

氏 名(本籍) 佐々木 修

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 340 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 2 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 豚肺虫感染肺組織の好酸球増多の成因と
その意義について

論文審査委員 (主 査)

教授 勝野 正則

教授 星野 忠彦

教授 佐々木康之

論文内容要旨

豚肺虫感染肺組織の好酸球増多の成因と その意義について

一般に蠕虫感染時には感染局所と末梢血中に著明な好酸球の増多が認められる。この好酸球増多の成因は虫体のもつ好酸球走化因子とアレルギーの二つの面から研究されてきたが、断片的知見が多く、同一虫種を用いた一連の研究は少ない。特に、豚肺虫は養豚界に経済的損失をもたらす主要な蠕虫の一つであるが、本虫についてのこの種の研究は皆無であった。

著者は、豚肺虫症の主要な病態の一つが肺組織の好酸球増多にあることから、この成り立ちの解明を企図し、本研究を行い以下のような知見を得た。

1. 感染局所における虫体への好酸球応答

豚肺虫の寄生を認めた21例の自然感染豚の肺組織の好酸球浸潤は、細気管支内の成虫や肺胞および肉芽腫内の虫卵に直接的に反応する像と虫体・虫卵の存在しない小葉間結合組織における反応像の二つに大別された。前者では多くの場合、マクロファージ、好中球、形質細胞、リンパ球の浸潤を伴い、その細胞反応に免疫学的機序が関与することが示唆された。

一方、モルモットに豚肺虫を経口接種し、肺組織ならびに末梢血中の好酸球の動態を逐日調べたところ、感染後5日から肺組織へ侵入した虫体は、感染後7日にその数を著増し、同時に肺組織および血中の好酸球増多が認められた。この感染初期の肺組織の好酸球増多にはマクロファージ、リンパ球、好中球等の参加は少なく、それは非免疫学的細胞反応と思われ、虫体またはその代謝産物の有する好酸球走化因子に依存するものと思われた。

2. 成虫、虫卵、3期子虫の白血球走化作用

上述の成績から感染初期の肺組織の好酸球増多は虫体成分が直接関与するものと思われた。そこで、成虫、虫卵、3期子虫の抽出液の好酸球、好中球、マクロファージに対する走化作用を *in vivo* または *in vitro* で調べた。

成虫抽出液を正常モルモットの皮内に注射すると、8時間後をピークとする少数のマクロファージを伴った好酸球と好中球の浸潤が発現した。これは成虫抽出液中には、これらの細胞に対する走化因子が存在することを示している。

つぎに、*in vitro* で成虫、虫卵、3期子虫抽出液の濃度とこれらの細胞の走化活性の関係を調べたところ、いずれの抽出液も好酸球、好中球およびマクロファージに用量依存性の走化作用を示し、そ

の蛋白質濃度の対数と走化細胞数との間に一次回帰を示した(図1)。このうち、3期子虫抽出液は成虫や虫卵の抽出液よりも好酸球に対して高い走化活性を示し、好中球とマクロファージに対する活性は低いものであった。

これは各発育段階の豚肺虫は各種白血球に対する走化因子を有するが、発育過程でその走化活性は異なることを示している。

3. 好酸球・好中球・マクロファージ走化因子の分離

ついで、比較的材料の得られ易い成虫抽出液中の好酸球・好中球・マクロファージ各走化因子の分離を試みた。成虫抽出液を Sephadex G-100 でゲル濾過すると、好酸球走化活性は分子量16万をピークとして溶出され、好中球とマクロファージの走化活性は12万を中心として溶出された(図2)。

つぎに、この両画分を含む高分子画分を等電点電気泳動により分画したところ *in vitro* での走化活性は広範な pH 域にみられたが、そのうち好酸球に特異的に作用する画分は pH 7.2 ± 0.2 に、好中球に特異的なそれは pH 5.2 ± 0.2 に、マクロファージに特異的なそれは pH 4.8 ± 0.2 にあった(図3)。以下、それをそれぞれ好酸球走化因子、好中球走化因子、マクロファージ走化因子と呼ぶ。

4. 好酸球・好中球・マクロファージ走化因子の虫体内分布

上述の好酸球・好中球・マクロファージ走化因子に対する家兎抗血清を作製し、これを用いて雌成虫と3期子虫における走化因子の分布を間接蛍光抗体法で調べた。

その結果、好酸球走化因子は成虫の非収縮性の体筋層部分と消化管の筋層、絨毛、内容物と3期子虫の消化管に認められた。マクロファージ走化因子は成虫と3期子虫の体筋層の全層に認められたが、消化管には認められなかった。

