

実験的ラット肝蛭症の免疫診断学のおよび病理学的研究

奈良県立医科大学寄生虫学教室

吉岡豊

IMMUNODIAGNOSTIC AND PATHOLOGICAL STUDIES ON EXPERIMENTAL FASCIOLIASIS IN RATS

YUTAKA YOSHIOKA

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received November 29, 1991

Summary: The aim of this study was to establish an experimental model for fascioliasis in rats and to investigate the relationship between immunochemical changes in the blood and histopathological changes in the liver. Experimental infection with *Fasciola* sp. was established in Wistar rats of 5~9 weeks old. Direct evidence of infection was obtained from ovum positive stools, which appeared at 8 weeks after infection. The findings suggested that the parasite had matured to the adult stage in the liver. Additional evidence included an increase in the levels of GOT and GPT at 3 to 8 weeks and similar increases in LAP activity at 4 to 8 weeks after infection. The raised levels of GOT and GPT reflected liver parenchyma damage caused by fluke infestation and elevated LAP provided evidence of fluke migration into the bile ducts.

Marked increases in specific antibody levels were detected by ELISA as early as 1 week after infection, and specific immunoprecipitation bands were detected 2 weeks after infection. Antibody levels reached maximum at 8~10 weeks after infection. These results suggest that the ELISA method could be especially useful in the early diagnosis of experimental fascioliasis in rats.

Direct histopathological analysis of livers at intervals after infection demonstrated that: 1) metacercariae of *Fasciola* sp. mature to the adult stage in rats; 2) invasion into the liver by the parasite occurred between 2 and 4 weeks; 3) migration to the main bile duct occurred between 6 and 8 weeks; 4) pathological changes in the liver caused by *Fasciola* sp. in this model were similar to those described for human fascioliasis.

In conclusion, the present studies have established a useful model for experimental infection with *Fasciola* sp. in 5~9-week-old rats. In addition a specific micro ELISA for antibody to *Fasciola* sp. has been developed for the early diagnosis of fascioliasis. The process of invasion into the liver and migration into the biliary tract was monitored by the measurement of serum enzyme activities release from hepato-biliary foci.

Index Terms

experimental fascioliasis (*Fasciola* sp.), rats, ELISA, liver function tests, pathology

結 言

肝蛭症(Fascioliasis)の原因となる *Fasciola* 属は世界の広い地域に分布し、その感染によって牛や綿羊等の反芻家畜の生産、育成と蛋白源の増産に著しく障害を与え、これによる経済的損失は計り知れない¹⁾。我国では肝蛭感染の主体は牛で、本邦各地に散在して寄生が認められている。

基本的な発育環は虫卵→ミラシジウム→中間宿主：ヒメモノアラガイ(スポロシスト→レジア→セルカリア)→水生植物の茎(メタセルカリア)→宿主の順である。

水草、牧草や稲ワラの表面で被囊したメタセルカリアを牛が経口摂取すると、小腸で幼虫が脱囊し、小腸壁に侵入し、これを貫いて腹腔に現れ、ついで肝臓の表面から実質内に侵入して最終的に胆管又は胆嚢に達し成虫にまで発育することは知られている²⁾。

一方、ヒトの感染例²⁾³⁾も散発ながら報告されており、人畜共通寄生虫病として重要な寄生虫病のひとつである。

ヒトへの感染は水生植物(セリ、ミョウガ等)の表面で被囊したメタセルカリアを摂取した場合、稲の茎に被囊したメタセルカリアを稲刈りなどの時、手や農具を介して不用意に経口摂取した場合、さらに脱囊後間もない幼虫がひそむ牛の消化管や肝臓を生食した場合などとされている²⁾。

今日、人畜共に肝蛭症の診断には臨床症状、糞便虫卵検査、免疫学的診断法(補体結合反応、寒天ゲル内沈降反応、カウンター電気泳動法、免疫電気泳動法、赤血球凝集反応および皮内反応など)を併用して行われているが、最終的には糞便虫卵検査によって確定診断をくだしている¹⁾²⁾³⁾。

著者らは操作が比較的簡単で、短時間に多数の検査が可能な牛肝蛭症の間接 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)診断法を 1984 年に我国で始めて検討し既に報告した⁴⁾⁵⁾。

ELISA による肝蛭症の診断結果を判断する場合、肝蛭の成長に伴う抗体産生状況、感染に伴う病態および病理所見を感染実験により総合的に知る必要がある。

実験感染動物としては、本邦ではマウス、家兎および山羊が多く用いられているが⁶⁾、ラットを用いた報告は虫卵排出の確認に用いた 1~2 例にすぎない。即ち、今までラットには年齢抵抗性があり、肝蛭の実験感染動物としては適さないとされていた⁶⁾⁷⁾。肝蛭感染の実験小動物として、渡辺⁸⁾によればマウスは死の転機をとり 40 日以降の観察は困難であったと述べている。そこで、家兎や綿羊・山羊で肝蛭の実験感染がなされ、各動物での pre

patent period(感染から成虫となるまでの期間)も検討されている。

肝蛭の本来の宿主である牛や綿羊・山羊に代えて、著者は今回、手近にあり入手が容易でしかも一度に多検体の検索が可能なラットを実験動物として選んだ。ラットでの実験感染モデルを確立するため、血清免疫学的診断法、血液検査および糞便虫卵検査、血清生化学検査および病理学的検査を実施し、肝蛭感染に伴うラットの病態に関する研究をおこなったのでその結果を報告する。

材料および方法

感染実験：実験 I では、肝蛭感染に伴う血清抗体価の推移を間接 ELISA とカウンター電気泳動法(counter immunoelectrophoresis; CEP)による免疫学的診断手技を用いて検討し、併せて糞便および血液の顕微鏡的検査を実施した。実験 II では、肝蛭感染に伴う血清抗体価(ELISA)の推移と肝機能との関係を経時的に検討した。実験 III では、肝蛭感染に伴う肝臓の病理学的変化を経時的に観察した。

各実験ともに SPF の Wistar 系ラット(静岡県実験動物農業協同組合)の雄を用いた。

一連の感染実験に用いたメタセルカリアは、奈良県内の水田より採取したヒメモノアラガイから冷水中にて、セルカリアを遊出させ、麦桿に付着・被囊させたものである。乾燥後、4°C 多湿条件下で保存し、約 1 カ月後にそれぞれのラット 1 匹当たり 30 個のメタセルカリアを経口投与した。なお、虫卵検査は沈澱法である渡辺氏法⁹⁾を用いた。

実験 I：肝蛭感染に伴う間接 ELISA、カウンター電気泳動法による血清抗体価の推移。

実験に用いたラットは 9 匹で、実験開始時平均体重 250 g の約 9 週齢のものを用いた。実験期間は昭和 59 年 8 月 6 日から 20 週間とし、採血および採便は感染(メタセルカリア投与)時、感染後 3 日目、1 週目以後 10 週目までは 1 週毎とし、以後 20 週目までは 2 週毎とした。なお採血は心臓採血により実施し、血液塗抹標本を作成し、白血球百分比を算出した。同時に血清を分離し血清反応に供した。

ELISA および CEP 用抗原としては、屠場より得た牛肝臓寄生の肝蛭虫体を 37°C 滅菌生理食塩水で数回洗浄し、ガラスホモジネーターにて破碎後、乳鉢に入れ、0.1%食塩水を加えて凍結し、これを乳棒で磨砕し、融解直前、これを再び凍結し、この磨砕・融解・凍結を数度繰り返した後、4°C、10000 g で 1 時間遠心した。その上清を 4°C、12 時間蒸留水で透析し凍結乾燥したものを

