

小形条虫に対する宿主マウスの感染阻止能の研究

I. 正常マウスへの passive transfer と それに関与する細胞の性質

浅野 和 仁 篠田 み ゆ き
中 村 文 規 岡 本 謙 一

(昭和59年9月11日 受領)

Key words: *Hymenolepis nana*, BALB/c mouse, passive transfer, protective immunity, vinblastine

小形条虫虫卵の経口投与により初感染を受けたマウスでは、再度の虫卵による経口感染が極めて早期に阻止される (Heyneman, 1962, 1963). しかも、このような強力な感染阻止能は、終生免疫と称されるほど長期間マウス体内で存続している。一方、著者ら (1982) がヌードマウスを受容者として行った阻止能の移入実験の結果は、初感染後4日目に供与マウスから採取した腸間膜リンパ節細胞は阻止能の移入に有効であるのに対し、21日目の細胞は効果のないことを示した。また、初感染4日目の腸間膜リンパ節細胞を抗 Thy-1.2 抗血清と補体で処理することにより阻止能移入の効果が消退する (浅野ら、未発表) ことから、未感染ヌードマウスへの感染阻止能の移入に寄与している細胞は、小形条虫感染後21日以内に消失する性質のT細胞であることが示唆される。しかしながら、阻止能の移入に寄与している細胞のより詳細な性質については検討されていない。

今回、受容マウスとして正常マウスを用いた時の阻止能移入の可否、感作細胞の移入を受けた受容マウス体内における阻止能の持続期間について検討を加えた。さらに、供与マウス体内における阻止能の移入に寄与している細胞の動態を調べるとともに、細胞の分裂を阻害すると言われている vinblastine (Valeriote and Bruce, 1965) を注射した供与マウスから採取した4日目腸間膜リンパ節細胞による阻止能の移入実験等、阻止能の移入に寄与している細胞の性質を探るためのいくつかの実験を行ったので報告する。

材料と方法

実験動物：感染阻止能の移入実験には、感作細胞の供与者として5～6週齢の BALB/c 系雄マウスを、受容者として4週齢の同系雄マウスを使用した。小形条虫虫卵は、当教室で direct cycle により維持されている虫体の受胎節より集め、投与の直前に Berntzen and Voge (1965) の方法により卵殻を除去したものである。小形条虫 cysticeroid は、Voge (1964) の方法に準じて虫卵を経口摂取させた甲虫 (*Tribolium* sp) の体内より生理的食塩水中に洗い出したものである。

抗血清：抗 Thy-1.2 抗血清 (Miles-yeda, Ltd., Lot No. M-16) は、32倍の希釈時に BALB/c 系マウスの腸間膜リンパ節細胞に対して、45.2%の cytotoxicity を示した。この抗血清を -80°C に保存し、実験に際しては、Medium 199で10倍に希釈したものをを用いた。

補体：cytotoxic test に用いた補体はモルモットより得た血清を Cohen and Schleginger (1970) の方法に従い血清中に含まれる可能性のあるマウスT細胞に対する自然抗体を吸収したものである。

vinblastine：vinblastine (塩野義) は、滅菌蒸留水に溶解後直ちに $5\mu\text{g/g}$ (Mcgregor and Logie, 1973) をマウスの尾静脈内に注射した。

感作の方法及び感作細胞浮遊液の調整：BALB/c 系マウスに1,000個の小形条虫卵あるいは500個の cysticeroid を経口投与し、感作した。

移入用の感作細胞浮遊液は、感作後4日目、6日目または10日目のマウスの腸間膜リンパ節から、また、Thy-1.2 陽性細胞数の推移を追跡するための感作細胞浮遊

液は、感作後経日的にマウスの腸間膜リンパ節から、それぞれ既報（浅野ら，1982）の方法により採取した細胞を Medium 199 中に浮遊させ、調整したものである。

感作細胞の移入と感作阻止能の判定：感作細胞の移入数は、1回の注射につき 5×10^7 個あるいは 7.3×10^7 個であった。注射は48時間おきに3回マウスの尾静脈内に行った。尚、感作細胞は採取後2時間以内に注射した。

