

インド産ウェステルマン肺吸虫症のモデルラット肺の病理組織学的研究

吾妻美子^{1*}, K. Rekha Devi², Kanwar Narai², 長瀧 充^{3,4}, 福永佐枝⁴,
徳弘慎治⁴, Susiji Wickramasinghe⁴, Lalani Yatawara⁴, 吾妻 健⁴

Pathological Study of Pulmonary Lesions of Experimental Paragonimiasis in Wister Rat Model Infected with *Paragonimus westermani* in India

Yoshiko AGATSUMA,^{1*} K. Rekha DEVI,² Kanwar NARAI,² Mitsuru NAGATAKI,^{3,4}
Sae FUKUNAGA,⁴ Sinji TOKUHIRO,⁴ Susiji WICKRAMASINGEHE,⁴
Lalani YATAWARA,⁴ Takeshi AGATSUMA⁴

Abstract: A patho-histological study of pulmonary lesions of experimental paragonimiasis was performed on infected Wistar rats with *Paragonimus westermani* in India. Mainly we examined the histology of inflammation and repair of lungs in the infected model rats. In 18 days after infection, the adhesive pleuritis and pulmonary emphysema were recognized. Injured tissues were immediately followed by an acute local reaction characterized by the vascular changes, including the outpouring of plasma fluids and proteins, and soon thereafter by the massing of eosinophils and mast cells. In 35 days after infection, the one adult worm or pairs and eggs in the cyst was surrounded with granulation tissues, the lung parenchyma was heavily infiltrated with many mast cells macrophages and eosinophils. The hemorrhages were recognized in the alveolus or the lung parenchyma largely. 45 days after infection, the epithelial cells of cyst metaplasted to the stratified flattened epithelium and so soon keratinized. These were inflammatory responses and the process of repair to injury with the infection of *Paragonimus westermani*. Many alveolar macrophages were activated, and phagocyted the erythrocytes.

Keyword: *Paragonimus westermani* · Eosinophil · Alveolar macrophage

はじめに

ウェステルマン肺吸虫症 paragonimiasis は
ウェステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani*
(*P. westermani*) の感染により発症する。東南

アジアに広く分布し、特に韓国、台湾、中国に
多い。成虫は肺に虫嚢をつくり、虫嚢内に産出
された虫卵は喀痰や糞便を介して外界に出る。
外界に出た虫卵はカワニナやカニを第一中間宿

¹高知学園短期大学医療衛生学科医療検査専攻, agatsuma@kochi-gc.ac.jp

780-0955 高知市旭天神町292-26 Department of Medical Hygiene, Kochi Gakuen College. 292-26 Asahitenjincho, Kochi 780-0955 Japan.

²インド医学研究所 Regional Medical Research Center, N. E. Region (Indian Council of Medical Research), Post Box #105, Dibrugarh 786 001, Assam, India.

³株式会社ソフィ研究開発部 781-1522 高知県吾川郡仁淀川町田村 Life Science Center, Study Inc. Tamura Niyodogawa-cho Agawagun, Kochi 781-1522 Japan.

⁴高知大学医学部環境保健学教室 783-8505 南国市岡豊町小蓮 Department of Environmental Health Science, Kochi Medical School, Kochi University, Kohasu Oko-cho Nankoku-city, Kochi 783-8505 Japan.

主として miracidium、sporocyst、redia、cercaria と発育する。cercaria はカワナゴと第二中間宿主のカニに捕食され metacercaria になる。終宿主はヒトを始め、トラ、イヌ、ネコなどで、終宿主に摂取された metacercaria は、小腸内で脱嚢し腸壁を貫通して腹腔に出て、感染後10~14日には、横隔膜を通過して、胸腔に移行し、肺胸膜面より肺に進入する¹⁾。肺には虫嚢を中心にその周囲を、好酸球やマクロファージなどの炎症細胞が取り囲みを虫嚢腫と呼ばれる特異的な肉芽腫が形成される。結核に類似の咳、喀痰、胸水貯留等の臨床症状を呈する²⁾。