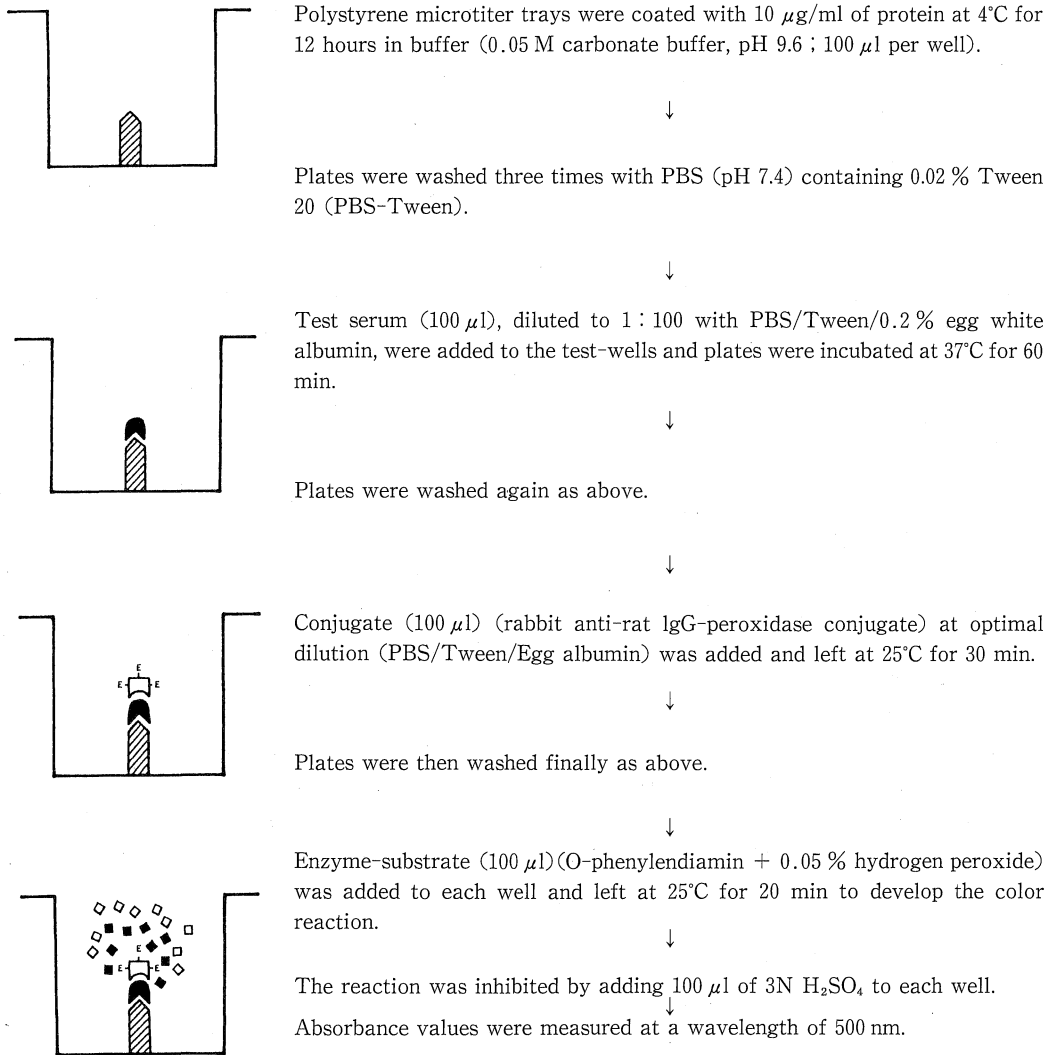


Fig. 1. ELISA procedures by indirect antibody assay.

0.1 % 食塩水抽出粗抗原として用い蛋白濃度は Lowry 法⁹⁾の方法にて測定した。

間接 ELISA の術式は以下の通りで Voller 法⁹⁾の方法に準じた (Fig. 1.)。

- ① 肝蛭抗原の固相化：ポリスチレン製トレイ (ダイナテック ; 655001) に抗原が至適濃度⁴⁾⁵⁾, 10 $\mu\text{g/ml}$ の蛋白量になるように 0.05 M 炭酸バッファー (pH 9.6) で希釈し, ウェルあたり 100 μl を 4°C 12 時間で固相化した。
- ② 0.02 % Tween 20 加リン酸緩衝食塩水 (PBS ; pH 7.4) で洗浄。
- ③ 被検血清の添加：固相化した肝蛭抗原に血清中の特異 IgG 抗体を結合させるため 0.2 % egg white albumin 加

PBS で 100 倍希釈した血清を 56°C 30 分間非働化の後 100 $\mu\text{l/well}$ 入れ 37°C 60 分間反応させた。

- ④ 再び洗浄。
- ⑤ 検体中の抗体に結合させるため至適⁴⁾⁵⁾に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG ウサギ血清 (Miles 社製) を 100 $\mu\text{l/well}$ 入れ 25°C 30 分間反応させた。
- ⑥ 十分に洗浄。
- ⑦ 基質反応：基質として O-フェニレンジアミンを 0.05 % H_2O_2 で活性化させ, 100 $\mu\text{l/well}$ 入れ遮光し 25°C 20 分間発色させた。
- ⑧ 直ちに 3 N H_2SO_4 を 100 μl 入れ発色を停止した。
- ⑨ 500 nm で吸光度 (O.D.) を測定した。

CEP 術式

- ①寒天平板は1%アガロース(Difco社製)加PBS(pH 7.2)をガラス板に満載し、凝固させたものに直径4mmの穴を通電と平行の方向に4mm間隔で平行にあげる。
- ②陰極側には3mg/mlとなるように0.025mlの滅菌蒸留水に0.1%食塩水抽出肝蛭抗原を溶解し抗原液として入れる。
- ③陽極側にはラット血清を0.025ml入れる。
- ④ガラス板の幅1cm当たり3mAの割合で通電した。
- ⑤25分後にガラス板を取り出して沈降線の有無を観察した。

実験II：肝蛭感染に伴う経時的肝機能検査

実験に用いたラットは20匹で、実験開始時平均体重105gの5週齢のものを用いた。実験期間は昭和61年9月9日から16週間とし10匹ずつを感染(メタセルカリア投与)群, 対照(非感染)群とした。採血は両群とも0~4週までは1週毎に、その後は6, 8, 10, 12, 16週にそれぞれ心臓穿刺により採血し、血清を分離して、肝機能検査および抗体検査に用いた。なおELISAによる抗体測定および虫卵検査は実験Iと同様の方法で実施した。

肝機能検査項目は、GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic pyruvic transaminase), LDH(lactic dehydrogenase), ALP(alkaline phosphatase), LAP(leucine aminopeptidase), γ -GTP(gamma glutamyl transpeptidase), cholesterol, bilirubin, ChE(cholinesterase), TP(total protein), Alb

(albumin), Glb(globulin)およびA/G比で、血清蛋白の分画はセルローズアセテート膜電気泳動法を用いたが、他は全てオートアナライザーで実施した。なお、有意差の検定には、t検定を用いた。

実験III：肝蛭感染に伴う肝臓の経時的病理学的変化

実験に用いたラットは24匹で、実験開始時平均体重100gの5週齢のものを用いた。実験期間は昭和63年10月3日から16週間で3匹ずつのグループは、0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16週にそれぞれ病理解剖に供した。肝臓組織標本は10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋した。薄切切片は常法のヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。

結 果

実験I：1. 肝蛭感染に伴うELISAによる血清抗体価の推移

感染前のO.D.値は 0.088 ± 0.034 で、感染後3日目では 0.080 ± 0.048 と感染前と有意差を認めなかった。感染後1週目には 0.176 ± 0.026 と感染前に比べ有意($P < 0.01$)なO.D.値の上昇を認めた。

2週目には 0.271 ± 0.050 , 3週目には 0.316 ± 0.093 , 4週目には 0.363 ± 0.048 , 5週目には 0.414 ± 0.036 , 6週目には 0.482 ± 0.065 , 7週目には 0.500 ± 0.056 , 8週目には 0.545 ± 0.067 , 9週目には 0.591 ± 0.088 , 10週目には 0.587 ± 0.100 , 12週目以降は 0.530 ± 0.079 (12週), 0.533 ± 0.083 (14週), 0.526 ± 0.075 (16週), $0.530 \pm$

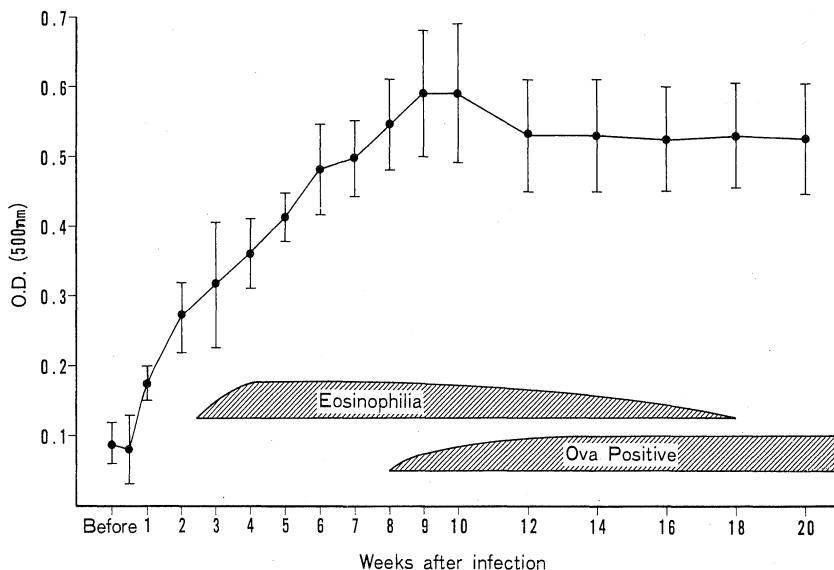


Fig. 2. Changes in ELISA value during experimental infection in rats.

0.080(18週), 0.525 ± 0.085 (20週)と感染後9~10週の最高値より若干低下したものの0.53前後の高いO.D.値を実験終了時の20週目まで持続していた(Fig.2.).

2. CEP検査

全てのラットで感染前, 感染後3日目, 感染後1週目には沈降抗体は検出されなかったが, 感染後2週目以降実験終了時の20週目までの全てのラットに明瞭な沈降線が確認された(Fig.3.; 代表例).

3. 糞便虫卵検査

連続して採便が可能であった6匹中, 最も早く肝蛭虫卵を検出したのは感染後8週目で2/6匹であったが, その後漸次虫卵を排泄するラットが増加し, 9週目には3/6匹, 10週目では4/6匹, 12週目では5/6匹となり, 感染後14週目には全てのラットで虫卵の排泄を認めた(Fig.4.).

なお, 無差別に集めた50個の排泄された肝蛭卵の長径, 短径の測定値は, $159.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$, $83.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ であった.

4. 白血球の百分比

リンパ球(Ly.)は当初80%前後であったが, 感染後は減少し, 感染後5~16週目には65%~70%となった. 好中球(Neu.)は当初10~15%であったが, 感染後は増加し, 感染後7~12週目には20~25%を占めていた(Fig.5.). 好酸球(Eos.)は感染前に1%前後であったが, 感染後は急激に増加し, 感染後4~5週目には約10%を占めるに至ったが, その後は徐々に減少したが, 実験終了時でも正常値よりなお好酸球の増加を認めた(Fig.6.).

