



Title	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
Author(s)	辻, 尚利; Tsuji, Naotoshi
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第4810号
Issue Date	1995-06-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3083398
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51280
Type	doctoral thesis
File Information	000000287706.pdf



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

辻 尚 利

1995

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

173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

略語一覧表

2D-PAGE	two-dimensional poly acrylamide gel electrophoresis	二次元電気泳動
bp	base pair	
cDNA	complementary DNA	
D-MEM	Dulbecco's modified eagle's medium	ダルベッコ改変イーグル培養液
DNA	deoxyribonucleic acid	
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	
EPG	egg per gram feces	糞便1g当たりの虫卵数
HSC	heat shock cognate	恒常型熱ショック蛋白質
HSP	heat shock protein	熱ショック蛋白質
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid	
kb	kilobase	
kDa	kilodalton	
L ₃	third-stage larva	第3期幼虫
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonic acid	
mRNA	messenger RNA	
NEPHGE	non-equilibrium pH gradient gel electrophoresis	非平衡pH勾配ゲル 電気泳動
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝食塩液
PFU	plaque-forming unit	
PVDF	polyvinylidene difluoride	
RNA	ribonucleic acid	
SDS	sodium dodecyl sulfate	
SSC	standard saline citrate	
SSCP	standard saline citrate phosphate	
TPBS	tween 20 phosphate buffered saline	ツウイーン20加リン酸緩衝食塩液

目次

緒言	-----	1
第 I 章 スナネズミを用いたベネズエラ糞線虫の長期継代法の確立	-----	5
1. 序文	-----	6
2. 材料と方法	-----	7
3. 成績	-----	8
1)ベネズエラ糞線虫感染スナネズミ及び感染ラットにおける糞便1g 当たりの虫卵数の推移の比較		
2)ベネズエラ糞線虫感染スナネズミ及び感染ラットの小腸より回収 された成虫数の比較		
3)ベネズエラ糞線虫感染スナネズミにおける糞便1g当たりの虫卵数 の長期推移		
4. 考察	-----	11
5. 要旨	-----	13
第 II 章 ベネズエラ糞線虫の各発育期における構成蛋白質の比較	-----	14
1. 序文	-----	15
2. 材料と方法	-----	16
3. 成績	-----	18
ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫, 寄生期幼虫及び成虫におけ る構成蛋白質の比較		
4. 考察	-----	20
5. 要旨	-----	21
第 III 章 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 <i>in vitro</i> 培養系の確立	-----	22
1. 序文	-----	23
2. 材料と方法	-----	24
3. 成績	-----	26

1) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫の経時的形態変化	
2) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫の構成蛋白質の比較	
3) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫ならびに感染ラットより回収した寄生期幼虫における抗原性の比較	
4. 考察	31
5. 要旨	33
第IV章 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おける熱ショック蛋白質の産生	34
1. 序文	35
2. 材料と方法	36
3. 成績	38
1) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫の産生蛋白質の比較	
2) 分子量70kDa蛋白質及び低分子量領域蛋白質の経時的変動	
3) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫における恒常型熱ショック蛋白質70の産生	
4. 考察	43
5. 要旨	45
第V章 ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫における熱ショック蛋白質70関連遺伝子の発現とその性状	46
1. 序文	47
2. 材料と方法	48
3. 成績	50
1) 熱ショック蛋白質70関連cDNA (pSH70-1) のクローニング及び塩基配列の決定	
2) ゲノムDNAにおけるpSH70-1の性状	
3) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫におけるpSH70-1の発現量の比較	
4. 考察	56
5. 要旨	58
総括	59

緒言

糞線虫症 (Strongyloidiasis) は糞線虫属 (Genus *Strongyloides*) の線虫によっておこる寄生虫性疾患である。ヒトにおける本症の分布は熱帯・亜熱帯を中心とした地域で、感染者の大半は土に接する機会の多い農作業従事者などでしめられている (57)。また、感染者の在住地域では、ヒト成人T細胞白血病ウイルス抗体保有者が極めて高率に検出されることから、ウイルス性疾患をもたらす寄生虫感染症として近年注目されるようになった (24)。一方、家畜での糞線虫症は、以前には産業上問題になることは少なかった。しかし、家畜の飼育形態の変化によって、オガクズが敷料として導入されて以来、糞線虫に起因する子牛の死亡例が多数報告されるようになった (75)。オガクズはもともと糞線虫などの消化管内線虫を培養する際に用いられてきた素材であった。このことから、夏期のオガクズを敷き詰めた牛舎は、糞線虫にとって好適な発育環境であったことがその後の調査で判明した (75)。本症の罹患者は、なんの前兆もなく死に至ることから、“ポックリ病”とも言われ、産業上はもちろんのこと、学術的にも死に至るメカニズムに興味を寄せられるようになった (77)。

糞線虫属の線虫は、宿主特異性が強いため、*S. stercoralis* はヒトに、*S. papillosus* (乳頭糞線虫) は牛に、*S. ratti* (ネズミ糞線虫) はラットというように、生活環の成立にはそれぞれの固有宿主を必要とする (71)。すなわち、ヒト及び家畜を宿主とする糞線虫は、マウスやラットの実験小動物には感染しない。このことから、ヒト及び家畜糞線虫症の研究は、主にネズミ糞線虫を感染させたマウスやラットの感染系を用いて行われてきた (16, 50)。モデル感染系を用いた糞線虫症の研究は宿主側、すなわちラットやマウスの免疫反応等の解析が中心となって進み、その成果は、ヒト及び家畜の糞線虫症における診断法及び治療法の確立に大きく貢献してきた (16)。しかし、その反面、糞線虫の発生・分化などに関するいわゆる、病原体側の生物学的機能についてはほとんど解明されていない。

一般に、哺乳類に寄生する線虫の生活環は非常に複雑である。なかでも糞線虫属の特徴は、体外の自由生活世代と寄生世代の2つの生活様式を持つことである (66)。自由生活世代や寄生世代で産卵された虫卵からラブジチス型 (R型) 幼虫が生まれ

る。その後、この幼虫は2回脱皮して感染性を有する第3期幼虫(L₃)として寄生世代となるか、あるいは4回脱皮してR型成虫として自由生活世代となるか、どちらかの発生過程をたどる。このように発生過程に2つの様式があるのは、発生分化の研究上非常に興味をもたれるところである。また、注目すべきところは生殖様式にもみられる。自由生活世代では雌雄異体の成虫が交尾して産卵するの対して、寄生世代では宿主の腸管内に雌成虫しか寄生しておらず、雄性先熟の雌雄同体あるいは単為生殖の雌成虫が産卵して次世代をつくる。このように糞線虫は、生物の発生を探る上で、貴重な題材となり得るものの1つであると思われる。

糞線虫の宿主体内における移行経路は、主にネズミ糞線虫を用いた実験によって明らかにされてきた(1, 30, 74)。皮膚より侵入したL₃は寄生期L₃として皮下組織を進みながら頭部にまで達し、頭蓋腔へ侵入後、鼻腔より食道へ嚥下され、最終的に小腸内で第4期幼虫から成虫にまで発育し寄生する。しかし、ヒト及び牛に寄生する糞線虫では、脳への幼虫移行は認められていない。事実、牛を用いた実験感染でも、脳からは1匹も寄生期L₃が回収されなかったことが報告されている(77)。

ドブネズミ(*Rattus norvegicus*)を自然宿主とする糞線虫にはネズミ糞線虫の他に*S. venezuelensis*(ベネズエラ糞線虫)が知られている。ベネズエラ糞線虫は1934年にBrumpt(11)によってはじめて報告され、これまでに世界各地の野鼠から分離されている(29, 71)。ラットに両糞線虫を実験感染させたWertheimら(83)によれば、一定数のL₃を皮下投与すると、小腸で成虫にまで発育する数はベネズエラ糞線虫の方が多いことから、ラットへの感染性はネズミ糞線虫より優れていたと述べている。さらに、Satoら(64)は宿主体内におけるベネズエラ糞線虫の移行経路に関する研究を行い、感染後のL₃は脳実質に侵入せず、皮下組織を移行した後、ほとんどが肺を通過し小腸に達することから、L₃の体内移行経路がネズミ糞線虫と大きく異なることを報告した。

糞線虫は自由生活期のL₃が経皮感染によって宿主体内に侵入し、この感染の前後で虫体は全く異なった環境にさらされることになる。これは虫体にとっては相当なストレス状態におかれているものと考えられる。しかし、実際に自由生活期L₃を実験的に宿主に感染させてみると、ほとんどの幼虫が体内に侵入し、発育していることから何らかのストレス回避機構が働いているものと考えられる(58)。寄生線虫類の環境適応メカニズムについて、Barrett(5)は、寄生虫の発育に關与する遺伝

子に、生活環全体を通して発現しているものと、ある発育期だけに特異的に発現する2通りの様式があると述べている。さらに、後者については生活環に存在する異なる環境に対して、寄生虫は2通りの適応様式をもつという仮説を立てている。すなわち、様式の1つは次の発育期に進む前に、すでに次の環境に適応する準備が予めプログラムされている場合である。2つ目は虫体があらたな環境に直面した際に、何らかの分子が虫体内に合成され、それから適応過程が準備されるという場合である。これらの仮説に対して、虫体の形態学を中心として進められてきたこれまでの研究手法では、その実証は困難であった。しかし、寄生虫領域においても分子生物学的手法が研究手法の1つにとり入れられようになった現在、徐々に Barrettの仮説は実証されてきている(45, 52, 59)。

一般に、生物はストレスから自己を防御する機能を細胞レベルにおいて備えている。特に、細胞の損傷を最小限に抑える手段として、細菌から哺乳動物の細胞に至るまで、ストレス蛋白質と呼ばれるストレスによって誘導される蛋白質を作り出すことが知られている(43)。ストレス蛋白質は、一時的な温度変化によって産生が認められることから熱ショック蛋白質とも呼ばれ、ストレス蛋白質と熱ショック蛋白質は同義語として扱われている。熱ショック蛋白質は分子量によっていくつかの群(ファミリー)に分けられている(44)。なかでも、分子量70キロダルトン(kDa)付近の蛋白質で構成される熱ショック蛋白質70ファミリーは、大腸菌やショウジョウバエの実験系を用いて最も研究が進められている蛋白質の一群である(7, 11)。