本研究では、*P. westermani* を実験的に Wistar ラットに感染させ、感染後経時的に剖検して肺を摘出し、肺における組織障害と宿主の細胞や組織による防御反応の時間経過による変遷について病理組織学的に検討した。

方 法

18匹の Wistar ラット（すべて8週齢の雌で体重200g）で感染実験をした。感染の方法は、抗生物質入りの生理食塩水に *P. westermani* の metacercaria 50隻を浮遊させ、腹腔に注射して感染させた。感染後18日目、35日目、45日目、60日目に各4匹、74日目に2匹を剖検して肺を摘出し病理組織学的に検討した（表1）。ラットの肺組織を、10%緩衝ホルマリンで48時間固定後、パラフィン包埋し3 μ に薄切した。ヘマトキシリン・エオジン染色、PAS 反応、AB-PAS 重染色で粘液の検索を行った。好酸球および担鉄マクロファージを同一切片上で観察するためにベルリン青・ダイロン重染色、また、肥満細胞をトルイジン青染色で検索した。トルイジン青は、pH4.1、pH7.0の緩衝液³⁾に溶解したものと、60%アルコール溶液⁴⁾とを比較検

討した。その結果、60%アルコール溶液による染色が、バックグラウンドの結合組織は染まらず、肥満細胞のみが特異的に赤紫色のメタクロマジーを呈し、観察に適していたので、全組織をこの方法で検索した。また、免疫組織化学酵素抗体法で、IgE の検出を試みた。BETHYL 社の HRP-conjugated anti rat IgE sheep polyclonal antibody を用いて、直接法で検索した。

結 果

感染後18日目には、成虫・卵とも肺組織中には認められなかったが、胸膜炎が発症しており、炎症細胞による胸膜の肥厚が認められた。胸膜は肥厚しているだけではなく、炎症反応が非常に激しく肺葉同士の癒着が惹起していた（図1）。胸膜炎が起こっている部位には、好酸球、リンパ球、マクロファージ、形質細胞、肥満細胞等の炎症細胞が滲出していた。一方、肺内部組織では肺胞壁の肥厚を伴う間質性肺炎が発症し、血管周囲は血漿の滲出により浮腫状態に陥り、その中に好酸球の滲出も認められた。また、気管支粘膜上皮の過形成が見られ、PAS 陽性の中性粘液多糖類を有する杯細胞の増加、基底膜の肥厚、気管支平滑筋の肥大が起こっていた。末梢の肺胞は拡張し、肺気腫に陥っていた。

35日目には、破壊された気管支粘膜上皮をもつ気管支内腔が虫嚢になり、この中に1、2隻の成虫が棲息していた。今回検索できた35日目の肺組織中には、全体で4隻の成虫を数えることができたが、その4隻とも生存していた。成虫の体表面には皮棘があり、体内の太い消化管には赤血球が充満していた。成虫による組織破壊と吸血の結果、虫嚢周囲には出血が著しかった（図2）。その赤血球をマクロファージが貪食しているが、まだ赤血球が崩壊していないの

