

A
008.8
>811

中山醫學院八十四學年度碩士論文

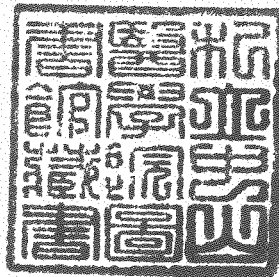
研究所別：醫學研究所

指導教授：李秀雄 博士
王朝鐘 博士

論文名稱：Milbemycin D 及 VD-99-11 對感染廣東住血線
蟲老鼠治療效果之生化評估

**Biochemical evaluation of Milbemycin D and
VD-99-11 on *Angiostrongylus cantonensis* infected
in rats**

研究生：徐玲玉



中華民國八十五年六月

中山醫學院圖書館



C036247

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所
----- 組 84 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: Milbemycin D 及 VD-99-11 對感染感染廣東住血線蟲老鼠治療效果之生化評估

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

 同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

 同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 李秀雄

研究生簽名: 徐玲玉 學號: R8201105
(親筆正楷)

日期: 民國 _85_ 年 __6_ 月 ____ 日

備註: 1. 上述同意與不同意之欄立若未鉤選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如 第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞
地址: 台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名: 徐 玲 玉 聯絡電話: (04)3896190-12331

地址: 台中市南區大慶街二段 113 號 中山醫學院 寄生蟲學科

本論文為中山醫學院授理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

高雄醫學院寄生蟲學科主任 顏全敏 博士

顏全敏

中山醫學院寄生蟲學科主任
(論文指導教授) 李秀雄 博士

李秀雄

中山醫學院生化研究所所長
(論文指導教授) 王朝鐘 博士

王朝鐘

中華民國八十五年六月

學生徐玲玉論文題目為 Milbemycin D 及 VD-99-11

對感染廣東住血線蟲老鼠治療效果之生化評估，其論

文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會

審查合格及口試通過，並由指導教授核閱後無誤。

指導教授：李秀雄博士

簽名：

李秀雄

王朝鐘博士

簽名：

王朝鐘

中華民國八十五年六月

誌謝

本論文首先要感謝兩位恩師 寄生蟲學科主任李秀雄博士在學業、工作與研究上悉心的指導及生化所所長王朝鐘博士在生化領域細心之指引，得以順利完成，特誌銘謝，永感謝忱。文稿初成復蒙 高雄學醫學院寄生蟲科主任顏全敏博士撥冗詳細指正，並提供寶貴意見，使之更臻完美，由衷感激。

求學期間，感謝徐成金教授、蔣思澈老師在蛋白質純化技術之鼎力相助；林玉玲老師、李妙真老師、小佩、自君在生化實驗之全力支持；許振東醫師、林偉隆醫師在病理切片研究之費心襄助；陳美倫老師、蔡崇弘老師在生物統計學之盡心輔助，廖娟娟小姐在整個實驗過程之全力輔佐；育芳、婉瑩、俐均、日萱、仲鏢和秉儒在資料排版上之細心協助，使本文得以順利完竣，在此一併誌謝。

最後僅將本文獻給摯愛的先生-文章、可愛的女兒-佳真、最關心我的父母以及所有協助我的良師益友。

八十五年六月

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	2
第一章 緒論	
第一節 前言	4
第二節 研究動機	10
第二章 材料與方法	11
第三章 結果	23
第四章 討論	27
圖表及說明	32
參考文獻	51

中文摘要

以宿主肺臟組織蛋白變化之現象，評估不同之 γ -aminobutyric acid(GABA) 類驅蟲藥 VD-99-11 及 Milbemycin D，治療感染廣東住血線蟲第三期幼蟲的大白鼠之治療效果，作為與傳統治療效果之比較，以探討其優劣性。實驗結果在感染廣東住血線蟲而未治療及以 VD-99-11 治療組之老鼠肺臟組織微粒體的 SDS-PAGE 電泳分析中發現分子量 22-kDa 有一明顯蛋白質，然未感染及以 Milbemycin D 治療組之老鼠肺臟組織的微粒體卻沒有相同蛋白質；使用 superdex 200 column 作連續層析法純化，鑑定此蛋白質其化學性及免疫性為鐵蛋白 (ferritin)，再利用等電點電泳法及離子交換層析法確認其為 L ferritin。觀察應用免疫組織染色法之病理切片，在感染廣東住血線蟲肺臟組織有發炎現象，浸潤之吞噬細胞內也有 ferritin 之堆積。因此，推測鐵蛋白 (ferritin) 為感染廣東住血線蟲致病機轉之重要因素。據此，我們認為以生化方法評估治療效果方法正確同時也可作為探討致病機轉之研究方法之一。

英文摘要

Protein variation of the lung tissue in the rats, which infected for *Angiostrongylus cantonensis* third larvae were treated with VD-99-11 and milbemycin D, compared with the effects of traditional chemotherapeutics. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis techniques were used to analyze the biochemistry differences of the lung tissue. We found the 22-kDa protein was quantitatively increased in the lung microsomes from the *Angiostrongylus cantonensis* infected and incured rats, however, it was almost absent in normal and cured rats. The protein was purified by sequential chromatography on Superdex 200 column, and was identified chemically and immunologically as ferritin. Moreover, using isoelectric focusing and anion exchange chromatography, it was further known as L ferritin. The distribution of this 22-kDa protein in the lung tissue of the *Angiostrongylus cantonensis* infected rats was studies by immunocytochemistry. The positively stained cells were mainly infiltration macrophages.

From the result, We predicted that there may be some relationships between ferritin and pathogenesis of infected *Angiostrongylus cantonensis*. Therefore, We think the therapeutic used biochemical evaluation mentioned above was correct and could be one of the methods to study pathogenesis.

前言

廣東住血線蟲是一種鼠類寄生蟲，最早於 1933 年由中國學者陳心陶先生在中國大陸廣東省玄鼠及褐鼠之肺臟所發現寄生蟲，命名為 *Pulmonema cantonensis*；1937 年日人松本 (Matsumoto) 在台灣東岸花蓮之野鼠體內發現本蟲之感染，為台灣鼠類感染之第一報告；同年橫川 (Yokogawa) 將之命名為 *Haemostrongylus ratti*。世界第一個人體報告，是 1945 年在台灣由野村 (Nomura) 和林 (Lin) 兩位醫師從一位十五歲疑似腦膜炎的日本男孩腦脊髓液中取得蟲體，經橫川證實為廣東住血線蟲未成熟蟲體；1946 年 Dougherty 發現 *Pulmonema cantonensis* 和 *Haemostrongylus ratti* 二屬與 *Angiostrongylus* 屬相同，而重新命名此寄生蟲為廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*)。然而在當時此寄生蟲並未受到廣泛注意；直到 1959 年 Hsieh 發表 [台灣之人畜共通寄生蟲病概要] (Outline of Parasitic Zoonoses in Taiwan)，文章中提到 1937 年松本和 1945 年野村和林的發現，此寄生蟲病才受到世界各地的重視。

廣東住血線蟲雌性蟲體長 22-32mm、直徑 0.32-0.50mm，雄性蟲體長 20-25mm、直徑 0.30-0.40mm，成蟲寄生於老鼠肺動脈及心臟；1955 年生活史首先由 Mackerras and Sandars 所描述，其生活史中，需要有軟體動物當為中間宿主，包括陸生螺類、水生螺類及蛞蝓等 (Cross, 1967; Otsuru, 1977)，各種螺類為流行病學的重要傳染媒介；此外，有多種動物可當為保蟲宿主，如淡水蝦、渦蟲、淡水蟹和蛙類(虎皮蛙、金線蛙) (Alicata, 1962; Rosen *et al.*, 1967; Otsuru, 1979; Beck *et al.*, 1980; Bowden, 1981)，老鼠為自然界適當宿主，人為非適當宿主；當第一期幼蟲由老鼠糞便排出之後，進入中間宿主體內，由第一期幼蟲發育為第二期幼蟲再繼續發育形成第三期幼蟲，適當宿主老鼠由口腔食入感染第三期幼蟲之中間宿主後，1-2 天第三期幼蟲會到腦部，進入嗅球 (olfactory lobes) 和大腦半球 (cerebral hemispheres)，4-6 天形成第四期幼蟲，最後到蜘蛛膜下腔 (subarachnoid space)，約 7-9 天會形成第五期幼蟲，26-29 天移行至肺動脈繼續發育形成成蟲，由食入第三期幼蟲至糞便發現第一期幼蟲整個生活史需 42-45 天 (Bhaibulaya, 1975)。

廣東住血線蟲在非適當宿主只形成大小長 7.7-18.3mm、直徑 0.03-0.3mm 之第四期幼蟲或第五期幼蟲(未成熟蟲體)(Alicata, 1970)，人的感染因誤食感染廣東住血線蟲第三期幼蟲之中間宿主或保蟲宿主，感染廣東住血線蟲在非適當宿主體內，幼蟲移行時的機械性傷害及浸潤之嗜酸性白血球所釋放之毒素及化學物質，是造成中樞神經系統病害之主要原因 (Yoshimura, 1994)；人食入感染性第三期幼蟲之後，會侵入胃黏膜並進入血管及淋巴管造成胃腸道症狀 (Jindrak and Alicata, 1968)，也可能侵入肝臟而造成肝臟腫大 (Yii, 1976)，最後，這些幼蟲會經由血液循環或周圍神經系統進入腦部 (Jindrak, 1968、1970; Jindrak and Alicata, 1970)，造成發燒、嚴重頭痛、噁心或嘔吐、倦怠、頸部僵硬、神經錯亂、昏迷甚至造成死亡等中樞神經系統之病害性 (Alicata, 1965)；第四期或第五期幼蟲可在大腦髓質、橋腦、小腦、腦軟膜發現 (Yii, 1976)。人體感染除了在腦部發現蟲體之外，此寄生蟲也會侵犯眼部 (Huang *et al.*, 1964)；另外，1968年 Yii *et al.*，由一位台灣五歲女孩之肺臟組織發現成蟲，1986年 Hwang *et al.*，發現一個九位感染者的家族中有四位死於肺臟併發症，

1978年 Sonakul 在泰國一位34歲之婦女肺臟組織也發現蟲體。

廣東住血線蟲主要分佈于熱帶及亞熱帶，從南緯23度到北緯23度，東經100度到西經150度，其氣候大多溫暖潮溼，涵蓋國家有台灣 (Chen, 1979)、中國大陸 (Yang *et al.*, 1984)、東南亞國家包括泰國 (Punyagupta *et al.*, 1970)、馬來西亞 (Lim and Ramachandran, 1979)、並可達太平洋群島夏威夷 (Rosen *et al.*, 1967)、大溪地 (Rosen *et al.*, 1961) 及澳洲北部 (Prociv and Brindley, 1984)，為造成當地居民嗜伊紅性腦膜炎及腦膜腦炎的主要原因 (Alicata, 1970)。台灣、泰國及南太平洋地區包括夏威夷、大溪地為廣東住血線蟲感染嚴重地區。