また、抗好中球血清はマクロファージ走化因子とも交差し、その特異性はやや低いものであったが、これを用いて好中球走化因子の分布を調べたところ、マクロファージ走化因子のそれと同様の分布を示した(表1)。

以上のことは、好酸球走化因子は他の因子とは異なり消化管から体外に排出され易い部位に分布することを示している。そこで、雌成虫と3期子虫を RPMI 1640 培地で48時間培養後、その上清の好酸球走化活性を調べたところ、*in vivo* と *in vitro* で活性が認められた。これにより好酸球走化因子は体外に容易に排出されることが確認された。

蠕虫の白血球走化因子に関する研究は多いが、その虫体内分布は本研究においてはじめて証明したものである。

5. 好酸球走化因子の in vivo での走化活性

好酸球走化因子の in vivo での特異的走化活性とこれへの免疫学的機序の関与の有無を、正常および感染モルモットの皮膚を用いて調べた。

正常モルモットにおける好酸球走化因子の注射部の好酸球は、8時間後をピークとする単峰性の浸潤を示したが、in vitro とは異なり好中球の走化も認められた。しかし、in vivo では好酸球が好中球に比べ著しく少ない血中からの走化であることを考慮すると、本因子の in vivo での特異性は低いものとは思われない。

感染モルモットにおける好酸球走化因子の注射部の肉眼的な変化は、正常動物の場合と同様陰性であった。組織学的に好酸球は正常動物と同様に単峰性の浸潤を示したが、その浸潤細胞数の増加は正常動物より速やかで、~~そのピークは高く~~、その衰退も遅いものであった(図4)。肥満細胞数の変化は軽度であり(図4)、好酸球走化因子に対するPCA抗体も検出されなかった。

これらのことから、好酸球走化因子はアレルゲン性が乏しく、本因子は感染動物の体内でも免疫学的経路を経ずに直接好酸球を動員するものと思われると共に、感染動物の好酸球は正常動物と異なり、その機能が修飾されていることが示唆される。

6. 感染モルモットにおける成虫抽出液の好酸球走化活性と免疫学的機序の関与

一方、感染後14日以降のモルモットでは成虫抽出液の皮内注射部に肉眼的に明瞭な皮内反応が発現した。この反応は即時型で、組織学的にも好酸球、好中球の浸潤、水腫、出血と共に肥満細胞の脱顆粒と消失を伴っていた。

また、感染動物では皮内反応の出現にやや遅れて、PCA反応を呈する成虫抽出液に対する抗体が血中に証明された。このような感染動物の皮膚の好酸球浸潤は正常動物の注射部の数倍にも増強された(図4)。

この増強は好酸球走化因子ではみられないもので、同因子とは異なる虫体成分に依るものと思われる。感染中・後期の好酸球浸潤にはこの成分に対する免疫学的反応が関与するものと思われる。

7. 好酸球の虫体傷害作用

つぎに、感染局所に浸潤した好酸球の宿主側の意義を知ることにした。

まず、正常および豚肺虫感染モルモットの好酸球の虫体への付着を調べたところ、いずれの好酸球も感染後14日以降の血清の存在下で3期子虫に多数付着した(図5)。この付着は感染好酸球で速やかで、感染動物の好酸球は局所への移動前にすでに感作・修飾されていることが示唆された。感染モルモット血清中には虫体表在抗原に対する抗体が検出され、好酸球はこの抗体を介して虫体に付着するものと思われた。

この好酸球の付着した3期子虫をモルモットに経口接種し、肺に出現した成虫数を調べたところ、その付着しない子虫を接種した場合に比べ回収率は明らかに低い成績を得た。これは好酸球がエフェクター細胞として3期子虫に傷害を与えることを示している(表2)。感染動物の肺組織に寄生する虫体は3期子虫とは発育段階を異にするが、おそらく好酸球は同様の働きをするものと思われる。

