

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)	いし 石	みね 嶺	つよし 毅
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	6 0 7 9	号
学位授与の日付	昭 和 5 8 年 5 月 1 1 日		
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	<i>Plasmodium gallinaceum</i> 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) 教授	中林 敏夫	(副査) 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 5×10^4 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°C、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. 附着細胞の鑑定：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附着細胞の貧食能をみるために、培養2日目の培地中にラテックス粒子を添加した。全附着細胞中の貧食細胞数は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貧食率は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：附着細胞中の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：附着細胞を剥離し、EEF感染細胞数を約 $5 \times 10^4 / 0.1\text{ml}$ 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附着細胞を得た。

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。