表1 . 実験に用いた Wistar ラットの数

after infection	18 day	35 day	45 day	60 day	74 day	total
No. of rat	4	4	4	4	2	18

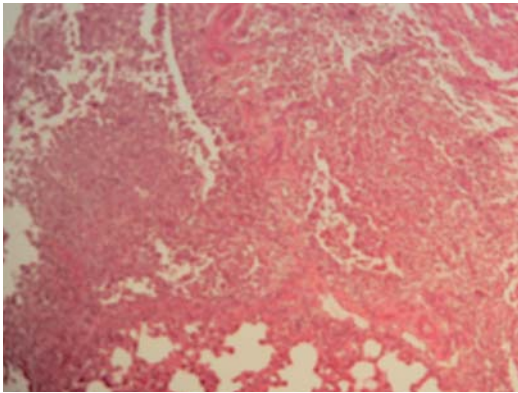


図1．激しい胸膜炎が発症し肺葉同士が癒着している。HE染色×50

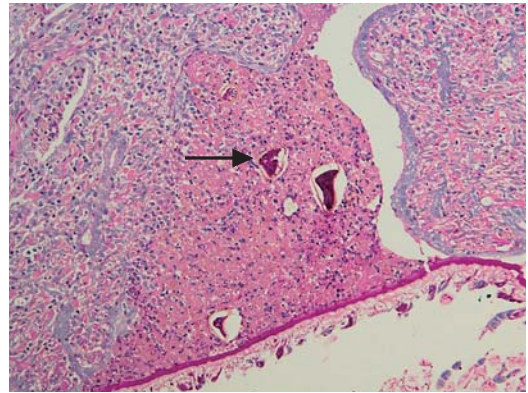


図4．成虫周囲に産卵されている卵(→)。PAS染色×100



図2．虫嚢内の成虫(→)。虫体の消化管に赤血球が充満しており、虫嚢周囲は出血が著しい。近接してリンパ濾胞が認められる。HE染色×25

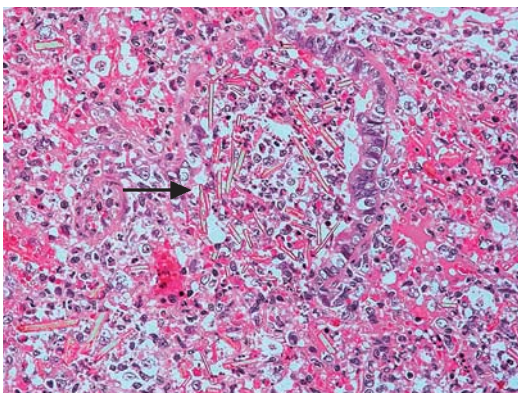


図3．組織内には棒状の不規則な形をした黄褐色のシャルコーライデン結晶が多数析出している(→)。HE染色×200

でヘモジデリンには至らず、HE染色でうすい橙色の赤血球が充満しているが、ベルリン青は陰性であった。虫嚢周囲には赤血球の他に、崩壊した好酸球等が固まりをなし気管支塞栓を形成していた。またリンパ濾胞の形成も認められた。血管からはリンパ球や好酸球が滲出し、組織内には棒状の不規則な形をした黄褐色のシャルコーライデン結晶が多数析出していた(図3)。また、肺肺炎と肺水腫状態が顕著に進行している。この時期から、虫嚢周囲や胸膜下には産卵が開始されていた。卵は楕円形もしくは卵円形で、外側を黄金色のクチクラに囲まれ、卵の内容物はPAS陽性の卵細胞や卵黄細胞で充満していた(図4)。卵周囲を好酸球が取り囲んでいた。

45日目には、気管支内に成虫の死骸とそれを取り囲む多数の細胞の核片、壊死細胞からなる塞栓が形成されており、その気管支は拡張し周囲組織を圧排していた。多数の出血した赤血球を貪食し、ベルリン青陽性のヘモジデリンを胞体内に有するマクロファージが散在していた。胸膜下にはリンパ球の滲出が顕著であった。この時期になると虫嚢の上皮は重層扁平上皮化生を起こしていた(図5, 6)。気管支粘膜下には多数の好酸球と形質細胞があり、肺全体には肺胞マクロファージが貪食した赤血球が崩壊し、ヘモジデリン化した担鉄マクロファージも多数認められた。成虫は35日目には、100%生存していたが、45日目には16隻中11隻(約70%)

