

小形条虫感染に伴うマウス小腸の phospholipase 活性の変動と六鉤幼虫の発育に及ぼすその効果

浅野和仁・村松邦彦・岡本謙一

(平成元年2月28日掲載決定)

要 約

小形条虫感染マウス, 並びに感作腸間膜リンパ節細胞を注射したヌードマウス小腸の phospholipase 活性, さらには, マウス腸絨毛内における六鉤幼虫から cysticeroid への発育阻止と phospholipase との関連性について調べた。得られた結果は以下の通りである。

- 1) BALB/c 系マウスに小形条虫虫卵1,000個を経口投与, その12, 24, 48, 72, 96そして120時間後にマウスを殺し, 小腸の phospholipase 活性を調べたところ, その活性は72時間目に最も高かった。
- 2) 1,000個の虫卵を経口投与後5日目に再度虫卵を経口投与(1,000個/マウス), その12, 24, 48時間後に小腸の phospholipase 活性を調べたところ, その活性は時間に関係なく常に高かった。
- 3) BALB/c 系マウスに1,000個の虫卵を経口投与, その4日目に感作腸間膜リンパ節細胞を採取した。この感作細胞をヌードマウス(BALB/c-nu/nu)の尾静脈内に一日おきに3回(1回当り 5×10^7 個)注射, 最終注射から48時間目に1,000個の虫卵を経口投与, その24時間目に当該ヌードマウスを殺し小腸の phospholipase 活性を測定した。感作細胞を注射したヌードマウス小腸のそれは, 未感染マウスから採取した細胞を注射した対照ヌードマウスの約7倍と極めて高かった。
- 4) 上記と同様に細胞を注射したヌードマウスに細胞の最終注射から48時間目に1,000個の虫卵を経口投与, その4日後にマウスを殺し, 腸絨毛内の cysticeroid の有無を調べたところ, 感作細胞を注射したヌードマウスからは1匹の cysticeroid も検出できなかった。

Key words: *Hymenolepis nana*, mouse, phospholipase, larval development, adoptive transfer

緒 言

小形条虫虫卵をマウスに経口投与するとその虫卵由来の六鉤幼虫は, マウスの腸絨毛内に侵入し cysticeroid にまで発育, 4~5日後には腸腔内に脱出して成条虫になる。ところが, 前もって虫卵を経口投与したマウスに再度虫卵を経口投与してもその虫卵由来の六鉤幼虫は, マウスの腸絨毛内に侵入はするものの cysticeroid にまで発育することなく感染後48時間以内に死滅・排除される(Miyazato *et al.*, 1979)。

著者らは, これまでに上述したようなマウスの小形条虫に対する再感染防御免疫の発現機構について細胞性免疫の立場から検討を加え, 防御免疫の発現には腸間膜リンパ節内のT細胞が寄与していること(Asano *et al.*, 1986), さらには腸絨毛内からの六鉤幼虫の排除と遅延型過敏症が密接に関係している可能性があること(Asano *et al.*, 投稿中)などを報告してきた。しかし, 腸絨毛内における六鉤幼虫の殺滅機構に関しては不明な点が多

い。

Adewusi and Goven (1987) は旋毛虫-マウスの系を用いて, マウス小腸の phospholipase 活性を測定, 感染マウスのそれは未感染マウスに比らべて有意に高いことを観察すると共に, 旋毛虫幼虫の体表にはリン脂質があるとされている(Castro and Fairbairn, 1969) ことから, phospholipase が同幼虫の殺虫に寄与している可能性があることを推論している。さらに, Lempereur *et al.*, (1980) は, ^3H 標識コリンを取り込ませたマンソン住血吸虫シストソミューラとラット好酸球を *in vitro* において混合培養すると, リン脂質の放射能活性が急速に低下することを観察し, シストソミューラの殺虫には好酸球に由来した phospholipase が寄与している可能性のあることを報告している。また, 小形条虫をマウスに感染させるとその小腸では, phospholipase の活性が感染14日目以降から著しく増加するという報告(Ottolenghi, 1973)もある。

著者らはすでに, 小形条虫虫卵からエーテルとアルコールの混合液によって脂質を抽出, 湿性灰化後リンの

検出を試み、虫卵1個当り $4 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ のリンが含まれていることを観察した(浅野, 未発表)。このことは、小形条虫虫卵には phospholipase の基質となりうるある種のリン脂質が含まれていることを示唆するものである。