近年、寄生虫における熱ショック蛋白質の生物学的機能・意義に関する研究が多数報告されるようになってきた(45, 52, 59, 81)。熱ショック蛋白質の産生はストレス状態及び正常な発育時にも認められことから、おそらく自己の生活環を維持するために不可欠な蛋白質とされてきている(45, 52, 59)。特に、寄生線虫では、熱ショック蛋白質70ファミリーと低分子量の熱ショック蛋白質ファミリー(分子量が16から30kDa付近までの蛋白質)の2つが虫体の発育に重要な役割を果たしていることが報告されている(17, 35, 45, 79)。しかし、ベネズエラ糞線虫における熱ショック蛋白質に関する研究は全く実施されておらず、この蛋白質の生物学的機能・意義については不明である。

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L₃から寄生期L₃へ

の發育過程に焦点をあて、その發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継代では、2～3週間で次の宿主に替える必要があり繁雑であるため、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。次いで、自由生活期のL₃及びラットから寄生期のL₃を回収し、發育期の差異による虫体構成蛋白質について検討した。さらに、自由生活期L₃から寄生期L₃への發育における生化学的機構を明らかにする一環として、自由生活期L₃から寄生期L₃に發育させる*in vitro*の培養系確立を試みた。さらに、この培養系を用いて、發育に關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。

本論文は全5章から構成されている。第I章では、スナネズミにおけるベネズエラ糞線虫の感染態度について述べた。第II章では、二次元電気泳動を用いて自由生活期L₃、寄生期L₃及び成虫における構成蛋白質の差異について述べた。第III章では、温度25℃及び37℃で*in vitro*培養した自由生活期L₃の形態変化について比較検討し、さらに、それらの構成蛋白質及び抗原性について感染ラットから回収した寄生期L₃と比較した成績を述べた。第IV章では、*in vitro*の培養系を用いて、自由生活期L₃から寄生期L₃へと形態変化する間における熱ショック蛋白質の産生について述べた。第V章では、ベネズエラ糞線虫の熱ショック蛋白質70関連遺伝子の単離を試み、その性状及び發育過程における遺伝子の発現について検討した成績を記載した。

1. 序文

スナネズミは*Brugia*属など多くの寄生虫に対して、固有宿主とは異なった感受性を示すことで知られている(3)。すなわち、*Brugia pahangi*感染スナネズミでは、長期間のミクロフィラリア血症を示すため、この特異的な感染態度を利用して、寄生虫株の維持、宿主免疫応答及び駆虫薬の効果試験など各種寄生虫領域の実験に広くスナネズミが用いられている(3, 12, 38)。

ドブネズミを自然宿主とする*S. venezuelensis*(ベネズエラ糞線虫)は、ヒトの糞線虫*S. stercorarius*のモデル寄生虫として用いられ、その感染ラット及びマウスは糞線虫症の疾患モデルとして利用されている(64, 65)。しかしながら、ベネズエラ糞線虫感染ラットでは小腸内に寄生している成虫は自由生活期L₃感染後、2週目より徐々に体外に排除され、同3週目にはほとんどの成虫が体外に排虫されてしまう。しかも、1度感染が成立した宿主には再感染しないため、本虫の株継代などは非常に繁雑である。従って、スナネズミにベネズエラ糞線虫の感染が成立し、しかも*B. pahangi*感染時のような持続感染が成立すれば、糞線虫症の研究はさらに発展するものと考えられる。

そこで著者は、スナネズミ及びラットにベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃を感染させ、感染後両者の糞便1g当たりの虫卵数(EPG)の推移について調べた。

本章ではベネズエラ糞線虫感染スナネズミ及びラットにおける虫卵排出動態及び成虫の寄生態度について記載し、ラットの代替宿主としてスナネズミを用いた場合の有用性について論じた。

2. 材料と方法

供試寄生虫：ベネズエラ糞線虫は1984年鹿児島県下の野鼠より分離し，家畜衛生試験場寄生虫研究室においてSprague-Dawley (SD) 系ラットを用いて継代している株を用いた．自由生活期L₃はTairaら (76) が考案した糞便培養によって得た．すなわち，感染ラットの新鮮便を水道水で希釈し，100メッシュの金網を用いて濾過した後，ロートを備えた吸引ビンに脱脂綿を入れ濾液を吸引濾過した．濾液を含んだ脱脂綿をポリエチレン製の袋に入れ，両端をシールした後，温度25℃の空気相下で4日間静置した．その後，脱脂綿よりポリエチレンバッグの内側に移動してきた自由生活期L₃回収し，実験に供した．

供試動物：スナネズミ及びラットは，それぞれ寄生虫研究室で自家繁殖したTUM系，SD系を用いた．スナネズミは体重48-72 g，8-10週令，ラットは150-200 g，6-7週令のものを用いた．供試動物は1頭ずつ再感染を防ぐためワイヤー底のケージに入れ，餌及び水を適宜与えた．

実験設計：①スナネズミ及びラットの各動物1群4頭に，それぞれ自由生活期L₃を 1×10^2 ， 1×10^3 ， 1×10^4 匹感染させ，その後毎日糞便1g当たりの虫卵数 (EPG) を計数した．スナネズミでは感染後100日に，ラットでは同46日に小腸に寄生している成虫の数を調べた．②スナネズミに自由生活期L₃を 1×10^4 匹感染させ，その後450日間EPGの推移を調べた．

動物への自由生活期幼虫の感染：予め計数し所定数の自由生活期L₃を脱脂綿に含ませ，プラスチック製ビーカー容器内にその脱脂綿を静置した．その後直ちにビーカー内に動物を収容し直接皮膚に暴露させることによって感染させた．

EPGの計数：EPGはマックマスター法を改良したTairaらの方法 (76) によって計数した．

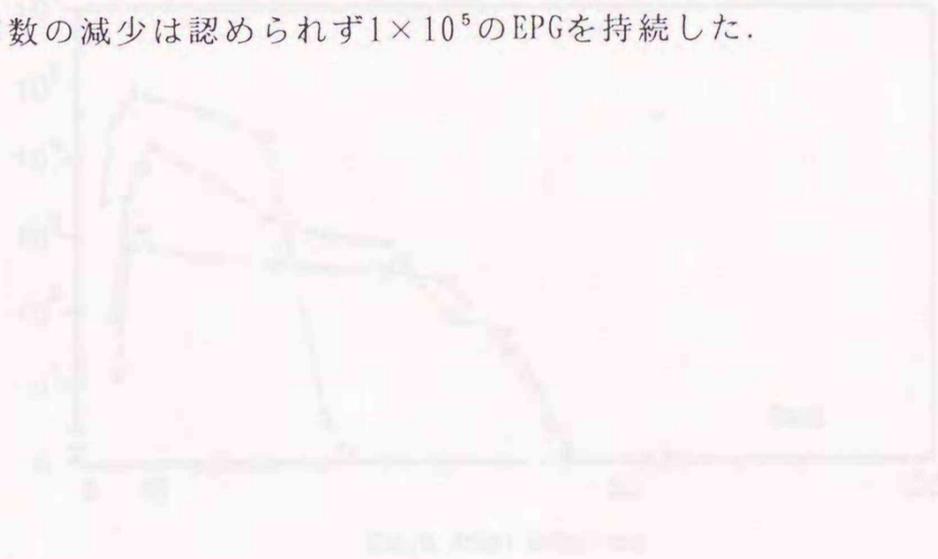
成虫の回収：動物をエーテルによって麻酔した後，直ちに小腸を摘出した．ペニシリン (500 IU/ml，明治製菓，東京) とストレプトマイシン (2 mg/ml，明治製菓) を含有した予め加温しておいた生理食塩水に切開した小腸を入れ，温度37℃，5%二酸化炭素下で一晩静置した．その後，遊出した成虫を回収して実体顕微鏡下で計数した．

3. 成績

1) ベネズエラ糞線虫感染スナネズミ及び感染ラットにおける糞便1g当たりの虫卵数の推移の比較：スナネズミ及びラットにおける感染後のEPGの推移を図1-1に示した。EPGは両動物ともに感染後6~7日より算定され、同9~10日に最高値に達した。その後、ラットではEPGが徐々に減少し、感染後27~45日に虫卵は糞便中より消失した。感染から虫卵消失までの期間は感染させた自由生活期L₃数が多いほど短かった。しかしながら、スナネズミのEPGは感染後100日まで、減少することなく高い値を示し、最高EPGは、感染L₃数 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 匹でそれぞれ約 1×10^3 , 1×10^4 及び 1×10^5 であった。

2) ベネズエラ糞線虫感染スナネズミ及び感染ラットの小腸より回収された成虫数の比較：感染後100日におけるスナネズミ小腸からの回収成虫数は感染L₃数に比例して増加した。これに対して、感染後46日におけるラットでは感染L₃数の増加によっても回収成虫数の増加は認められなかった(表1-1)。

3) ベネズエラ糞線虫感染スナネズミにおける糞便1g当たりの虫卵数の長期推移：図1-2に、2頭のスナネズミにおける感染後450日間のEPGの推移を示した。観察期間中、虫卵数の減少は認められず 1×10^5 のEPGを持続した。



