資 料

蚊の吸血量とミクロフィラリア 摂取数の個体別測定法

前田龍一郎 栗原 毅

帝京大学医学部寄生虫学教室

(〒173 東京都板橋区加賀)

(受領: 1980年8月6日)

New method for measuring the blood volume and the number of microfilariae ingested by individual mosquitoes

Ryuichiro MAEDA and Takeshi KURIHARA

Department of Parasitology, Teikyo
University School of Medicine,
Itabashi, Tokyo 173, Japan

フィラリアの伝播疫学を研究するうえで、宿主のミクロフィラリア (以下 mf と記す) 密度と媒介昆虫による mf 取り込み数、あるいは消化管からの脱出数との関係を知ることはきわめて重要で、これまでも多くの報告がある。

しかし、これまでの報告の多くは、吸血量を複数の蚊の吸血前後の体重差の平均からもとめたり、消化管内血液を塗抹して mf 数を数える方法が用いられ、必ずしも高い精度をもつとは思われない。

近年吸血量の測定には、消化管内血液を溶血後、比色定量する方法が改良されてきており、Briegel *et al.* (1979) は、ヘモグロビンをシアン化してから比色定量する方法で、1匹ずつの蚊の吸血量をもとめる精度の高い測定法を開発した。一方、低密度の mf 血症を診断する方法として Millipore filter を用いた濾過膜濃縮法 (Bell, 1967) が開発されて以来、各種の研究がなされ、Membrane filter を用いることにより、mf の漏出がほとんど無い状態で濃縮できるようになった (Dennis and Kean, 1971)。

われわれは、この2方法を組み合わせ、個体ごとに蚊の消化管内血液をホモジナイズして溶血後、フィルターで濾過して、その濾液の吸光度から吸血量を測定し、フ

ィルターを染色後鏡検して mf 数を求めるという方法を開発した。本報は、この方法を行うにあたっての諸条件を検討した成績である。

材料と方法

Brugia malayi: 聖マリアンナ医科大学病害動物学教室より分与された、亜周期性マレー糸状虫を、トウゴウヤブカ、スナネズミを用いて累代飼育している系統 (測定時 mf 密度は13.0/ μ l)。

Dipetalonema viteae: 東京大学医科学研究所寄生虫部より分与され、*Ornithodoros moubata*, スナネズミを用いて累代飼育している系統 (測定時 mf 密度は21.2/ μ l)。

Aedes togoi: 長崎大学医学部医動物学教室より分与された長崎産トウゴウヤブカを累代飼育。実験供試蚊は、羽化後25°C, 70% RH で飼育した。

Meriones unguiculatus: 東京大学医科学研究所寄生虫部より分与され累代飼育している Jms: MON 系スナネズミ。

Drabkin's solution: Legowski and Boroviczeny (1962) の処法。1.0g NaHCO₃, 0.1g K₂CO₃, 0.05g KCN, 0.2g K₃Fe(CN)₆ を DDW で1l としたものの。

ホモジナイザー: 池本理化製、ポッター型テフロンホモジナイザーで容量5mlのもの。クリアランス0.09, 0.21, 0.29の3種類を比較した。

フィルターおよびホルダー: 東洋濾紙製 Membrane filter TM-300G, 孔径3 μ m を KS-25フィルターホルダーに装填して用いた。

染色液: 0.05% Azur II 水溶液3~4滴をスライドグラス上にとったフィルター上に滴下し、カバーグラスをかけて個別に染色した。

分光光度計: 日立製、200-20型分光光度計

本法の諸条件を検討するにあたって、原則として以下の手順で行った。

吸血蚊より取り出した消化管とその中の血液を、テフロンホモジナイザーを用いて2mlの Drabkin's solution (以下D液と記す) にホモジナイズし、室温で放置して溶血させる。これを孔径3 μ mの Membrane filter で濾過し、その濾液の540nmにおける吸光度を測定する。フィルターは、ホモジナイザー等を洗った DW を濾過した後、スライドグラス上にとって0.05% Azur II 水溶液3滴で個別に染色して、mf 数を数える。

結 果

1. 比色定量法の精度

スナネズミの血液50 μ l ずつを、12.5, 25, 50, 100, 200ml のD液にホモジナイズした検体、未吸血蚊1匹の

Fig. 1 Linear regression of HiCN (O.D.₅₄₀) and amount of blood from jird. ($y=0.0246x+0.0013$)

