinant on the host antibody response repertoire. Exp. Parasitol. 72 : 403, 1991.
- 29) Takahashi, Y., Mizuno, N. and Araki, T. : Ultrastructural localization of phosphorylcholin antigen in *Trichinella spiralis*. Jpn. J. of Tropical Medicine and Hygiene 20 : 88, 1992.
- 30) 荒木恒治, 高橋優三, 吉川義朗, 西山利正, 宇野貴子 : 旋毛虫の形態に関する研究—アクニトロン包埋とエオジン・ヘマトキシリン染色による組織学的研究. 輸入食品による寄生虫病の研究—特に最近多発せる顎口虫症および旋毛虫症を中心に. 昭和60年度科学研究費補助金(総合研究A)研究成果報告書. p134, 1986.
- 31) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Yamada, S., Nakajima, M. and Araki, T. : *Trichinella spiralis*; Antigenic substances associated with the alimentary tract. Exp. Parasitol. 68 : 414, 1989.
- 32) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Wada, T. and Araki, T. : Immunocytochemical evaluation of *Trichinella spiralis* larval antigen. J. Electron Microsc. 39 : 155, 1990.
- 33) Mizuno, N., Takahashi, Y., Uno, T., Suzuki, H. and Araki, T. : Further characterization of the excretory and secretory antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae. Jpn. J. Parasitol. 40 : 260, 1991.
- 34) Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Yagi, J., Aisaka, A. and Araki, T. : Morphological study of the stichocyte granules of *Trichinella spiralis* muscle larvae. Jpn. J. Parasitol. 38 : 77, 1989.
- 35) Takahashi, Y., Mizuno, N., Uno, T., Tokuda, C. and Araki, T. : Direct evidence that the cuticle surface of *Trichinella spiralis* muscle larvae shares antigenicity with stichocyte  $\alpha$ -granules and the esophagus-occupying substance. J. Parasitol. 75 : 290, 1990.
- 36) Mizuno, N., Uno, T., Suzuki, H., Shimazu, K., Takahashi, Y. and Araki, T. : Antibody against the cuticle surface of *Trichinella spiralis* muscle larvae predominantly reacts to parasite constituents of pI 4.0 and 5.4. Jpn. J. Parasitol. 39 : 400, 1990.
- 37) 西山利正 : 旋毛虫症における循環抗原検出並びにその抗原性の検討. 奈医誌. 38(3) : 398, 1987.
- 38) Nishiyama, T., Araki, T., Mizuno, N., Wada, T., Ide, T. and Yamaguchi, T. : Detection of circulating antigens in human trichinellosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 86 : 292, 1992.
- 39) 荒木恒治, 西山利正, 吉田 豊, 宇野貴子, 高橋優三, 瀬川武彦 : 実験的旋毛虫症における循環抗原検出ならびにその抗原性の検討. 輸入食品による寄生虫病の研究—特に最近多発せる顎口虫症および旋毛虫症を中心に. 昭和60年度科学研究費補助金(総合研究A)研究成果報告書. p83, 1986.