台灣由於氣候及文化習慣，廣東住血線蟲之中間宿主、保蟲宿主和自然界適當宿主分佈廣泛，1937年松本在台灣花蓮野鼠體內發現此寄生蟲蟲體之後，1964年 Kuntz *et al.*, 1967年 Cross *et al.*, 1972年 Chen., 1975年 Yii *et al.*, 1976年 Cross and Van Peenen, 和 1977年 Otsuru,等，對台灣不同地區之老鼠作流行病學之調查，發現台灣有七種老鼠為廣東住血線蟲天然終宿主，分別是刺鼠 (*Rattus coxinga coxinga*)、白腹鼠 (*R. losea*)、褐鼠 (*R.*

norvegicus)、家鼠(*R. rattus subsp.*)、蘭嶼黑鼠(*R. rattus mindanensis*)、澎湖黑鼠(*R. rattus rufescens*)、鬼鼠(*Bandicota indica nemorivaga*)，其中鬼鼠之感染率更高達 50 % 以上；自然界的中間宿主有二種陸螺為非洲大蝸牛(*Achatina fulica*) (Chiu, 1964; Cross, 1967; Chen *et al.*, 1971; Wen, 1973; Chen *et al.*, 1974; Otsuru *et al.*, 1976; Otsuru, 1977)、薄殼蝸牛(*Bradybaena similaris*) (Chiu, 1964)，一種水螺為田螺(*Cipangopaludina chinensis*) (Chang and Cross, 1966)，二種蛞蝓為大型蛞蝓 (*Laevicaulis alte*) (Otsuru, 1977)、小型蛞蝓 (*Vaginulus plebeius*) (Cross, 1967)；自然界的保蟲宿主有一種渦蟲類(*planarian*) (Cross, 1967)、二種青蛙-虎皮蛙 (*Rana tigrina*) 和金線蛙 (*Rana plancyi*) (Otsuru, 1977)。台灣從 1945 年發現世界第一個人體病歷報告之後，間隔將近二十年直到 1964 年 Huang 發現第二個病歷，但此後即不斷有病歷報告，1979 年 Chen 統計台灣地區共有 259 個病歷報告，死亡率高達 3.1 %，流行地區分佈於南台灣、東台灣，大多數是孩童感染，並無性別差異，流行季節於夏季雨季 6-9 月間；在台灣主要

感染途徑大多因吃入未煮熟之非洲大蝸牛 (Yii, 1975; Chen, 1979; Hung and Chen, 1988)，而造成民眾相當大之危害；目前已超過 300 個病歷 (Hwang *et al.*, 1986)；是台灣相當重要的人畜共通寄生蟲病，且並無適當之治療藥物予以治療，因此，以生化技術評估感染廣東住血線蟲老鼠之治療效果，以探討其致病機轉及作為發展新驅蟲藥的參考。

研究動機

自從 1937 年日人松本 (Matsumoto) 在台灣東岸花蓮之野鼠體內發現廣東住血線蟲感染，且 1945 年野村 (Nomura) 及林 (Lin) 二位醫師在台灣發現廣東住血線蟲世界第一個人體病例報告之後，這種寄生蟲在台灣是相當重要的人畜共通寄生蟲病之一 (Yii, 1976; Chen, 1979)。

雖然，廣東住血線蟲對人類最嚴重的危害，係傷害人體中樞神經系統，為造成嗜伊紅性腦膜炎及嗜伊紅性腦膜腦炎之主要原因；但在 1968 年之後，在人體之肺臟也有該蟲體之發現，因而使患者產生肺炎、肺肉芽腫、肺出血等症狀，造成肺臟組織之病害性 (Yii *et al.*, 1968; Sonakul, 1978; Hwang *et al.*, 1986)；而由於廣東住血線蟲如何破壞肺臟組織之致病機轉方面之研究文獻頗稀，有鑑於此，本研究利用生化技術分析感染廣東住血線蟲之老鼠肺臟組織及以藥物治療之老鼠肺臟組織之蛋白質變化現象，以探討廣東住血線蟲之致病機轉，並作為發展新驅蟲藥之參考。

材 料 與 方 法

一、動物感染

1. 第三期幼蟲之收集

從實驗室中所感染廣東住血線蟲第一期幼蟲之 *Biomphalaria glabrata*，收集感染性第三期幼蟲。

方法：將感染的 *Biomphalaria glabrata* 壓碎，以 1 : 30 之比例加入人工胃蛋白消化液，放入磁性攪拌子於 37 °C 恆溫箱以磁性攪拌機攪拌 2 小時，取出用紗布過濾，加入生理食鹽水稀釋、靜置，每隔 30 分鐘，再倒掉一半上清液，以生理食鹽水清洗至上清液完全清澈；再用滴管吸取沉澱物，於解剖顯微鏡下，收集第三期幼蟲。

人工胃蛋白消化液之配製：(使用前 1 小時配製)

7 gm pepsin , (1:2500, Sigma)

8 ml HCl ,

Dist. water to 1000 ml

2. 實驗動物分組

使用動物為購自國科會動物中心之 *Wistar* strain 四週齡雄性大白鼠，分實驗組、陽性對照組及陰性對照組；每組各 5 隻老鼠。

3. 動物感染

實驗組及陽性對照組之老鼠，於感染前 12 小時禁食空腹，每隻老鼠以口餵管餵食 20 隻廣東住血線蟲第三期幼蟲；陰性對照組不作任何處理。

二、藥物治療

感染後第六天實驗組老鼠以口餵管分別給予 milbemycin D 及 VD-99-11 之驅蟲藥治療。

1. Milbemycin D :

5mg/kg 之劑量治療，連續投藥十天。

2. VD-99-11 :

0.6mg/kg 之劑量治療，連續投藥三天。

三、效果評估

1. 感染後蟲數之計數

(1). 第一期幼蟲之檢查

感染後第八週連續三天收集老鼠糞便，以福馬林-乙醚濃縮法 (formalin-ether concentration) 計算每公克糞便中第一期幼蟲數目。

(2). 成蟲計數

感染後第十五週解剖老鼠，計算老鼠肺動脈及心臟內之成蟲數。

2. 生化評估

(1). 肺臟組織之萃取

未感染廣東住血線蟲之陰性對照組、感染未治療之陽性對照組及經藥物治療之感染老鼠解剖後，每隻老鼠取 1 公克之肺臟組織，於冰浴中儘量切碎，組織與均質液之比例為 1:5，以均質機研磨至組織完全磨碎均質，於冷凍離心機分別以 600 xg 重力離心 10 分鐘，沉澱物為細胞核，上清液再以 15,000 xg 重力離心 30 分鐘，沉澱物為粒線體，再取上清液以 100,000 xg 重力離心 60 分鐘，沉澱物為微粒體，上清液為細胞質；將細胞核、粒線體及微粒體之 pellete 溶於均質液，與細胞質一起置於 -20 °C 保存。

均質液之配製：

0.282 g Tris-HCl, pH:7.4 (20mM) ,
67.24 mg EDTA (2mM) ,
10 ml glycerol (10 %),
349 μ l β -mercaptoethanol ,
d₂H₂O to 100 ml.

(2). 蛋白質定量分析

取 20 μ l 之肺臟萃取物，加入 Bio-Rad protein assay dye 2.5 ml，室溫反應 10 分鐘，測 595 nm 吸光值。以 bovine serum albumin 為標準液，測定細胞核、粒線體、微粒體及細胞質之蛋白質濃度。

(3) 電泳分析

採用 Bio-Rad 公司 Protean II xi cell 之電泳槽作蛋白質電泳分析。

蛋白質電泳的方法：將電泳玻片洗淨擦乾，利用約 0.75mm spacer 為間隔裝好電泳片，製備 12% SDS-PAGE 之 separating gel，混合均勻後迅速倒入電泳片中，直到液面距離 well 約 1.5cm 處為止，加入去離子水，覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層水倒掉，再開始製備 4.0% SDS-PAGE 之 stacking gel，混合均勻後倒入電泳片中，將電泳齒梳插入電泳片中，若有氣泡，則上下移動齒梳，使氣泡離開 gel，待 stacking gel 凝固後，拔掉齒梳，用二次清水清洗 well 數次，準備 loading sample (Laemmli, 1970)。

取 20 μg 的蛋白質樣本加等量之 sample buffer，於 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 分鐘後，迅速放回冰上等待 loading，將所有檢體用毛細管 tips 小心加至每個 well，加上標準 proteins standard marker (Bio-Rad)，將上下電泳槽加入 SDS 電泳緩衝液至電導線被蓋過為止，以電源供應器通電，開始以 15mA 電流直到色帶跑至 stacking gel 與 seperating gel 的交界處，調整電流為 30mA，當色帶跑至底線時，才停止電泳。電泳完畢後，將膠體取出，以 Coomassie blue 染色

12 % SDS-PAGE 之配製：

12 ml 30 % acrylamide/0.8 % bis，

9.9 ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ ，

7.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH:8.8，

300 μl 10 % SDS，

300 μl 10 % Ammonium persulfate，

12 μl TEMED.

4.0 % SDS-PAGE 之配製 :

1.3 ml 30 % acrylamide/0.8 % bis ,
1 ml d₂H₂O ,
2.5 ml 0.5 M Tris-HCl, pH:6.8 ,
100 µl 10 % SDS ,
100 µl 10 % Ammonium persulfate ,
10 µl TEMED.

Sample buffer 之配製 :

1.0 ml 0.5M Tris-HCl, pH 6.8 ,
1.6 ml glycerol ,
1.6 ml 10 % SDS ,
0.4 ml β-mercaptoethanol ,
0.4 ml 0.5 % (W/V) bromophenol blue ,
3.0 ml d₂H₂O.

5x electrode buffer 之配製 :

15.0 g Tris base (25mM)
72 g glycine (192mM)
3.0 g SDS (0.1 %)
d₂H₂O to 1000 ml

0.1 % Coomassie blue 之配製：

1 g coomasie blue G-250 溶於 (400 ml methanol ，
100 ml acetic acid ， 500 ml Dist. water) 中，溶解後，
過濾之。

脫色液之配製：

100 ml methanol ，
75 ml acetic acid ，
d₂H₂O to 1000 ml

四、22-kDa protein 之單離、純化及鑑定

1. 單離、純化

取感染廣東住血線蟲老鼠肺臟組織均質後的微粒體 4 ml ，先以 0.45 μ m 孔隙的 acetate membrane 過濾，再使用 Superdex 200 gel filtration column (HR 26/60 pharmacia) 層析，使用 50mM pH 7.4 之 Tris buffer (0.1M NaCl)，流速每分鐘 2ml ，於 UV 檢測器下，每次收集 5ml ，將每個 peak 所收集的蛋白質作 SDS-PAGE 電泳分析，結果第二個 peak 含有分子

量 22-kDa 之蛋白質，用 10mM pH7.4 之 Tris buffer 透析，隔夜後，冷凍乾燥；再溶於 6M urea，使用同樣的 column 再一次層析，收集含有 22-kDa 蛋白質的第二個 peak，透析、冷凍乾燥保存。

2. 分子量之測定

應用 gel filtration HPLC 之方法，測定此蛋白之 native 分子量 (Andrews 1965)。

將純化的 22-kDa 蛋白質使用 TSK-3000 SW ultrapeak column (7.5 x 300mm Toyo-soda)，緩衝液為 0.1 M phosphate buffer (0.1M Na₂SO₄，0.05% NaN₃，pH 6.5) 流速每分鐘 1ml，測量此蛋白質的 retarding time，以已知分子量的蛋白質標準品作 Standard curve，計算其分子量。

