

## 学位論文題名

ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫から  
寄生期幼虫への発育に関する研究

## 学位論文内容の要旨

*Rattus* 属のげっ歯類を自然宿主とするベネズエラ糞線虫は、ヒト及び家畜を宿主とする糞線虫のモデル寄生虫として用いられている。本虫の宿主への感染は、自由生活期である感染幼虫の経皮的侵入によって成立する。経皮感染の前後で幼虫を取り巻く環境は、土壤中の外的環境から宿主体内の内的環境に変化する。しかし、自由生活期の幼虫は相当なストレス状態に曝されているにも関わらず、なんら損傷も受けずに2つの環境に巧みに適応して発育し、感染後は寄生期の幼虫として体内を移行し、最終的に小腸に寄生する。著者は、ベネズエラ糞線虫の経皮感染時における自由生活期幼虫から寄生期幼虫への発育過程に焦点をあて、その発育機構を明らかにすることを目的に実験を計画した。

はじめに、現在のラットを用いたベネズエラ糞線虫の実験室内維持では、2～3週で次の宿主に継代する必要があるため、スナネズミを用いたベネズエラ糞線虫の長期継代法について検討した。次に、自由生活期幼虫及び、感染ラットから寄生期幼虫及び成虫を回収し、発育期の差異による虫体構成蛋白質について検討した。また、自由生活期幼虫から寄生期幼虫への発育における生化学的機構を明らかにする一環として、感染幼虫を移行幼虫に発育させる *in vitro* の培養系確立を試みた。さらに、この培養系を用いて、発育に関与する蛋白質及びそれを規定する遺伝子の発現について解析した。

第1章では、スナネズミにおけるベネズエラ糞線虫の長期感染に

ついて調べ、スナネズミを用いての長期継代法について検討した。その結果、感染スナネズミでは、成虫の長期持続寄生が成立し、その寄生期間は感染後450日以上に及んだ。また、寄生期間中、糞便内の虫卵数は減少することなく安定した値を維持し、その値は投与感染幼虫数に依存することが確認された。これらのことから、ラットの代替宿主としてスナネズミを用いることにより効率のよい継代及び自由生活期幼虫を大量かつ短期間に準備することが可能となった。

第Ⅱ章では、発育期の差異における生化学的性状を明らかにする一環として、二次元電気泳動を用いて自由生活期幼虫、肺寄生期幼虫及び成虫の構成蛋白質について検討した。その結果、自由生活期幼虫は13個の特異的スポットを有し、肺寄生期幼虫及び成虫と明らかに区別された。これに対して肺寄生期幼虫及び成虫はわずか6スポットを除いてほぼ同一なパターンであった。これらのことから、虫体を構成する蛋白質は自由生活期の虫体と寄生期の虫体では大きく異なることが分かった。

第Ⅲ章では、自由生活期から寄生期への発育における生化学的機構を解明するために、宿主を用いずに自由生活期の幼虫を寄生期にまで発育させる *in vitro* の培養系確立を試みた。温度25℃において虫卵から発育した自由生活期幼虫は、培養温度を37℃に変化させることによって、その形態は宿主から回収した移行幼虫の形態にまで変化することが確認された。また、形態変化の認められた幼虫と感染ラットから回収した移行幼虫の構成蛋白質及び抗原性について、二次元電気泳動及び感染ラット血清を用いたウエスタンブロット法によって検討したところ、両者のスポットパターン及び主要抗原はほぼ同一であった。これらのことから、自由生活期幼虫を温度37℃の環境下で培養することによって、虫体は寄生期幼虫へと発育することが確認され、*in vitro* の培養系を確立し得た。

第Ⅳ章では、感染時の虫体発育に関与する蛋白質を明らかにするため、第Ⅲ章で確立した *in vitro* の培養系を用いて自由生活期幼虫を $S^{35}$ メチオニンで代謝標識し、二次元電気泳動によって蛋白質を

分離した後、オートラジオグラフィーを実施した。その結果、自由生活期の幼虫が寄生期へと形態変化する間に分子量70 kilodalton(kDa)の蛋白質の産生増大及び2つの複合体よりなる16~22kDaの蛋白質の産生が確認された。これらの蛋白質は、熱ショック蛋白質(HSP)70に対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法及びパルスチェイス法を用いた解析から、HSP70及び低分子量領域HSPの関連蛋白質であることが示された。これらのことから感染時の虫体発育にはHSPが深く関与することが示唆された。