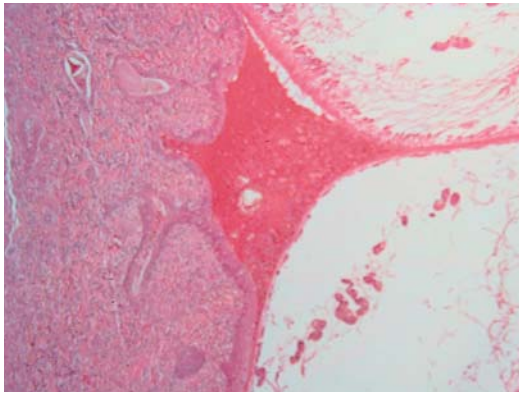


図5．重層扁平上皮化生を起こしている虫嚢上
皮と顕著な出血。HE染色×100

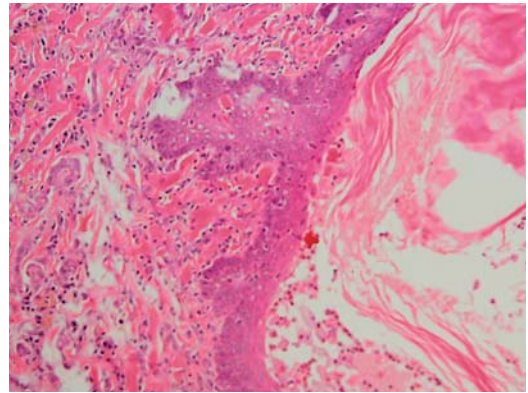


図7．虫嚢上皮は扁平上皮化生が著しく、重層
でしかも乳頭状増殖をし、さらに表層が
角化している。HE染色×200

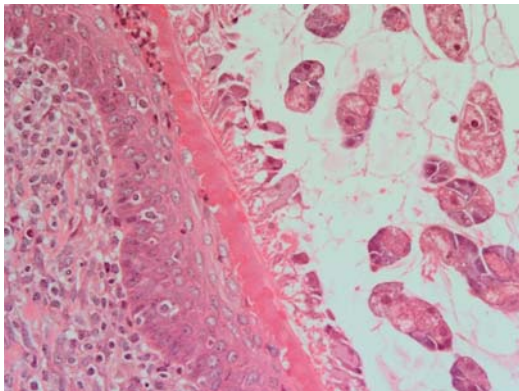


図6．図5の拡大で、虫嚢の重層扁平上皮化生。
右は成虫。図左はラット肺組織。
HE染色×200

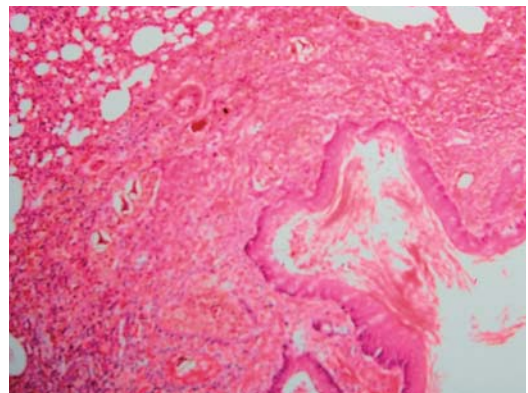


図8．虫嚢の角化型扁平上皮化生と肺間質の線
維化。HE染色×100

表2．Wistar ラット肺組織中の成虫数

感染後	18 day	35 day	45 day	60 day	74 day
生虫	0	4/4 100.0%	11/16 68.8%	2/4 50.0%	2/6 33.4%
変性・膨化虫	0	0	5/16 31.2%	2/4 50.0%	4/6 66.6%

成虫は感染後35日目から肺組織、虫嚢内に認められた。

表3．1つの虫嚢周辺組織に認められた虫卵数

after infection	18 day	35 day	45 day	60 day	74 day
No. of eggs	0	5, 7	4, 8, 15, 42, 64	81, 100	23, 69, 92

が生存し、残り5隻（約30%）は膨化・変性していた（表2）。35日目頃から産出された卵が45日目では増加し、生存している成虫の周囲には多数産卵していた（表3）。しかし、膨化・変性した成虫の周囲には産卵数も少なかった。60日目になると、成虫に接している部位の虫嚢上皮は扁平上皮化生が著しく進行し、重層で乳頭状増殖をし、さらに表層が角化していた（図7）。虫嚢周囲には形質細胞、担鉄マクロファージが多数で、その間に多数産卵されており、一つの虫嚢周囲に、組織切片上で100ヶ以上数えるものもあり、この時期の産卵数が最も多かった（表3）。

この時期になると好酸球は減少し、ベルリン青に濃染する担鉄マクロファージが優位となった。気管支粘膜の顕著な過形成と、動脈壁の肥厚が著しく、また、間質の強い線維化が起り、太い膠原線維の束が密に増生しており、虫嚢腫の線維性変化と間質性肺炎の進行がみられた。感染後74日目では、生存している成虫の割合が減少し、虫嚢内は死骸と虫嚢上皮が剥離した角化物で閉塞していた。虫嚢周囲の肺組織は、強い線維化が起り、密性結合組織が束になって錯綜していた（図8）。好酸球は極端に減少し、ベルリン青に濃染する担鉄マクロファージが主体になってきた。膨化・変性、あるいは死滅した成虫の割合が増加し、それに伴い産卵数は60日より減少していた（表2, 3）。