3. 22-kDa 蛋白質 Polyclonal antibody 之製備及鑑定

將純化之 22-kDa 蛋白質 (500 µg protein/ml)，與等量之 Freund' s complete 佐劑乳化，在日本大白兔之背部皮下注射不同部位，二星期及四星期再分別追加注射，於最後一次注射十二天之後，收集血液，離心，取血清，進行各種分析。

a. 雙相免疫擴散法 (*Double immunodiffusion*)

將 1% agarose 以 100 °C 煮沸 1-5 分鐘，冷卻至 45 °C 時再注入 75x15 mm 玻片上，打上四個洞，在中央槽中注入製備的抗體，周圍之槽中注入老鼠之 liver ferritin (Sigma)，置於室溫，24 小時後觀察。

b. 免疫電泳 (*Immuno-electrophoresis*)

如雙相免疫擴散法 (Keyser, 1972)，玻片先倒入 1 % agarose，待冷凝後，於 agarose 上，打兩個圓槽，一方圓槽注入純化的分子量 22-kDa 之蛋白質，另一方圓槽注入感染廣東住血線蟲肺臟組織均質液，然後置於電泳槽，加入 60mM 的巴比妥酸緩衝液 pH 8.6 之電泳液，電泳完後，在 agarose 中央挖出一長條形之槽，注入 22- kDa 蛋白質之抗血清放入潮溼培養皿中，48 小時之後，再脫蛋白，以 Amido black 染色觀察。

c. 等電點電泳法 (*Isoelectric focusing*)

使用 pH 梯度 3-10 (Ampholyte, Bio-Rad) 之薄層 polyacrylamide gels 進行電泳，首先 15 分鐘 100 伏特，接著 15 分鐘 200 伏特，最後 15 分鐘 450 伏特，染色觀察。

d. 離子交換層析法 (*Anion exchange chromatography*)

使用 NeoBQr AQ column (4 ml, Dynachrom AS) 層析，緩衝液為 pH 7.4, 200mM Tris-HCl, 以鹽梯度法沖提，記錄其層析圖 (Worwood *et al.*, 1976)。

e. 免疫點墨吸漬法 (*Immunoblotting*)

取 5 μ g 純化的 22-kDa 蛋白質、老鼠肺臟組織微粒體均質液及老鼠 liver ferritin (Sigma)，加入 sample buffer 混合均勻，100 °C 加熱 5 分鐘使蛋白質變性，然後 loading 至 12% 的 SDS-PAGE 電泳，電泳完畢後；取出膠體，轉移至硝化纖維紙 (Bio-Rad) (Towbin and Gordon, 1984)，將硝化纖維紙與含 5% 脫脂奶粉的 PBS 作用 1 小時，加入 rabbit anti-rat 22-kDa protein antiserum (1:2000 dilution) 於 37 °C 作用 2 小時，以緩衝液清洗，與 primary antibody 作用後之硝化纖維紙再進一步與 horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Bio-Rad) 作用 1 小時，以緩衝液清洗，最後以受質 DAB kit (vector) 進行呈色反應，待色帶出現後，以蒸餾水終止呈色反應並清洗之。

五、肺臟組織病理變化觀察

1. 病理切片

將肺臟組織固定於 10% 福馬林，以石蠟包埋，切片 5 μ m 以 hematoxylin-eosin 進行染色，封片、觀察。

2. Immunocytochemistry

製作 5 μ m 之切片，浸於 xylene 脫蠟，將切片水化依序浸於 100% 乙醇 \rightarrow 95% 乙醇 \rightarrow 70% 乙醇 \rightarrow 50% 乙醇，最後以 PBS 清洗，以含 0.05%(v/v) H₂O₂ 的甲醇，室溫下作用 10 分鐘，去除組織中內生性過氧化酵素，以 PBS 清洗 3 次，加入含 10% nonimmune goat serum 之 PBS，室溫下作用 30 分鐘將之洗掉，滴加 rabbit anti-rat 22-kDa protein antiserum (1:1000) (primary antibody)，室溫下作用 45 分鐘，以 PBS 清洗，滴加 biotinylate-goat anti-rabbit-IgG Ab 作用後，以 PBS 清洗，再滴加 streptavidin conjugated horseradish peroxidase 反應後，以 PBS 清洗，以 diaminobenzidine 於室溫下染色 1-4 分鐘，蒸餾水沖洗，最後以 hematoxylin 作對比染色。

結 果

一、藥物治療效果

成蟲數與幼蟲數之變化

表一顯示使用 milbemycin D 治療感染廣東住血線蟲之老鼠，糞便未發現第一期幼蟲，解剖後也未在肺動脈及心臟發現蟲體，老鼠體重及肺臟重量與陰性對照組比較，以 Wilcoxon-Sum rank 分析，結果 $p > 0.05$ ，二者之間並沒有顯著差異，為治癒組；而以 VD-99-11 治療感染之老鼠，其幼蟲數、成蟲數、老鼠重量及肺臟重量與陽性對照組比較，以 Wilcoxon-Sum rank 分析，結果 $p > 0.05$ ，二者之間也沒有顯著差異為未治癒組。

電泳分析蛋白質之變化

利用 SDS-PAGE 電泳分析老鼠肺臟組織蛋白質之變化結果如圖一，在陽性對照組及未治癒組之老鼠肺臟組織微粒體，發現分子量 22-KDa 有一明顯蛋白質，而在陰性對照組及治癒組之老鼠肺臟組織微粒體，並未發現此蛋白質。

二、22-kDa 蛋白質之單離、純化

將感染廣東住血線蟲之老鼠肺臟微粒體，以 Superdex 200 gel filtration column 作連續層析法，在第一次層析，層析圖中如圖二 a，此蛋白質位於第二個 peak，再一次使用 superdex 200 gel filtration column 層析，收集純度較高之分子量 22-kDa 蛋白質如圖二 b。

三、Ferritin 之鑑定

22-kDa 蛋白質 *native* 分子量、*isoform* 之鑑定

應用 HPLC 以 TSK-3000 SW gel filtration column 層析，測定 22-kDa 蛋白質 *native* 分子量約為 440-kDa。(圖三)

因為 ferritin 有 *isoform*，以等電點電泳法測定 22-kDa 蛋白質之 PI 值為 5.0-6.4(圖四)，與 L ferritin 相似；離子交換層析法其層析圖與老鼠之 liver ferritin 相類似，(圖五)均顯著表示 22-kDa 蛋白質為 L ferritin。

Polyclonal antibody 之製備、分析

以純化之 22-kDa 蛋白質製備 polyclonal antibody，將製備的 rabbit anti-rat 22-kDa antiserum 與純化之 22-kDa 蛋白質利用雙相免疫擴散法觀察，是否有抗原-抗體反應之沉澱線；由圖六可看出中央槽中的兔血清，可分別與週圍槽中純化之 22-kDa 蛋白質產生免疫沉澱線，顯示兔血清確實有對抗 22-kDa 蛋白質之抗體存在。

爲了確認此抗體是否爲單一特異性，由免疫電泳之分析結果，如圖七在純化的 22-kDa 蛋白質之一邊，有一條免疫沉澱線，而在感染廣東住血線蟲老鼠肺臟組織均質液這邊，也只有單一條沉澱線，因此，確認此抗血清爲具有單一特異性之抗體，以作爲免疫分析使用。

免疫點墨吸漬法分析

爲了鑑定 22-kDa 蛋白質，將感染廣東住血線蟲老鼠肺臟組織均質液、正常老鼠肺臟組織均質液、純化的 22-kDa 蛋白質以及老鼠 liver ferritin 作 immunoblotting 分析，如圖八除了正常老鼠肺臟組織均質液在 22-kDa 沒有蛋白質存在，其它均可在 22-kDa 發現明顯的蛋白質存在。

由以上之實驗結果，在感染廣東住血線蟲及未治癒組之老鼠肺臟組織微粒體所發現分子量 22-kDa 之蛋白質為 L ferritin。

四、肺臟組織之病理變化現象

觀察感染廣東住血線蟲肺臟組織之切片，在肺動脈內有肉芽腫及血管內膜增生(圖九 a)，巨大細胞及吞噬細胞浸潤肺臟實質組織，內含蟲卵及幼蟲，且伴有纖維化之現象(圖九 b)，浸潤之吞噬細胞，大多圍繞於增生之血管周圍(圖九 c)，且發現其細胞質含有細小顆粒(圖九 d)。

將感染廣東住血線蟲之老鼠肺臟組織作免疫組織染色法發現增殖的血管附近有浸潤之吞噬細胞，細胞質內發現有細小顆粒(圖十 a-b)；相對地，圍繞於正常老鼠之小支氣管之吞噬細胞，則無此現象(圖十 c)。顯示有高量之 ferritin 堆積在感染廣東住血線蟲之老鼠肺臟組織所浸潤之吞噬細胞內。

討 論

由於廣東住血線蟲幼蟲於感染後第三天進入宿主之中樞神經系統(Jindrak, 1970), 第十天會在腦部發育成未成熟蟲體 (Alicata and Jindrak, 1970)。有多種藥物已由動物實驗中證實, 可殺死廣東住血線蟲幼蟲或未成熟蟲體, 包括 thiabendazole (Cuckler *et al.*, 1965; Nishimura, 1965/1966), l-tetramisole (Jindrak and Alicata, 1969), mebendazole (Lammler and Weidner, 1975; Hayashi *et al.*, 1982; Hwang and Chen, 1988), flubendazole (Maki and Yanagisawa, 1983), avermectin B_{1a} (Ishii *et al.*, 1983), ivermectin (Ishii *et al.*, 1985), and milbemycin D (Terada *et al.*, 1987a), 在本研究我們使用二種 GABA 類藥物 milbemycin D 和 VD-99-11, milbemycin D 是屬於治療廣東住血線蟲 GABA 類藥物之一, 1986 年 Sano *et al.*, 已發現在體外對廣東住血線蟲成蟲會造成麻痺現象, 且 1987 年 Terada *et al.*, 於老鼠感染第六天給予連續十天之藥物治療有相當顯著療效; 1995 年本研究室 Lee *et al.*, 發表 VD-99-11 *in vitro* 於低濃度會使廣東住血線蟲成蟲產生麻痺現象; 在以往研究治療藥物之效果, 大多以治療後蟲體回收數、雌蟲排出之幼蟲數及肺

臟重量作為治療效果之判讀。在本實驗中，治療後除了以蟲體回收數、雌蟲排出之幼蟲數及肺臟重量作為結果之判讀，另外，也以肺臟組織蛋白質變異現象作為評估之標準，實驗結果發現以 milbemycin D 治療之實驗組，與 Terata *et al.*, 1987 年之研究結果一致，可將廣東住血線虫幼蟲完全殺死而未能形成成蟲，在肺臟組織之電泳分析未發現 ferritin；而以 VD-99-11 治療之組別，雖然 VD-99-11 於體外實驗會對成蟲蟲體造成麻痺，但由於本實驗在感染第六天即予治療，此時還未形成成蟲蟲體，可見此藥物無法將廣東住血線虫幼蟲殺死，其藥物機轉有待進一步探討，所以在肺臟組織之電泳分析中發現與感染而未治療老鼠肺中相同之 ferritin 存在。