そこで今回、小形条虫六鈎幼虫の phospholipase による殺滅の可能性について調べたので報告する。

材料と方法

実験動物

本実験で使用したマウスは5週令のBALB/c系雄マウス(BALB/c-+/+)、並びに4週令の同系雌ヌードマウス(BALB/c-nu/nu)であった。小形条虫虫卵は、当教室で継代している虫体の受胎節より集め、投与の直前にBerntzen and Voge (1965)の方法によって卵殻を除去したものである。

小腸抽出物の作製

1,000個の虫卵を1回だけ経口投与したマウスと、初感染後5日目に1,000個の虫卵を再度経口投与したマウスを用意した。これらのマウスを初感染後あるいは再感染後所定の時間に殺し、小腸全長を摘出、氷冷した12.5%グリセリン、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2 、 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ EDTAを含むpH6.6のリン酸緩衝液(以下単に緩衝液とする)中で切開、腸内容物を除去した。次に、この小腸を濾紙ではさみ緩衝液を吸収後重さを測定、19倍量の緩衝液中で小腸をホモジナイズした。このようにして得たものを小腸抽出物として実験に用いた。

phospholipase の測定

Larsh *et al.* (1974)の方法に準じて小腸のphospholipase活性を測定した。上記の方法で調整した小腸抽出物 $20 \mu\text{l}$ をスピッツに入れ、緩衝液を加えて全量を 0.6ml に調整、 37°C の恒温層内に4分間静置した。そして、前もって 37°C に加温しておいた 6.5mg/ml の lysolecithine (SIGMA, LOT No. 17F-8400) 0.3ml を加え、振盪混和

後、 37°C の水溶液中で反応させた。30分後にスピッツを氷水につけて反応を停止させ、 2ml のヘプタンを加えた後、窒素ガスを通気させながら 0.01N の NaOH を用いて滴定した。反応液全体が青く染まった時点を滴定の終点とし、その活性を組織湿重量 1g 当り1時間に分解される lysolecithine の μmol 数として表わした。また、ヘプタン 1ml 当り $2 \mu\text{mol}$ のパルミチン酸 (SIGMA, LOT No. 105F-00232) を溶解させたものを滴定のスタンダードとした。

細胞浮遊液の調整

本実験で使用した細胞浮遊液は、正常BALB/c系マウス、および1,000個の虫卵を経口投与後4日目マウスの腸間膜リンパ節から既報(浅野ら, 1982)の方法によって採取した細胞を2%牛胎児血清(GIBCO)を含むMedium 199(日本製薬)中に浮遊させたものである。細胞濃度は培地 1ml 当り 25×10^7 個であった。

細胞のヌードマウスへの注射

前記の方法で調整した細胞を1回につき 5×10^7 個ずつ、一日おきに3回ヌードマウスの尾静脈内に注射した。

六鈎幼虫の発育の可否の判定

細胞の最終注射から48時間目に虫卵1,000個を受容者ヌードマウスに経口投与、その4日後にマウスを殺し、Okamoto (1968)の用いた方法に準じて腸絨毛内のcysticeroidの有無を調べ、六鈎幼虫の発育を判定した。

結 果

1. 小形条虫感染に伴うマウス小腸の phospholipase 活性の変動

小形条虫虫卵1,000個を経口投与したマウス(以下初感染マウスとする)を12, 24, 72, 96, 120時間目に、さらに初感染後5日目に1,000個の虫卵を再度経口投与したマウス(以下再感染マウスとする)を12, 24, 48時間目にそれぞれ6匹ずつ殺し、小腸の phospholipase 活性

Table 1 Phospholipase activity of intestinal tissue from BALB/c mice infected with 1,000 *Hymenolepis nana* eggs

Hours after infection	Phospholipase activity*		
	No infection	Primary infection	Secondary infection
12	2226(38.0)	3536(163.0)	19431(5665.0)
24	—	3289(349.0)	24719(5190.0)
48	2240(55.0)	4775(288.4)	11852(313.5)
72	—	11574(307.0)	—
96	—	10857(100.0)	—
120	—	5103(62.1)	—

*: Numbers represent μmol of lysolecithine hydrolyzed/g of wet tissue/hour
Figures in parentheses represent standard deviation.