また、感染動物の血清(抗体)も3期子虫に傷害作用を有することが示された(表2)。

8. 豚肺虫感染肺組織の好酸球増多の成因とその意義

以上の知見に基づき、豚肺虫感染動物の肺組織にみられる好酸球増多の成因をまとめるとつぎのようになる。

感染初期、肺組織に幼若虫が到達し、その発育過程で消化管から排出される好酸球走化因子の直接作用により、血中から好酸球が組織中に走化する。

一方、感染経過と共に生じた虫体成分に対する抗体が虫体を傷害し、また、虫体に付着した抗体を介して虫体に好酸球が多数付着し、さらに、虫体の傷害を助長する。

感染中・後期にはこのような虫体から遊離した好酸球走化因子とは異なる虫体成分は、アレルゲンとして働き、これに対する免疫反応が好酸球増多を助長する(表3)。

以上、豚肺虫症の病態、特に感染局所の好酸球増多の成因とその意義の一端を明らかにした。

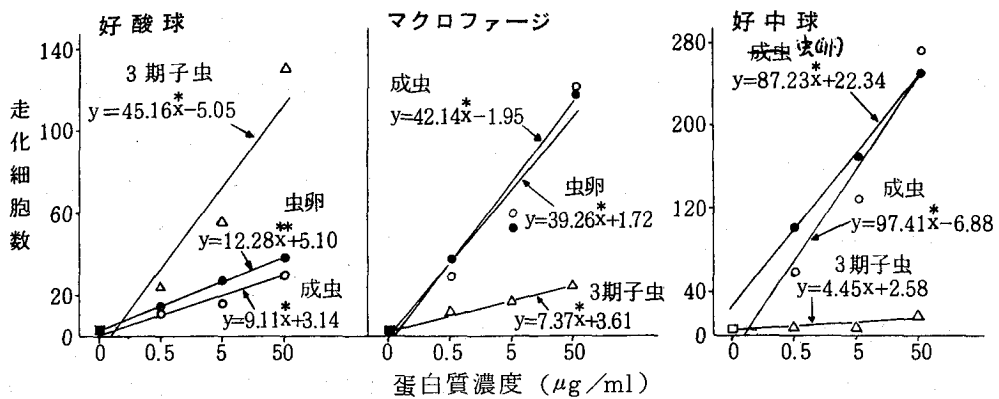


図1 3期子虫、成虫、虫卵抽出液の濃度とin vitroでの白血球走化作用

y ; 走化細胞数、x ; 蛋白質濃度の対数、* ; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 。
 Δ ; 3期子虫抽出液、 \circ ; 成虫抽出液、 \bullet ; 虫卵抽出液、 \blacksquare ; P B S (pH 7.4)。