Ferritin 為人體儲存鐵之水溶性蛋白質，對體內鐵的 homeostasis 相當重要；由 24 個 subunit 所組成 (Munro and Linder, 1978)，在一般發炎現象、惡性腫瘤、肝炎等疾病均會造成 ferritin 之增加 (Hoy and Jachs, 1981; Bacon *et al.*, 1983; Peter, 1985)。由於來自不同基因或分佈於不同組織；ferritin 有 isoform 之存在 (Munro *et al.*, 1987)，分別為 H form 及 L form，分子量 21,000 Da 及 19,000Da，二者之間有 50% 之同質性 (Arosio *et al.*, 1978; Whiting, *et*

al., 1981); 1974年 Powell *et al.*, 的研究指出由於病害所造成鐵質過量的組織，L ferritin 會顯著增加。1978年 Wagstaff *et al.*, 1980年 Khogo *et al.*, 和 1981 Bomford *et al.*, 分別研究體內 isoferritin 之特性，提出了一個結論，雖然，H ferritin 對鐵質之吸收較快且結合力較強，但在鐵質過量之組織，堆積的卻是 L ferritin；在本研究中感染廣東住血線蟲老鼠肺臟組織浸潤之吞噬細胞所堆積的也是 L ferritin。

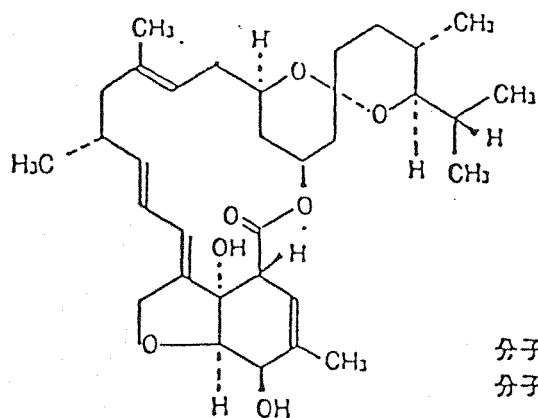
Ferritin 之增加，與組織之發炎現象有關 (Konijn, 1977; Konijn *et al.*, 1981), 1980和 1981年 Dorner *et al.*, 研究 ferritin 合成與細胞之相關性，提出 ferritin 主要是由吞噬細胞及淋巴球合成；1991年 Aguas *et al.*, 在動物實驗中發現 ferritin 在發炎現象會堆積於 membrane-bounded vesicles，1992年 Wesselius *et al.*, 提出在吸煙者之肺臟組織浸潤的吞噬細胞也有 ferritin 之堆積，雖然，這些促使 ferritin 增加的機轉，並無法完全瞭解，然而，1993年 Fahmy & Young 提出由於發炎現象造成高濃度的細胞素 (cytokine) 及局部鐵之過量，因而促使 ferritin 在吞噬細胞之合成增加。在感染廣東住血線蟲老鼠肺臟組織切片，肺動脈內有血管內膜增生，且伴有吞噬細胞之浸潤，細胞質內發現有 ferritin 的堆積。

由於 Fe^{++} 鐵為自由基之催化因子 (Haber and Weiss, 1934)，而自由基會造成許多組織傷害 (Ambruso *et al.*, 1981; Whiting *et al.*, 1981)；1981年 Bennett 提出在紅血球循環當中，吞噬細胞有吞食及貯存鐵之功能；因此，當組織受傷害，紅血球被破壞所釋放之鐵質，被吞噬細胞吞噬後，與 ferritin 結合，以減少 free ion 之含量，降低對組織之傷害。在我們的實驗發現感染廣東住血線虫之老鼠肺臟組織造成之病變與 ferritin 堆積在浸潤的吞噬細胞是有很大的相關性，就觀察廣東住血線虫寄生肺動脈而論，蟲體會造成血管壁的破損，而使血液流入組織中，血液的紅血球被吞噬細胞吞食，然後由 phagolysosomes 消化，由血色素釋放之鐵質，造成局部的鐵質過量及高濃度的細胞素 (cytokine)；1980年，Kay 提出這些細胞在紅血球循環中去除毒素，是一種保護作用，因此，促使 ferritin 在吞噬細胞合成，對組織而言，是一種保護作用。

Ferritin 不僅存在脊椎動物 (Heusterspreute and Crichton, 1981)，其它包括螺類 (Bottke, 1985; Bottke *et al.*, 1988)、昆蟲 (Nichol and Locke 1989)、植物 (Ragland *et al.*, 1990)、黴菌 (David *et al.*, 1971)、細菌 (Tsugita and Yariv, 1985) 和寄生蟲 (Dietzel *et al.*, 1992)等均發現 ferritin 之存

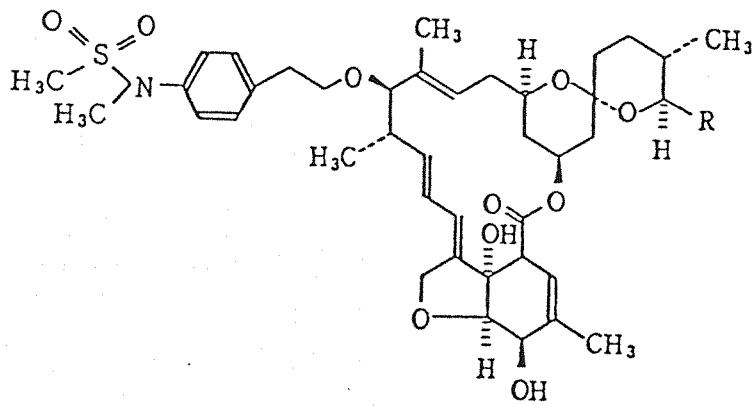


在，1992年 Dietzel *et al.*, 提出寄生於血管之曼森住血吸蟲成蟲體內含有 ferritin，1995年 Ersfeld *et al.*, 在感染包生條蟲之病人血清發現此蛋白質明顯增加，而提出可以 ferritin 作為診斷之指標；1993年 Fahmy & Young 提出由於發炎現象造成高濃度的細胞素及局部鐵質過量，因而促使 ferritin 在吞噬細胞合成；在本研究中感染廣東住血線蟲老鼠肺臟組織浸潤之吞噬細胞有 ferritin 之堆積，因此，推測 ferritin 為感染廣東住血線蟲致病機轉之重要因素。據此，我們認為以生化方法評估治療效果，方法正確同時亦可作為探討致病機轉之研究方法之一。



分子式：C₃₃H₄₈O₇
 分子量：556.74

Chemical structure of Milbemycin D



R : CH₃ 20% 以下
 C₂H₅ 80% 以上

Chemical structure of VD-99-11

表一：

**Effect of VD-99-11 and milbemyacin D
against larval stages of *Angiostrongylus cantonensis* in rats**

Drugs	oral dose (mg/Kg)	No. exam.	LPG/female 8th week($\times 10^3$)	Rat BW at sacrifice (g)	Rat lung-BW at ratio at sacrifice	No. of worms recovered
Control (Positive)	0	5	12.3 \pm 10.9	246.6 \pm 65.3	6.4 \pm 3.5	18.0 \pm 2.8
VD-99-11	0.6.x3	5	10.0 \pm 4.7	295.7 \pm 15.0	3.0 \pm 0.8	15.2 \pm 2.6
Control (Negative)	0	5	0	240.0 \pm 11.8	0.6 \pm 0.1	0
Milbemyacin D	5x10	5	0	290.8 \pm 41.1	0.5 \pm 0.1	0

Results are shown as mean \pm SD of four animals each

Wilconson-sum rank $p > 0.05$

(Comparison of positive control group and which treat with VD-99-11 group ;

Comparison of negative control group and which treat with milbemyacin D group)

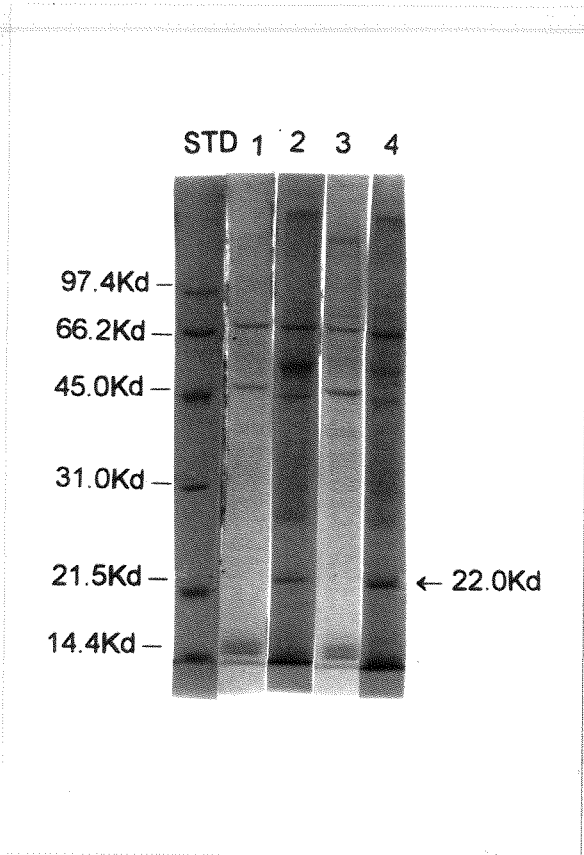


Figure 1. SDS-PAGE analysis of lung microsomes. Lanes: STD, molecular weight standards; 1, lung microsomes of normal rats; 2, lung microsomes of infected rats. 3, lung microsomes of cured rats; 4, lung microsomes of incured rats.