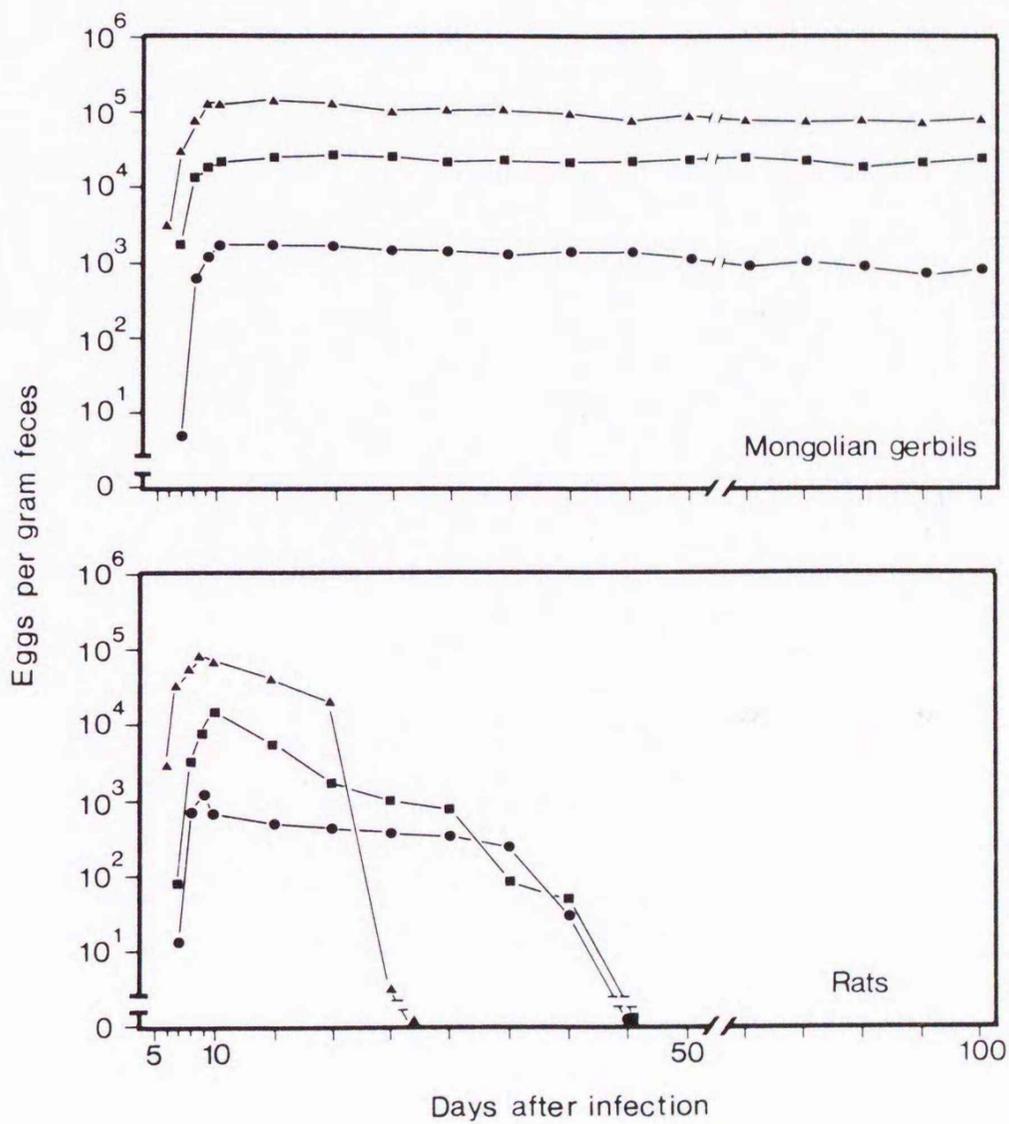


図 I-1 ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫 1×10^2 , 1×10^3 及び 1×10^4 匹を感染させたスナネズミ及びラットにおける糞便1g当たりの虫卵数の推移. ●: 感染させた自由生活期幼虫数 1×10^2 , ■: 1×10^3 , ▲: 1×10^4 匹. 数値は動物4頭の幾何平均で示した.

表 I-1 ベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫を感染させた
スナネズミ及びラットの小腸から回収した成虫数の比較.

動物	感染数 (匹)	剖検日 (感染後日数)	回収した成虫数 (平均±標準偏差)
スナネズミ	1×10^2	100	17.5 ± 5.6
	1×10^3	100	242.0 ± 110
	1×10^4	100	$2,076.0 \pm 569$
ラット	1×10^2	46	3.0 ± 0.7
	1×10^3	46	13.3 ± 3.0
	1×10^4	46	2.5 ± 2.7

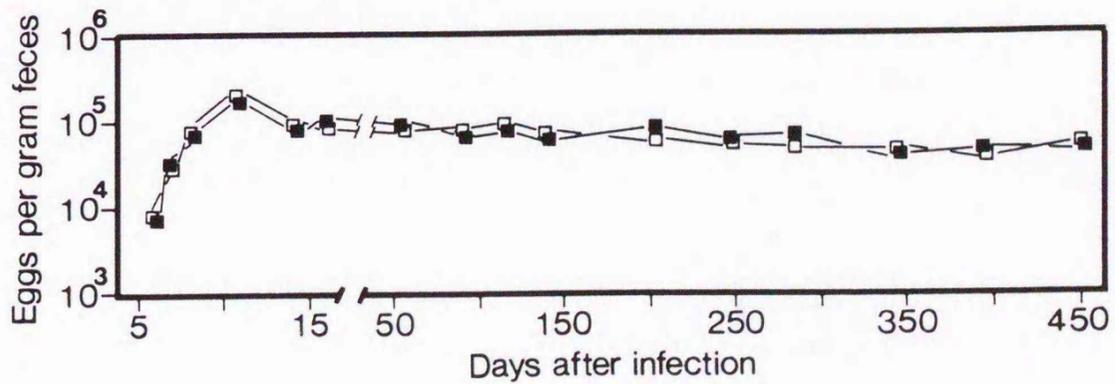


図 I-2 ベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫を 1×10^4 匹感染させたスナネズミにおける糞便1g当たりの虫卵数の長期推移.

4. 考察

ドブネズミを自然宿主とするネズミ糞線虫では、感染後数週で小腸から成虫は体外に排出される。その排出機構についてはこれまでに多数報告され、主に腸管の粘膜型肥満細胞の関与が強く示唆されている(2, 15, 48, 49)。ネズミ糞線虫をラットに感染させて虫体の寄生期間について調べたUchikawaら(80)によれば、感染から成虫が体外に排除されるまでの期間は、感染数に依存し、感染数の多いほど、虫体の寄生期間は短くなることが述べられている。今回の研究で、ラットにおけるベネズエラ糞線虫の虫卵の排出期間は、投与数が多いほど、虫卵の消失は早く認められたことから、ラットにおけるベネズエラ糞線虫の感染数と寄生期間との関係もネズミ糞線虫感染の場合とほぼ一致するものと思われた。一方、ベネズエラ糞線虫感染スナネズミでは、虫体が排出されずに長期にわたって寄生し産卵を続けることが確認された。

ベネズエラ糞線虫と近縁種で、ヒトに寄生する糞線虫(*S. stercoralis*)では、産卵された虫卵は、腸管内でラブジチス型幼虫から感染性を有するL₃まで発育し、再び腸管粘膜より体内に侵入する(71)。その結果、長期にわたって持続感染が成立することになり、宿主体内ではあらゆる発育期の虫体が認められる。このような糞線虫属における自家感染例は、現在までのところ*S. stercoralis*とネコを宿主とする*S. felis*などの数種のみ認められている感染様式である。今回の研究でも、自家感染による感染様式が糞線虫属のなかに存在することを考慮し、感染スナネズミにおける組織内幼虫、糞便内の幼虫を繰り返し検索した。しかし、寄生期L₃やラブジチス型幼虫などは検出されなかった。このことから、ベネズエラ糞線虫感染スナネズミにおける長期にわたる虫卵の排出は、成虫の持続寄生によるものと考えられた。

スナネズミにおけるベネズエラ糞線虫成虫の寄生期間はラットよりも長く、小腸に寄生する成虫は、少なくとも感染後450日間以上虫卵を排出しているものと考えられた。これまで宿主として用いられてきたラット及びマウスでは、感染後数週で虫卵は消失し、しかも再感染が成立しないため、実験の実施にあたっては相当数の動物を準備する必要があった。今回確認されたスナネズミにおけるベネズエラ糞線虫

のこの特異的な感染態度は、使用する実験動物数の数を減すことができ、効率の良い株継代の面からラットに代る継代用の動物として、非常に有用であることが示された。

5. 要旨

スナネズミにおけるベネズエラ糞線虫の成虫の寄生期間を明らかにするために、自由生活期L₃1×10²、1×10³及び1×10⁴匹をスナネズミ及びラットに感染させ、感染後100日までEPGを調べた。その結果、スナネズミではいずれの投与数においてもEPGは感染後9～10日にピークに達し、その後は投与数に依存したEPGを感染後100日まで維持した。これに対してラットでは感染後数週で虫卵は糞便中より消失した。また、感染後100日における小腸内の成虫数を調べたところ、回収された成虫数は投与数に依存した数値を示した。さらに、自由生活期L₃1×10⁴匹を感染させたスナネズミについて感染後450日までEPGを調べたところ、感染後450日まで虫卵は減少することなく、安定したEPGが持続することが確認された。これらの成績から、スナネズミは自然宿主であるラットの代替宿主として、ベネズエラ糞線虫株の維持などに有用であると考えられた。

第 II 章

ベネズエラ糞線虫の各発育期における構成蛋白質の比較

1. 序文

近年、電気泳動を用いた蛋白質解析によって、寄生虫の構成蛋白質が発育期の違いによって差異があることが明らかにされてきている(4, 84)。ネズミ糞線虫の自由生活期L₃と成虫を用いてそれぞれ構成蛋白質を調べたNorthern(53)によると、両者にはそれぞれの発育期に特異的な蛋白質が存在すると述べている。しかし、糞線虫では体内移行という特異な発育期が存在するにもかかわらず、これまでに寄生期L₃の構成蛋白質について解析した報告はない。その理由として、糞線虫属のモデル寄生虫として用いられてきたネズミ糞線虫では、蛋白質解析に供するだけの虫体が感染動物から十分に得られないことによるものと考えられた。