感染阻止能移入の成否の判定は、前報（浅野ら，1982）と同様の方法により行った。

Thy-1.2 陽性細胞の検出：Thy-1.2 陽性細胞数は、マウスより前記の方法で調整した細胞浮遊液を用いて cytotoxic test により計数した。

実際には、血球計算盤上で100個の細胞を数え、抗血清と補体の添加により死滅した細胞数から抗血清を欠いた対照において死滅した細胞数を減じたものを Thy-1.2 陽性細胞とし、細胞100個に占める Thy-1.2 陽性細胞の割合を求め同時に計数した総細胞数より Thy-1.2 陽性細胞数を算定した。

結果

1) 小形糸虫感染マウスにおける Thy-1.2 陽性細胞数の経日的変動

小形糸虫虫卵1,000個を経口投与した BALB/c 系マウスを感染後2, 4, 6, 11, 21, 31日目に殺し、腸間膜リンパ節に含まれる Thy-1.2 陽性細胞数を計数した。マウスは実験群10匹、対照群6匹とした。結果は Fig. 1 に示してある。

非感染対照マウスにおける総細胞数は、 16.7×10^6 個から 30.1×10^6 個であった。しかし、感染マウスにおけるそれは、虫卵投与後徐々に増加（2日目 35.4×10^6 個、4日目 66.8×10^6 個）し、6日目には最高値 95.8×10^6 個に達し、11日目にかけて減少、それ以降大きな変動はなかった。また、Thy-1.2陽性細胞数の変動も総細胞数とほぼ同様の変動 pattern を示した。すなわち、対照マウスでは 9.0×10^6 個から 14.9×10^6 個を、感染マウスでは2日目 16.4×10^6 個のものが4日目には 43.7×10^6 個と最高になり、6日目から11日目にかけて減少、それ以降はほぼ同一の値を示した。

2) 感染阻止能の移入に及ぼす感作細胞供与マウスの vinblastine 処理の効果

vinblastine には細胞の有糸分裂を阻害し、分裂中の細胞を死滅させる作用がある（Valeriotte and Bruce, 1965）。このことを利用して、阻止能の移入に寄与して

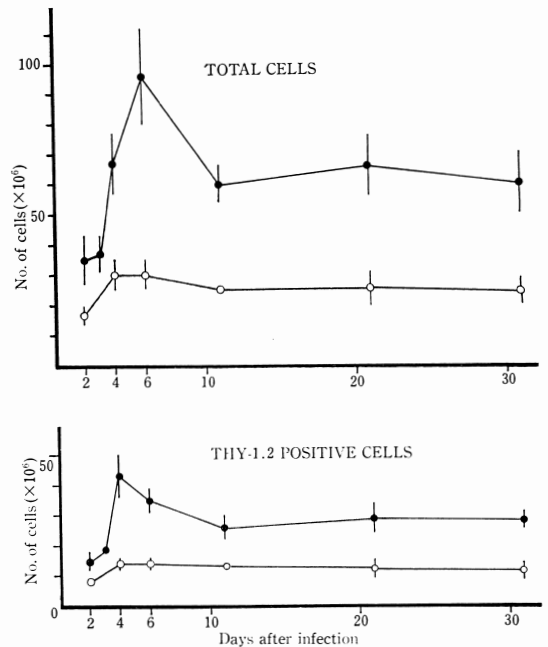


Fig. 1 Changes in cellularity of the mesenteric lymph node in BALB/c mice at various times after *Hymenolepis nana* infection. ●—●: Experimental group, Mean (10 mice) \pm S. D. ○—○: Control group, Mean (6 mice) \pm S. D.

いる細胞の *in vivo* における vinblastine に対する感受性を調べた。

感作細胞は、虫卵経口投与後4日目の供与マウスから採取したものである。この細胞を受容マウスの尾静脈内に1回当たり 5×10^7 個ずつ48時間おきに3回注射したのについて感染実験を行った。その結果は Table 1 に示してある。vinblastine で処理しなかったマウスから採取した感作細胞を注射したマウス（表中 VBL non-treated として示してある）では、感染が全く成立しないか、あるいは1個から6個という極めて少数の cysticercoid の寄生を認めたにすぎなかった。しかし、細胞採取15時間前に体重1g 当り $5 \mu\text{g}$ の vinblastine を注射したマウスから採取した感作細胞を注射したマウス（表中 VBL treated として示してある）では、全例に感染が成立していたが、cysticercoid の感染数28個から74個は対照マウスのそれ（最低109個，最高222個）より明らかに少なかった。