実験II: 肝蛭感染に伴う肝機能検査

肝機能検査と間接ELISAによる抗体価と糞便虫卵検

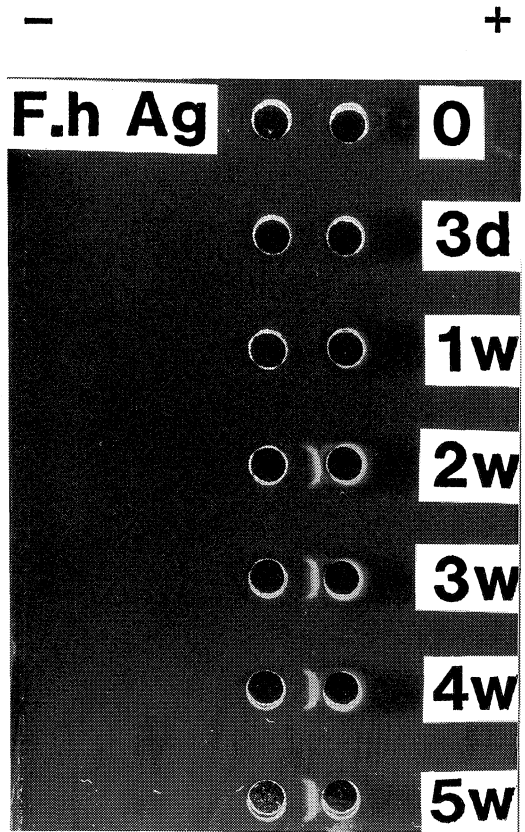


Fig. 3. Results of CEP after infection of *Fasciola* sp. Each left well contains *Fasciola* sp. extract and each right well contains rats serum.

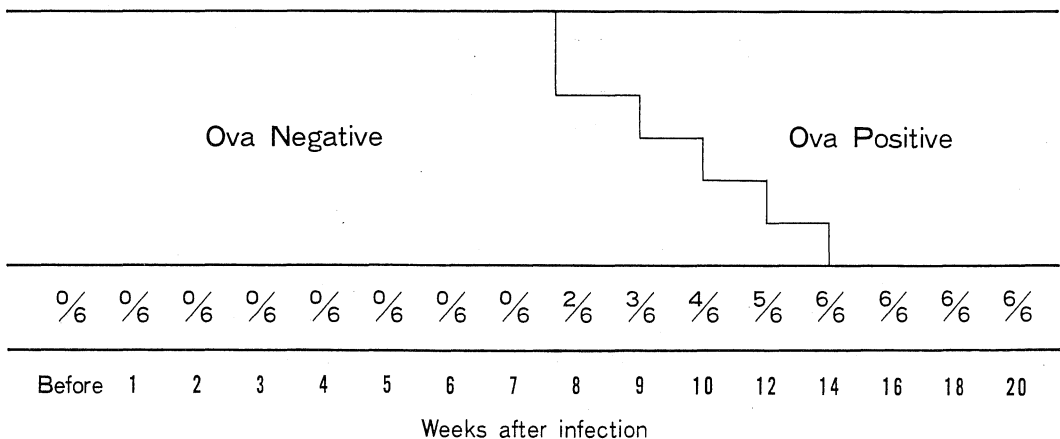


Fig. 4. Fecal examination.

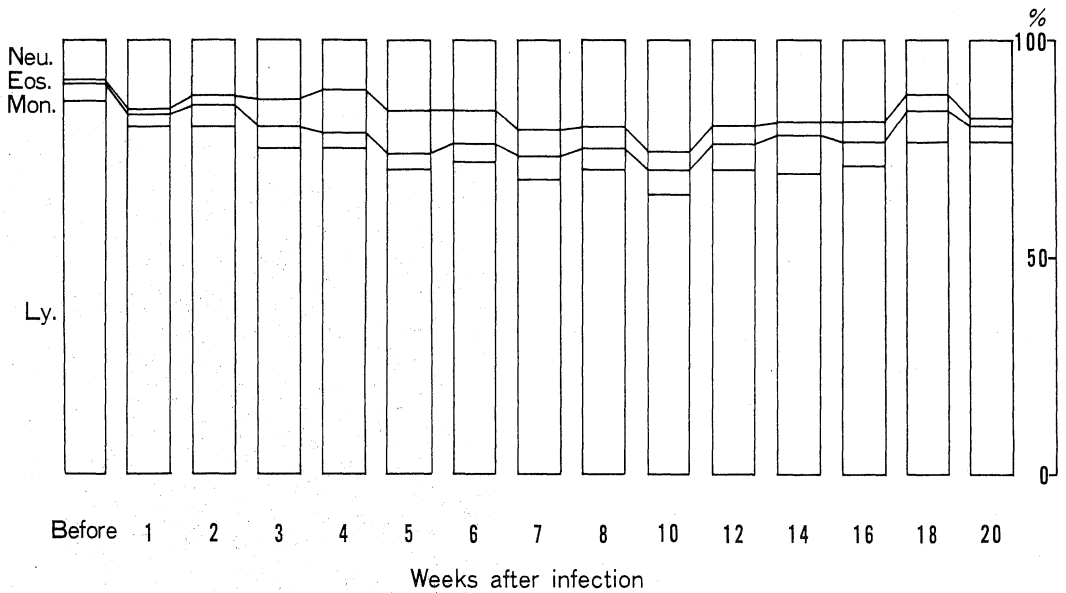


Fig. 5. Hematological changes following infection with 30 metacercariae of *Fasciola* sp.

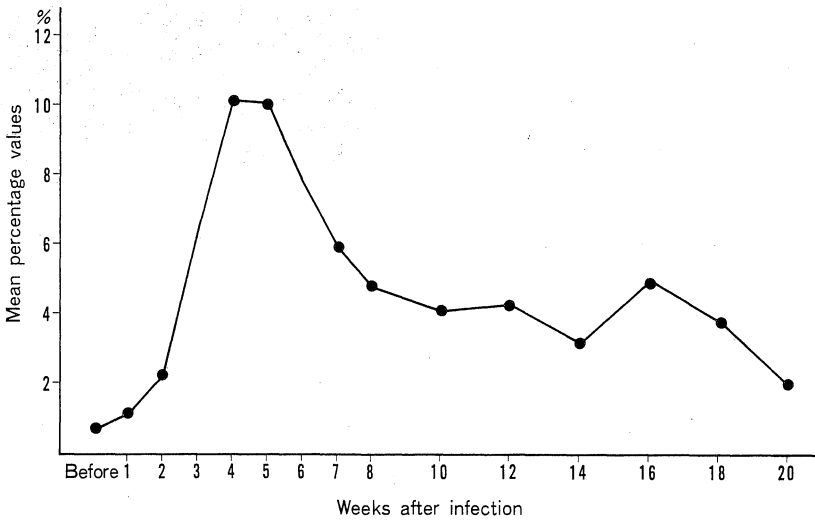


Fig. 6. Percentage of eosinophil after infection of *Fasciola* sp.

査の関連を知るため、更に 10 匹のラットについて検討した。予め間接 ELISA、虫卵検査により肝蛭感染の成立を確認した。即ち、ELISA による O.D. 値は感染後 1 週目には有意に上昇し、10 週目に最高値に達し、以後 16 週目の実験終了時まで高値を示した。虫卵検査では感染後 8 週目で 3/10 匹、10 週目には 8/10 匹、12 週目には全てのラットに虫卵の排泄を認めた。

即ち、間接 ELISA による抗体価の推移および虫卵の

排泄状況から、実験 II はほぼ実験 I と同様の傾向であることが実証された。そこで、各週期における肝機能検査を実施し次の結果を得た。

1. GOT 活性：感染後 3 週目から有意 ($P < 0.05$) に上昇し始め 8 週目で最高値 (180 KU) に達し、対照群 (90 KU) の約 2 倍となった。その後は低下し、12 週目以降は対照群と有意差は認められなくなった (Fig. 7.).

2. GPT 活性：GOT 同様、感染後 3 週目から有意 (P

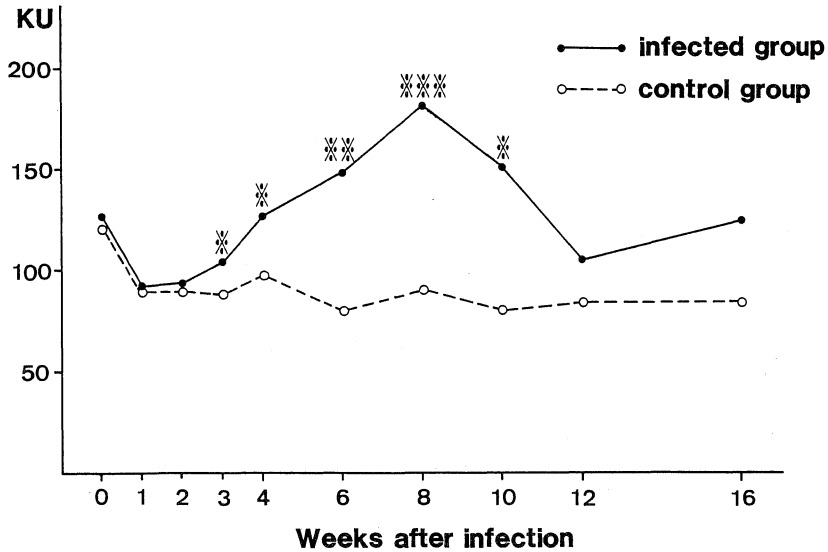


Fig. 7. Mean serum activities of GOT in rats during experimental infections with *Fasciola* sp. (* $p < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$)