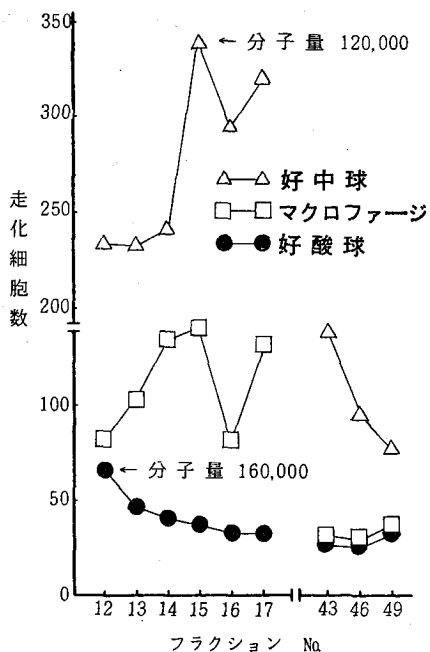


図2 豚肺虫成虫抽出液の Sephadex G-100 の画分の好酸球、好中球、マクロファージ走化活性

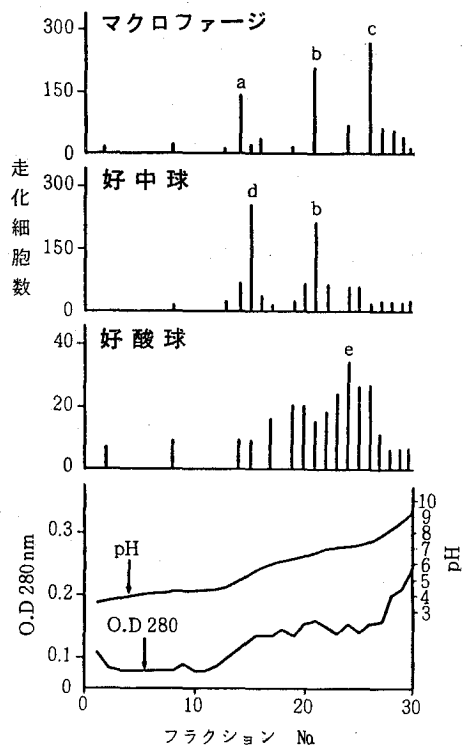


図3 豚肺虫成虫抽出液の Sephadex G-100 の高分子画分の等電点電気泳動による好酸球、好中球、マクロファージ走化因子の分画

a ; マクロファージ走化因子。
d ; 好中球走化因子。
e ; 好酸球走化因子。

表1 好酸球、マクロファージ、好中球走化因子の雌成虫と3期子虫体内での分布（間接蛍光抗体法による）

| 分 布 | 走 化 因 子 | | | | | |
|--------|---------|------|---------|------|-------|------|
| | 好 酸 球 | | マクロファージ | | 好 中 球 | |
| | 雌成虫 | 3期子虫 | 雌成虫 | 3期子虫 | 雌成虫 | 3期子虫 |
| 体筋層 | | + | | + | | + |
| 非収縮性筋層 | +++ | | +++ | | +++ | |
| 収縮性筋層 | — | | +++ | | +++ | |
| 腸 管 | | ++ | | — | | — |
| 腸 絨 毛 | ++ | | — | | — | |
| 筋 層 | +++ | | — | | — | |
| 内 容 物 | ++ | | — | | — | |
| 虫 卵 | — | | — | | — | |
| 子 宮 | — | | — | | — | |

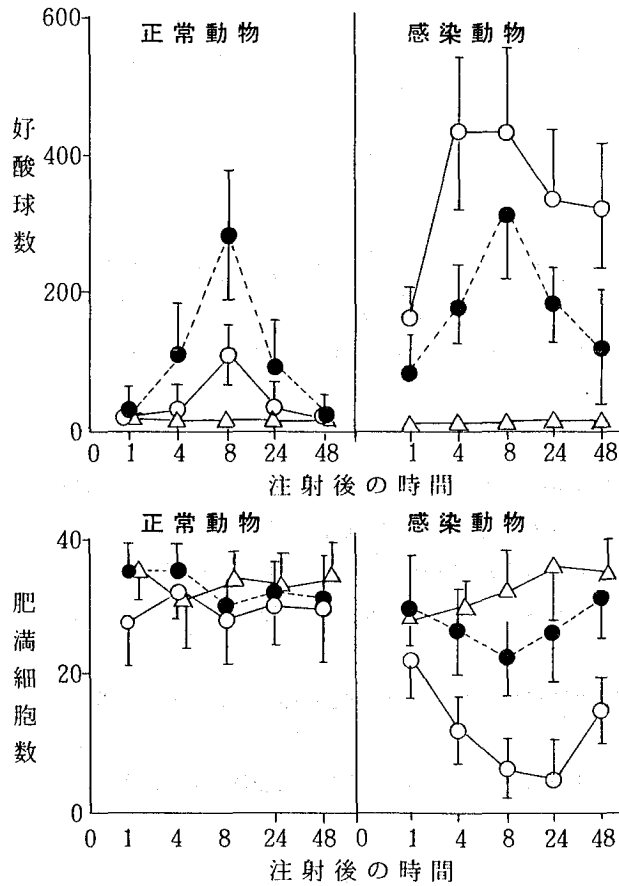
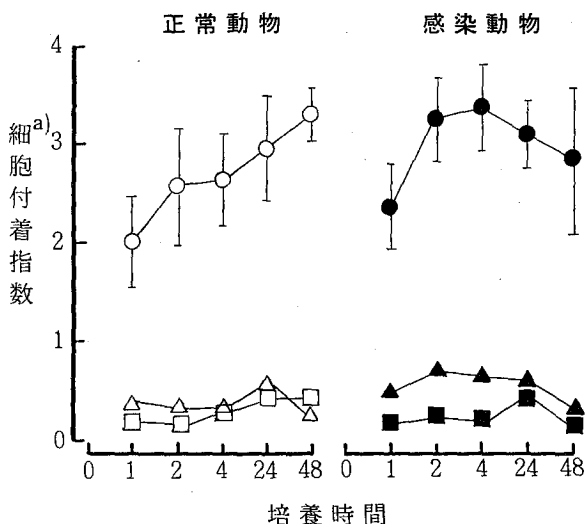


