Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Plasmodium gallinaceum赤外型の発育鶏卵培養およびin vitro細胞培養 |
| Author(s) | 石嶺, 毅 |
| Citation | 大阪大学, 1983, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33966 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【1】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 石嶺　毅（いしみね つよし） |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 第 6079 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和58年5月11日 |
| 学位授与の要件 | 医学研究科　病理系専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | ***Plasmodium gallinaceum*** **赤外型の発育鶏卵培養および in vitro 細胞培養** |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教授　中林　敏夫<br>(副査)<br>教授　深井孝之助　　教授　伊藤利根太郎 |

## 論文内容の要旨

（目　的）

鳥類マラリアの赤外型（EEF）は肝実質細胞に寄生する哺乳類マラリアEEFと異なり，諸臓器中の細網細胞内で分裂増殖する。またPlasmodium fallax（P. f.），P. lophurae（P. l.）のEEFは stage specific な抗原性を有し，EEFによって感作された宿主は赤内型（EF）感染に対して低抗性を示さない。また抗EF剤であるchloroquineがEEFに対して有効性がないことが知られている。この様にEEFはEFと生態的に相違するのみならず，抗原性や抗マラリア剤に対する反応性も大いに異っている。従ってマラリア原虫の生態，免疫学的研究では各発育期の原虫の培養，分離に関する効率的方法が必要となる。Davis，Graham らはP. f.，P. l. のEEFを線維芽細胞内で増殖させ，メロゾイドを分離，収集し得たが，P. gallinaceum（P. g.）の場合線維芽細胞内での増殖がみられず，線維芽細胞が宿主細胞として最適でないことが推察されている。

本研究ではEEF原虫を発育鶏卵の漿尿膜（CAM）上に接種し，胎児の諸臓器内，およびCAMにおけるEEFの増殖を検討し，併せてCAM上の接種材料（EEF感染肝小片）の周囲の増殖細胞を培養することにより，より高率のEEF感染を示すマクロファージ系細胞を大量に得ることを目的として試みたものである。

（方法ならびに成績）

1. P.g. はDr. Shute（WHO，Regional Office for the Western Pacific，Manila）より供与された。EEFはEF感染鶏に吸血させたAedes aegyptiの唾液腺より分離したスポロゾイトを幼鶏に接種し，12日後に肝，脳内に増殖したEEFを12日卵のCAM上に接種継代することによって得られた。

2. 発育鶏卵におけるEEF感染

12日孵卵群にEEF感染肝小片（約5 x $10^4$ 個のEEF感染細胞を含む）をCAM 上に接種し，その後鶏卵胎児の体重，脾重量，および諸臓器中のEEF感染細胞率について観察した。

感染胎児は，接種後5日目以後体重増加率が著しく低下した。感染群では脾腫が著明で，脾重量の比体重値も著しい増加を来し，9日目に体重10gあたり24mgを示したが，対照群では6mgに達するものは見られなかった。各臓器内に5日目以後幼若栄養体が出現し，以後増数とともに，原虫発育も進行した。特に肝臓においては，顕著で7日目，5.2％，8日目．8.7％，9日目に10.3％の感染細胞率を示した。

CAMに存続する接種材料（EEF感染肝小片）の肝実質細胞は変性し，その周囲に単核細胞，線維芽細胞，多形核細胞が集積し，単核細胞群中にはEEF感染細胞がみられ，経時的に増加し，9日目に11.2％の感染細胞率を呈した。また接種部位を中心に，周囲のCAMに白斑（pock）が形成され，接種後7日目に平均254個，9日目に360個まで増加した。

3. EEF感染細胞のin vitro培養

接種7日目に接種材料としたEEF感染肝小片を採取し，0.25％ pronase E 含有ハンクス液で37℃，45分間振盪培養して得られた細胞を20％ calf serum 含有TC－199を用いて in vitro 培養を試みた。

a．付着細胞の鑑定　：　マクロファージの形態を示す単核細胞が培養期間中90％前後の率で認められ，肝実質細胞は皆無であった。またマクロファージと推定される単核付着細胞の貪食能をみるために，培養2日目の培地中にラテックス粒子を添加した。全付着細胞中の貪食細胞数は60～80％値を示し，このうちEEF原虫の細胞内侵入を受けている細胞中の貪食率は6.5～8.5％の比率に留まった。

b．培養細胞中のEEF感染細胞率の推移　：　付着細胞中のEEF感染細胞率は培養開始後経時的に上昇し，12日目に56％のピーク値を示し，以後漸次減少し，20日目に8％となり，24日以後さらに低率に留まった。

c．培養EEFの幼鶏に対する感染性　：　付着細胞を剥離し，EEF感染細胞数を約5 x $10^4$／0.1mℓに調整し，3～10日令の幼鶏に接種した。被接種幼鶏では培養日数が増加するに従って，潜伏期の延長，ピークパラサイテミア値の低下，パラサイテミア持続日数の短縮，最低Ht 値の上昇等が認められた。

（総　括）

① EEF接種鶏胎児の体重増は著しく障害され，脾腫が顕著であり，諸臓器中の細網細胞内にEEFが検出されるが，特に肝臓内に多く存在した。また接種材料としたEEF感染肝小片の周囲には白斑が形成され，高率にEEF感染細胞が認められた。

② 接種後7日目のEEF感染肝小片をpronase処置し，in vitro 培養に供することにより，EEF原虫の宿主細胞であるマクロファージ系細胞を主とした付着細胞を得た。

③ in vitro 培養下でEEFは培養12日目にピーク値（56％感染細胞率）を示す増殖がみられた。これらのEEF原虫は培養日数を経るに従って，幼鶏への感染性が減少することから，次第に変性死滅する原虫数が増加することが考えられた。

## 論文の審査結果の要旨

ニワトリマラリア Plasmodium gallinaceum の赤外型は臓器内の網内系細胞中で増殖し，赤血球中の赤内型と異なり，in vitro 培養や原虫の分離，収集はきわめて困難である。P. g. 赤外型の発育鶏卵漿尿膜上接種により，諸臓器，特に肝臓内では10%以上の赤外型の感染細胞率がえられること，また漿尿膜上に感染細胞を含む白斑形成がみられることを証明した。これらの白斑内の細胞を pronase 処理後に in vitro 培養に供することにより，明らかに赤外型原虫の増殖がみられ高感染細胞率を呈した。

この研究は今後マラリアの赤外型原虫の生態学，免疫学等の研究発展に寄与するところが多大であると考えられる。