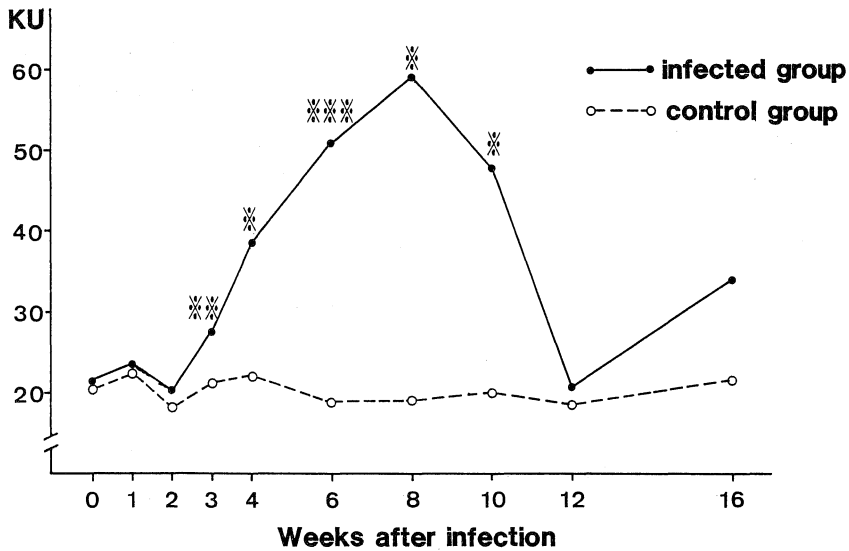


Fig. 8. Mean serum activities of GPT in rats during experimental infections with *Fasciola* sp. (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.01$)

<0.01)に上昇し、8週目で最高値に達し、対照群の20 KUに対し60 KUと約3倍となったが、その後は低下し、12週目以降は対照群と有意差は認められなくなった(Fig.8.).

3. LAP活性：感染後4週目より活性上昇が見られ、8週目にはピークに達し、対照群の150 G.R.U.に対し、210 G.R.U.と有意($P < 0.05$)上昇し、その後は低下の傾向を

示したが、感染後10~16週でも対照群より約30 G.R.U. 高い活性を示していた(Fig.9.).

4. A/G比：感染後6週目より有意($P < 0.001$)に低下し、10週目には1.22となり、その後も16週目まで対照群より有意の低下を認めた(Fig.10.). このA/G比の有意な低下は、6週目以降のAlb.の有意な低下およびGlb.の有意上昇によるものであった(Fig.11.).

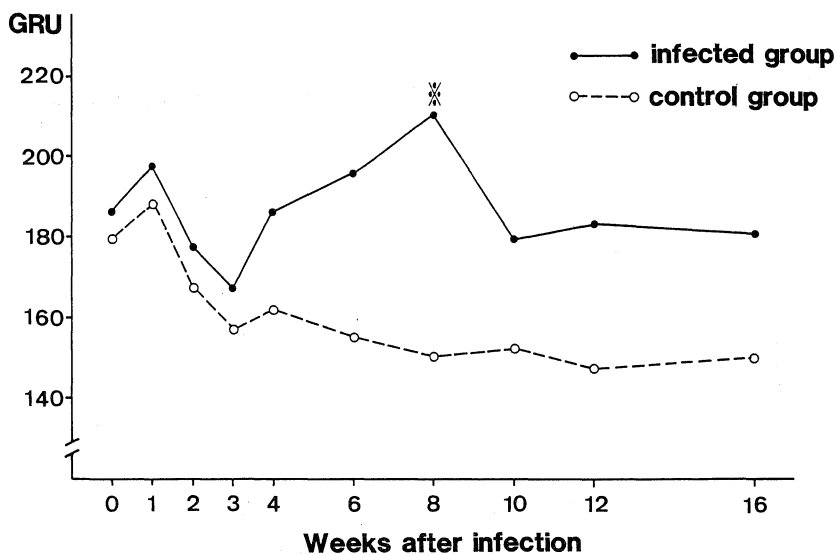


Fig. 9. Mean serum activities of LAP in rats during experimental infections with *Fasciola* sp. (* P<0.05)

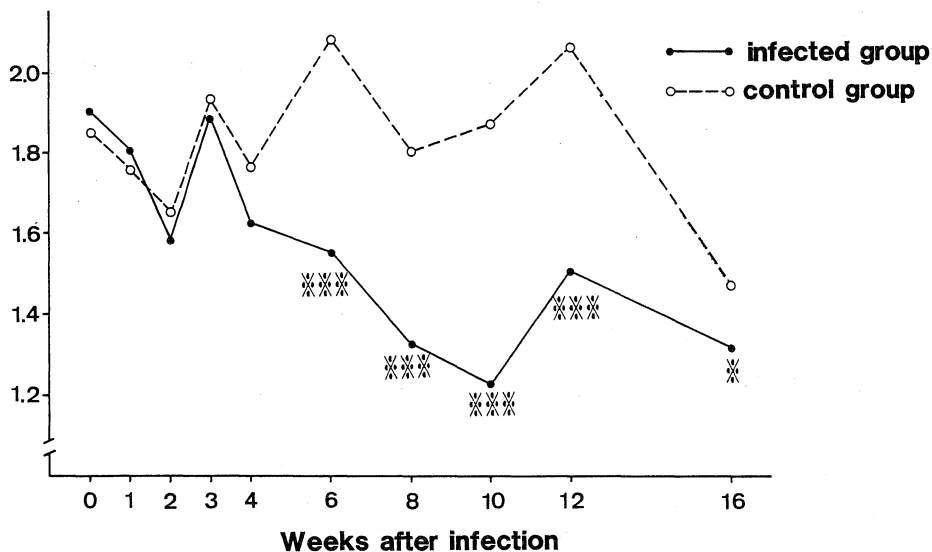


Fig. 10. Mean serum A/G ratio in rats during experimental infections with *Fasciola* sp. (* P<0.05 *** P<0.001)

5. その他：LDH, ALP, γ -GTP, cholesterol, bilirubin, および ChE に関しては、いずれも一定の傾向は見いだせなかった。

以上の実験 I のラット 9 匹, 実験 II のラット 10 匹の肝蛭感染に伴う血清抗体価の推移, 糞便や血液の顕微鏡的検査および, 実験 II の経時的肝機能検査結果を Fig. 12. にまとめた。

実験 III：感染ラットの肝臓の経時的病理学的変化

感染後 2 週目には、肝被膜の所々に小出血斑が見られた。幼若肝蛭の肝実質内への侵入・迷走に伴って肝被膜下には、多くの赤色～灰白色の直線状または蛇行した小孔(虫道と思われる)が見られた。

感染後 4 週目には、肝蛭の成長に伴って大きくなった虫道と思われる所が肝被膜下のみならず肝の断面の随所

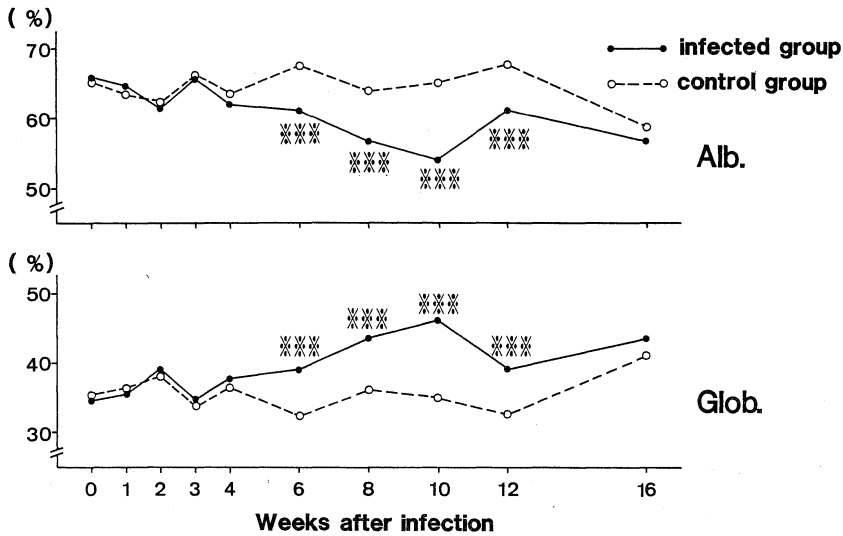


Fig. 11. Mean serum Alb, Glob levels in rats during experimental infections with *Fasciola* sp. (*** P < 0.001)

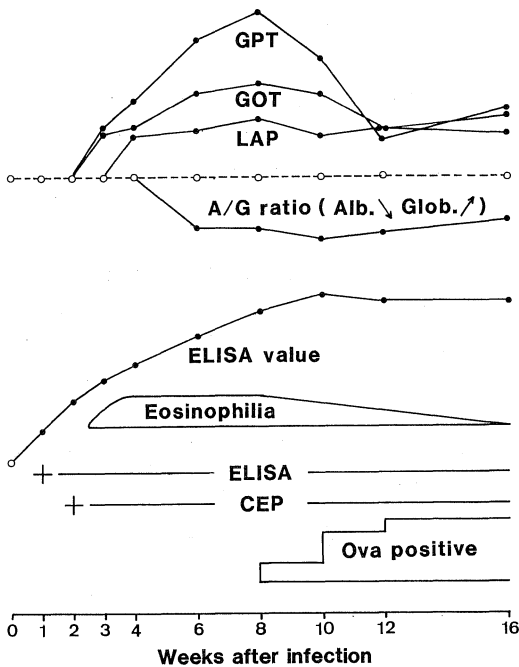


Fig. 12. Summary of clinical profile changes in rats infected with *Fasciola* sp.