- : blood from jird,
- ▲ : midgut of mosquito,
- × : midgut and Malpighian tubule

消化管のみを2mlのD液にホモジナイズした検体、消化管とマルピーギ管のみをホモジナイズした検体各々(3回繰り返す)を、30分室温で放置し溶血させた後に、Membrane filterで濾過し、540nmにおける吸光度を測定した。各検体2mlあたりの血液量(x)とO.D.₅₄₀(y)との関係をグラフに表すと(Fig. 1)、相関係数0.99できわめて明確な直線性を示した。また、消化管のみをホモジナイズした場合には測定値としては示されず、マルピーギ管をホモジナイズした検体では、 $O.D._{540}=0.013$ となり、蚊1匹のマルピーギ管が、血液の約0.4μlに相当する誤差を生じることがわかった。

2. 溶血後の検体の安定性

150μlのスナネズミの血液を100mlのD液にホモジナイズし、30分間室温で放置し溶血させた後、2mlずつ小試験管に分注してそのまま室温に置いたものと、冷蔵庫(4°C)に保存したものについて、経時的に吸光度を測定した。

Fig. 2にみられるように、溶血後わずかな吸光度の減少がみられ、2時間以後はやや激しくなる。冷蔵庫に保存した検体も、室温に放置したものと同様であった。

3. スナネズミにおける血中ヘモグロビン量の個体差

生後3カ月、6カ月、1年の非感染スナネズミと、*Dipetalonema viteae*感染スナネズミ(生後1年)、*Brugia malayi*感染スナネズミ(生後1年)について、それぞれ雌雄1匹ずつから10μlの血液をとり、6mlの

Fig. 2 Stability of homogenized blood sample One hundred and fifty microliters of blood of jird was homogenized in 100 ml Drabkin's solution and incubated at room temperature (25°C).

D液で溶血後、O.D.₅₄₀をもとめた(3回繰り返す)。

Fig. 3にみられる様に、若いネズミでヘモグロビン値が高く、雌より雄の方が高い値を示したが、フィラリア感染による差はみとめられなかった。

4. 蚊の吸血前後のスナネズミのヘモグロビン値の変化

スナネズミのヘモグロビン値に、吸血刺咬の影響がでるか否かを調べるため、羽化後5日令のトウゴウヤブカ300匹をスナネズミから吸血させ(30分間)、吸血前と後に10μlずつ3回採血し、10mlのD液に溶血してヘモグロビン値を測定した。吸血前のO.D.₅₄₀が0.079, 0.076, 0.078, 吸血後が0.077, 0.078, 0.075で、吸血前後30分間でのヘモグロビン値の変化はみられなかった。

5. Membrane filterの適性

今回の実験では、孔径3μmの東洋濾紙製 Membrane filter TM-300Gを用いた。このフィルターによる hemiglobincyanide の吸着の有無を調べるため、濾過前後の試料の吸光度を調べたが、変化はみられなかった。また濾液の通過は良好でmfの漏出もみとめられなかった。

6. 最適なホモジナイズの条件

蚊より取り出した消化管と血液を、クリアランス0.09, 0.21, 0.29mmの3種のポッター型テフロンホモジナイザーで5ストロークずつホモジナイズし、その後、Membrane filterで濾過して、その上のmfの破損率を調べた。実験は5回ずつ行い、内部の一片が出たmfも破損したものに含めた。

この結果、クリアランス0.09では合計102のmf中4匹、0.21では95中0, 0.29では76中1匹の損傷mfが認

Fig. 3 Hemoglobin content of blood from various jirds

められた。また、クリアランス0.29のものでは血液が十分にホモジナイズされず、かたまりが残った。したがって、ホモジナイザーのクリアランスは0.20程度が適当と思われた。

考 察

われわれは、Briegel *et al.* (1979) の方法に比べて4倍の希釈率で検体をホモジナイズしたが、実験上十分な精度を得ることができた。また、血液量と吸光度はきわめて良い比例関係にあることが明らかになった。しかし、マルピーギ管が混入した場合には、Briegel *et al.* (1979) も述べているように、誤差を生じ、その大きさは、われわれの行った方法で血液量の0.4 μ l に相当する値だった。溶血後の検体の吸光度は、2時間以内に測定すれば、室温あるいは冷蔵庫保存いずれの場合にも、ほぼ問題はないと考えられる。