一方、ドブネズミを自然宿主とするベネズエラ糞線虫では、感染後寄生期L₃が小腸に達するまでの間に、そのほとんどが肺を通過すると考えられている。自由生活期L₃の皮下投与後3日のマウスにおける各種臓器の寄生期L₃を調べたSatoら(64)によれば、投与数の50%以上が肺から回収されたと述べている。このことから、ベネズエラ糞線虫では、寄生期L₃を比較的容易にしかも多数獲得できる点で、糞線虫属の体内移行期における各種虫体解析に有用であると考えられた。

生物学領域における蛋白質解析では、二次元電気泳動(2D-PAGE)は分離能及び分解能の高さから有効な解析手段の1つにあげられている(54)。寄生虫学領域でも2D-PAGEは広く用いられ、寄生虫種間の分類などに応用されている(72, 73)。

本章では、ベネズエラ糞線虫の各発育期に特異的な蛋白質を明らかにするために、2D-PAGEを用いて自由生活期L₃、寄生期L₃及び成虫の3つの発育期について構成蛋白質の解析を試みた。

2. 材料と方法

供試寄生虫：ベネズエラ糞線虫は第 I 章で記載した株と同一であった。

供試動物：動物は体重180-200gの雄のラットを用いた。

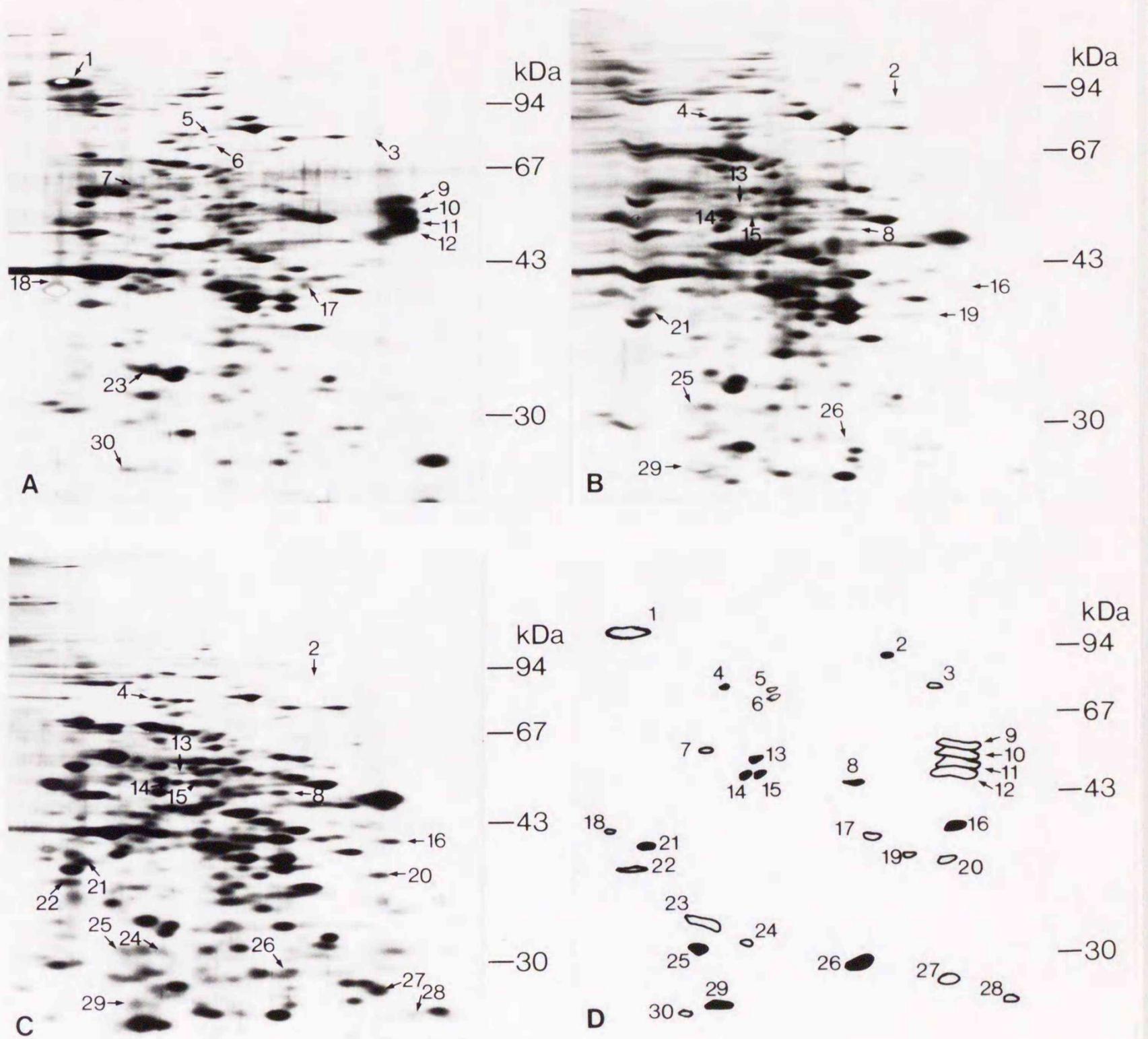
供試虫体の分離：自由生活期L₃は第 I 章で述べた糞便培養によって得た。培養後の自由生活期L₃はペニシリン(400 IU/ml)及び硫酸ストレプトマイシン(2 mg/ml)を含有したリン酸緩衝食塩水(PBS: 0.01M: pH 7.4)で5~6回洗浄した後、PBSに入れ-80°Cで凍結保存した。寄生期L₃は自由生活期L₃感染後3日のラットより得た。すなわち、第 I 章に記載した感染方法によって自由生活期L₃を感染させたラットを感染後3日にエーテル麻醉殺した後、肺を摘出して適当な大きさに細切した。その後、組織より寄生期L₃を遊出させるため、予めPBSを入れた尖底遠心管を加温しておき、その中に細切した臓器をつめた病理組織保存用袋(TISSU-A-PAK, 形式: T-0, 千葉メディカル)を入れ37°Cで3時間静置した。遠心管の沈査よりL₃を回収した後、5~6回洗浄液で洗浄した後、PBSに入れて-80°Cで凍結保存した。成虫は自由生活期L₃感染後10日のラットの小腸より得た。すなわち、感染ラットをエーテル麻醉殺した後、洗浄液を入れて加温した尖底遠心管に切開した小腸を入れ、37°C、5%二酸化炭素下で3時間静置した。遠心管の沈査より組織から遊出してきた成虫を回収し、寄生期L₃と同様に洗浄した後保存した。

電気泳動：2D-PAGEはSugimotoら(72)の方法に準じて行った。電気泳動用の試料は以下のようにして調製した。分離した自由生活期L₃、寄生期L₃及び成虫をPBSで洗浄した後、氷上に置いたガラスホモジナイザーを用いて25 µlのPBSでホモジナイズした。懸濁液に等量の二次元電気泳動緩衝溶液[9M 尿素, 4% (v/v) ノニデットP-40, 2% (v/v) 2-メルカプトエタノール及び2% (v/v) アンホライン(pH3.5-10, LKB, Sweden)]を混和した後、遠心して非可溶化物を除き、上清を泳動用試料とした。試料の蛋白質濃度は市販の蛋白質アッセイキット(Bio-Rad, USA)を用いて調べた。蛋白質量120-170 µgを含有した15 µlの試料を一次元目の非平衡pH勾配ゲル電気泳動[NEPHGE, O'Farrellら(54)]用管状ゲルに載せ、400ボルトで2時間電気泳動を行った。二次元目はLaemmli and Favre(40)の方法に準じて作製した10%のポリアクリルアミドゲルを用いて実施した。電気泳動後、ゲルを銀染色キット

(第一化学薬品, 東京) を用いて染色した。

3. 成績

ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫，寄生期幼虫及び成虫における構成蛋白質の比較：図II-1のA-Cに2D-PAGEによって分離された自由生活期L₃，寄生期L₃及び成虫の蛋白質スポットパターンを示した。それぞれの発育期で200以上の蛋白質スポットが確認された。その内，ほとんどのスポットが3つの発育期に共通して認められたが，図II-1のDに示すように，発育期に特異的もしくは2つの発育期に共通なスポットとして合計30個のスポットが確認された。スポットNos. 19, 20, 22, 24, 27及び28を除いて，他の全てのスポットは，寄生期L₃及び成虫に共通していた。また，スポットNo. 19は寄生期L₃のみで検出されたのに対し，スポットNos. 20, 22, 24, 27及び28は成虫のみで検出された。一方，自由生活期L₃に特異的なスポットとして，Nos. 1, 3, 5-7, 9-12, 17, 23及び30が検出された。



図II-1 ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫 (A), 寄生期幼虫 (B) 及び成虫 (C) の二次元電気泳動像. 図A, B 及びCにおける矢印は2つの発育期にのみに共通もしくは1つの発育期だけに特異的な蛋白質スポットであることを示す. (D) 図A-Cで認められたスポットパターンの模式図. 白ぬきは発育期に特異的な蛋白質. 黒塗りは寄生期幼虫と成虫に共通して認められた蛋白質. ゲル及び模式図のpIは左側が塩基性, 右側が酸性を示す. 分子量マーカーは各図の右側にキロダルトン (kDa) で示した.