3) 感作後経日的に採取した細胞による阻止能の移入 本実験では供与マウス体内における阻止能の移入に寄

Table 1 Effect of vinblastine treatment on the adoptive transfer of protective immunity against *Hymenolepis nana* in BALB/c mice

| Type of cells transferred | No. of mice examined | No. of cysticercoids in individual mice | | | | | | | | |
|---------------------------|----------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|
| non-sensitized | 6 | 109 | 126 | 131 | 132 | 134 | 222 | | | |
| VBL nontreated | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 6 |
| VBL treated | 6 | 28 | 35 | 39 | 47 | 64 | 74 | | | |

Vinblastine (VBL) given at 5 $\mu\text{g/g}$ body weight, 15 hrs before cell collection. All the donor mice were orally inoculated with 1,000 eggs 4 days before cell collection. All the recipient mice received 5×10^7 cells/injection on days -6, -4 and -2 relative to the challenge (orally 1,000 eggs on day 0).

Table 2 Adoptive transfer of protective immunity against *Hymenolepis nana* in BALB/c mice by the injection of immune mesenteric lymph node cells

| Interval between oral infection and collection of cells from donor (days) | Total No. of cells injected ($\times 10^7$) | No. of mice examined | No. of cysticercoids in individual mice | | | | | | | |
|---|---|----------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 4 | 15 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | |
| NSC* | 15 | 3 | 105 | 123 | 151 | | | | | |
| 6 | 15 | 6 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| NSC | 15 | 3 | 101 | 108 | 120 | | | | | |
| 10 | 15 | 6 | 134 | 138 | 144 | 165 | 168 | 188 | | |
| NSC | 15 | 3 | 207 | 224 | 247 | | | | | |
| 10 | 21.9 | 5 | 129 | 130 | 145 | 152 | 184 | | | |
| NSC | 21.9 | 3 | 143 | 155 | 182 | | | | | |

All the donor mice were orally inoculated with 1,000 eggs.

All the recipient mice were intravenously injected three times with a single dose of cells (5×10^7 or 7.3×10^7) on days -6, -4 and -2 relative to the challenge (orally 1,000 eggs on day 0).

* Non-sensitized cells

与している細胞の寿命を調べた。感作細胞数は1回の移入注射につき 5×10^7 個あるいは実験によっては 7.3×10^7 個であった。注射は攻撃感染前6, 4, 2日の計3回行った。結果は Table 2に示してある。

感作後4日目の細胞を1回当たり 5×10^7 個 (総数 15×10^7 個) 注射したマウスでは5匹中3匹には感染が全く成立せず、残り2匹にもわずかに1個ずつの cysticercoid の寄生を認めたのみで攻撃感染の阻止されていることが示された。感作後6日目の細胞を注射したマウスでは、すべてのマウスに阻止能が移入されていたが、感作後10日目の細胞では阻止能を移入できなかった。また、注射1回当たり 7.3×10^7 個の感作後10日目の細胞を注射したマウスでも、そのすべてに攻撃感染が成立し、阻止能を移入できなかった。

4) 受容マウス体内における阻止能の持続期間の検討
前記の阻止能移入実験では、いずれも感作後所定の日数を経過した細胞の移入終了後2日目に攻撃感染を行い、阻止能移入の可否を検討したが、この実験では感作後4日目の細胞を48時間おきに3回 (注射1回当たり 5×10^7 個, 総数 15×10^7 個) 受容マウスの尾静脈内に注射し、移入終了後2, 4, 6日目に攻撃感染を行い、阻止能の持続期間を調べた。結果は Table 3に示してある。

移入終了後2日目に攻撃感染したマウスに寄生していた cysticercoid 数0個から12個は対照マウスのそれより著しく少なく、攻撃感染が阻止されていた。また、4日目に攻撃感染したマウスでも同様の結果であった。移入終了後6日目に攻撃感染したマウスではその全例に感染が成立し、阻止能を移入できなかった。しかし、この