免疫組織化学酵素抗体法でIgEを染色したが、感染初期から出現していた形質細胞の細胞質内には染まらず、胸膜下組織や間質の結合組織に陽性であった。

考 察

自然界では、終宿主である哺乳類が、寄生している *metacercaria* ごとカニを摂取すると、小腸で脱嚢し、腸壁を穿通し腹腔に出る。その後、腹壁に侵入し、そこで約1週間留まり、再び腹腔に出てその後10～14日後に横隔膜を穿通し胸腔に移行、肺胸膜面より肺実質に侵入し約2ヶ月後に成虫になるといわれている⁵⁾。本研究においては、50隻の *metacercaria* を実験的に Wis-

tar ラットの腹腔内に感染させた結果、感染18日目には成虫は認めなかったが、胸膜炎と肺気腫が発生していた。胸膜炎は、症状が激しく、膜の肥厚のみならず肺葉同士の癒着が起っていた。35日目には、虫嚢が形成され、その中に1～2隻の成虫が棲息し卵も少数出されていた。今回実験に用いた Wistar ラットは、小型哺乳類であるため感染後の移動経路が短いため、通常言われている2ヶ月より早く成虫になったのかも知れない。胸膜炎や肺内炎症巣に出現している構成細胞は、リンパ球、マクロファージ、形質細胞、肥満細胞、好酸球である。寄生虫感染における肥満細胞や好酸球は特異的細胞である。肥満細胞⁶⁾は、感染初期から出現し時間が経過しても減少しなかった。肥満細胞から分泌されるヒスタミンが、気管支粘膜を刺激し、粘膜上皮細胞、杯細胞の増殖を促進する⁶⁾。粘液分泌の増加により気管支の閉塞が起り肺気腫が発症したものと思われる。肺気腫は、終末細気管支より末梢、すなわち固有の気腔領域が異常に拡張した状態で、気管支、細気管支内の粘液栓や粘膜の腫脹による気道閉塞に起因する、いわゆる気管支喘息に類似の組織像である⁷⁾。

寄生虫感染により eosinophilia が惹起されることはよく知られている。Mukae ら⁸⁾は、Paragonimiasis を発症した66歳、男性の末梢血中に22.8%まで好酸球が増加したと症例報告している。Takamoto ら⁹⁾によると好酸球はTリンパ球が産生するIL-5に刺激されて血管から滲出してくる。本研究においても、感染後18日目から血管の周囲に好酸球が滲出している像を確認した。そして、虫嚢が形成された35日目以降には、その周囲を好酸球を主体とする炎症細胞が取り囲み、いわゆる虫嚢腫が形成されていた。卵のクチクラの膜を破壊し、卵内へ好酸球が侵入していたが、成虫へ直接侵入している像は認められなかった。それにもかかわらず45日目頃から一部の成虫の膨化・変性が始まり、時間の経過とともにその数は増加した。壊死に陥っている好酸球や好酸球からの脱顆粒が多く、黄褐色で棒状のシャルコー・ライデン結晶の析出も

認められた。好酸球の毒性は細胞質内の好酸性顆粒が含有しているカチオンタンパク cation protein である。このタンパクは major basic protein (MBP)、eosinophil cationic protein (ECP)、eosinophil peroxidase (EPO)、eosinophil-derived neurotoxin (EDN) である^{10,11)}。これらのカチオンタンパクが大量に細胞外へ放出されることにより大型の成虫が殺傷されたと思われる。

マクロファージの増加も顕著で、出血した赤血球を貪食していた。35日目にはマクロファージに貪食された赤血球はまだ溶血せず、45日、60日と時間が経過する程、ベルリン青強陽性の担鉄マクロファージの数が増加した。