に見られた。又、これらは不規則な出血斑や壊死斑を形成していた。

感染後4~6週目には、肝の剖面では白色の虫道は肝の被膜面に見られ、出血斑や壊死斑が肝の深い部分に見ら

れた。肝の被膜面では、フィブリンが、肝の表面壊死部を覆って粘着し、肝葉は互いに軽く癒着していた。

感染後6週目には、肝の深部に遊走した虫道と思われる所は暗赤色を呈し、肝の横隔膜面は横隔膜とフィブリンで癒着し始めていた。主胆管はわずかに拡大、肥厚し小胆管には数匹の虫体が見られた。

感染後8~16週では、主胆管の顕著な肥厚や拡張は週を経るごとに見られた。肝表面の病巣部は収縮して肝表面には凹凸が認められた。感染後10週目には主胆管は拡張し、その壁は肥厚しており、葉によっては肝実質のかんりの部分が線維化していた。また、隣接葉との線維性癒着は軽度で、あるラットでは肝が腹膜と癒着していた所もあった。感染後12~16週目では、主胆管の入り口は紡錘状に広がり成虫数匹が入っていた(Plate 1.)。また、主胆管の漿膜面も硬く肥厚していた。

肝臓の病理組織学的所見

肝蛭感染後の肝臓の経時的組織学的変化を Table 1. に総括した。

感染後2週目の肝の組織学的所見では、肝実質内移行中の幼若肝蛭によってひきおこされたと思われる穿孔または壊死巣が見られた。これらは肝表面に近い被膜下に局限し、虫体の穿孔・迷走によると思われる多数の肝細胞壊死巣および出血が認められた。幼若虫の通過した虫道と思われる空洞には巣状の出血や、広い肝実質細胞の壊死を認めた。その周囲には好中球が浸潤していた(Plate 2.)。

Table 1. Histological findings of livers in rats infected with *Fasciola* sp.

weeks after infection	Effection No. of rats	Hepatic cells		cell infiltration		fibrosis	bile duct proliferation
		necrosis	regeneration	neutrophil	eosinophil		
0	3	-	-	-	-	-	-
2	3	+	-	+	-	-	-
4	3	++	-	++	+	+	-
6	3	++	-	+++	++	++	-
8	3	+++	-	+++	++	++	-
10	3	-	+	+	+++	+++	++
12	3	-	++	-	++	+++	++
16	3	-	++	-	++	+++	++

+ : mild ++ : moderate +++ : severe

なお、肝表面から肝実質への穿孔した虫道と思われる所は結合織によって修復されていた。また、グリソン氏鞘部には多形核白血球の浸潤が見られた。虫道と思われる壊死巣に隣接する類洞内 Kupper cell は腫大していた (Plate 3., Plate 4.).

感染後 4 週目には深部の虫道と思われる壊死巣は更に拡大していた。虫体の発育とともに肝実質の損傷は増大し、新しい虫道と思われる壊死巣の中心は出血および肝細胞の壊死巣で、その壊死巣には円形細胞や好中球の浸潤が顕著であった。また一部の壊死巣では出血や肝細胞の壊死とともに好中球が多く認められ、その周囲に好酸球の浸潤があり、これらを大きく包むように線維の増生が認められた (Plate 5.). グリソン氏鞘は好酸球の浸潤が顕著で小葉間結合織の増生が明らかとなっていた。

感染後 6 週目の肝の病理組織学的特徴は広範にわたる多量の線維の増生で、多くの古い虫道と思われる壊死巣では肝の壊死や多形核白血球の浸潤を取り囲むように多量の結合織の増生が見られ、一部の虫道と思われる所は結合織によって修復されていた。一方、新しい虫道と思われる所では肝細胞の壊死や出血と多形核白血球の浸潤像を示していた。

グリソン氏鞘は好酸球の慢性浸潤をふくむ小葉間結合織の増生がみられ一部で小胆管の増生が見られた。

感染後 8 週目以降には、新しい虫道と思われる壊死巣は殆どなくなり、古い虫道と思われる壊死巣は出血や壊死を中心に多形核白血球の浸潤が有り、これらの周囲は線維の増生が顕著であった。肝は全体的に線維化が顕著で線維の網目には多くの好酸球が慢性に浸潤しており、胆管周囲には小胆管が増生されていた。一部の肝小葉は島状になり肝細胞の多くは空胞変性を伴っていた。胆管内には成熟した肝蛭が認められた (Plate 6.).

感染後 10 週目、12 週目には、肝の線維化は更に進行し、結合織内には慢性の好酸球の浸潤が顕著で、腺腫様に小偽胆管は増生し褐色の色素や老廃物の沈着を認めた。肝小葉は幅広い結合織で包まれ偽小葉の再生像が認められた (Plate 7.).

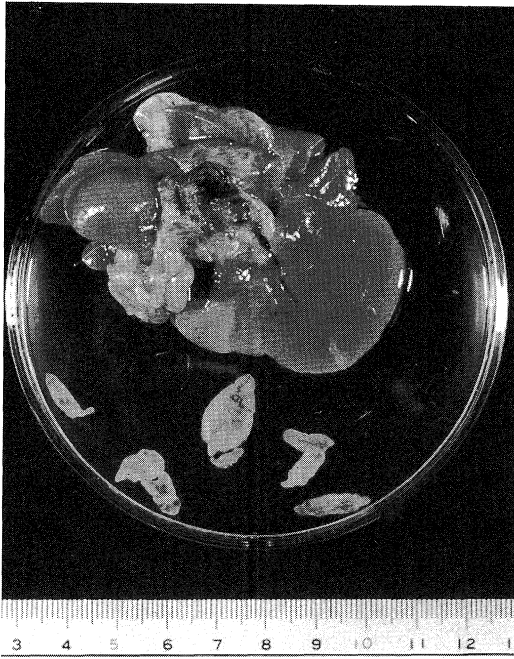
感染後 12 週目、16 週目には、肝の間質の線維化は更に進み、結合織は肉芽様となりそこには好酸球の浸潤や色素の沈着を認めた。肝蛭を含んだ肥厚した主胆管にはその上皮の一部に壊死が見られ、壊死巣に接する部分では著しく肥厚し結合織の増生が見られた。またそこには好酸球の浸潤、褐色色素の沈着および小胆管の腺腫様増殖を認めた (Plate 8.).

考 察

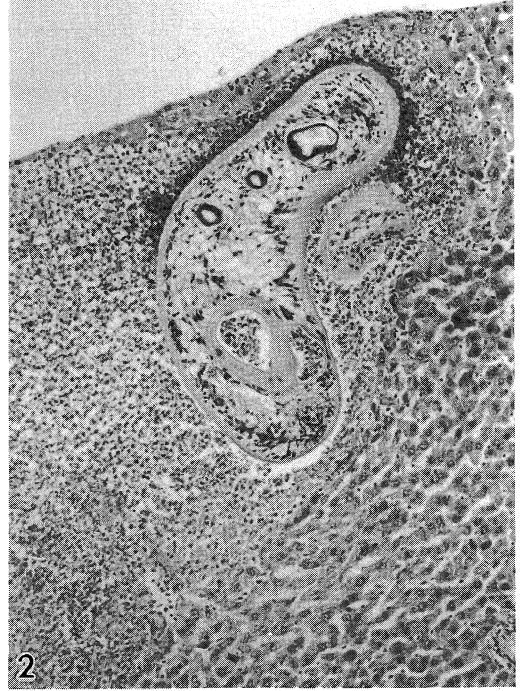
肝蛭症は人畜共通寄生虫病 (Parasitic zoonoses) とし

Explanation of plates

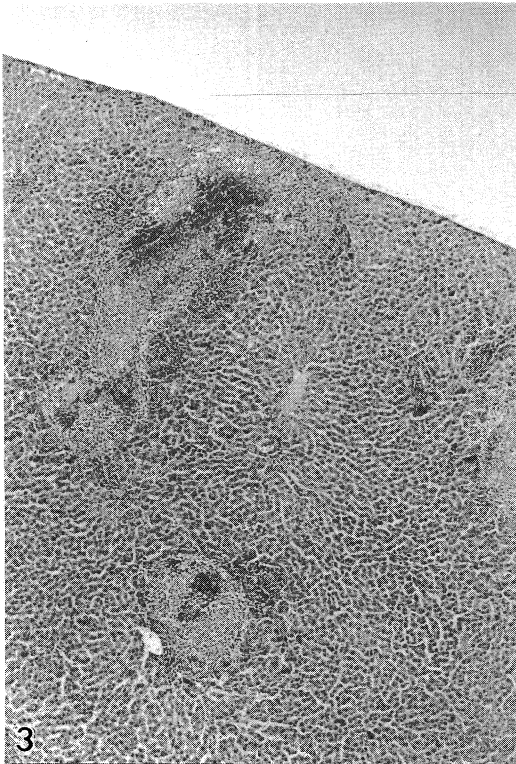
- Plate 1. At week 10, the main bile ducts of the hilus showed a fusiform dilation and contained interleaved adult *Fasciola* sp.
- Plate 2. Histological picture of the liver at week 2 in a rat treated with oral administration of metacercariae of *Fasciola* sp., showing a fluke with cell infiltration in the subcapsule of the liver. (HE ×40)
- Plate 3. Histological picture of the liver at week 2 after the oral administration, showing prominent inflammatory cell infiltration with liver cell necrosis. (HE ×40)
- Plate 4. Higher magnification of Plate 3., showing remarkable cell infiltration. (HE ×100)