4. 考察

今回の研究では、ベネズエラ糞線虫の発育期によって構成蛋白質に違いがあることが確認された。特に興味ある成績として、自由生活期 L_3 の主要蛋白質であるスポットNos. 12-14は、寄生期 L_3 及び成虫では消失していることが確認された。ネズミ糞線虫の自由生活期 L_3 では、Groveら(27)の電子顕微鏡を用いた観察から、宿主の皮膚を通過する間に最上層の虫体表皮を脱ぎ捨てることが報告されている。このことから、今回観察されたスポットの消失は脱落した表皮に関連する蛋白質であるものと考えられた。

ベネズエラ糞線虫の自由生活期 L_3 は、虫卵よりふ化した第1期幼虫(L_1)、第2期幼虫(L_2)とその後脱皮を経て、経皮感染によって体内に侵入した後も脱皮することなく、 L_3 のままで体内を移動し小腸内で L_4 及び成虫へと発育する。今回の研究で、寄生期 L_3 及び成虫のスポットパターンは、発育期が全く異なるものでありながら類似していた。これに対して、自由生活期 L_3 と寄生期 L_3 とも、同じ L_3 でありながら、構成蛋白質に大きな違いが認められた。Barrett(5)によれば、一般に線虫は、自由生活期から寄生期への発育過程でそれぞれの環境に適応するために、虫体の細胞膜の構成成分及び代謝回路が、劇的に変化することが述べられている。今回の研究で認められたベネズエラ糞線虫の構成蛋白質の大きな違いは2つの環境、すなわち外界の自由生活期と宿主体内の寄生期における環境の違いに大きく依存するものと考えられた。

5. 要旨

ベネズエラ糞線虫の各発育期における特異的な蛋白質を明らかにするため、2D-PAGEを用いて自由生活期L₃、寄生期L₃及び成虫の構成蛋白質を解析した。その結果、自由生活期L₃は13個の特異的スポットを有し、寄生期L₃及び成虫とは明らかに区別された。これに対して、寄生期L₃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。これら発育期における構成蛋白質の違いは、外界の自由生活期と宿主体内の寄生期における環境の違いによるものと考えられた。

第三章

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 *in vitro* 培養系の確立

1. 序文

一般に、寄生虫では自由生活期から寄生期への発育には、温度、二酸化炭素などの環境要因が深く関与していると言われている(52)。寄生線虫の *Nippostrongylus brasiliensis* では、温度変化だけで自由生活期の L₃ が寄生期への形態に変化することが報告されている(9)。

ベネズエラ糞線虫の生活環には自由生活期と寄生期が存在する(42)。宿主への感染は、自由生活期の L₃ によって成立し、その後は寄生期の L₃ として発育する。本虫の生活環を実験室内で維持する場合、通常、温度 25°C を適温とする糞便培養によって自由生活期 L₃ を準備し、宿主の皮下に直接投与するか、あるいは第 1 章に記載した方法によって経皮感染させている。感染時、自由生活期 L₃ は温度 25°C から 37°C への変化にすばやく適応し、虫体はなんら損傷も受けずに発育する。これら L₃ の一連の行動は、虫体がどのようにして温度変化に適応し、自由生活期が寄生期へと発育するのか、そのメカニズムに興味をもたれる。

一方、糞線虫属の線虫において、自由生活期 L₃ を寄生期 L₃ に発育させる *in vitro* の培養系については、これまでにネズミ糞線虫を用いて試みられてきたが、確立されるまでには至っていない(14, 18, 28, 46, 78)。

著者は、自由生活世代から寄生世代への発育に関する生化学的機構を解明する一環として、まずはじめに、自由生活期 L₃ を寄生期 L₃ に発育させる *in vitro* の培養系確立を試みた。

本章では、温度 25°C 及び 37°C で培養した自由生活期 L₃ の形態変化、構成蛋白質及び抗原性の 3 つについて検討した。

2. 材料と方法

供試寄生虫：供試したベネズエラ糞線虫株及び培養に用いた自由生活期L₃は、第I章に記載した通りである。in vitro培養に供した自由生活期L₃は、ペニシリンGカリウム（500 units/ml, 半井化学, 京都）, 硫酸ストレプトマイシン（500 units/ml, 半井化学, 京都）及びアンホテリシンB（4 μg/ml, Sigma, USA）を含有したリン酸緩衝食塩水（PBS; 0.01M, pH 7.4）を用いて5~6回洗浄した。寄生期L₃は自由生活期L₃感染後3日のラットの皮下組織より得た。回収方法は第II章に記載した通りである。

感染経過血清：ベネズエラ糞線虫自由生活期L₃を第I章に記載した方法によってラットに感染させたラットより得た。すなわち、初回感染として 1×10^4 匹の自由生活期L₃を経皮感染させ、さらに初回感染後21日に 1×10^4 匹を感染させたラットから、初回感染後30日に全採血して感染経過血清を準備した。血清は-20°Cに保存し、ウェスタンブロット法の一次血清として用いた。

in vitro培養：供試培養液はダルベッコ [Dulbecco and Freeman (19)] 改変イーグル液（D-MEM, 430-3700EA, Gibco BRL, USA）であった。培養液にはペニシリンGカリウム（250 units/ml, 半井化学, 京都）, 硫酸ストレプトマイシン（250 units/ml, 半井化学, 京都）及びアンホテリシンB（2 μg/ml, Sigma, USA）を含有させた。洗浄し終えた自由生活期L₃ 2×10^4 匹を、5 mlの培養液を入れた組織培養用フラスコ内（25 ml, Falcon, USA）に移し、栓をした後水平状態のまま温度25°Cあるいは37°Cの空気相下に静置した。培養液は隔日で交換した。培養期間中、数匹の虫体を採取して形態変化を顕微鏡下で毎日観察した。また、必要に応じて、回収した虫体を氷上のスライドガラスに載せ、直接顕微鏡下（Zeiss, Axiophot, Germany）で写真撮影した。

虫体計測：虫体の体長等の計測は、自動計測装置（ニコン, Cosmozone 1SA, 東京）を用いて行った。虫体の計測部位は表III-1に示した。

蛋白質解析：第II章に記載した2D-PAGEを用いて虫体の構成蛋白質の変化を調べた。電気泳動用の試料は以下のようにして作製した。すなわち、虫体 2×10^4 匹を培養フラスコより採取し、PBSを用いて洗浄した後、マイクロチューブに入れて25 μlの

PBSを混和後、マイクロホモジナイザー（コスモバイオ，東京）を用いて氷上でホモジナイズした。その後、直ちに二次元電気泳動用緩衝溶液（組成は第II章に記載した）とホモジナイズした虫体を等量混和し十分に可溶化した。遠心後非可溶化成分を遠心除去して上清を電気泳動用の試料とし、その15 μ lを非平衡pH勾配ゲル電気泳動（NEPHGE）用の管状ゲルに供した。NEPHGEは400V、2時間の条件で実施した。二次元目はLaemmli（39）の方法に準じて12.5%の均一ポリアクリルアミドゲルを用いて実施した。電気泳動後、ゲルは銀染色キット（第一化学，東京）を用いて染色あるいはウェスタンブロット解析に供試した。

ウェスタンブロット法による解析：ウェスタンブロット法はKawazuら（36）が記載した方法に従って実施した。すなわち、2D-PAGEによって分離した虫体の蛋白質を、Dunn（20）の方法に準じてポリビニルデンジフルオライド膜（PVDF, Immo-bilon transfer membrane; Millipore, USA）に転写した。蛋白質を転写した膜は1%フィッシュゼラチンを含む0.1%ツイーン20加PBS（TPBS）で一晩静置した。100倍希釈した感染ラット血清を一次血清として転写膜に1時間反応させ、TPBSで3回洗浄した後、2,500倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ二次血清（H&L chain, Cappel, USA）に1時間反応させた。転写膜は3回TPBSで洗浄後、1.3mMのジアミノベンチジン（半井化学，京都），1.3mMの塩化コバルト（Sigma, USA）及び0.02%過酸化水素（半井化学，京都）を含む基質溶液を用いて発色反応を実施した。

3. 成績

1) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫の経時的形態変化：温度25℃で培養した自由生活期L₃では培養後7日間に何ら変化は認められなかった。これに対して、温度37℃で培養した虫体では培養後1日より特異的な形態変化が認められた(図Ⅲ-1)。すなわち、培養後1日に頭部は球状を呈し、食道及び腸管細胞の拡幅が認められ(図Ⅲ-1B)、さらに、培養後3日には、頭部の球状化及び角皮下には小滴の蓄積が確認された(図Ⅲ-1C, D)。培養した虫体の神経環、食道腸管結合部及び肛門部における体幅が増加したのにもかかわらず、虫体の体長、食道長などについては、培養後7日でも変化は認められなかった(表Ⅲ-1)。

培養は虫体の生存を確認しながら14日まで継続し、虫体の形態変化を観察したが第4期幼虫へ発育したものは認められなかった。

2) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫の構成蛋白質の比較：図Ⅲ-2に温度25℃及び37℃で3日間培養した虫体の2D-PAGEによる蛋白質スポットパターンを比較した。それぞれの虫体で200個以上のスポットが認められ、そのほとんどが共通であった。しかし、番号を記した合計17個スポット、スポットNos. 1-4及び5-17は温度25℃及び37℃の虫体にそれぞれ特異的であった。