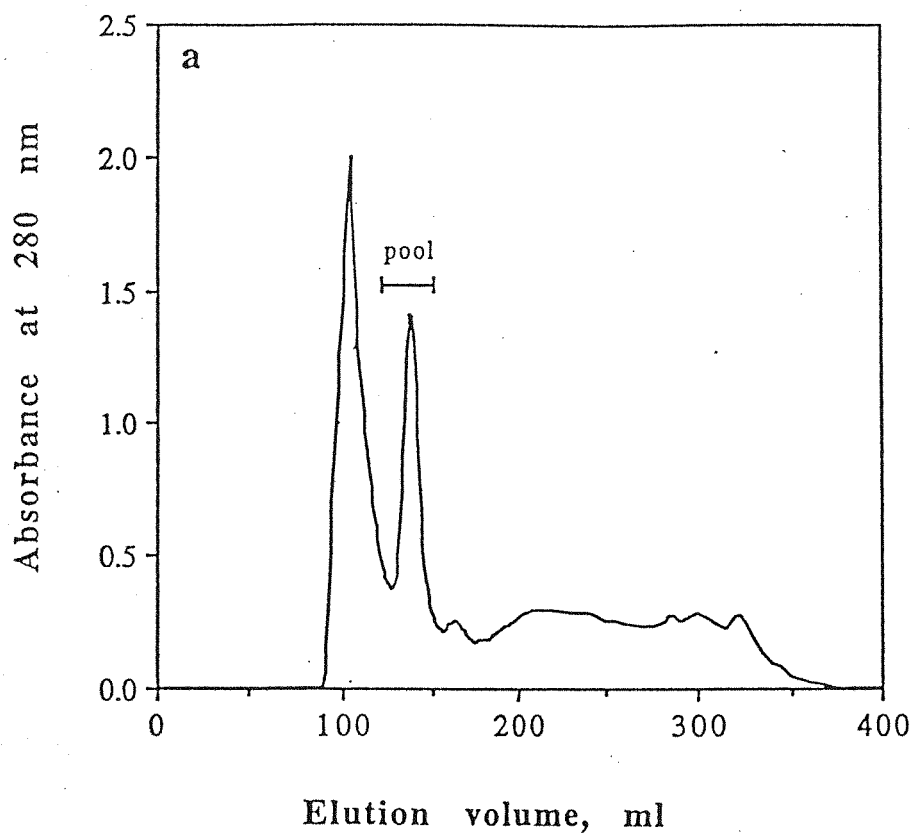
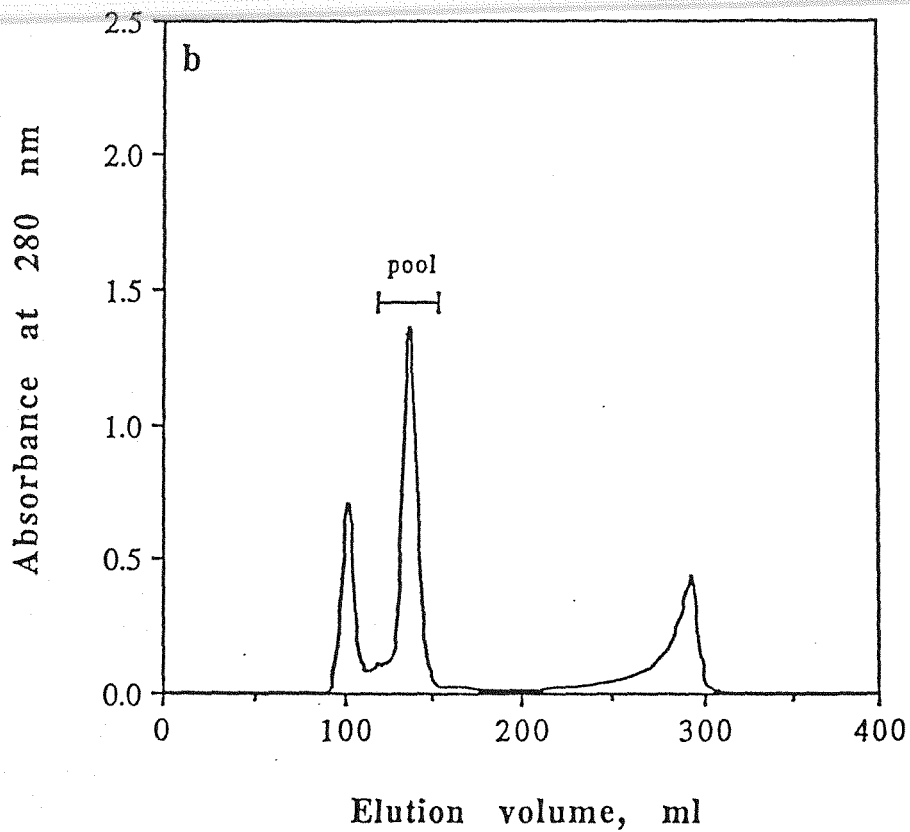


Figure 2. Superdex 200 column chromatography of homogenous lung microsomes from *A. cantonensis* infected rats. (a) Four milliliters of homogenous lung microsomes was chromatographed on a Superdex 200 column. Fractions of second protein peak were pooled, dialysed overnight against 10 mM Tris-buffer, and then lyophilized.



(b) Two of these samples were dissolved in 6M urea and pooled, then rechromatographed on a second Superdex 200 column. Fractions eluting between 125 and 150 ml were pooled, dialyzed and lyophilized.

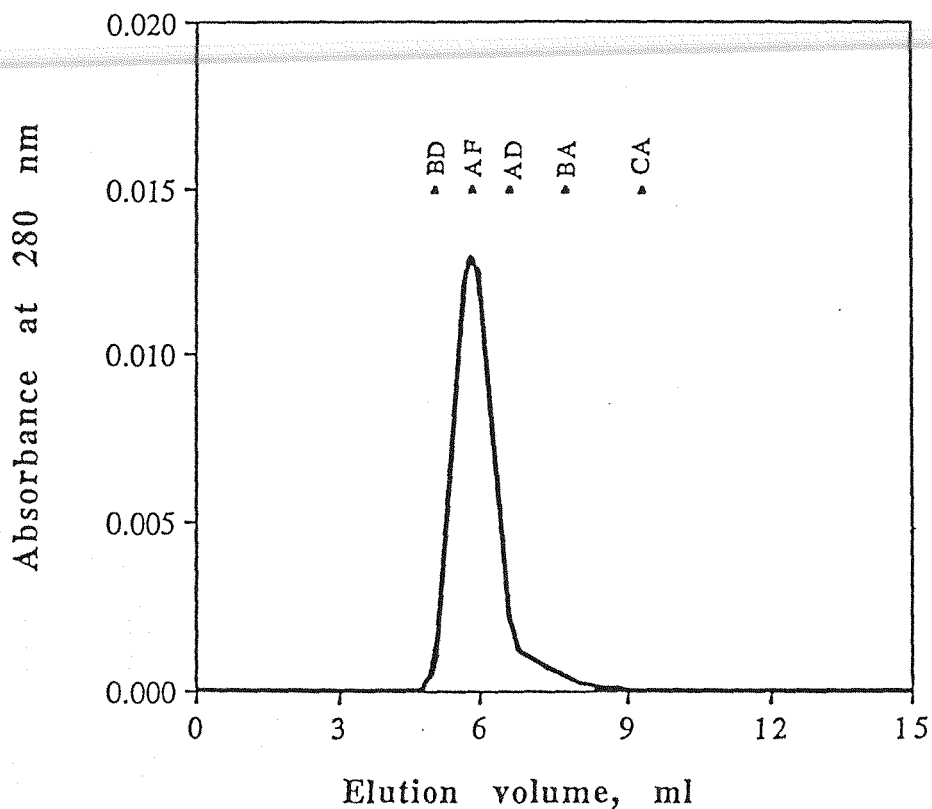


Figure 3. TSK-3000 SW gel filtration column chromatography of purified 22-kDa protein by HPLC. Molecular weight markers for the column included blue dextran (BD; $>2 \times 10$ Mr), apoferritin (AF; 443,000 Mr), alcohol dehydrogenase (AD; 150,000 Mr), bovine albumin (BA; 66,000 Mr), carbonic anhydrase (CA; 29,000).

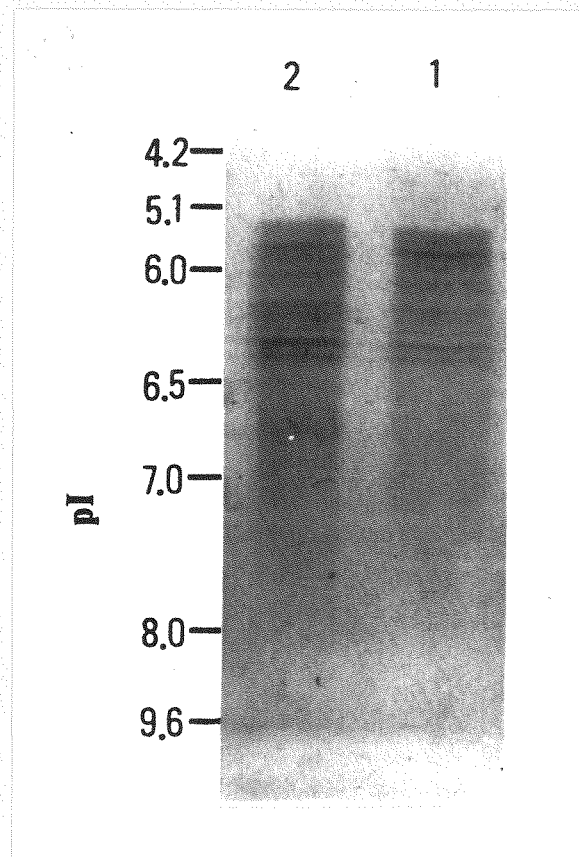


Figure 4. Isoelectric focusing of purified 22-kDa protein compared with rat liver ferritin. Lanes: 1, 22-kDa protein; 2, rat liver ferritin. IEF standards are listed on left.

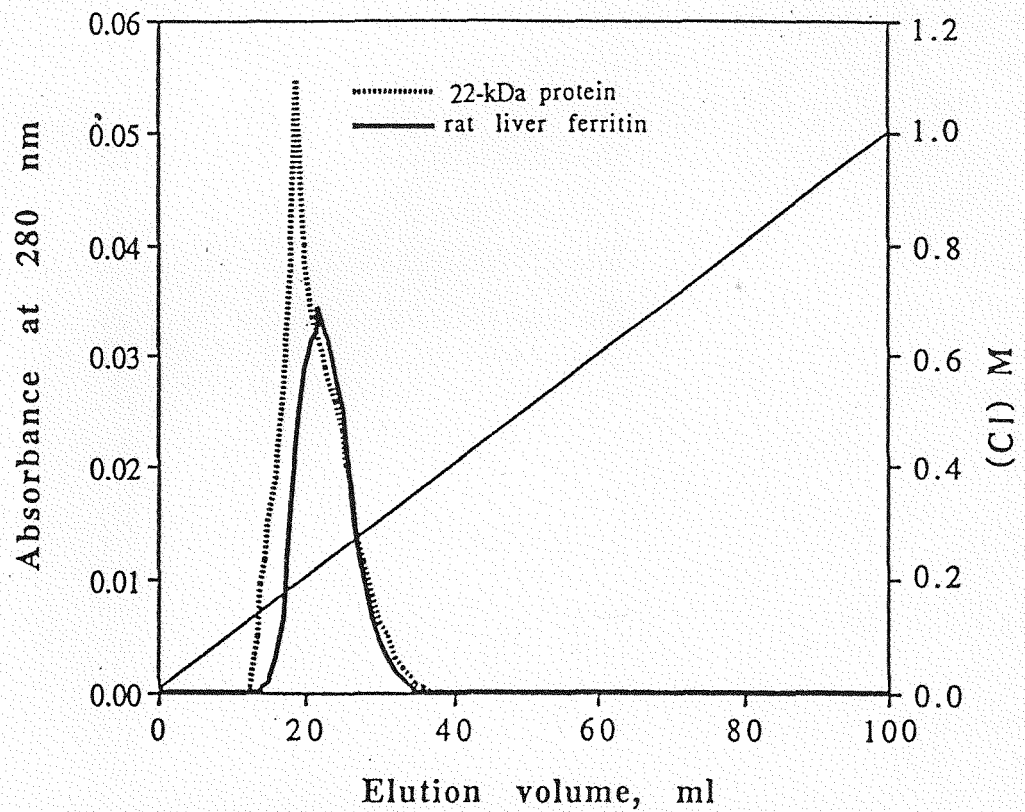


Figure 5. Anion exchange chromatography of the infiltrated macrophage ferritin compared with the liver ferritin. Samples were applied to NeoBar AQ column and eluted with a chloride gradient. Proteins were detected by UV monitor.