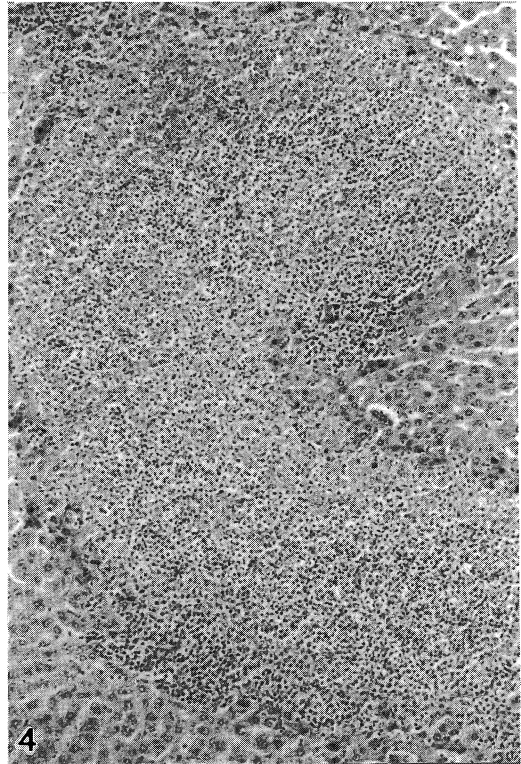
1



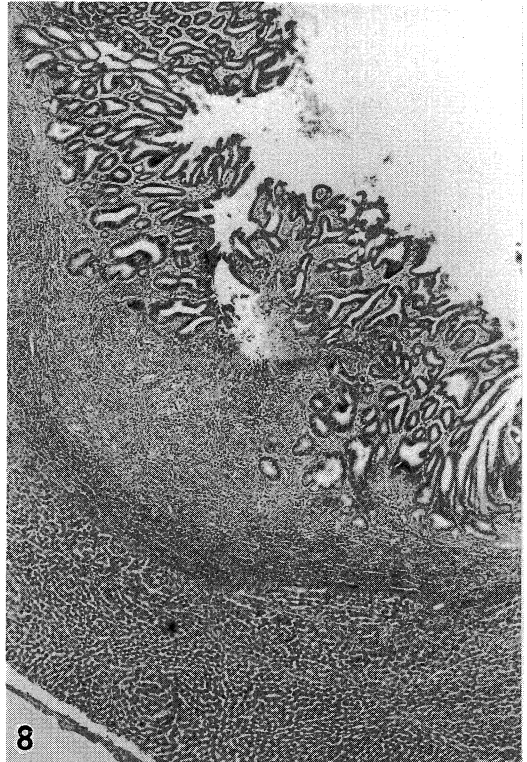
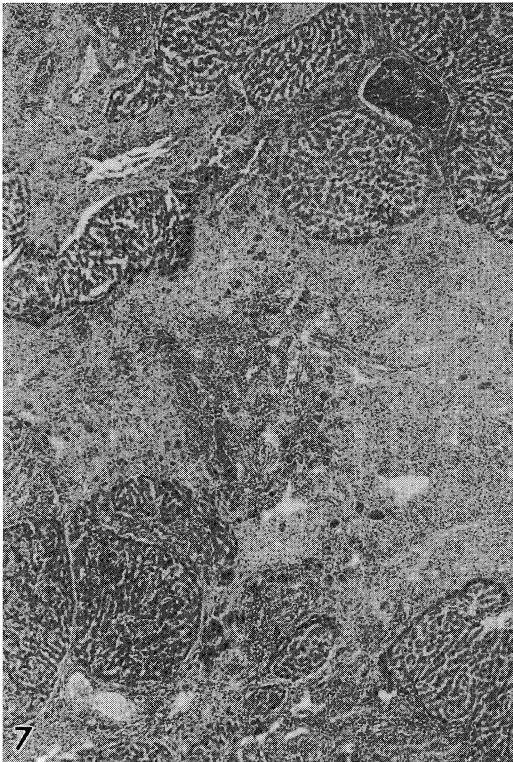
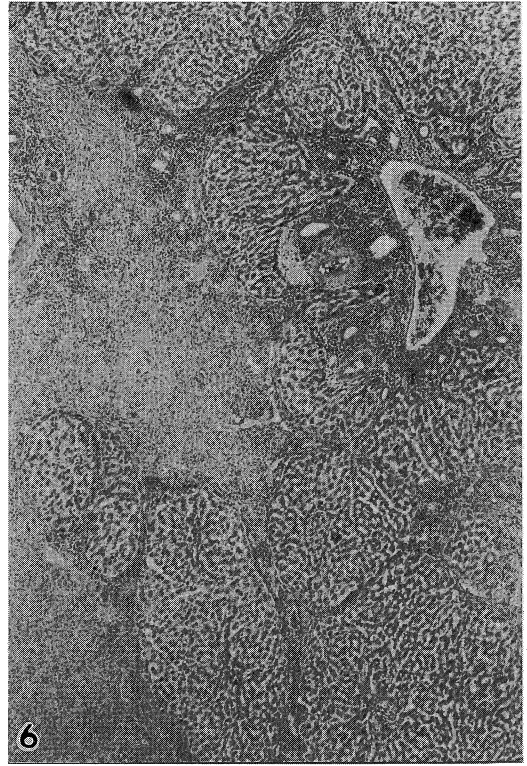
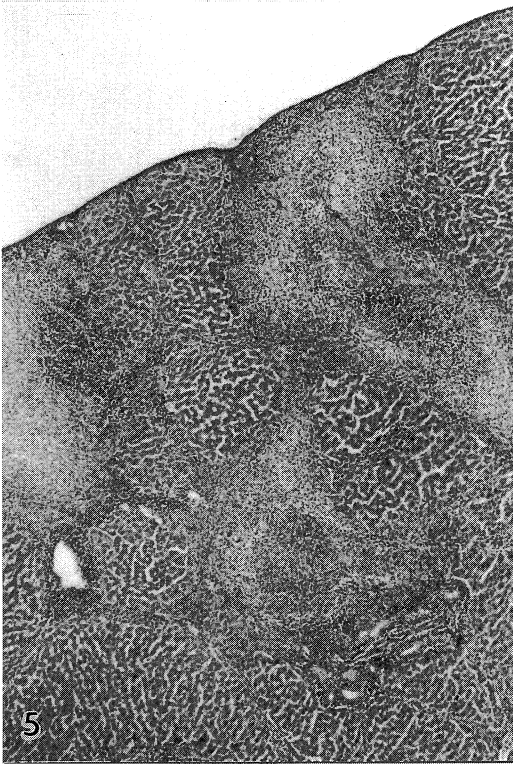
2



3



4



て重要な疾患である。

「肝蛭」は、*Fasciola hepatica* に与えられた和名であり、輸入動物を除いて我国には分布せず、*Fasciola gigantica* の形態とほぼ一致する虫体ならびに、*F. hepatica* と *F. gigantica* との中間型が極めて多く分布しているとされている¹⁾⁶⁾。

本邦の肝蛭は分類学的位置に疑問が抱かれ種々検討されたが、未同定の状況にあり、今日、日本産肝蛭は *Fasciola* sp. と呼ぶことにされている。

肝蛭の発育は終宿主体外と終宿主体内とに大別され、体外での発育には中間宿主：ヒメモノアラガイ (*Lymnaea ollulla*) を必要とする。実際の観念に立つと、堆肥→水田→ヒメモノアラガイ→水稲・畦畔草→イネワラ→牛と言われており¹⁾、牛肝蛭症は本邦の基幹農業である稲作と極めて深いかわりあいがあった。

人への感染は、セリ、ミョウガなどの生食、稲刈り時の手指を介しての経口的侵入、ウシの生肝の生食による幼虫の侵入などが考えられている²⁾³⁾。

牛肝蛭症の重要性にかんがみ、著者らは農林水産省総合助成研究として6年間にわたり、牛肝蛭症の防除技術の研究を行い、その成果を既に報告してきた¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。

今日、人畜共に肝蛭症の診断には、末梢血液、血清生化学的検査、虫卵検査のほか、多くの免疫学的診断法が開発され、これらを併用して行われている¹²⁾。著者らは既に間接 ELISA による牛肝蛭症の免疫学的診断の有効性について報告してきた⁴⁾⁵⁾。ELISA による肝蛭症の診断結果を判断する場合、肝蛭の成長に伴う抗体産生状況、感染に伴う病態生化学所見および病理所見を感染実験により知る必要があった。肝蛭に関する実験感染動物として本邦ではマウス、家兎および山羊が多く用いられているが、ラットを用いた報告はほとんどない⁶⁾。ラットには年齢抵抗性があり肝蛭の実験感染動物としては適さないとされていた⁶⁾⁷⁾。

本来肝蛭の宿主である牛や綿羊に代えて簡便なラットを用いて感染実験を実施し、ラットでの実験感染モデル

を確立するため免疫学的診断法、血液および糞便の顕微鏡的検査、血清生化学検査および病理学的検査を実施し、肝蛭感染に伴うラットの病態に関する基礎的検討を行った。ラットでの実験感染は、Rajasekariah ら¹⁴⁾の使用した週齢および投与メタセルカリア数の成績をもとにして、9週齢および5週齢のラットを使用し、投与メタセルカリア数は30個とした。

今日まで諸外国では、肝蛭症の診断に ELISA を利用する試みが種々なされている。しかし、ELISA による肝蛭症の診断では使用した抗原の精製度、濃度、手法等同じものはほとんどない。抗原は粗抗原を用いたものが多く¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、Farrell ら¹⁸⁾は部分的に精製した抗原よりも粗抗原のほうが良かったと述べている。今回著者は屠場より得た牛胆道寄生の肝蛭の0.1%食塩水抽出粗抗原を使用した。Hillyer ら¹⁹⁾は抗原の固相化至適蛋白濃度は10 μg/ml で4°C、1晩の固相化が良好であったと述べている。著者らも ELISA による牛肝蛭症の診断⁴⁾⁵⁾と同様の結果を得ているので、今回も固相化蛋白濃度は10 μg/ml で4°C、12時間固相化した。