45日目からは、虫嚢を形成している上皮が重層扁平上皮になり、60日目には、乳頭状増殖部位もあり一層厚みを増した角化していた。虫嚢は、metacercaria が気道内、すなわち気管支に定着することにより形成される。多列線毛円柱上皮、ないしは立方上皮の気管支粘膜が成虫の刺激により扁平上皮化生を起し、重層化、角化へと化生性変化をすることにより成虫に対応している。扁平上皮化生については、吾妻ら¹²⁾が、ネコに発症したスリランカ産ウエステルマン肺吸虫症で、同じ所見を認めている。

免疫組織化学酵素抗体法を用いて、IgE について検索したが、早期から出現している形質細胞内には染まらず、胸膜下組織や間質の結合組織にのみ陽性を示した。これは、抗体が不適切なのか、あるいは、形質細胞内の免疫グロブリンが IgE 以外のものなのか不明である。Mukae ら⁸⁾は、初感染の場合は、血清中の IgM を検査するのが有効であると報告している。今後、他の免疫グロブリンについての検討と、今回観察された間質結合組織における IgE 陽性所見について検討する必要がある。

ま と め

P. westermani の metacercaria 50 隻を Wistar ラットの腹腔内に感染させた結果、感染18日目に、胸膜炎と肺気腫が発症し、肥満細胞、リンパ球、好酸球、マクロファージが組織中に滲出

していた。気管支粘膜上皮細胞と杯細胞の増殖を認め、気管支喘息と類似の組織所見を呈した。35日目には虫嚢内に1、2隻の成虫が棲息し、その周囲には卵の産出も生じた。虫嚢周囲には、炎症細胞が取り囲み虫嚢腫が形成された。45日目以降は、虫嚢上皮は重層扁平上皮化生と角化が起こった。この感染実験系により、成虫の感染が成立し、時間経過に伴う宿主の組織変化を研究できる大変有効な動物モデルと思われる。

引用文献

- 1) 加茂 甫：肺臓寄生の吸虫類 ウエステルマン肺吸虫 *臨床寄生虫学*, 1994, 東京, 南江堂, 127-138.
- 2) Michael DeFrain, MD and Robert Hocker, ND, FCCP: North American Paragonimiasis. Case report of a severe clinical infection. *Chest*, 2002, 121, 1368-1372.
- 3) 谷澤 徹、神山隆一：パラフィン包埋切片の染色法, トルイジン青染色, *スタンダード病理学 病理検査のすべて*, 2002, 東京, 文光堂, 26.
- 4) 佐野 豊：肥満細胞 *組織学研究法*, 1979, 東京, 南山堂, 288.
- 5) 伊藤洋一, 山口 昇, 安居院宣昭, 内田明彦：呼吸器系に寄生する吸虫類, ウエステルマン肺吸虫, *医療従事者のための医動物学*, 2006, 東京, 講談社サイエンティフィク, 65-67.
- 6) Peter Lydyard, Carlo Grossi, 秦 長博訳：免疫系の細胞 好塩基球と肥満細胞 多田富雄監訳 *免疫学イラストレイテッド*, 1990, 東京, 南江堂, 40-42.
- 7) 能勢真人：気管支喘息 *医系病理学*, 1997, 東京, 中外医学社, 366-367.
- 8) O. Mukae, H. Taniguchi, J. Ashitani et. al.: Casereport: *Paragonimiasis westermani* with seroconversion from immunoglobulin IgM to IgG with the clinical course. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, 65, 837-839.
- 9) M. Takamoto, K. S. Ovington, C. A. Behm, K. Sugane, I. G. Young, and K. I. Matth:

- Eosinophilis, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57BL/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology*. **1997**, 90, 511-517.
- 10) S. Motojima, E. Frigas, D. A. Loegering, and G. J. Gleych: Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev. Respir. Dis.*, **1989**, 139, 801-805.
- 11) 日塔武彰：好酸球のリボヌクレアーゼと生体防御，*山形医学*，2003，21，47-61．
- 12) 吾妻美子，長瀧 充，石上盛敏ら：スリランカ産ウエステルマン肺吸虫 *Paragonimiasis westermani* の感染によりネコ肺に発生した病変の病理組織学的研究，*高知学園短期大学紀要*，2004，35，31-37．

