

家畜の糞線虫の消化管からの排除における
粘膜型肥満細胞の役割

(研究課題番号 07660405)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金 (基盤研究C2)

研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 堀井洋一郎
(宮崎大学農学部助教授)

はしがき

糞線虫属には多くの種類があり、この寄生虫による疾病は獣医学領域においても重要である。近年わが国において乳頭糞線虫 *Strongyloides papillosus* に起因する子牛の突然死が数多く報告され、新たな問題が提起されている。このような消化管寄生虫の宿主腸管からの免疫学的排除については古くから多くの研究がなされているがいまだ定説は得られていない。ここ数年、腸管からの寄生虫の排除には IL-3 依存性に増殖する粘膜型肥満細胞 (MMC) が関与する *S. ratti* 感染のような系と、杯細胞からの粘液が関与する *Nippostrongylus brasiliensis* のような系とがあることが、マウス、ラット等の実験動物を用いて示された。最近われわれはスナネズミに *S. ratti* や *N. brasiliensis* を感染させると *S. ratti* は正常に排除されるにもかかわらず、*N. brasiliensis* はまったく排除されないことを見出した。ラットに寄生する別種の糞線虫 *S. venezuelensis* を感染させた場合にもやはり排虫は見られなかった。これら3種の腸管寄生線虫感染時にスナネズミの小腸粘膜内に増加する肥満細胞はすべてホルマリン固定で染色性を失わず、ヘパリンをプロテオグリカンとして含有しており、いわゆる結合組織型 (CTMC) の特性を示した。また、マウスやラットの MMC に特徴的にみられる腸管上皮内への侵入はまったくみられず、少なくともネズミ類の2種の糞線虫の排除には MMC が必要であることがわかった。このことからスナネズミはヌードマウスや β/β^0 マウスと並んで MMC 欠損動物として寄生虫の腸管からの排除機構を調べるモデル動物として利用可能なことがわかった。

一方、ブタやウシのような動物で実際に糞線虫の排除のメカニズムを詳細に検討することは容易ではない。しかし、肥満細胞欠損動物である上記のような実験小動物を使うことにより、各種糞線虫の排除における粘膜型肥満細胞の役割や肥満細胞以外の消化管粘膜における排除機構の利用法を明らかにできると考える。我々はこれまでに粘膜型肥満細胞や硫酸基に富む酸性のムチンがネズミの糞線虫の排除に有効であり、動物や寄生虫の種類の組み合わせの違いによりこれらの機構を使い分けている可能性を示してきた。したがって、すでに知られているマウスやラット以外の動物の糞線虫の排除機構を検討することは、寄生虫排除機構の多様性と共通性を整理する上で非常に重要な課題であると考え本研究は実施された。

研究組織

研究代表者 : 堀井洋一郎 (宮崎大学農学部助教授)

研究分担者 : 牧村 進 (宮崎大学農学部教授)

研究経費

平成7年度 1、500千円

平成8年度 800千円

計 2、300千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. 堀井洋一郎、石川直人、名和行文： 寄生虫感染と免疫。臨床免疫、27、718-728、1995.
2. MURAKUMO, Y., IDE, H., ITOH, H., TOMITA, M., KOBAYASHI, T., MARUYAMA, H., HORII, Y. & NAWA, Y.: Cloning of the cDNA encoding mast cell tryptase of Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*, and its preferential expression in the intestinal mucosa. *Biochemical Journal*, 309, 921-926, 1995.
3. TIURIA, R., HORII, Y., MAKIMURA, S., ISHIKAWA, N., TSUCHIYA, K. & NAWA, Y.: Effect of testosterone on the mucosal defence against intestinal helminths in Indian soft-furred rats, *Millardia melitana* with reference to goblet and mast cell responses. *Parasite Immunology*, 17, 479-484, 1995.
4. ITOH, H., MURAKUMO, Y., TOMITA, M., IDE, H., KOBAYASHI, T., MARUYAMA, H., HORII, Y. & NAWA, Y.: Cloning of the cDNAs for mast-cell chymases from the jejunum of Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, and

their sequence similarities with chymases expressed in the connective-tissue mast cells of mice and rats. *Biochemical Journal*, 314, 923-929, 1996.