を測定した。結果は Table 1 に示した。ここに示した値は、マウス 1 匹につき 3 検体を測定して得た値の平均と標準偏差である。

未感染対照マウス小腸の phospholipase 活性は、12時間目 $2226 \pm 38.0 \mu \text{ mol}$ 、48時間目 $2240 \pm 55.0 \mu \text{ mol}$ であった。一方、初感染マウスのそれは感染時間の経過と共に次第に増加 (12時間目 $3536 \pm 163.1 \mu \text{ mol}$ 、48時間目 $4775 \pm 288.4 \mu \text{ mol}$)、72時間目には最高の $11574 \pm 307.0 \mu \text{ mol}$ となったが、120時間目には $5103 \pm 62.1 \mu \text{ mol}$ と激減した。次に再感染マウス小腸の phospholipase 活性を調べたところ、その活性は再感染12時間目 $19431 \pm 5665.0 \mu \text{ mol}$ 、24時間目 $24719 \pm 5190 \mu \text{ mol}$ と初感染マウスのそれと比較して非常に高かったが、再感染48時間目には $11852 \pm 313.5 \mu \text{ mol}$ と初感染72時間目の値とほぼ同じ値にまで低下した。

2. ヌードマウス小腸の phospholipase 活性とその腸絨毛内における六鉤幼虫の発育に及ぼす感作細胞静脈内注射の効果

ヌードマウスの尾静脈内に1回当たり 5×10^7 個の感作細胞を一日おきに3回注射、最終注射から2日目に1,000個の虫卵を経口投与し、その24時間後に小腸の phospholipase 活性を測定した。結果は Table 2 に示した。

未感染マウスから採取した細胞を注射したヌードマウス (Non-immunized と表示) 小腸の phospholipase 活性は $3179 \pm 230.1 \mu \text{ mol}$ であった。ところが、感染4日目のマウスから採取した細胞を注射したヌードマウス (immunized と表示) のそれは、 $23138 \pm 3760.7 \mu \text{ mol}$ と前者と比較して極めて高かった。

次に、細胞の最終注射から2日目に1,000個の虫卵を経口投与、その4日後に受容者ヌードマウスを殺し、腸

絨毛内の cysticeroid 数を数えるという方法によって、当該マウスの腸絨毛内における六鉤幼虫の cysticeroid への発育の可否を調べた。その結果は Table 2 に示した通りである。未感染マウスから採取した細胞を注射したヌードマウス (Non-immunized と表示) は、いづれも1匹当たり329個から382個の cysticeroid を保有していたが、感作細胞を注射したヌードマウス (immunized と表示) からは全く cysticeroid を検出できなかった。

考 察

小形条虫虫卵の経口投与を受けたマウスは、虫卵投与後24~48時間後には極めて強い感染防御能を獲得し、再度の虫卵による経口感染を完全に阻止する。このような再感染防御能は攻撃投与された虫卵のマウス腸管における孵化を抑制したり、あるいは六鉤幼虫の腸絨毛内への侵入を阻止するものではなく、むしろ腸絨毛内に侵入した六鉤幼虫に対して殺滅的に作用するものであるとされている (Ito and Yamamoto, 1976, Friedberg *et al.*, 1979)。著者らのこれまでの解析から、虫卵投与後早期に発現してくる上述したような再感染防御能は細胞性免疫によっている可能性が高い (浅野ら, 1982, Asano *et al.*, 1986) が、六鉤幼虫に対して殺滅的に作用する可能性のある物質については不明な点が多い。

Ottolenghi (1973) はすでに、小形条虫虫卵1,000個をその卵殻を除去することなくマウスに経口投与、経時的に小腸の phospholipase 活性を測定し、感染14日目からその活性が急激に増加、20日から40日にかけてピークになることを観察すると共に、虫卵や虫体には phospholipase 活性がないことから、小形条虫の感染によってマウス小腸そのものの phospholipase 活性が増加すると結論づけている。しかし、今回著者らが、前もって卵殻を除

Table 2 Effect of intravenous injection with mesenteric lymph node cells (MLNC) on phospholipase activity and on larval development in nude mice

Type of MLNC injected	No. of mice examined	Phospholipase activity*	No. of cysticeroids in individual mice
Non-immunized	3	3179 (230.1)	—
	3	—	329, 347, 382
Immunized	3	23138 (3760.7)	—
	5	—	0, 0, 0, 0, 0

Immunized MLNC were prepared from BALB/c mice infected with 1,000 *Hymenolepis nana* eggs 4 days before.

All the recipient nude 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.

Phospholipase activity was measured 24 hours after the challenge.

Cysticeroid counts were made on day 4 of the challenge.

*: See Table 1.