Table 3 Persistence of immunity to *Hymenolepis nana* in BALB/c mice challenged at intervals after adoptive transfer with immune mesenteric lymph node cells

| Interval between final cell transfer and challenge (days) | treatment | No. of mice examined | No. of cysticercoids in individual mice | | | | | | | |
|---|-----------|----------------------|---|-----|-----|----|----|----|-----|----|
| | | | | | | | | | | |
| 2 | IMLNC* | 8 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 12 |
| | NSC† | 3 | 251 | 261 | 266 | | | | | |
| 4 | IMLNC | 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 7 |
| | NSC | 3 | 162 | 219 | 273 | | | | | |
| 6 | IMLNC | 7 | 40 | 48 | 52 | 72 | 74 | 81 | 105 | |
| | NSC | 3 | 232 | 285 | 324 | | | | | |

All the donor mice were orally inoculated with 1,000 eggs 4 days before cell collection.

All the recipient mice received 2-day-interval transfer injection (5×10^7 cells/injection, i.v.) and were orally challenged with 1,000 eggs.

* Immune mesenteric lymph node cells

† Non-sensitized cells

Table 4 Passive protection of BALB/c mice by the injection of immune mesenteric lymph node cells from mice infected with *Hymenolepis nana* cysticercoids

| Type of cells injected | No. of mice examined | No. of cysticercoids in individual mice | | | | |
|------------------------|----------------------|---|-----|-----|-----|-----|
| Noninfected | 3 | 268 | 273 | 461 | | |
| Infected | 5 | 243 | 327 | 338 | 345 | 350 |

All the donor mice were orally inoculated with 500 cysticercoids 4 days before cell collection.

All the recipient mice were intravenously injected three times with a single dose of cells (5×10^7) on days -6, -4 and -2 relative to the challenge (orally 1,000 eggs on day 0).

時の cysticercoid 寄生数40個から105個は対照マウスのそれ(232個~324個)より少なかった。

5) cysticercoid の経口投与により感作したマウスの細胞による阻止能の移入

既報(浅野ら, 1982)や前記の実験ではいずれも虫卵を経口投与した感作マウスから細胞を採取し、阻止能の移入を試みた。しかし、小形条虫の場合、マウスに cysticercoid を経口投与しても成虫感染が成立する。そこで、本実験では、500個の cysticercoid を経口投与した供与マウスから細胞を採取し、阻止能移入の可否を検討した。感作後4日目の細胞を1回当り 5×10^7 個ずつ攻撃感染の6, 4, 2日前に受容マウスの尾静脈内に注射したのについて感染実験を行った。結果は Table 4 に示してある。

感作細胞を注射したマウス(表中 Infected として示してある)では、その全例に攻撃感染が成立し、阻止能を移入し得なかった。

考 察

小形条虫虫卵をマウスに経口投与すると、マウスはその12~48時間後には再感染に対する強力な阻止能を獲得する。このような虫卵の経口投与により発現してくる効果的な感染阻止能を理解するために感作脾細胞(Friedberg, et al., 1967)や腹腔滲出細胞(Gupta, et al., 1980)を用いて阻止能の未感染マウスへの移入実験が行われたが、いずれも虫卵感染マウスが示す再感染阻止能に匹敵するような強力な阻止能の移入には成功していない。また、感染後3週以上経過したマウスの血清の注射

により阻止能の移入が可能であるとした Ito (1977) の報告は、阻止能の移入に有効とされた血清の採取時期からみて、前述したような初感染後早期に発現してくる感染阻止能の成立機構を説明するには不十分である。

一方、著者ら (1982) は、初感染後 4 日目の腸間膜リンパ節細胞を虫卵による感染が何度でもおきるヌードマウスの尾静脈内に注射移入することにより虫卵による攻撃感染を完全に拒否する程強力な阻止能を当該マウスに賦与し得ること、更に、阻止能の発現には腸間膜リンパ節内の T 細胞、すなわち T_2 細胞の関与を示唆する結果を報告した。その結果、虫卵経口感染後極めて早期に発現してくる感染阻止能の成立機構には、細胞性免疫が大きく関与していることがより一層明確になった。