5. OKADA, M., NAWA, Y., HORII, Y., KITAMURA, T. & ARIZONO, N.:
Development of basophils in Mongolian gerbil. Formation of basophilic cell clusters in the bone marrow after *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Laboratory Investigation*, 76, 89-97, 1997.
6. TATEISHI, M., HORII, Y., MARUYAMA, H., NAWA, Y., TSUCHIYA, K. & MAKIMURA, S.: Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure parasite-specific antibodies of Indian soft-furred rats, *Millardia melitana*. *Journal of Veterinary Medical Science*, (in press).

(2) 口頭発表

1. 名和行文、伊藤浩史、井手久満、村雲由子、堀井洋一郎：スナネズミとマウスの肥満細胞プロテアーゼ cDNA の比較検討 (2) 肥満細胞キマーゼについて。第12回日本疾患モデル学会。平成7年11月18日。
2. 堀井洋一郎：消化管内寄生線虫の排除における粘膜型肥満細胞と杯細胞の役割。第121回日本獣医学会。平成8年4月2日。
3. 山中篤志、堀井洋一郎、牧村 進、浦 重義、垣平博臣：スナネズミ腸管内への乳頭糞線虫の外科的移入により引き起こされる麻痺性イレウス。第123回日本獣医学会。平成9年4月2日。

(3) 出版物

1. 堀井洋一郎、丸山治彦、名和行文：Bio Defence シリーズ1。ヒトと動物のディフェンス - 巧妙な異物との戦い -、菜根出版、平成8年3月22日。

研究成果

1. スナネズミ肥満細胞プロテアーゼの分子生物学的解析

スナネズミ小腸粘膜の肥満細胞の性状は他の齧歯類と比べて非常にユニークなものであり、ヘパリンを持ち、粘膜上皮層内への侵入像もみられない。また *S. venezuelensis* に対する再感染防御能を調べたところ、体内移行期幼虫に対する再感染防御は完璧に作動しているにもかかわらず、腸管内に移入された成虫に対してはまったく防御がみられなかった。この事実はスナネズミにおいては糞線虫属寄生虫に対するエフェクター、すなわち MMC が正常に作動していないことを示している。そこで、スナネズミの肥満細胞亜群の性質をさらに詳細に調べる目的で、肥満細胞プロテアーゼ cDNA のクローニングを行ったところ、スナネズミ小腸からトリプターゼと 2 種類のキマーゼの cDNA を得ることができた。その配列と発現部位をマウスやラットの CTMC や MMC のプロテアーゼと比較してみたところ、スナネズミ小腸粘膜からクローニングされた肥満細胞プロテアーゼはいずれもラット、マウスの CTMC 型に相当するものが発現されていることが判明した。RNA ブロットの結果ではスナネズミの場合、皮膚・粘膜共に同じ肥満細胞プロテアーゼが検出され、プロテアーゼによる亜群の同定は困難であった。この一連の成果により、マウスやラットでは CTMC、MMC という明確な肥満細胞亜群が存在するのに対して、スナネズミの場合にはその両者の性格は非常に良く似ていた。このようなスナネズミ肥満細胞の特質のうち、いずれが糞線虫排除能の欠損と関連しているのかについて、今後さらに研究の必要がある。

2. *Strongyloides stercoralis* の排除における粘膜型肥満細胞の関与

イヌの小腸より回収した *S. stercoralis* 成虫を W/W^v マウスと対照の $+/+$ マウスの十二指腸に外科的に移入し虫体に排除にかかる期間を比較したところ、*S. stercoralis* の排除には肥満細胞欠損の W/W^v マウスの方が $+/+$ マウスより明らかに腸期間を要した。また、C57BL/6 マウスにあらかじめ IL-3 を投与し、粘膜型肥満細胞を増加させてから同様に移入すると、対照マウスに比べて、明らかに寄生数が減少した。これらのことから