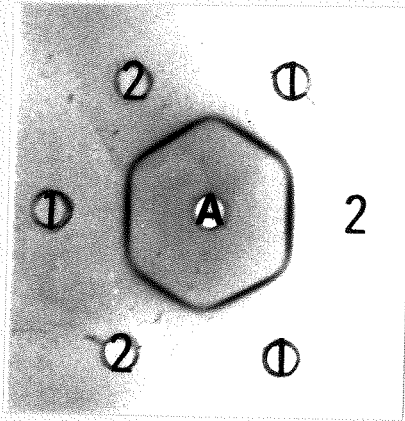


Figure 6. Ouchterlony gel diffusion of purified 22-kDa protein (1) and rat liver ferritin (2). The antibody used was anti-22-kDa protein antiserum



Figure 7. Immunoelectrophoresis in agarose gel of homogenous lung from *A. cantonensis* infected rats (1), and purified 22-kDa protein (2). Antibody through (arrow) contained antiserum to the 22-kDa protein. Proteins were stained with Amido Black.

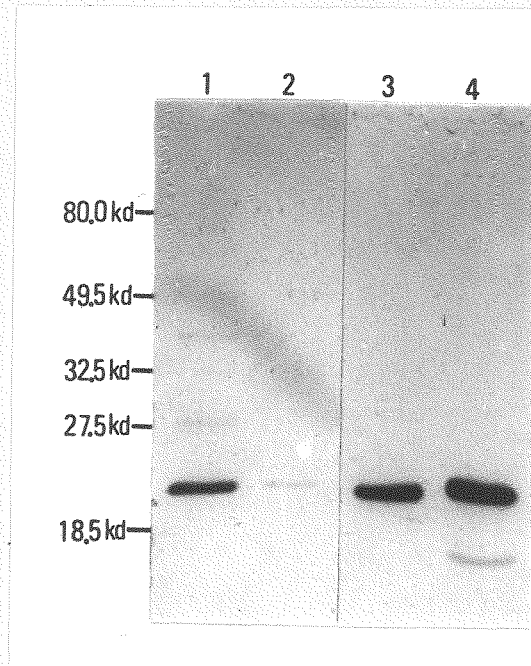


Figure 8. Immunoblotting of the 22-kDa protein. Lanes: 1, homogenous lung of *A. cantonensis* infected rats; 2, homogenous lung of normal rats; 3, purified 22-kDa protein; 4, rat liver ferritin. These proteins were immunostained with anti-22-kDa protein antiserum. Prestained molecular weight standards were run in parallel.

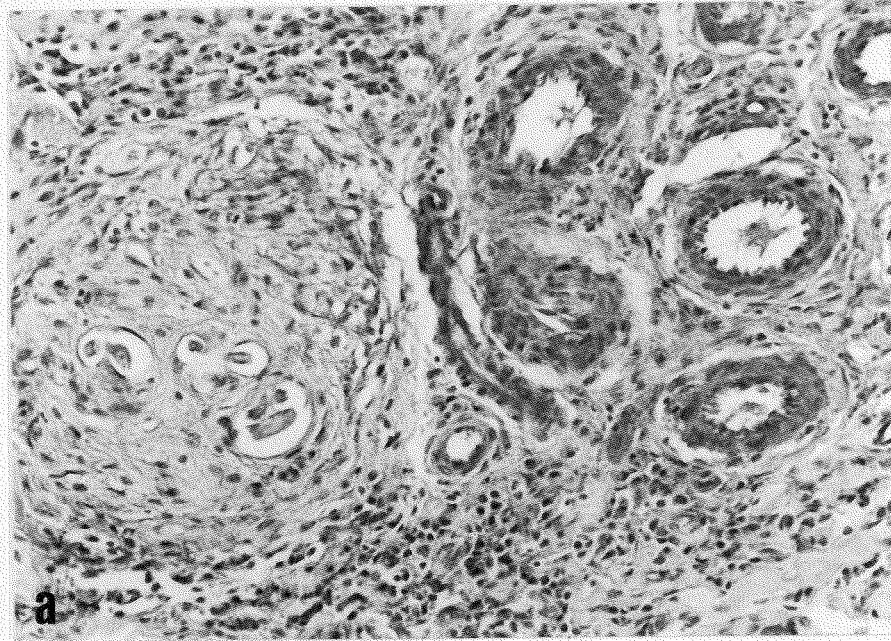


Figure 9a. *A. cantonensis* in the lung causing granuloma formation and vascular proliferation. HE \times 100

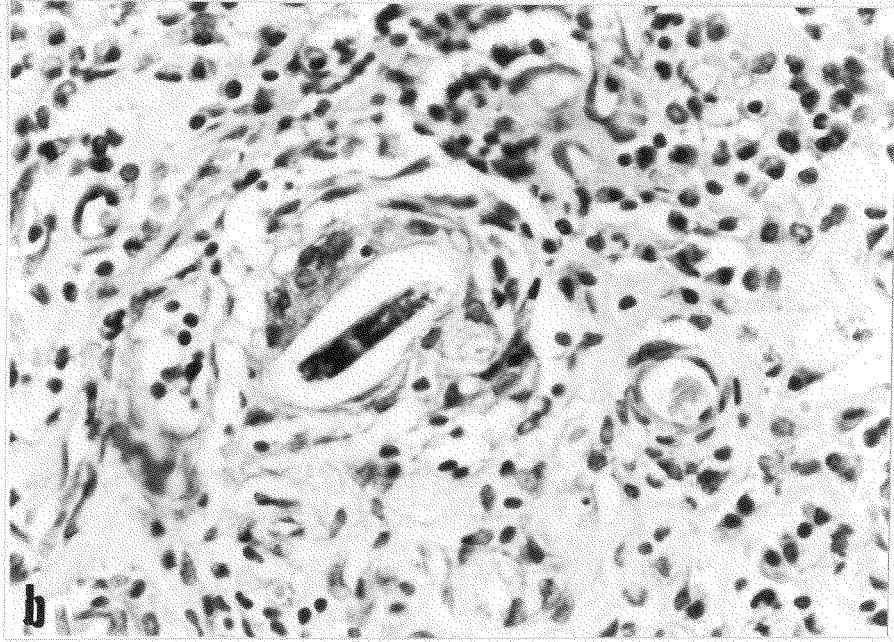


Figure 9b. Giant cell and macrophage are found around the *A. cantonensis*.
The parenchyma tissue of lung shows fibrotic change. HE \times 200

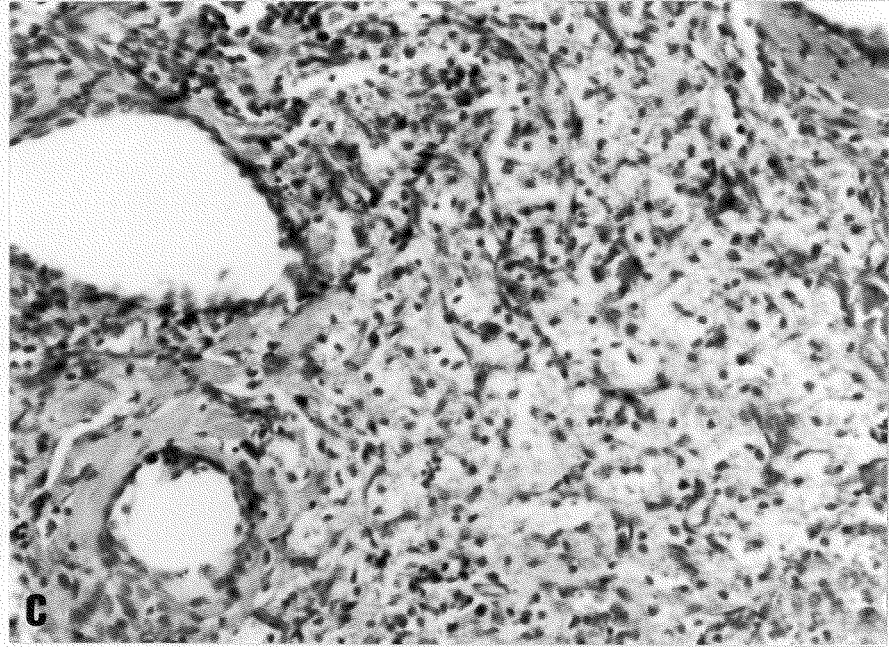


Figure 9c. Macrophage infiltration is noted near the proliferated blood vessels. HE \times 100

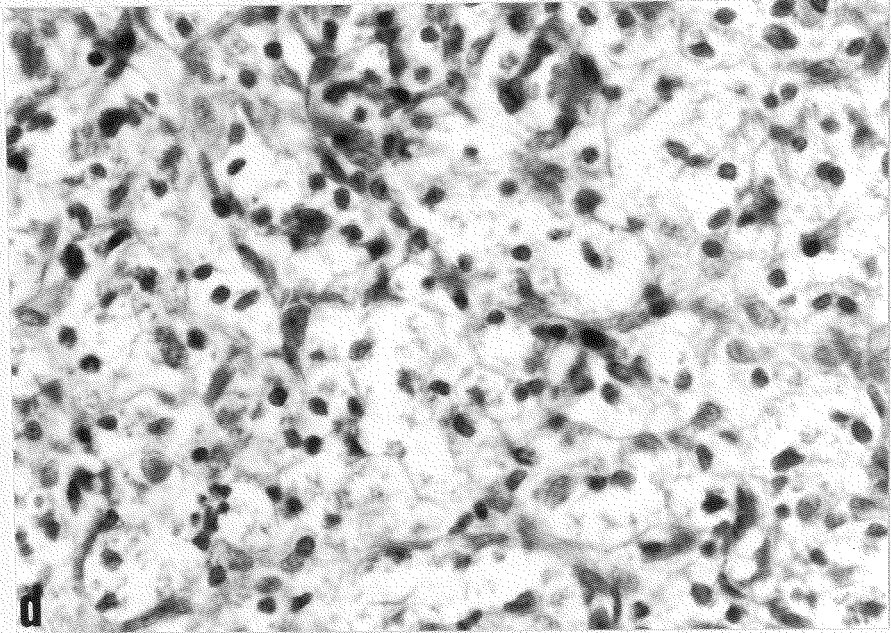


Figure 9d. Infiltrated macrophage contains clear cytoplasm with fine granules. HE \times 200

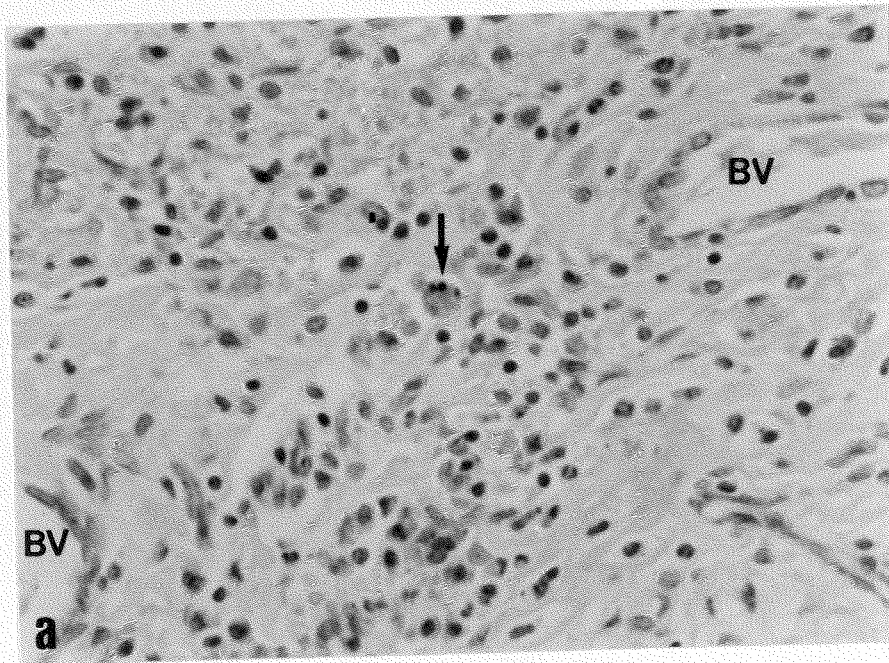


Figure 10a. Immunohistochemical distribution of ferritin in the lung of *A. cantonensis* infected rat. Macrophages next the blood vessels (BV) are positively stained (arrows). Ferritin/ABC-H staining $\times 50$