去した虫卵の経口投与を受けた初感染マウス小腸の phospholipase 活性を測定して得た結果 (Table 1) は、感染72時間目にはその活性が急激に増加、96時間目まではその状態が持続していたが、感染120時間目になると急激に低下するという Ottolenghi (1973) の報告とは異なったものであった。

小形条虫虫卵をその卵殻を除去することなくマウスに経口投与した場合の寄生虫体数は極めて少ないが、投与の前に卵殻を除去するとその寄生数は飛躍的に増加するとされている (Berntzen and Voge, 1965) ことから、上述したような phospholipase 活性変動の差異は、マウスに寄生している虫体数の違いによっている可能性がある。このことは、再感染によって人為的に寄生虫体数を増加させたマウス小腸の phospholipase 活性は初感染マウスのそれと比較して極めて高いことを示した本実験の結果、さらには自家感染が起きるとされている感染14日目を降 (Reed *et al.*, 1977) から急激に phospholipase 活性が増加することを示した Ottolenghi (1973) の報告からも支持されるであろう。

小形条虫虫卵をマウスに経口投与すると、腸管内で孵化、遊離した六鉤幼虫が腸絨毛内に侵入し徐々に発育、48時間後には腸絨毛内に侵入した幼虫の周囲に囊壁が形成され、その中で六鉤幼虫が次第に完全な形の cysticeroid に発育していくとされている (Hunninen, 1935)。また、(Miyazato *et al.*, 1979) も小形条虫感染マウス腸管の組織学的観察から上記と同様な幼虫の発育を報告している。

そこで、前述したような phospholipase 活性の経時的変動とこれらの報告を併せると、初感染マウスでは腸絨毛内に侵入した六鉤幼虫の周囲に囊壁が形成された時点から小腸の phospholipase 活性が増大するが、再感染マウスでは六鉤幼虫の腸絨毛内侵入後比較的早期からその活性が著増していることになる。従って、初感染マウスでは六鉤幼虫の周囲に形成された囊壁が phospholipase の作用から幼虫を保護、その結果六鉤幼虫の正常な発育が可能になるのに対し、再感染マウスでは phospholipase が直接六鉤幼虫に作用、その幼虫に殺滅的な効果を及ぼしている可能性のあることが推察される。

次に、上述したような phospholipase による六鉤幼虫の殺滅の可能性をより一層明確なものにするためにヌードマウスを受容者とした防御能の移入実験を行なった。その結果、感作腸間膜リンパ節細胞の注射によってヌードマウス小腸の phospholipase の活性が高まると共に、そのようなマウスでは攻撃感染由来の六鉤幼虫が cysticeroid にまで発育できないことが判明した (Table 2)。このことは、腸絨毛内における六鉤幼虫の殺滅と phospholipase が密接に関係していることを明瞭に示している。

小形条虫再感染マウスの小腸では、腸絨毛内に侵入した幼虫の周囲には著明な好酸球の浸潤があること (Friedberg *et al.*, 1979, Miyazato *et al.*, 1979)、さらには、マウス腸管の phospholipase は好酸球に由来していることが示されている (Ottolenghi, 1970, Adewusi and Goven, 1987)。また、マウスから採取した感作腸間膜リンパ節細胞を同系のマウスの静脈に注射すると、その細胞は受容マウスの腸管に移行・定着することも観察されている (Guy-Grand *et al.*, 1974)。従って本実験の結果とこれらの報告を併せると、ヌードマウスに静注された感染4日目の腸間膜リンパ節細胞は当該ヌードマウスの腸管に移行・定着し、攻撃感染由来の六鉤幼虫の抗原にすばやく反応、好酸球に作用すると考えられている因子、所謂 eosinophil stimulating promotor (Colley, 1973, Lewis *et al.*, 1977) を産生放出、その結果腸の phospholipase 活性が増加し、六鉤幼虫が死滅した可能性が推察される。しかしながら、この点に関しては今後更に詳細な検討を加えてみる必要があるだろう。また、*in vitro* において phospholipase を六鉤幼虫に作用させ、その効果を直接観察することも今後の課題として残されている。

文 献

- 1) Adewusi, K. and Goven, A. J. (1987): Effect of anti-thymocyte serum on the eosinophil and lysophospholipase responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol.*, 94, 115—122.
- 2) 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.
- 3) Asano, K., Shinoda, M., Nakamura, F. and Okamoto, K. (1986): *Hymenolepis nana*: Passive transfer of mouse immunity by T-cell subset of phenotype Lyt-1. *Exp. Parasitol.*, 61, 373—378.
- 4) Berntzen, A. K. and Voge, M. (1965): *In vitro* hatching of oncospheres of four Hymenolepidid cestodes. *J. Parasitol.*, 51, 234—242.
- 5) Castro, G. A. and Fairbairn, D. (1969): Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization *in vitro*. *J. Parasitol.*, 55, 51—58.
- 6) Colley, D. G. (1973): Eosinophils and immune mechanisms. I. Eosinophil stimulation promotor (ESP): a lymphokine induced by specific antigen and phytohemagglutinin. *J. Immunol.*, 110, 1419—1423.
- 7) Friedberg, W., Neas, B. R., Faulkner, D. N. and Congdon, C. C. (1979): *Hymenolepis nana*: Intestinal tissue phase in actively immunized mice. *J. Parasitol.*, 65, 61—64.
- 8) Guy-Grand, D., Griscelli, C. and Vassalli, P. (1974): The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. *Eur. J. Immunol.*,