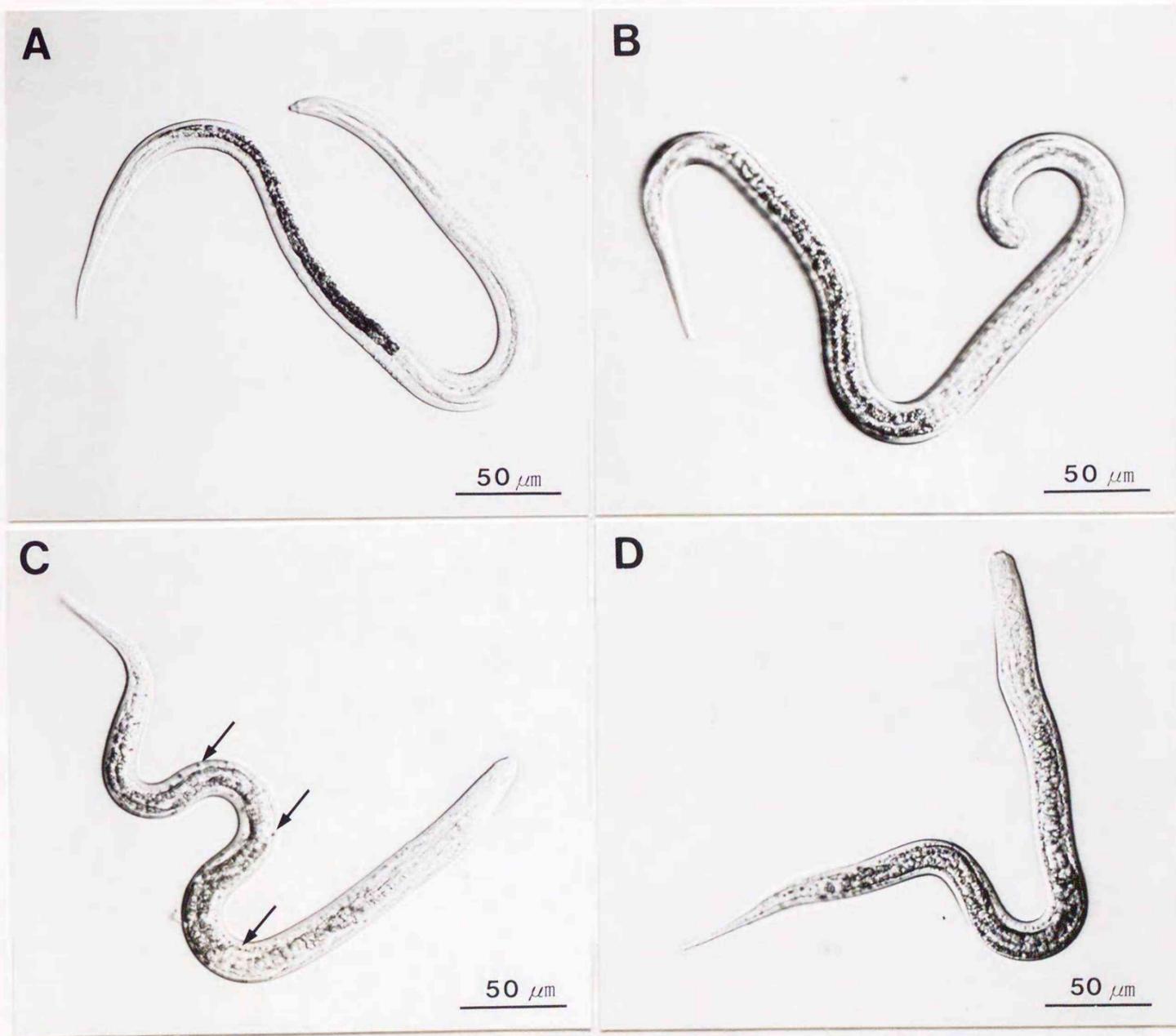
3) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫ならびに感染ラットより回収した寄生期幼虫における抗原性の比較：温度25℃及び37℃で3日間培養した虫体と、感染ラットより回収した虫体3種についてのウェスタンブロット法による解析の成績を図Ⅲ-3に示した。スポットNos. 6, 7, 12及び13は培養虫体及び宿主から回収した寄生期L₃に共通であった。温度37℃で培養した虫体及び宿主より回収した寄生期L₃では、スポットNos. 2, 4, 5, 8-10, 14及び15が共通して認められたのに対して、温度25℃と37℃ではスポットNo. 1のみが共通であった。スポットNos. 3, 16及び17はラットから回収した寄生期L₃に特異的であった。

表Ⅲ-1 温度25℃及び37℃のダルベッコ改変イーグル培養液で培養したベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫の虫体計測値の経時的变化。

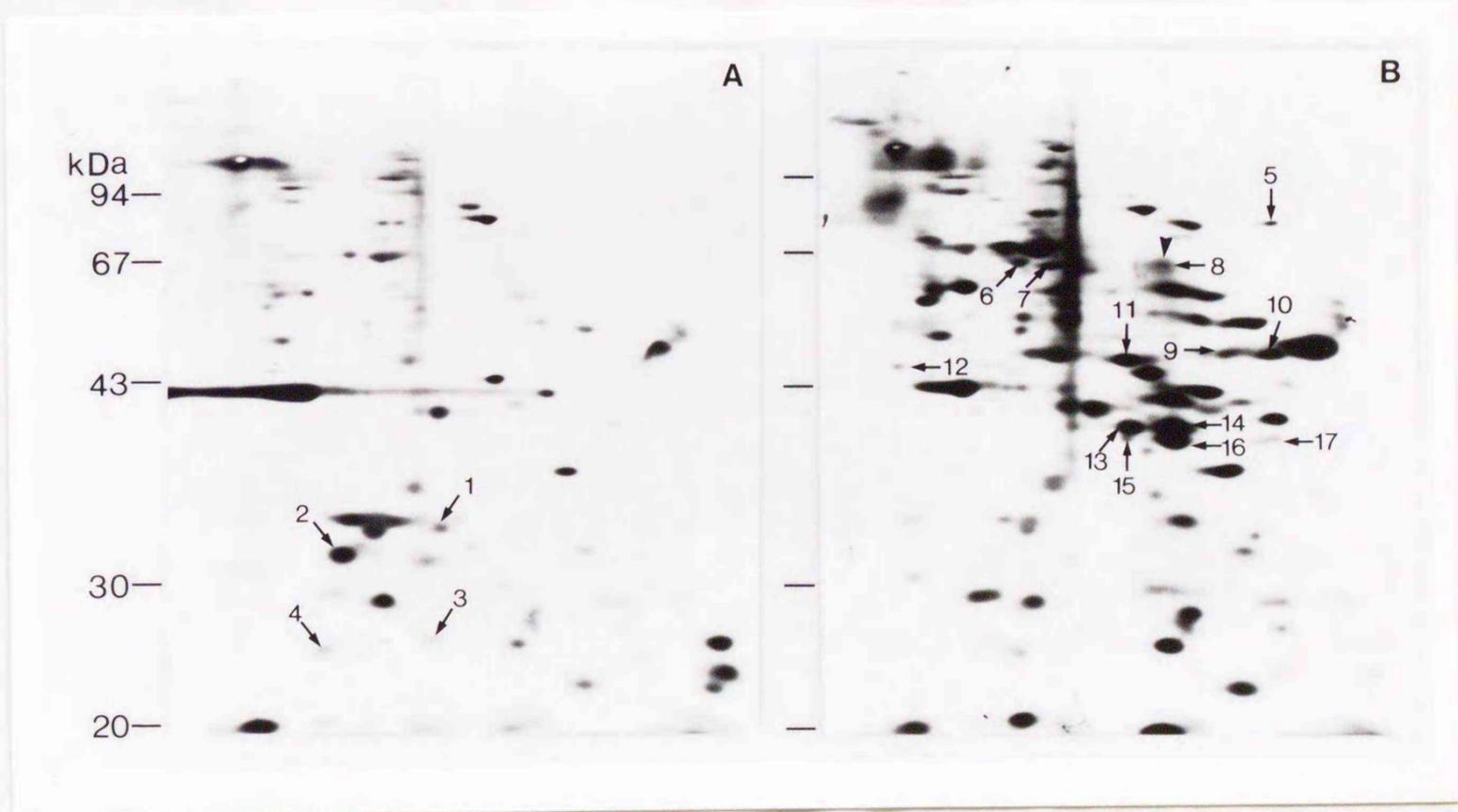
計測部位	温度 (°C)	培養後日数					
		0	1	2	3	5	7
長さ							
体長	25	561.3±25.1 ^{a)}	557.2±33.5	538.2±21.1	543.8±32.6	532.7±26.5	546.6±32.7
	37		514.1±39.0	511.1±20.0	515.0±19.5	509.3±31.8	515.9±28.3
食道	25	251.7±16.4	248.9±18.9	253.5±16.4	246.3±12.6	236.2±8.9	247.9±15.6
	37		231.0±24.1	232.5±13.7	221.6±8.9	235.7±18.7	241.0±13.6
腸管	25	240.5±28.0	237.5±25.2	243.8±24.5	237.9±25.3	223.3±21.3	234.2±23.1
	37		223.5±9.2	232.6±16.3	229.0±25.2	225.8±24.8	235.0±13.9
尾	25	60.0±9.3	62.3±6.4	60.4±4.7	61.7±6.0	63.1±5.7	59.5±7.4
	37		56.5±5.6	54.7±7.5	54.0±4.5	53.7±5.0	54.1±5.4
幅							
神経輪	25	15.6±1.4	14.6±1.8	14.4±1.8	15.8±2.0	14.4±1.5	15.4±1.2
	37		18.8±2.4	19.8±2.1	20.1±1.3	22.9±2.0	22.4±1.6
E-I ^{b)} 結合	25	16.8±1.9	15.5±1.9	16.0±3.1	17.3±1.9	16.4±1.1	16.9±1.2
	37		19.8±1.5	20.4±2.7	19.7±1.2	21.0±1.9	22.2±2.1
肛門	25	9.9±1.6	9.2±1.4	9.3±1.4	9.7±1.2	10.0±1.2	9.4±1.7
	37		9.2±1.8	10.5±1.1	10.9±1.2	11.3±1.2	11.5±1.7