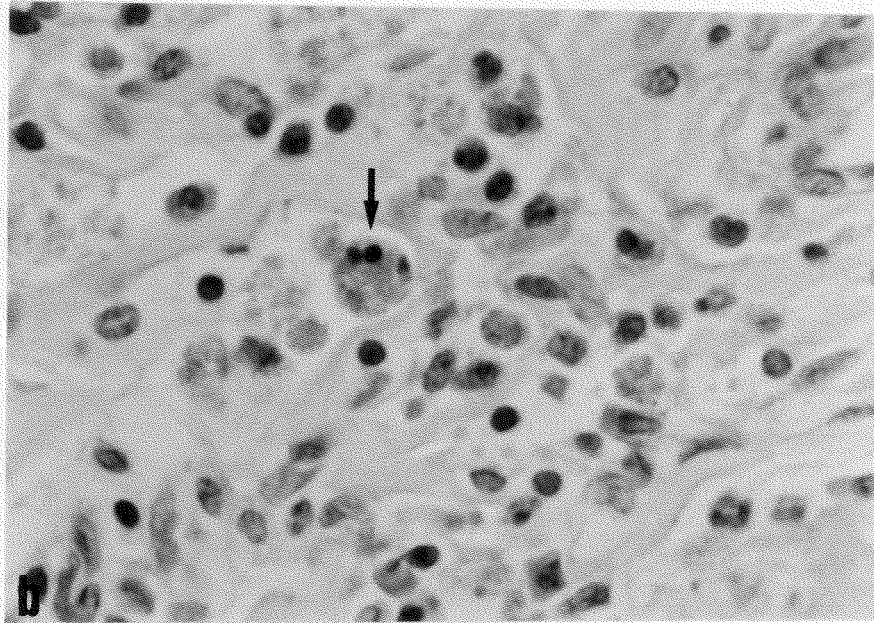


Figure 10b. Immunohistochemical distribution of ferritin in the lung of *A. cantonensis* infected rat. Macrophages infiltrating the lung of infected rat are positively stained (arrows). Ferritin/ABC-H staining $\times 200$.

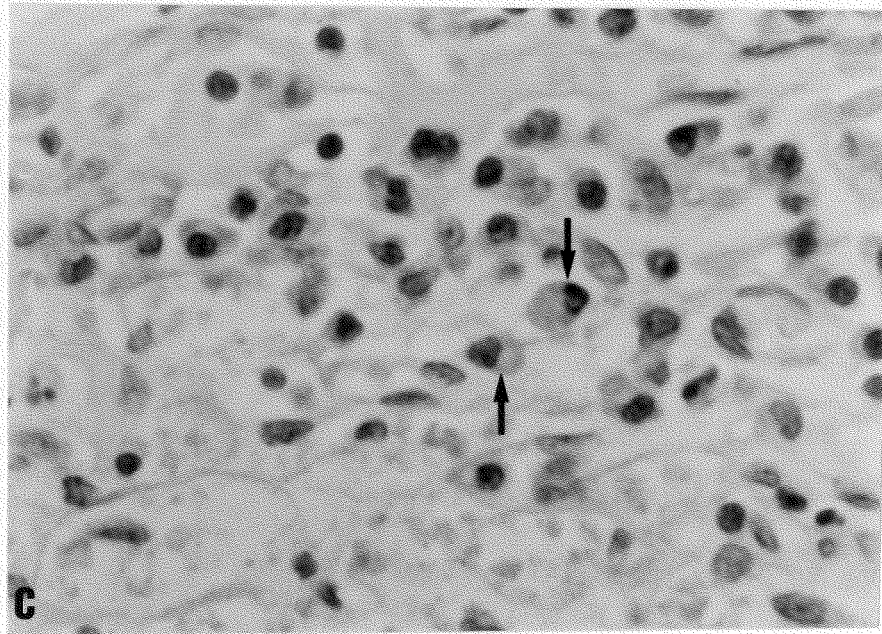


Figure 10c. Immunohistochemical distribution of ferritin in the lung of normal rat. Macrophages in the lung of normal rat are not stained.(arrows).Ferritin/ABC-H staining $\times 200$

參考文獻

- Aguas, A. P., Grande, N. R. and Carvalho, E. (1991) Inflammatory macrophages in the dog contain high amounts of intravesicular ferritin and are associated with pouches of connective tissue fibers. *American Journal of Anatomy*, 190(1): 89-96.
- Alicata, J. E. (1962) (Nematoda: Metastrongylidae) as a causative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. *Can. J. Zool.*, 40:5-8.
- Alicata, J. H. (1965) Biology and distribution of the lungworm *Angiostrongylus cantonensis* and its relation to eosinophilic meningitis and other neurological disorders of man and animals. In: *Advances in parasitology* Vol III. I. B. Dawes (ed.) , Academic Press Inc., London. New York. pp 223-248.
- Alicata, J. E. and Jindrak, K. (1970) Murine angiostrongylosis. In: Anderson H.H.(ed) *Angiostrongylosis in the Pacific and Southeast Asia*. Thomas, Springfield, III, pp 50-62
- Ambruso, D. R. and Johnston, R. B. (1981) Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.*, 41: 1628-36
- Andrews, P. (1965) The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96: 595-606.

- Arosio, P., Adelman, T. G. and Drysdale, J.W. (1978) On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J. Biol. Chem.*, 253: 4451-4458.
- Bacon, B. R., Tavill, A. S., Brittenham, G. M., Park, C. H. and Reckagel, R. D. (1983) Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *Journal of Clinical Investigation*, 71: 429-439.
- Beck, M. J., Cardina, T. M. and Alicata, J. E. (1980) Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in American Samoa. *Hawaii Med. J.*, 39: 254-257.
- Bennett, G. D. and Kay, M. M. B. (1981) Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp. Hematol.*, 9: 297-307.
- Bhaibulaya, M. (1975) Comparative studies of the life history of *Angiostrongylus mackerrasae* (Bhaibulaya, 1968) and *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). *Inter, J, Parasitol.*, 5: 7-20.
- Bomford, A., Conlon-Hollingshead, C. and Munro, H. N. (1981) Adaptive responses of rat tissue isoferritins to iron administration. *J. Biol. Chem.*, 256: 948-955.
- Bottke, W. (1985) Electrophoretic and immunologic studies on the structure of a mollusc ferritin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 325-334.

- Bottke, W., Burschlyk, M. and Volmer, J. (1988) On the origin of the yolk protein ferritin in snails. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 197(7): 377-382.
- Bowden, D. K. (1981) Eosinophilic meningitis in the New Hebrides: two outbreaks and two deaths. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 30: 1141-1143.
- Chang, P. K. and Cross, J. H. (1966) Eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: Report of a human infection and a new intermediate host. *J. Formosan Med. Assoc.*, 65: 637-638.
- Chen, H. T. (1933) A preliminary report on a survey of animal Parasites of Canton, China, rats. *Lingnan Sci. J.*, 12: 65-74.
- Chen, E. R., Hsieh, H. C. and Shih, C. C. (1971) First report on biological study of *Achatina fulica* (an Intermediate host of *A. cantonensis*) in south Taiwan. *J. Formosan Med. Assoc.*, 70: 364. (by title only)
- Chen, E.R. (1979) Angiostrongyliasis and eosinophilic meningitis on Taiwan: A review." *Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia*" edited by Cross, J.H. A special publication of the NAMRU-2, Taipei, Taiwan. pp 57-73.
- Chen, S. N. (1972) A Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rodents and snails on Pescadores Islands (Peng-hu). *Chinese J. Microciol.*, 5: 129.
- Chen, S. N., Lo, C. T., Lee, S. Y. and Liu, K. H. (1974b) *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Achatina fulica* from Taiwan. *Chinees J. Microbiol.*, 7: 62-63.

- Chiu, J. K. (1964) Snail hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in Taipen, Taiwan. Bull. Inst. Zool. Acad. Sin., 3: 55-62.
- Cross, J. H. (1967) Review of angiostrongyliasis in Taiwan. Seminar on helminthiases and eosinophilic meningitis. pp. 7, South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia.
- Cross, J. H. and Van Peenen, P. F. D. (1976) *Angiostrongylus cantonensis* in rats on Makung, Pescadores Islands. Chinese J. Microbiol., 9: 85-86.
- Cuckler, A. C., Egerton, J. R. and Alicata, J. E. (1965) Therapeutic effect of thiabendazole on *Angiostrongylus cantonensis* infected in rats. J. Parasitol., 51: 392-396.
- David, C.N. and Easterbrook, K. (1971) Ferritin in the fungus *Phycomyces*. J. Cell Biol., 48:15-28.
- Dietzel, J., Hirzman, J., Preis, D., Symmons, P. and Kunz, W. (1992) Ferritins of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms. Mol. Biochem. Parasitol., 50:245-254
- Dorner, M., Silverstone, A., Nishiya, K., de Sostoa, A., Munn, C. G. and de Sousa, M. (1980) Ferritin synthesis by human T lymphocytes. Science., 209: 1019-21.
- Dorner, M. H., Silverstone, A., de Sostoa, A., Munn, G., and de Sousa, M. (1983) Relative subunit composition of the ferritin synthesized by selected human lymphomyeloid cell populations. Exp. Hematol., 11(9): 866-872.

- Dougherty, E. C. (1946) The genes *Aelurosteongylus* Cameron, 1927 (Nematoda: Metastrongyloidea), and its relatives; with the description of *Parafilaroides*, gen. nov., and *Angiostrongylus gubernaculatus*, sp. nov. Proc. helminth Soc. Wash., 13: 16-25.
- Ersfeld, K. and Craig, P. S. (1995) Cloning and immunological characterisation of *Echinococcus granulosus* ferritin. Parasitol. Res., 81: 382-387.
- Fahmy, M., and Young, S. P. (1993) Modulation of iron metabolism in monocyte cell line U937 by inflammatory cytokines; changes in transferrin uptake, iron handling and ferritin mRNA. Biochem. J., 1296: 175-181.
- Haber, F. and Weiss, J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. Roy. Soc., London. Series A. 147:332-351.
- Hayashi, M., Terada, M., Ishii, A. I., Kino, H. and Sano, M. (1982) Studies on chemotherapy of parasitic helminths (XIV). Anthelmintic effect of mebendazole on *Angiostrongylus cantonensis* in rats. Jap. J. Parasitol., 31: 575-580.
- Heusterspreute, M. and Crichton, R. R. (1981) Amino acid sequence of horse spleen apoferritin. FEBS Lett. 129, 322-327.
- Hoy, T. G., and Jacobs, A. (1981) Changes in the characteristics and distribution of ferritin in iron-loaded cell cultures. Biochem. J., 193: 87-92.