第V章では、感染時の虫体発育機構を遺伝子レベルで解明するため、産生の増大が確認されたHSP70関連蛋白質を規定する遺伝子の性状について検討した。温度37℃で培養した自由生活期幼虫のmRNAより、ラムダZAPⅡベクターを用いてcDNAライブラリーを作製した。その結果、これまでに報告されている哺乳動物のHSP70遺伝子との間で70%以上の相同性を示す全長1705 base pair(bp)のクローン(pSH70-1)を得た。pSH70-1の塩基配列から推定される3通りのアミノ酸配列の内の1つは、すでに報告されている各種生物の恒常型HSP70との間に85%以上の高い相同性を示した。サザンブロット法による解析からpSH70-1は、ゲノム上に単一コピーで存在することが分かった。また、ノーザンブロット法による解析から、pSH70-1の反応する3.2kbのmRNAの発現量は、虫体が発育する間に増加することが示された。これらのことから、ベネズエラ糞線虫のHSP70関連遺伝子は、感染時の虫体発育に深く関与する遺伝子であることが示唆された。

以上5章の成績から、スナネズミをベネズエラ糞線虫の宿主として用いることによって効率のよい継代法が確立され、また、自由生活期と寄生期の幼虫における構成蛋白質の変化は、発育環境によるものと推察された。さらに、自由生活期の幼虫を寄生期の虫体に発育させる*in vitro*の培養系の確立によって、感染時の虫体発育にHSPが重要な役割りを果たしていることが示唆された。なかでもHSP70については遺伝子レベルでも発現が認められ、環境への適応及び形態変化の誘導が遺伝子によって規定され、複雑な生活環を営

む上で予めプログラムされていることを示唆した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 神 谷 正 男  
副 査 教 授 小 沼 操  
副 査 教 授 渡 邊 智 正  
副 査 助 教 授 奥 祐 三 郎

学 位 論 文 題 名

## ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫から 寄生期幼虫への発育に関する研究

土壌伝播性の糞線虫には、外界の自由生活期と宿主寄生期の2つの発育期が存在する。宿主への感染は皮膚より侵入する第3期幼虫(L<sub>3</sub>)によって成立し、その後は体内を移行し寄生部位である小腸内で第4期幼虫から成虫にまで発育する。本研究は、この一連の発育過程においてL<sub>3</sub>がどのようにして異なった環境に適応し発育するのか、感染時の虫体発育過程に焦点をあて、ヒト及び家畜に寄生する糞線虫類のモデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫を用いてその発育機構について検討したものである。

ベネズエラ糞線虫の実験室における継代は、通常ラットを用いて行われている。しかし、継代方法が繁雑で、自由生活期L<sub>3</sub>を多数入手する方法は確立されていない。申請者は代替宿主を用いた継代方法の改良を試み、スナネズミにおける成虫の長期寄生現象を利用した長期継代法を確立した。そこで、一度に多数の自由生活期L<sub>3</sub>を準備できるようになったことから、各発育期における虫体構成蛋白質を調べた。その結果、自由生活期と寄生期の虫体では大きく異なることを明らかにし、この差異は虫体を取り巻く環境に依存するものと推察した。

自由生活期L<sub>3</sub>の好適発育温度は25°Cである。申請者は自由生活期L<sub>3</sub>の培養温度に注目し、*in vitro*の培養系確立を試みた。これによって、培養を宿主の体温である37°Cで実施することによって、寄生期L<sub>3</sub>の形態的特徴を有した虫体に変化し、加えて、構成蛋白質及び抗原性の面からも十分に目的を果たした培養系の確立に成功した。また、発育が温度変化によって認められたことから熱ショック蛋白質(HSP)の産生が形態変化に関与するものと想定された。そこで、培養温度37°Cで自由生活期L<sub>3</sub>が産生する蛋白質及び遺伝子の発現についてさらに検討を行った。

自由生活期L<sub>3</sub>の形態が寄生期へと変化する過程で、分子量70kDaの恒常型HSP70の産生増大及び分子量16~22kDa付近の低分子量領域蛋白質のあらたな産生が確認された。また、自由生活期L<sub>3</sub>よりHSP70関連遺伝子を単離することによって、本遺伝子が形態変化にともなって発現する遺伝子のひとつと考えられ、感染時の虫体発育にストレス蛋白質のひとつであるHSP70が重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、感染時の虫体発育を再現した*in vitro*の培養系によって、感染時における虫体の生化学的機構の一端が明らかにされた。これらの成果は、一連の発育過程における環境へ

の適応及び形態変化の誘導が遺伝子によって規定され、複雑な生活環を営む上で予めプログラムされていることを、糞線虫属の線虫で初めて明らかにしたもので宿主-寄生虫相互関係を理解する上で重要な知見であった。また、モデル寄生虫としてのベネズエラ糞線虫の有用性をさらに高めたものであり、糞線虫属線虫の生物学的機能解析の進展に寄与するところが大きい。審査員一同は、辻 尚利氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。