^{a)} 数値は虫体20匹の平均値±標準偏差

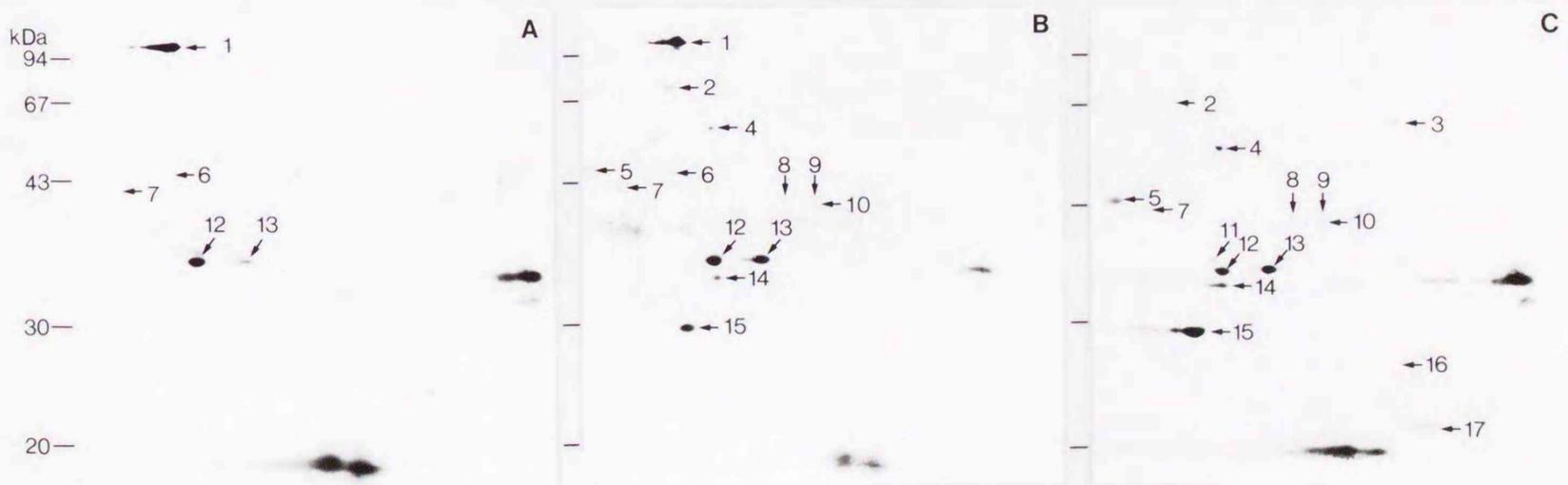
^{b)} 食道と腸管の結合部



図Ⅲ-1 温度37℃のダルベッコ改変イーグル培養液で培養したベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫の形態変化。A：培養前，B：培養後1日，C：培養後3日，D：培養後5日。Cにおける矢印は角皮下の小滴を指す。



図Ⅲ-2 培養後3日におけるベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫の二次元電気泳動による蛋白質スポットパターン. A: 温度25°Cで培養した虫体, B: 温度37°Cで培養した虫体, 電気泳動に供した可溶性蛋白質は 2×10^4 匹の虫体から得た. ゲルのpIは左側が塩基性, 右側が酸性を示す. 分子量マーカーは左側にキロダルトン (kDa) で示した.



図Ⅲ-3 培養したベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫ならびに感染ラットより回収した寄生期幼虫のウェスタンブロット法による解析. A: 温度25°Cで培養した虫体, B: 温度37°Cで培養した虫体, C: 寄生期幼虫. 転写膜のpIは左側が塩基性, 右側が酸性を示す. 分子量マーカーは左側にキロダルトン(kDa)で示した.

4. 考察

今回の研究では、組成が明らかな市販の培養液を用いて、自由生活期のL₃が適温とする温度25℃と、宿主の体内温度である温度37℃の培養温度条件における自由生活期L₃の発育について検討した。糞線虫の寄生期L₃に関する形態学的研究は、ネズミ糞線虫感染ラットを用いたMimoriら(47)によって実施されている。それによると、感染ラットの皮下より回収した虫体は、頭部が球状を示し、感染前の虫体とは明らかに異なることが述べられている。今回の研究でも、D-MEMを用いた温度37℃の培養条件下で自由生活期L₃を培養したところ、虫体の形態はMimoriら(47)の成績とほぼ一致するところまで変化した。また、培養後5日より観察された角皮下の小滴については、ネズミ糞線虫感染ラットの小腸より回収された脱皮前の寄生期L₃でも同じように確認されている。このような小滴の出現についてはMimoriら(47)は、第3期幼虫から第4期幼虫への発育に関連する形態変化のひとつであろうと推察している。

Wertheim(82)は、ネズミ糞線虫の自由生活期L₃と寄生期L₃の体幅について比較した。それによると、寄生期L₃の体幅は自由生活期L₃より広いことが述べられている。今回の研究でも、温度37℃で培養した自由生活期L₃の体幅は、培養後増加し、ネズミ糞線虫での成績とほぼ一致していた。しかしながら、食道の長さや腸管の長さなどの体長については、特に有意な変化は認められなかった。一般に、寄生線虫の*in vitro*における発育は遅く、培養した虫体は、宿主体内で発育した寄生期L₃と比較しても小さいことが知られている(28, 78)。

今回の研究では、自由生活期L₃の培養にD-MEMを用いた。D-MEMは哺乳類の細胞培養を目的として作られた血清無添加の培養液である(19)。Bonner(10)は温度変化と適当な栄養素を添加することによって、*Nippostrongylus brasiliensis*の自由生活期L₃を寄生期L₃の形態にまで発育させることができることを報告した。今回の研究では、イスコブ改変ダルベッコ培養液(34)などの市販の培養液を用いて、自由生活期L₃を温度37℃で培養することによって、図III-1に示したような変化が認められた。しかしながら、ブドウ糖やアミノ酸などの栄養素を除いたハンクス緩衝溶液などの塩類緩衝溶液では、自由生活期L₃の形態変化は認められなかった。ベネズエ

ラ糞線虫自由生活期L₃から寄生期L₃への発育にどのような栄養素が必要であるかについては、さらに検討する必要があるものと考えられた。

二次元電気泳動を用いて培養した自由生活期L₃の構成蛋白質を比較したところ、温度25℃の虫体と37℃の虫体のスポットパターンは異なっていた。また、ウェスタンブロット法による解析によって、温度37℃で培養した自由生活期L₃の主要抗原はラットから回収した寄生期L₃のそれと酷似していることが確認された。これらの成績から、温度37℃で培養した自由生活期L₃は、形態変化だけでなく構成蛋白質及び抗原性において、寄生期L₃にまで発育したものと考えられた。しかしながら、培養によって発育した虫体を宿主に投与した場合、成虫まで発育し、産卵を行えるのかどうかは不明である。今後、ラットを用いてそれらの点を明らかにする必要があると思われた。

自由生活期から寄生期への発育は、糞線虫の生活環において外界と宿主の2つの環境に直面するところであり、その適応メカニズムについては興味あるところである。これまでに、糞線虫属の線虫に関する自由生活期から寄生期への発育過程における分子レベルでの解析は実施されていない。本章で確立した*in vitro*の培養系は、ベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃から寄生期L₃への発育に関する生物学的及び生化学的機能解明の研究に有用であると考えられた。

5. 要旨

ベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃を寄生期L₃に発育させる *in vitro* の培養系を確立するため、ダルベッコ改変イーグル培地を用いて温度25℃及び37℃の空気層下での培養を試み、虫体の形態、構成蛋白質及び抗原性の変化について検討した。温度37℃で培養した自由生活期L₃は、培養後1日より虫体の頭部が球形様の形態を呈し、体幅の増加や表皮下に小滴などが認められ、これは感染ラットから回収した寄生期L₃のもつ特徴的形態であった。しかし、温度25℃で培養した自由生活期L₃では、特に形態変化は認められなかった。温度25℃及び37℃で3日間培養した自由生活期L₃について、2D-PAGEを用いて構成蛋白質を解析したところ、合計17個のスポットによって両者の虫体は区別された。さらに、2D-PAGEとベネズエラ糞線虫感染ラット血清を用いて、培養した自由生活期L₃とラットより回収した寄生期L₃の抗原性についてウェスタンブロット法による解析を実施した。その結果、温度37℃で培養した虫体の主要抗原は寄生期L₃とほぼ同一であった。

以上の成績から、自由生活期L₃の温度25℃から37℃への温度変化は、自由生活期L₃が寄生期のL₃に発育するのに重要な役割を果たしていることが強く示唆された。今回確立した *in vitro* の培養系は糞線虫属の自由生活期から寄生期への発育機構を生物学的及び生化学的に研究に有用であると考えられた。

第IV章

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
発育における熱ショック蛋白質の産生

1. 序文

ベネズエラ糞線虫の宿主への感染は自由生活期L₃の経皮感染による。この感染の間に、自由生活期は外界から宿主体内の環境に瞬時に適応し発育する。

第Ⅲ章では、自由生活期L₃を寄生期L₃に発育させる*in vitro*の培養系を確立したことを述べた。この自由生活期L₃の形態は、通常用いられている細胞培養液の中で、培養を温度37℃の温度条件下で実施することによって寄生期L₃に変化した。さらに、発育した虫体の構成蛋白質及び抗原性を、ラットの皮下組織より回収した寄生期L₃と比較したところほぼ同一であることが明らかとなった。温度変化は虫体にとってストレスと考えられる。しかし、自由生活期L₃はむしろ温度変化を利用することによって寄生期L₃に発育しているものと考えられた。

温度変化によって産生される熱ショック蛋白質（HSP）は、哺乳類から植物、細菌に至るまでの生物種を問わず認められ、分子量によっていくつかのファミリーに分けられている（43）。HSPの産生は、生物の正常な発育・分化に重要な役割を果たしているだけでなく、侵襲に直面した時の自己防衛にも関与するなど、生命の維持活動になくてはならないものとされている（9, 13）。特に、生活環が複雑な寄生虫では、HSPが虫体の発育・分化ならびに虫体を取りまく環境から自己を守るための蛋白質であるといわれている（41, 45, 85）。また、HSPは多くの寄生虫感染症において抗体産生を促す主要な抗原として認められている（6, 52, 59, 69, 85）。

本章では、第Ⅲ章で確立した自由生活期L₃を寄生期L₃に発育させる*in vitro*の培養系を用いて、自由生活期から寄生期に形態変化するまでの間の産生蛋白質について検討した。

2. 材料と方法

供試寄生虫：供試したベネズエラ糞線虫株及び培養に用いた自由生活期L₃は、第I章に記載した通りである。

虫体のラジオアイソトープ標識：虫体は、25mMのHEPES緩衝溶液及び4mMのグルタミンを混和したメチオニン無添加のダルベッコ改変イーグル培地（GIBCO BRL, 320-1970AG, USA）中において、150 μ ciもしくは75 μ ciの³⁵S-メチオニン（Amersham, SJ1015, USA）で代謝標識した。標識後の虫体を上記の培養液で3回洗浄した。

虫体からの標識蛋白質の抽出：標識虫体は氷上においたホモジナイザーでホモジナイズしたのち、一次元及び二次元電気泳動用緩衝液で蛋白質を抽出した。一次元電気泳動用の試料は、2%(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、5%(V/V)2-メルカプトエタノールを含有したトリス-塩酸（0.0625M, pH 6.8）を用いて100°C、5分間で可溶化し、非可溶化物を遠心除去して調製した。2D-PAGEの試料は第II章に記載した緩衝溶液を用いて、ホモジナイズした虫体を可溶化し、一次元電気泳動と同様にして非可溶化物を除去して調製した。