- 4, 435—443.
- 9) Hunninen, A. V. (1935): Studies on the life history and host-parasite relationships of *Hymenolepis fraterna* (*H. nana* var *fraterna* Stiles) in white mouse. *Am. J. Hyg.*, 22, 414—443.
 - 10) Ito, A. and Yamamoto, M. (1976): The mode of active protection against *Hymenolepis nana* reinfection in mice inoculated with different doses of shell-free eggs. *Jpn. J. Parasitol.*, 25, 247—253.
 - 11) Larsh, J. E. Jr., Ottolenghi, A. and Weatherly, N. F. (1974): *Trichinella spiralis*: Phospholipase in challenged mice and rats. *Exp. Parasitol.*, 36, 299—306.
 - 12) Lempereur, C., Capron, M. and Capron, A. (1980): Identification and measurement of rat eosinophil phospholipase D. Its activity of schistosomula phospholipids. *J. Immunol. Methods*, 33, 249—260.
 - 13) Lewis, F. A., Carter, C. E., Colley, D. G. (1977): Eosinophil and immune mechanisms. V. Demonstration of mouse spleen cell-derived chemotactic activities for eosinophils and mononuclear cells and comparisons with eosinophil stimulation promotor. *Cell. Immunol.*, 32, 86—96.
 - 14) Miyazato, T., Furukawa, T. and Inoue, T. (1979): Intestinal pathology associated with primary and secondary infections of *Hymenolepis nana* in mice. *Jpn. J. Parasitol.*, 28, 185—197.
 - 15) Okamoto, K. (1968): Effect of neonatal thymectomy on acquired resistance to *Hymenolepis nana* in mice. *Jpn. J. Parasitol.*, 17, 53—59.
 - 16) Ottolenghi, A. (1970): The relationship between eosinophilic leukocytes and phospholipase B activity in some rat tissues. *Lipids*, 5, 531—538.
 - 17) Ottolenghi, A. (1973): High phospholipase content of intestines of mice infected with *Hymenolepis nana*. *Lipids*, 8, 426—428.
 - 18) Reed, N. D., Isaak, D. D. and Jacobson, R. H. (1977): The use of nude mice in model systems for studies on acquired immunity to parasitic helminths. *Proceeding of the Second International Workshop on Nude Mice*, ed. by T. Nomura *et al.*, University of Tokyo Press, 3—16.

Abstract

PHOSPHOLIPASE ACTIVITY IN THE SMALL INTESTINE OF
MICE INFECTED WITH *HYMENOLEPIS NANA* AND ITS EFFECT ON THE
INHIBITION OF LARVAL DEVELOPMENT IN THE INTESTINAL VILLI

KAZUHITO ASANO, KUNIHICO MURAMATSU AND KEN-ICHI OKAMOTO

(Department of Medical Biology, School of Medicine, Showa University,
Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142 Japan)

After a primary infection with *Hymenolepis nana* eggs, BALB/c mice showed a short lived increase in phospholipase activity in the small intestine, which began 48 hours post infection, peaked at 72 hours and had declined by 120 hours. On the other hand, when the mice were given a secondary infection 5 days after the primary infection the same sequence of changes was apparent, but the time course was accelerated, i.e. peak activity of phospholipase occurred at 24 hours after the challenge.

Mesenteric lymph node cells (MLNC) were obtained from BALB/c donor mice 4 days after infection with 1,000 *H. nana* eggs. MLNC were injected into tail vein of recipient nude mice (BALB/c-nu/nu) on Day 6, 4 and 2 prior to the challenge. The cell dosage transferred was 5×10^7 per injection and the period from final cell transfer to the challenging infection was 2 days. Phospholipase activity in the small intestine was measured at 24 hours after the challenge. Intravenous injection with MLNC prepared from *H. nana*-infected mice elevated phospholipase activity greatly in excess of the value measured in control recipient mice. The effect of cell transfer on the larval development was assessed by counting the number of cysticercoids presented in the intestinal villi of recipient nude mice 4 days after the challenge. The transfer of sensitized MLNC inhibited larval development in the intestinal villi of the recipient nude mice; recipient nude mice which were injected with sensitized MLNC harboured no cysticercoids derived from the challenge infection.