次に、使用免疫グロブリンの種類に関してであるが、Hughes ら²⁰⁾は肝蛭感染牛の免疫グロブリンは IgG がその主体を占めるとの報告より、今回、ラットの肝蛭特異抗体を IgG レベルで測定した。

ELISA を用いた実験的肝蛭感染について、Levine (1980)ら²¹⁾はマウス、家兎ともに肝蛭粗抗原を用いた ELISA による抗体価は感染後2週以内に上昇し、4週目がピークであったと記している。しかし、実験動物としてのマウスは、感染後4~5週以内に多くが死亡し、感染実験の適当な宿主とは言いがたいと述べている。

Hillyer (1979)ら¹⁹⁾は8週齢のラットで肝蛭メタセルカリア15個投与で行った感染実験では、感染後4週までには ELISA による抗体価は上昇し、実験終了時の感染後12週でも抗体価の上昇が証明されたと報告している。Singlair ら²²⁾は6週齢のラットで肝蛭メタセルカリア6個投与では感染後15日に ELISA による抗体価は陽転

- Plate 5. Histological picture of the liver at week 4 after the oral administration, showing the necrotic area with inflammatory cell infiltration surrounded by thin fibrous tissue. (HE ×40)
- Plate 6. Histological picture of the liver at week 8 after the oral administration, showing severe fibrosis, regenerative nodules and pseudolobule formation surrounded by fibrous tissue. A fluke is seen in the main bile duct. (HE ×40)
- Plate 7. Histological picture of the liver at week 10 after the oral administration. Necrotic lesion surrounded by thick fibrous tissue and bile duct proliferation are seen with inflammatory cell infiltration. (HE ×40)
- Plate 8. Histological picture of the liver with a main bile duct at week 16 after the oral administration. Prominent cell infiltration is seen on the wall of main bile duct. (HE ×40)

したと述べている。

今回の9週齢(実験I)および5週齢(実験II)のラットで肝蛭メタセルカリア30個投与で行った感染実験でのELISAによる抗体価は、感染後1週目には既に有意な上昇を認め、更に漸次上昇し、9~10週をピークにその後は若干低下したが、実験期間中(16週および20週)はいぜん高い抗体価を示していた。

Levineら²¹⁾はCEP、虫卵の排泄状況も検討しており、CEPはマウスでは感染2週目から、ウサギでは4週目より出現すると述べている。Hillyerら²³⁾はCEPで、Rajasekariahら²⁴⁾はオクタロー法で肝蛭感染ラットは感染後2週目には沈降抗体を認めている。更にHillyerら²⁵⁾は精製抗原を用いたCEPでは5週目に陽転したとも述べている。

今回の実験感染(実験I)のラットでもCEPにて感染後2週目以降に沈降抗体を検出した。

肝蛭のprepatent periodについて、実験感染試験または発育史の一部として部分的な報告はある。渡辺⁹⁾は、*Fasciola* sp.の実験感染家兎で58.2日に糞便中に虫卵を検出している。赤羽²⁶⁾は家兎で、虫卵検出までの期間の最も短いものは77日、最も長かったものは102日であったと述べている。Levineら²¹⁾は虫卵は、マウスで感染後6~8週、家兎で8~10週に検出したと記している。Rajasekariahら¹⁴⁾は、ラットのprepatent periodは57~60日で、回収された肝蛭の大きさは不一致であったと述べている。

今回の実験感染(実験I, II)の9週齢および5週齢のラットの虫卵の排泄状況は、最も早く検出したものは感染後8週目で、遅くとも14週目には全てのラットで虫卵の排泄を認めた。排泄された肝蛭虫卵の長径・短径を測定した結果、日本産肝蛭(*Fasciola* sp.)の範疇に入るものであったが、肝蛭の大きさはさまざまであった。

肝蛭感染に伴う末梢血液の白血球の百分比ではリンパ球が感染後5週目から低下し、好中球が感染後7週目から増加、好酸球も感染後4~5週目には増加し、約10%を占めるに至った。肝蛭感染に伴う家兎の血液性状について、赤羽²⁶⁾は、好酸球百分率はほぼ10%に達したと述べている。今回の結果はRajasekariahら⁷⁾の肝蛭に感受性の高いとされている幼若ラットの成績にほぼ一致した。

以上の結果、本来肝蛭の宿主である牛や綿羊に代えて、比較的若齢のラットでの肝蛭感染実験の可能性が実証された。更にラットの感染実験においてELISAによる抗体価は感染初期からその上昇が加速度的に顕著で、その時期に好酸球増多症(Eosinophilia)が指摘され、虫卵の排泄が確認される頃には抗体価が最高に達し、その後も

高い抗体価の持続が認められた。即ちELISAによる免疫学的診断は感染後1週目以降に可能であった。肝蛭感染に伴う肝機能検査では、Sandemanら²⁷⁾が綿羊で、Bulginら²⁸⁾およびWyckoffら²⁹⁾が牛で、赤羽ら³⁰⁾が家兎でそれぞれ検討している。すなわち肝実質障害と胆管障害に関係した酵素をそれぞれ測定している。

今回の測定した肝機能検査成績では、GOTおよびGPTの活性値は感染後3週から有意($P<0.05$)に上昇し、感染後8週目までは漸次上昇を続け、対照群の2~3倍となったが、その後は低下し、感染後12週以降は対照群とに有意差は認められなくなった。LAPの活性値は感染後4週目より上昇が見られ、感染後8週目には対照群より有意($P<0.05$)に上昇していた。その後は低下の傾向を示したが、実験終了時でも高い活性値を持続していた。A/G比は、感染後6週目より有意($P<0.001$)に低下し、実験終了時まで有意差を示していた。Sandemanら²⁷⁾は綿羊の肝蛭症で肝実質の傷害はglutamate dehydrogenase(GLDH)に反映され、感染後2~3週目上昇し、11週目には低下したと述べ、胆管傷害は γ -glutamyl transferase(γ -GT)に反映され、感染後7週に上昇し、15週には低下したと述べている。

Bulginら²⁸⁾は牛肝蛭症でgamma glutamyl transpeptidase(γ -GTP)が感染後56日に上昇し、その後も高値を持続したと述べている。

赤羽ら³⁰⁾は家兎では、肝実質障害と見られる変化としては感染後20~90日の間に、GOT、GPT活性の上昇が見られたこと、胆管障害とみられる変化としては感染後50~60日の間に一過性にALP、cholesterol、bilirubin値は高値を示したが、LAP値は低値を示したことを報告している。

Thorpe³¹⁾はラットでの肝蛭感染実験において肝臓の障害はGOTの上昇によく反映され、低アルブミン血症と高グロブリン血症はラット実験肝蛭症の特徴であると述べている。更に血清ビリルビンは肝細胞障害や胆管通過障害の証拠の評価にはならないと述べており、今回の著者の結果も全く同様であった。またRajasekariah(1980)ら³²⁾はLDHの酵素活性の上昇が肝蛭感染ラットでみられたと述べているが、今回はその上昇は認めなかった。

胆管の機能に関して、 γ -GTPの上昇をBulgin(1984)ら²⁸⁾は牛で、Sandeman(1980)ら²⁷⁾は綿羊の感染実験でそれぞれ報告している。今回、ラットでの感染実験では γ -GTPの活性には著変はなかったが、LAPの活性はGOT、GPTの上昇より少し遅れて上昇し、8週目以降は有意な活性上昇が認められた。即ちこの時期に肝蛭

は胆管に達するものと思われ、やがてそこで成熟し、早いものでは感染後8週目より遅くとも14週に肝蛭虫卵の排泄を認め、この時抗体価は最高に達していた。肝機能障害でアルブミンが低下し、抗体価の上昇によりグロブリンが増加し、A/G比の低下を認めた。

今回のラットに於ける肝蛭実験感染では、種々な時期において肝蛭が肝実質から胆管内に移行するプロセスの想定が抗体価や酵素活性の変動により容易であった。

更に肝蛭に感染したラットの肝臓の病理変化を明らかにし、特異抗体と病理的所見の必然性を証明するためにメタセルカリア投与後のラットの肝臓の病理変化を経時的に観察した。

肉眼的所見は小出血斑、壊死斑、および胆管の肥大と拡張によって特徴づけられた病変の出現である。Thrope³³⁾は、ラットにおいても他の動物同様、経口的に摂取されたメタセルカリアは胃や小腸で幼若虫となり小腸壁を貫通して肝実質に侵入することを明らかにしている。

組織学的所見では、ラットの肝臓に侵入した肝蛭が種々の宿主反応を誘導すると思われる。線維素沈着を伴った著明な細胞浸潤や、虫体周囲又は虫道と思われる所には激しい炎症反応が見られた。出血および肝実質細胞の壊死巣には好中球の浸潤が顕著で、さらにこれらを取り囲むように結合繊維が増生していた。また小葉間に増生した結合繊維内には好酸球が多く、胆管の拡張・腫大を伴っていた。

牛や綿羊のような反芻獣の肝蛭感染による病理変化は感染前期と感染後期に分けられる。前期は肝実質内移行中の幼若虫によって起こる虫道の特徴とし、寄生虫性の急性創傷性肝炎または多発性出血性肝炎像を、後期は肝蛭の胆管寄生による慢性胆管炎や慢性間質性肝炎像を示すと言われる³⁾。

Rajasekariahら⁷⁾はラットでは、強い細胞浸潤と壊死巣は感染後4週で、感染後6週では大量の線維の増生が特徴で、感染後8週では修復像が肝実質に見られ、胆管肥大は感染後6週で現れたと述べている。また、Thrope³³⁾はラットにおける肝蛭感染の病理的特徴は肝臓の線維化と胆管の肥大であると述べている。