ら、*S. stercoralis* の排除には *S. ratti* や *S. venezuelensis* と同様に粘膜型肥満細胞の関与が強く示唆された。この結果は現在投稿中である。

3. 乳頭糞線虫 (*Strongyloides papillosus*) の排除における粘膜型肥満細胞の関与

S. stercoralis 同様、*S. papillosus* 成虫を W/W^m マウスと対照の +/+ マウスの十二指腸に外科的に移入し虫体に排除にかかる期間を比較したところ、両者の間に全く差は認められず、非常に短期間のうちに排除された。糞線虫の排除には、粘膜型肥満細胞のみでなく、硫酸基を多く含む酸性ムチンもエフェクターとして関与することから、ムチンの性状のことなるハムスター、スナネズミ、マウス、ラット等の齧歯類の小腸内に同様に移入を試みた。この結果、*S. papillosus* 成虫は酸性ムチンを持つハムスターには多数の寄生が成立したが、比較的中性のムチンを持つマウス、ラットにはほとんど寄生しなかった。しかし、同じく中性のムチンを持つスナネズミには、ハムスターと同程度の高い寄生率を示した。このことから、*S. papillosus* の排除には他の糞線虫と異なる基序の存在も考えられた。

4. 乳頭糞線虫 (*Strongyloides papillosus*) の腸管内移入による麻痺性イレウスの発生

S. papillosus をスナネズミ小腸内に外科的に移入すると、排便の抑制が起こり死亡することが観察された。そこで、排便抑制の機序を知るために以下の実験を行った。それぞれ100, 300, 600, 900隻の*S. papillosus* 成虫をスナネズミ（各群5匹以上）に移入し、経時的に排便の状況を観察した。100隻を移入した群では、虫卵検査により*S. papillosus* の寄生は確認されたが、排便の抑制、死亡ともに観察されなかった。300隻を移入した群では3～4日後に77.8%の個体で排便抑制がみられ、その後死亡した。600および900隻を移入した群では全ての個体で数日後に排便抑制が認められ、全頭死亡した。また、300隻を移入した翌日に駆虫を行い経時的に排便の観察を行ったところ、すべての個体で排便の抑制は見られず、死亡した個体もなかった。*S. papillosus*

移入後、排便抑制が確認されてからでも駆虫を行うと、8匹中3匹で排便が再開し回復した。排便が抑制された個体を開腹してみると、control群と較べて小腸は虚脱しており、盲腸、大腸内に内容物が溜まり著しく膨満していた。しかし、これらの個体での*S. papillosus* の寄生部位は殆ど小腸上部1/3に限局していた。また、機械的な閉塞は腸管全域にわたり認められなかった。腸管各部の組織学的検索においても著変は認められなかった。バリウムの胃内投与により経時的に消化管造影を行ってみると、control群では、胃から盲腸までのバリウムの平均通過時間が5時間であるのに対し、排便が抑制された5匹中3匹では胃から小腸への通過が全くみられなかった。以上の結果より、スナネズミ小腸上部における*S. papillosus* の寄生が何らかの原因となり、寄生数依存性に腸管の蠕動運動が抑制されるものと推定される。その結果麻痺性のイレウスが引き起こされ、宿主が死に至るものと考えられる。これらの詳細なメカニズムはまだ不明であるが、肉眼的、組織学的に著変が認められない点、糞線虫の寄生数に依存して麻痺が発生する点など、ウシにおいてみられる*S. papillosus* に起因すると考えられている心臓突然死と共通点も多くみられる。このことから、スナネズミとウシで発現部位は異なるものの、例えば寄生虫が迷走神経に影響を与え、神経性の障害を両者に引き起こしているようなことも考えられる。そうしてみると、一見全く異なった症状に見えるこれらの現象にも共通の機序が介在している可能性もある。したがって、スナネズミにおける*S. papillosus* による麻痺性イレウスの発症モデルはウシにおける突然死の機序解明に役立つ可能性があると考えられる。これらの結果も現在投稿準備中である。