- Hsieh, H. C. (1959) Outline of Parasitic Zoonoses in Taiwan. Formosan Science, 13: 99-109.
- Huang, W. H., Cheng, K. H. and Chang, I. H. (1964) The rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) found in human eye in Taiwan. J. Formosan Med. Assoc., 63: 598.
- Hung, T. P. and Chen, E. R. (1988) Angiostrongyliasis (*Angiostrongylus cantonensis*), In " Handbook of clinical neurology" Edited by Vinken, P. J., Bruyn, G. W., Klawans, H. L. p 545-562. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York.
- Hwang, K. P., Chen, E. R., Yen, C. M., Hsieh, H. C. and Shih, C. C. (1986) An outbreak of angiostrongyliasis cantonensis in a family in Taiwan, Pro. Sino-Japanese Sym. Parasitic Zoonosis, 165-171.
- Hwang, K. P. and Chen, E. R. (1988) Larvicidal effect of albendazole against *Angiostrongylus cantonensis* in mice. Am. Trop. Med. Hyg., 39(2): 191-195.
- Ishii, A. I., Terada, M., Kino, H. and Sano, M. (1983) Studies on chemotherapy of parasitic helminths: effects of avermectin B_{1a} on *Angiostrongylus cantonensis* in rats. Int. J. Parasitol., 13: 491-498.
- Ishii, A. I., Terada, M. and Sano, M. (1985) Studies on chemotherapy of parasitic helminths (XXIII) effects of ivermectin on *Angiostrongylus cantonensis* in rats. Jpn. J. Parasitol., 34: 411-417.
- Jindrak, K. (1968) Early migration and pathogenicity of *Angiostrongylus cantonensis* in laboratory rats. Ann. Trop. Med. Parsitol., 62: 506-517.

- Jindrak, K. and Alicata, J. E. (1968) Comparative pathology in experimental infection pigs and calves with larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. J. Comp. Pathol., 78: 371-382.
- Jindrak, K. and Alicata, J. E. (1969) Effect of *l*-tetramisole on *Angiostrongylus cantonensis* infection in rats. Chemotherapia, 14: 244-252.
- Jindrak, K. (1970) The pathology of intracranial angiostrongyliasis in rats. J. Comp. Pathol., 80: 287-97.
- Jindrak, K. and Alicata, J. E. (1970) Experimentally induced *Angiostrongylus cantonensis* infection in dogs. Am. J. Vet. Res., 31: 449-456.
- Kay, M. M. (1980) Cells, signals and receptors: the role of physiological auto-antibodies in maintaining homeostasis. Adv. Exp. Med. Biolchem., 129: 171-200.
- Keyser, J. W. (1972) Immunoelectrophoresis-application and recent developments. Chemistry in Britain, 8: 480-483.
- Khogo, Y., Yokota, M. and Drysdale, J. W. (1980) Differential turnover of rat liver isoferritins. J. Biol. Chem., 225: 5195-5120.
- Konijn, A. M. and Hershko, C. (1977) Ferritin synthesis in inflammation .
1. Pathogenesis of impaired iron release. Br. J. Haematol., 37: 7-15.
- Konijn, A. M., Carmel, N. and Lery, R. (1981) Ferritin synthesis in inflammation. Mechanism of increased ferritin synthesis. Br. J. Haematol., 49: 361-70.

- Kuntz, R. E. and Myers, B. J. (1964) The lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, of rodents on Taiwan (Formosa) and the offshore islands. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 13: 686-692.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-684.
- Lammler, G. and Weidner, E. (1975) Larvicidal activity of anthelmintics against *Angiostrongylus cantonensis*. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr., 88: 152-156.
- Lee, H. H., Shyu, L. Y. and Terada M. (1995) In vitro effects of VD-99-11 on *Angiostrongylus cantonensis* and isolated frog rectus. Parasitol. Res., 81: 615-621.
- Lim, B. L. and Ramachandran, C. P. (1979) Ecological studies on *Angiostrongylus malaysiensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in Malaysia. In: J. H. Cross (Ed.), Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia. Taipei, Taiwan. U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, NAMRU-2-SP-44: 26-48.
- Mackerras, M. J. and Sandars, D. F. (1955) The life history of the rat lung-worm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: Metastrongylidae), Austr. J. Zool., 3: 1-21.
- Maki, J. and Yanagisawa, T. (1983) A comparison of the effects of flubendazole and thiabendazole on the larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Trichinella spiralis*, *Diphyllobothrium erinacei* and *Hymenolepis nana* in mice. Parasitol., 87: 525-531.

- Matsumoto, T. (1937) Nematode found in lung, especially in the pulmonary artery of the wild rat. *Taiwan Igakai Zasshi*, 36: 32-35.
- Munro, H. N. and Linder, M. C. (1978) Ferritin structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiological Rev.*, 58: 317-396.
- Munro, H. N., Aziz, N., Leibold, E. A., Murray, M., Rodgers, J., Vass, J. K. and White, K. (1987) The ferritin genes: structure, expression, and regulation. In: Weintraub LR, Edwards CQ, Krikker M (eds) *Hemochromatosis*. New York Academy of Sciences, New York, pp 113-123.
- Nichol, H. and Locke, M. (1989) The characterization of ferritin in an insect. *Insect. Biochem.*, 19: 587-602.
- Nishimura, K. (1965/66) Experimental studies on the chemotherapy of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, in rats. *Chemotherapia*, 10: 164-175.
- Nomura, S. and Lin, P. H. (1945) The first human case infected with *Haemostrongylus ratti* Yokogawa. *Taiwan No Ikai*, 3: 589-592.
- Otsuru, M., Sekikawa, H., Sato, Y., Chiba, K., Suzuki, T., Wang, L. Y., Lee, S. Y. and Tseng, P. T. (1976) Epidemiological survey on angiostrongyliasis in Taiwan (2). *Jap. J. Parasit.*, 25: 84.
- Otsuru, M. (1977) *Angiostrongylus cantonensis*. In: *Animals of medical importance in the Nansei Islands in Japan*. Sasa, M., Takahasi, H., Kano, R. and Tanaka, H. (eds.) Shinjuku Shobo Ltd., Tokyo. pp 343-374.

- Otsuru, M. (1979) *Angiostrongylus cantonensis* and angiostrongyliasis in Japan. In: Cross, J. H. (Ed.), Studies on angiostrongyliasis Eastern Asia and Australia. Taipei, Taiwan, U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, NAMRU-2-SP-44, 74-117.
- Peters, T. J., O'Connell, M. J., and Ward, R. J. (1985) Role of free-radical mediated lipid peroxidation in pathogenesis of hepatic damage by lysosomal distrution. Free Radicals in Liver Injury. Oxford: IRL Press 107-115.
- Powell, L. W., Alpert, E., Isselbacher, K. J. and Drysdale, J. W. (1974) Nature, 250: 333-335.
- Prociv, P. and Brindley, P. J. (1984) Eosinophilic meningoencephalitis. Med. J. Aust., 141: 319.
- Punyagupta, S., Butang, T., Juttijudata, P and Rosen, L. (1970) Eosinophilic meningitis in Thailand: epidemiologic studies of 484 typical cases and the etiologic role of *Angiostrongylus cantonensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19:950-958.
- Ragland, M., Briat, J. F., Gagnon, J., Laulhere, J. P., Massenet, O. and Theil, E. C. (1990) Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. J. Biol. Chem., 265:18339-18344.
- Rosen, L., Laigret, J. and Bories, S. (1961) Obesrvations on an outbreak of eosinophilic meningitis on Tahiti, French Polynesia. Am. J. Hyg., 74: 26-42.

- Rosen, L., Loison, G., Laigret, J. and Wallace, G. D. (1967) Studies on eosinophilic meningitis. 3. Epidemiologic and clinical observations on Pacific islands and the possible etiologic role of *Angiostrongylus cantonensis*. Am. J. Epidemiol., 85: 17-44.
- Sano, M., Terada, M., Dharejo, A. M. and Ishii, A. I. (1986) In vitro effects milbemycin D on *Angiostrongylus cantonensis* and *A. costaricensis*. Jpn. J. Parasitol., 35: (1: Suppl.) 21.
- Sonakul, D. (1978) Pathological findings in four cases of human angiostrongyliasis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 9: 220-227.
- Terada, M., Ishii, A. K., Dharejo, A.M., Hayashi, M. and Sano, M. (1987) Studies on Chemotherapy of Parasitic Helminths (XXVIII). *In vivo* Efficacy of Milbemycin D against Larval Stages of *Angiostrongylus cantonensis* and *A. costaricensis*. Jpn. J. Parasitol., 36(1): 24-29.
- Towbin, H. and Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. Journal of Immunological Methods, 72: 313-340.
- Tsugita, A. and Yariy, J. (1985) Preliminary results for the primary structure of bacterioferritin of *E. coli*. Biochem. J., 231: 209-212.
- Wagstaff, M., Worwood, M. and Jacobs, A. (1978) Properties of human tissue isoferritins. Biochem. J., 173: 969-77.
- Wen, Y. F. (1973) Distribution patterns of *Angiostrongylus cantonensis* in *Achatina fulica*. Chinese J. Microbiol., 6: 116-121.

- Wesselius, L. J., Flowers, C. H. and Skikne, B. S. (1992) Alveolar macrophage content of isoferritins and transferrin. Comparison of nonsmokers and smokers with and without chronic airflow obstruction. *American Review of Respiratory Disease*, 145, 311-316.
- Whiting, R. F., Wei, L. and Stich, H. F. (1981) Chromosomedamaging activity of ferritin and its relation to chelation and reductions of iron. *Cancer Res.*, 41:1628-36
- Worwood, M., Dawkins, S., Wagstaff, M. and Jacobs, A. (1976) The purification and properties of ferritin from human serum. *Biochem. J.*, 157: 97-103.
- Yang, S., Yu, B., Chen, Y., Hu, Q., Zhu, S., Wang, X. and Wang, D. (1984) A clinical study on the first case of human angiostrongyliasis cantonensis recovered in China Mainland (in Chinese, English abstract). Case report, People's Republic of China. Paper also presented at: Congress of Chinese Medical Association on Snail-Borne Parasitic Diseases.
- Yii, C. Y., Chen, C. Y., Fresh, J. W., Chen, T. and Cross, J. H. (1968) Human angiostrongyliasis involving the lungs. *Chin. J. Microbiol.*, (Taipei) 1: 148-150.

- Yii, C. Y., Chen, C. Y., Chen, E. R., Hsieh, H. C., Shih, C. C., Cross, J. H. and Rosen, L. (1975) Epidemiologic studies of eosinophilic meningitis in Southern Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24 : 447-454.
- Yii, C. Y. (1976) Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25: 233-249.
- Yokogawa, S. (1937) A new species of nematode found in the lungs of rats *Haemostrongylus ratti* n. sp. *Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa.*, 27: 247-250.
- Yoshimura, K., Sugaya, H. and Ishida, K. (1994) The Role of Eosinophils in *Angiostrongylus cantonensis* Infection. *Parasitology Today*, 10(6): 231-233.