肝蛭による肝病変は感染初期には肝蛭幼若虫の肝実質内移行に伴う肝細胞の壊死と著明な細胞浸潤であった。次に後期肝内と初期胆管ステージが共に存在する時期があり、多量の線維素の沈着と胆管の拡張・腫大は後半の主な特徴であった。

GOT、GPTの酵素活性の上昇は肝蛭の肝実質内移行によると推定される肝実質の傷害を反映していると考え

られた。LAPの酵素活性の上昇は、胆管に達した肝蛭がそこで成熟し活動するため胆管が傷害を受けることを反映していると考えられた。

ラットの肝臓に於ける病理学的変化は肝蛭の発育と成熟に関係しており、ラットが適当な肝蛭の実験宿主であることを支持していると考えられた。

以上述べたごとく肝蛭感染に伴う血清抗体価の推移、糞便や血液の顕微鏡検査結果、経時的肝機能検査および病理学的変化はいずれもラットの実験モデルとしての有用性を実証できたものと思われる。

感染当初からの経時的な感染状況を把握しにくいヒトの肝蛭症においても、おそらく今回のラットの実験モデルとほぼ同様の経過をとると思われる。ラットを使用したELISAによる血清抗体検査、糞便や血液の顕微鏡検査、経時的肝機能検査および病理学的検査はヒト肝蛭症の臨床経過の指標となるであろう。

ここで用いた診断法や感染モデルはヒトにおける肝蛭症の発生病理の研究に役立つのみならず、今後は治療薬の開発および有効性の検討に充分有用となるものと思われる。

結 語

本来の肝蛭の宿主である牛や綿羊に代えてラットを用いて感染実験を実施し、ラットでの実験感染モデルを製作するため免疫学的診断法、血液および糞便の顕微鏡検査、血清生化学的検査および病理学的検査を実施し、肝蛭感染に伴うラットの病態生化学的基礎実験を行った。

9週齢及び5週齢の雄のラットにそれぞれ30個のメタセルカリアを経口投与して1~2週毎に経時的に実施した抗体検査、肝機能検査および病理学的検査の結果を総括すると次のとおりである。

肝蛭の幼若虫が肝実質に移行する感染初期に好酸球増多症やGOT、GPTの有意な上昇が指摘され、この時期にELISAによる抗体価は経時的に上昇した。即ち肝蛭は虫道を形成して肝実質を移行し、激しい炎症反応を起こしていた。これより若干遅れてLAPの活性上昇が認められた。即ちこの時期には肝蛭は胆管に達して、成熟し胆管は肥厚し、8~12週に虫卵の排泄を認めた。この時抗体価は最高に達していた。肝機能障害によりAlb.が低下し、抗体価の上昇によりGlb.が増加し、A/G比は低下したものと考えられた。更にラットの肝臓に於ける病理学的変化は肝蛭の発育と成熟に関係しており、ラットが適当な肝蛭の実験宿主であることを支持していた。

稿を終えるにあたりご指導、ご校閲を賜った恩師奈良県立医科大学寄生虫学教室荒木恒治教授、ご助言、ご校

聞を賜った本学細菌学教室榎葉周三教授、第2病理学教室日浅義雄教授に深甚なる謝意を表すると共に終始研究に御協力下さった本学寄生虫学教室の教室員諸兄姉に感謝致します。

本論文の要旨は第54回日本寄生虫学会総会(1985, 東京都)、第43回日本寄生虫学会西日本支部会(1987, 岡山市)、5th Sino-Japanese Symposium on Parasitic Zoonoses(1988, TAIPEI)および1st Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions(1990, Sendai)において発表した。

文 献

- 1) 獣医臨床寄生虫学編集委員会：獣医臨床寄生虫学。文永堂，東京，p 118, 1979.
- 2) 吉田幸雄：人体寄生虫学。南山堂，東京，p 152, 1984.
- 3) 荒木恒治：人肝蛭症。感染症 4 : 2. 29, 1974.
- 4) Yoshioka, Y., Nishiyama, T. and Araki, T. : Studies on fascioliasis (I). Immunodiagnosis of *Fasciola* sp. infections in cattle using indirect ELISA. Proceeding of Sino-Japanese Symposium on Parasitic Zoonoses 1984. p 64, 1984.
- 5) 吉岡 豊, 鶴野 保, 中島一男, 渡木一昌：間接ELISAによる牛肝蛭症の診断。臨床獣医 4(2) : 60, 1986.
- 6) 渡辺昇蔵：日本産肝蛭の分類学的研究。日本における寄生虫学の研究 4 : 427, 1964.
- 7) Rajasekariah, G. R. and Howell, M. J. : Age-associated responses in susceptible and resistant rats to infection with *Fasciola hepatica*. Int. J. Parasitol. 11 : 59, 1981.
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265, 1951.
- 9) Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. E. : Enzyme immunoassays for parasitic disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70 : 98, 1976.
- 10) 吉岡 豊, 青山 譲, 中島一男, 小山方玄：牛肝蛭病防除のプログラム作成に関する基礎的研究。第1報 牛糞内肝蛭卵の殺滅方法について。畜産の研究 34 : 1360, 1980.
- 11) 中島一男, 吉岡 豊, 青山 譲, 小山方玄, 吉原忍：牛肝蛭病防除のプログラム作成に関する基礎的研究。第2報 稲ワラ保存と肝蛭メタセルカリアの保存期間。畜産の研究 35 : 319, 1981.
- 12) 中島一男, 吉岡 豊, 青山 譲, 小山方玄, 吉原忍：牛肝蛭病防除のプログラム作成に関する基礎的研究。第3報 駆虫に関する調査および試験。畜産の研究 35 : 667, 1981.
- 13) 農林水産技術会議事務局：牛肝蛭病の防除技術。昭和57年度実用化レポート。p 185, 1983.
- 14) Rajasekariah, G. R. and Howell, M. J. : *Fasciola hepatica* in rats : Effects of age and infective dose. Int. J. Parasitol. 7 : 119, 1977.
- 15) Burden, D. J. and Hammet, N. C. : Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Fasciola hepatica* in cattle. Vet. Rec. 103 : 158, 1978.
- 16) Hall, R. F., Lang, B. Z., Waldhalm, D. G., Farrell, C. J., Delong, W. J. and Everson, D. O. : Experimentally induced *Fasciola hepatica* infection in young calves. Am. J. Vet. Res. 43 : 1876, 1982.
- 17) Zimmerman, G. L., Jen, L. W., Cerro, J. E., Farnsworth, K. L. and Wescott, R. B. : Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzym-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 43 : 2097, 1982.
- 18) Farrell, C. J., Shen, D. T., Wescott, R. B. and Lang, B. Z. : An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. Am. J. Vet. Res. 42 : 237, 1981.
- 19) Hillyer, G. V. and Weil, N. S. : Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infections with *Fasciola hepatica* II. The enzyme linked immunosorbent assay in infected rats and rabbits. J. Parasitol. 65 : 680, 1979.
- 20) Hughes, D. L., Hanna, R. E. B. and Symonds, H. W. : *Fasciola hepatica* : IgG and IgA levels in serum and bile of infected Cattle. Exp. Parasit. 52 : 271, 1981.
- 21) Levine, D. M., Hillyer, G. V. and Flores, S. I. : Comparison of counterelectrophoresis, the enzyme-linked immunosorbent assay, and Kato fecal examination for the diagnosis of fascioliasis in infected mice and rabbits. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 : 602, 1980.
- 22) Singlair, I. J. and Wassall, D. A. : The perox-

- idase anti-peroxidase technique for the demonstration of immunoglobulin G in rat livers infected with *Fasciola hepatica*. J. Comp. Path. **91** : 573, 1981.
- 23) **Hillyer, G. V. and Weil, N. S.** : Serodiagnosis of experimental fascioliasis by immunoprecipitation tests. Inter. J. Parasitol. **11** : 71, 1981.
- 24) **Rajasekariah, G. R. and Howell, M. J.** : Acquired immunity to the trematode *Fasciola hepatica* in rats. Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. **56** : 747, 1978.
- 25) **Hillyer, G. V. and Weil, N. S.** : Partial purification of *Fasciola hepatica* antigen for the immunodiagnosis of fascioliasis in rats. J. Parasitol. **63** : 430, 1977.
- 26) 赤羽啓栄 : 肝蛭感染ウサギの血液性状ならびに免疫学的抗体価の推移—特に体内移行との関係—第1報 感染後の血液学的諸性状の推移. 寄生虫学雑誌 **24** : 340, 1975.
- 27) **Sandeman, R. M. and Howell, M. J.** : In vitro studies of the response of sheep to infection with *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol. **6** : 347, 1980.
- 28) **Bulgin, M. S. and Anderson, B. C.** : Serum gamma glutamyl transpeptidase activity in cattle with induced fascioliasis. Res. Vet. Sci. **37** : 167, 1984.
- 29) **Wyckoff III, J. H. and Bradley, R. E.** : Diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in beef calves by plasma enzyme analysis. Am. J. Vet. Res. **46** : 1015, 1985.
- 30) **Akahane, H., Okada, Y. and Yoshida, Y.** : Biochemical studies of fascioliasis(1). Results of liver function tests in rabbits infected with *Fasciola* sp.. Jap. J. Parasit. **29** : 61, 1980.
- 31) **Thorpe, E.** : Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. Res. Vet. Sci. **6** : 498, 1965.
- 32) **Rajasekariah, G. R. and Howell, M. J.** : Enzyme assay for detecting resistance to reinfection with the liver fluke *Fasciola hepatica* in rats. Res. Vet. Sci. **29** : 124, 1980.
- 33) **Thorpe, E.** : The pathology of experimental fascioliasis in the rat. J. Comp. Path. **75** : 39, 1965.