図4 正常および豚肺虫感染後21日のモルモットの好酸球走化因子、成虫抽出液、PBSの皮内注射部の好酸球と肥満細胞数の経時的変化

●; 好酸球走化因子、○; 成虫抽出液、△; PBS (pH 7.4)。

図5 正常または豚肺虫感染モルモット腹腔滲出細胞の豚肺虫感染血清の存在下での3期子虫への付着の経時的变化



a) 細胞付着指数は、3期子虫の全表面が細胞に被われているもの(4+)、90-60%が被われているもの(3+)、60-30%が被われているもの(2+)、30-10%が被われているもの(1+)、10%以下が被われているもの(0)の5段階(Yoshimuraら1983)で示す。

- ; 正常モルモットの腹腔滲出細胞+感染後35日のモルモット血清。
- △; 正常モルモットの腹腔滲出細胞+正常モルモット血清。
- ; 正常モルモットの腹腔滲出細胞+RPMI 1640。
- ; 豚肺虫感染後21日のモルモット腹腔滲出細胞+感染後35日のモルモット血清。
- ▲; 豚肺虫感染後21日のモルモット腹腔滲出細胞+正常モルモット血清。
- ; 豚肺虫感染後21日のモルモット腹腔滲出細胞+RPMI 1640。

表2 豚肺虫3期子虫への好酸球の付着が感染力に及ぼす影響

| 3期子虫の培養 | 頭数 | 成虫回収率(%) ⁴⁾ |
|--|----|------------------------|
| 正常腹腔滲出細胞 ¹⁾ +感染血清 ²⁾ | 7 | 7.7 ± 4.4 a) |
| 感染腹腔滲出細胞 ³⁾ +感染血清 | 7 | 7.6 ± 5.8 a) |
| 感染血清 | 7 | 12.9 ± 5.1 b) |
| 正常腹腔滲出細胞+RPMI 1640 | 6 | 36.4 ± 10.9 c) |
| 感染腹腔滲出細胞+RPMI 1640 | 7 | 36.0 ± 8.7 c) |

1) 正常モルモットの腹腔滲出細胞。

2) 豚肺虫感染後35日のモルモット血清。

3) 豚肺虫感染後21日のモルモットの腹腔滲出細胞。

4) モルモットに60隻/頭を感染し、21日後に肺の成虫を回収。

a, c間、b, c間; $P < 0.01$ 、a, b間; $P < 0.05$ 。

表3 豚肺虫感染局所の好酸球浸潤の成因

| | 感染初期 | 感染中・後期 |
|----|----------------------|--|
| 虫体 | 好酸球走化因子の遊離 | 好酸球走化因子の遊離 抗体(補体)*と好酸球の付着 虫体の傷害 虫体成分(アレルゲン)の遊離 |
| 血液 | 好酸球増多 (好酸球機能の修飾)* | 好酸球増多 抗体 (Tリンパ球)* |
| 組織 | 好酸球増多 | 肥満細胞・好塩基球の感作 アナフィラキシー(各種メヂエターの遊離)* 好酸球、好中球、単核球の浸潤 出血、水腫 |

*; 今回の実験では確認しなかったもの。

審査結果の要旨

養豚界に損失をもたらす豚肺虫症の主要な病態の一つは肺組織の好酸球の浸潤であるが、その成因は不明であった。著者はこの解明を企画し、本研究を行った。

まず、豚肺虫の自然感染豚と実験感染モルモットの肺の病理組織学的観察から、肺における好酸球浸潤は本虫の直接的作用とこれに免疫学的反応が関与するものと推察した。

つぎに、3期子虫、成虫、虫卵の抽出液の白血球走化作用をモルモットを用い、*in vivo*, *in vitro*で調べ、それらが好酸球、好中球、マクロファージに対する走化作用を有することを知った。

そして、成虫抽出液からゲル濾過と等電点電気泳動により、それらの細胞に特異性の高い走化因子を分離した。また、このうち好酸球走化因子はアレルギー性が乏しく、感染動物においても免疫機構を介することなく、好酸球増多を惹き起こすことを示した。また、本因子は好中球、マクロファージ走化因子とは異なり、虫体の腸絨毛や腸内容物に分布すること、それが容易に虫体外に排出されることを示した。

一方、虫体には好酸球走化因子とは別に感染中・後期の動物に即時型皮内反応を起こす成分が含まれ、これによる免疫反応が好酸球浸潤を著しく増強することを示した。

最後に、感染動物では虫体に対する抗体を介して好酸球が虫体表面に付着し、それが虫体を障害することを示した。

これらの知見は豚肺虫症における好酸球増多の成因とその意義の一端を明らかにし、家畜寄生虫病学に重要な基礎的知見を加えたもので、審査員一同は、著者は農学博士の学位を得るに値するものと認めた。