vinblastine を投与した供与マウスから採取した感作細胞を用いて阻止能の移入を試みたところ、vinblastine 処理細胞を注射移入した受容マウスにおける cysticeroid 寄生数は、対照マウスのそれより明らかに少なく感染防御能移入の傾向が認められた (Table 1)。しかし、この寄生虫の特徴から寄生虫体数が減少したことを阻止能移入の指標にするのではなく、受容マウスにおける感染が成立しなくなることを指標にする必要がある。したがって、阻止能の移入に寄与している細胞は vinblastine に感受性のある細胞、すなわち芽球化したリンパ球と関連のあるものである可能性が考えられる。また、Table 2 に示したように感作後 10 日目の細胞を用いた実験において阻止能が移入されなかったことから、阻止能の移入に寄与している細胞は、虫卵による初感染後比較的短期間のみ供与マウスの腸間膜リンパ節内に存在していることが示唆された。小形条虫の場合、虫卵と cysticeroid のどちらを経口投与しても成虫の感染が成立するが、cysticeroid を経口投与したマウスではその後の虫卵による攻撃感染に対する阻止能が発現しないとされている (Heyneman, 1963) ことから、cysticeroid 投与マウスから採取した細胞を移入した実験 (Table 4) において、阻止能移入が成功しなかったことはうなづける結果といえよう。

近年、生体の免疫応答のほとんどは、T 細胞の関与した現象として理解され、更には、この T 細胞は生体内における役割によっていくつかの種類 (Subsets) に分類されている。今後、阻止能の発現に寄与している T 細胞の種類を解析に努めると共に、Fig. 1 に示したように虫卵経口投与後腸間膜リンパ節内で Thy-1・2 陽性細胞が急激に増加することの意味についても検討を加える必要がある。

要 約

BALB/c 系マウスを供与者、同系の正常マウスを受容者として、小形条虫に対する感染阻止能の移入を試みることに阻止能の移入に寄与している細胞の性質を検討するための実験を行った。得られた結果は次の通りである。

1. 小形条虫虫卵経口投与後供与マウスの腸間膜リンパ節内の Thy-1・2 陽性細胞数を経日的に追跡すると、4 日目に最高になり、11 日目にかけて減少、それ以降ほぼ同一の値を示した。

2. vinblastine を注射した供与マウスから採取した感作 4 日目の腸間膜リンパ節細胞を 1 日おきに 3 回 (1 回当たり 5×10^7 個) 受容マウスの尾静脈内に注射移入し、最終注射から 2 日目に 1,000 個の虫卵を経口投与した。虫卵投与後 4 日目に受容マウスの腸絨毛内の cysticeroid の有無を調べたところ、全例に感染が成立していた。

3. 小形条虫虫卵投与後 4, 6, 10 日目に供与マウスから腸間膜リンパ節細胞を採取した。これらの細胞を 1 日おきに 3 回受容マウスに注射し阻止能の移入を試みたところ、4 日目及び 6 日目の細胞を注射したマウスでは感染が阻止されていたが、10 日目の細胞の注射では感染を阻止し得なかった。

4. 虫卵投与後 4 日目に供与マウスから腸間膜リンパ節細胞を採取した。この感作細胞の注射移入 (1 日おきに 3 回、1 回当たり 5×10^7 個) を受けたマウスにおける阻止能の持続期間は最終注射から 4 日目までであった。

5. cysticeroid 投与後 4 日目の腸間膜リンパ節細胞の注射 (1 日おきに 3 回、1 回当たり 5×10^7 個) では、阻止能を移入できなかった。

以上のことから、阻止能の移入に寄与している細胞は、vinblastine の作用からみて虫卵の経口投与によって分裂増殖したものであることが推測される。

文 献

- 1) 浅野和仁・中村文規・岡本謙一 (1982) : 小形条虫に対する宿主マウスの感染阻止能のヌードマウスへの移入 (Passive transfer) とその免疫細胞学的検討。寄生虫誌, 31, 391-400.
- 2) Berntzen, A. K. and Voge, M. (1965) : *In vitro* hatching of oncospheres of four Hymenolepidid cestodes. J. Parasitol., 51, 235-242.
- 3) Cohen, A. and Schleginger, M. (1970) : Absorption of guinea pig serum with agar. Tra-