スナネズミの血中ヘモグロビン値は、個体差が約10%みとめられるが、フィラリアの感染による影響はみとめられなかった。多数の蚊に吸血させる場合にも、その吸血前後でヘモグロビン値は変わらず、1回の吸血実験については、その間の初めに吸血した蚊も、最後に吸血した蚊も、同一のスタンダードを用いて吸血量を換算してさしつかえないと考えられた。

今回用いたマレー糸状虫に関しては、クリアランス0.20程度で、5ストローク、ホモジナイズした場合が最も良い結果となり、クリアランス0.09では破損したmfが認められたが、これは他種のmfではまた異なる可能性がある。また、本法を用いた場合に、消化管内でのmfの脱鞘について言及することは必ずしも適当とは思われない。

濾過膜濃縮法については、Scheiber *et al.* (1976)、野上ら (1979) でその条件の検討がされている。今回、われわれは、東洋濾紙製 Membrane filter TM-300G

(孔径3 μ m)を用いたが、hemiglobincyanideの吸着はみられず、mfの漏出もみとめられなかった。染色は、野上ら (1979) の方法と同様に行ったが、染色液量については、野上らが2滴で染色したのに対して、今回使用したフィルターでは3～4滴用いた方が鮮明であった。

ま と め

フィラリア媒介蚊の吸血量とmf摂取数を、個体ごとに測定する方法について、その測定条件を検討した。

吸血蚊のマルピーギ管の混入は、血液0.4 μ l程度の誤差をまねく。溶血後2時間以内であれば検体は安定した吸光度を示した。スナネズミのフィラリア感染の有無、多数蚊による吸血の有無は、ヘモグロビン値に影響を与えない。テフロンホモジナイザーのクリアランスは、0.09では破損mfが混入するが、0.20程度で実用上支障ない結果を得た。

引用文献

- Bell, D. (1967) : Membrane filters and microfilariases: a new diagnostic technique. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **61** : 220-223.
- Briegel, H., A. O. Lea and M. J. Klowden (1979) : Hemoglobinometry as a method for measuring blood meal size of mosquitoes. *J. Med. Entomol.*, **15**(3) : 235-238.
- Dennis, D. T. and B. H. Kean (1971) : Isolation of microfilariae: Report of a new method. *J. Parasitol.*, **57** : 1146-1147.
- Legowski, St. and K. G. v. Boroviczeny (1962) : Exakte Hamoglobinbestimmung in der taglichen Praxis. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **87** : 1953-1960.
- 野上貞雄, 渋谷敏朗, 田中 寛 (1979) : ミクロフィラリア検出のための濾過膜濃縮法の改良に関する研究. *寄生虫誌*, **28**(3) : 125-132.
- Scheiber, P., R. A. Braun-Muzinger and B. A. Southgate (1976) : Bancroftian filariasis in To-

go. 1. A comparative field study of the membrane filtration concentration technique and conventional blood film. *Tropenmed. Parasitol.*, 27 : 224-228.

Summary

We examined the new method for measuring the amount of blood meal in individual mosquitoes using a spectrophotometric technique and the number of microfilariae by membrane filtration method.

Aedes togoi were fed on jird parasitized with *Brugia malayi* and frozen at -20°C immediately.

The midgut containing blood meal was homogenized in 2 ml Drabkin's solution [1.0g NaHCO_3 , 0.1g K_2CO_3 , 0.05g KCN, 0.2g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, in 1 liter distilled water], and incubated at room temperature ($20-25^{\circ}\text{C}$) for 30 min. The homogenate

was filtered through Membrane filter (pore size = $3\mu\text{m}$). The filtrate was transferred to a microcuvette and the optical absorbance was read in a spectrophotometer at 540 nm. The blood volume was calculated from the relationship between blood volume and optical absorbance calibrated previously.

The homogenizer was washed with 4 ml distilled water and the water was filtered through the same membrane to collect the suspected remainder of microfilariae. Then, the membrane was transferred on a glass slide and stained with 0.05% Azur II solution. The number of microfilariae was counted under a microscope.

The contamination of Malpighian tubule caused the increase of optical absorbance equal to 0.4 μl blood. The homogenized sample was stable for 2 hr and the suitable clearance of homogenizer was 0.2 mm in this case.