- nsplantation, 10, 130-132.
- 4) Friedberg, W., Neas, B. R., Foulkner, D. N. and Friedberg, M. H. (1967) : Immunity to *Hymenolepis nana* : Transfer by spleen cells. J. Parasitol., 53, 895-896.
 - 5) Gupta, R. K., Elezabeth, S. M., Kaushik, S. L. and Johri, G. N. (1980) : *Hymenolepis nana* : Transfer of acquired immunity in mice through sensitized peritoneal exudate cells. Experimentia, 36, 128-129.
 - 6) Heyneman, D. (1962) : Studies on helminth immunity : I. Comparison between luminal and tissue phase of infection in the white mouse by *Hymenolepis nana* (Cestoda : Hymenolepididae). Am. J. Trop. Med. Hyg., 11, 46-63.
 - 7) Heyneman, D. (1963) : Host-parasite resistance patterns. Some implication from experimental studies with helminths. Ann. N. Y. Acad. Sci., 113, 114-129.
 - 8) Ito, A. (1977) : The mode of passive protection against *Hymenolepis nana* induced by serum transfer. Int. J. Parasitol., 7, 67-71.
 - 9) Mcgregor, D. D. and Logie, P. S. (1973) : The mediator of cellular immunity. VI. Effect of the antimitotic drug vinblastine on the mediator of cellular resistance to infection. J. Exp. Med., 137, 660-674.
 - 10) Valeriote, F. A. and Bruce, W. R. (1965) : An *in vitro* assay for growth inhibiting activity of vinblastine. J. Nat. Can. Inst., 35, 851-856.
 - 11) Voge, M. (1964) : Development of *Hymenolepis microstoma* (Cestoda : Cyclophyllidea) in the intermediate host, *Triborium confusum*. J. Parasitol., 50, 77-80.

Abstract

PROTECTIVE IMMUNITY TO *HYMENOLEPIS NANA* IN MICE
I. TRANSFER OF IMMUNITY TO CONVENTIONAL BALB/c
MICE WITH SENSITIZED MESENTERIC LYMPH NODE
CELLS AND SOME IMMUNOLOGICAL PROPERTIES
OF THE TRANSFERRED CELLS

KAZUHIITO ASANO, MIYUKI SHINODA, FUMINORI NAKAMURA
AND KENICHI OKAMOTO

(Department of Medical Biology, School of Medicine,
Showa University, Tokyo, Japan)

Male BALB/c mice were used as donor and recipient. All the donor mice were given orally a single inoculation with 1,000 eggs or 500 cysticercoids of *H. nana*. Lymphoid cells were collected from the mesenteric lymph node of the donors. Each recipient mouse received three i.v. injections of cells at interval of 2 days via a tail vein. The effectiveness of passive transfer was assessed by counting the number of cysticercoids present in the intestinal villi of recipient mice 4 days after challenge.

Changes in the number of Thy-1.2 positive cells in the mesenteric lymph node were monitored at intervals throughout the primary infection with *H. nana* eggs. Thy-1.2 positive cells rapidly increased in numbers to peak on day 4, and progressively decreased by day 11. Thereafter, the number was paralleled to the control throughout the experiment.

Donor cells were collected 4, 6 and 10 days after immunizing infection with eggs (4-, 6-, and 10-day cells). Period from cell transfer to challenging infection in recipient mice was 2 days. Four- and 6-day cells successfully transferred immunity to the recipient mice, but 10-day cells had no effect on cysticercoid rejection. The transfer of cells collected 4 days after stimulation with cysticercoids inoculation had no demonstrable effect on cysticercoid rejection.

In order to investigate persistence of protective immunity in recipient mice, mice that received 4-day cells were challenged with eggs on 2, 4, or 6 days after final cell transfer. In contrast to the result obtained from mice challenged on days 2 and 4, no protective immunity was transferred when recipient mice were challenged on days 6.

Cells from vinblastine-treated donor mice, were unsuccessful in transferring the immunity from the donor mice to the recipient.

These results lend support to the idea that protective immunity to *H. nana* is at least partly mediated by vinblastine-sensitive cells and these cells, but not their progeny, were effective for the rejection of oncosphere.