虫体抽出液の解析：一次元電気泳動（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS-PAGE）はLaemmli（39）の方法に準じ、5-20%の密度勾配ゲルを用いて行った。2D-PAGEは非平衡pH勾配ゲル電気泳動〔（NEPHGE, O'Farrellら（54）〕とSDS-PAGEの組み合わせで行った。電気泳動後、ゲルを固定し増感液（Dupont, Enlighting, USA）に浸してゲル乾燥機（Biorad, USA）を用いて乾燥させた。オートラジオグラフィ及び蛋白質産生量の計測はバイオイメージングアナライザー（フジフィルム, BAS2000, 東京）を用いて行った。

ウェスタンブロット法による解析：2D-PAGEによる蛋白質の分離及びイムノブロットは、第III章に記載した方法で実施した。すなわち、ダルベッコ改変イーグル培養液で培養した自由生活期L₃をホモジナイズした後、二次元電気泳動用緩衝液で可溶化し、蛋白質を分離した後、ポリビニルデンジフルオライド膜（PVDF, Immobilon transfer membrane, Millipore, USA）に転写した。HSP70ファミリーの検出にあたっては、1,000倍に希釈したヒト熱ショック蛋白質の熱誘導型（HSP70）/恒常型

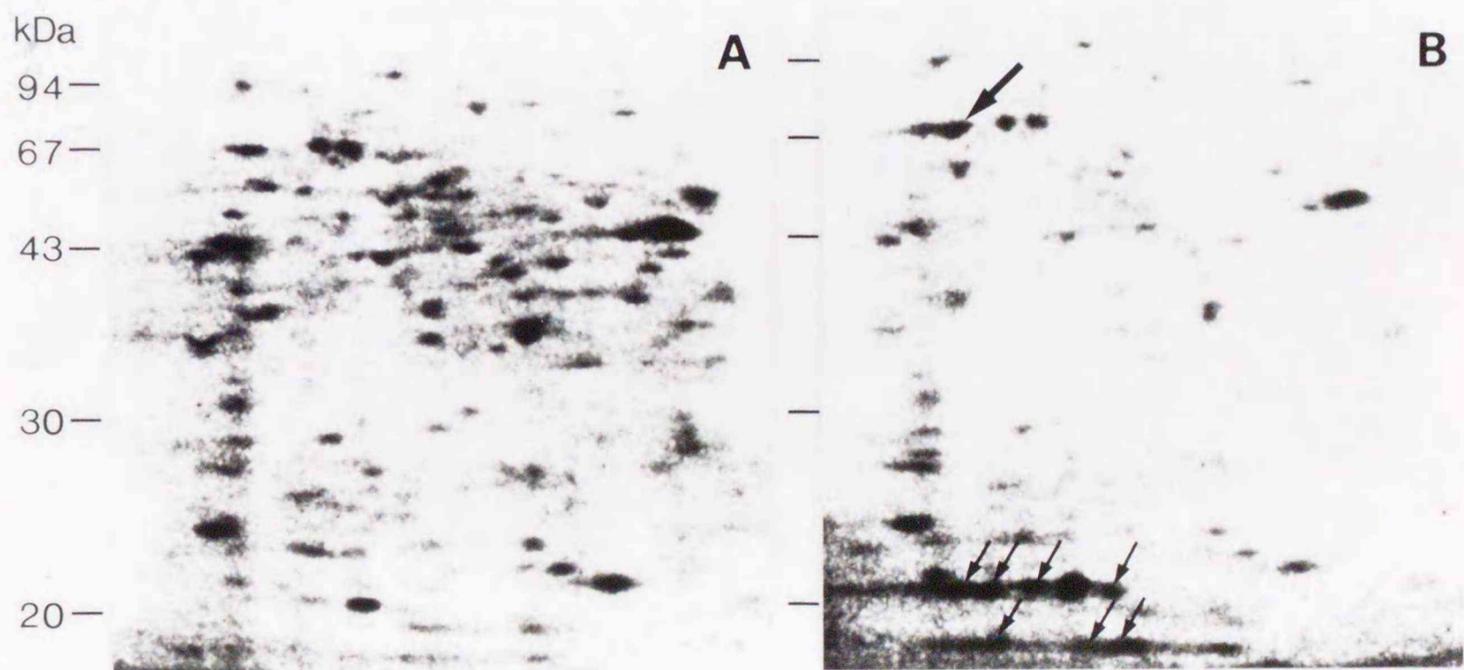
(HSC70) を認識するマウスモノクローナル抗体 (StressGen, SPA-820, Canada) を一次抗体に用いた。二次抗体には、抗マウスIgG西洋ワサビペルオキダーゼ (H&L chain, Cappel, USA) 標識羊血清を2,500倍に調製したものをを用いた。発色反応は第三章に記載した方法に従って実施した。

3. 成績

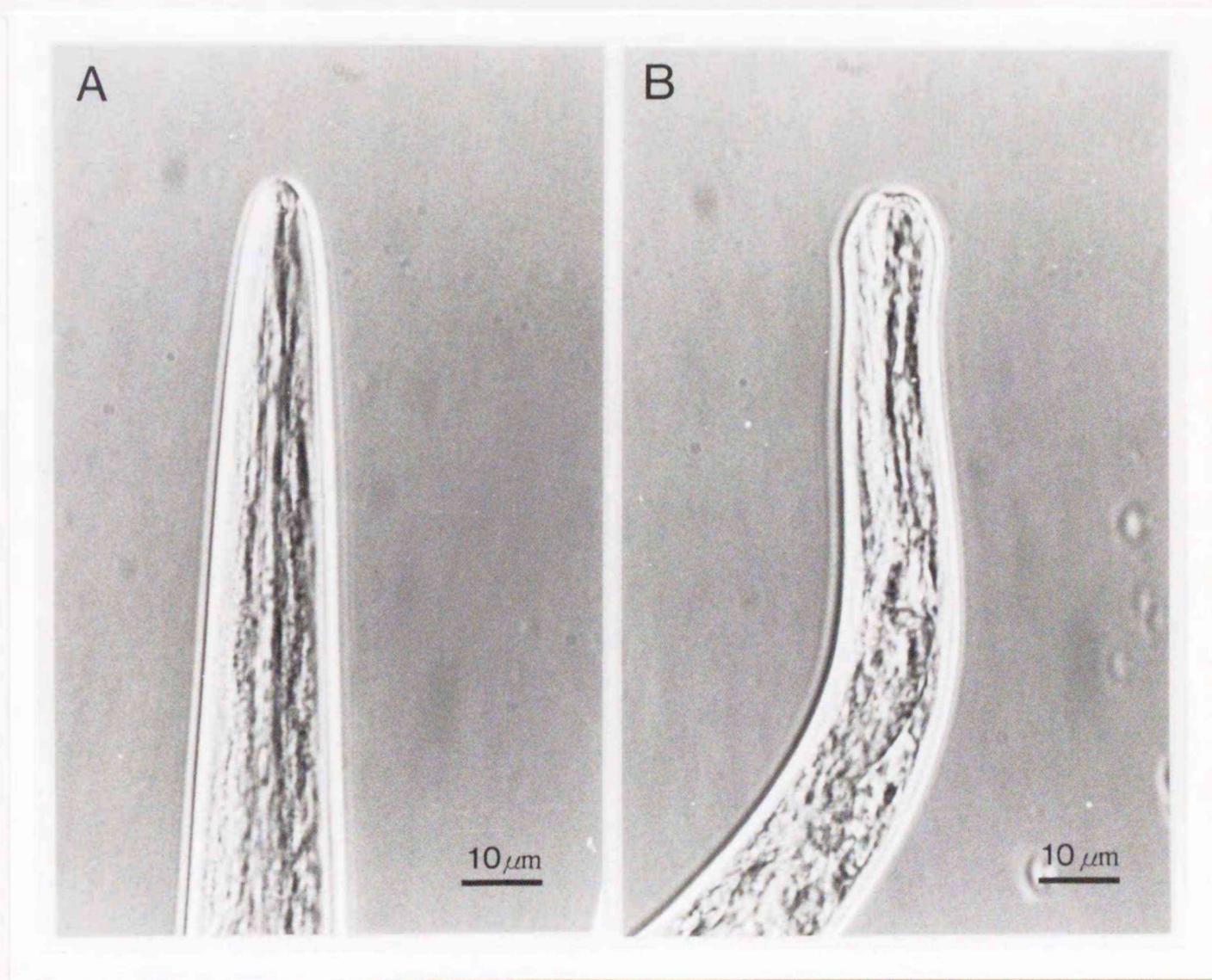
1) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫の産生蛋白質の比較：図IV-1に、自由生活期L₃ 2×10⁴匹を温度25℃及び37℃のダルベッコ改変イーグル培養液中で16時間代謝標識し、2D-PAGEを用いて分離した虫体産生蛋白質のスポットパターンを示した。両者の産生された蛋白質の全体像は質及び量ともに異なっていた。最も大きな違いは産生量が増大した分子量70kDa及び、温度37℃で産生された2つの複合体よりなる分子量16-22kDa（低分子量領域蛋白質）の蛋白質であった。図IV-2には、温度25℃及び37℃で培養した自由生活期L₃の形態変化を示した。培養後経時的に形態変化を観察しところ第三章で記載した虫体頭部の球状化は、培養後16時間に確認された。

2) 分子量70kDa蛋白質及び低分子量領域蛋白質の経時的変動：パルス標識法を用いてそれぞれの経時的産生量の変化を調べた（図IV-3）。分子量70kDa及び低分子量領域蛋白質は25℃から37℃で温度依存性に産生の増大が認められた。分子量70kDaの蛋白質は温度変化後、30分より増加したのに対して、低分子量領域蛋白質の増加は1時間後より確認された。

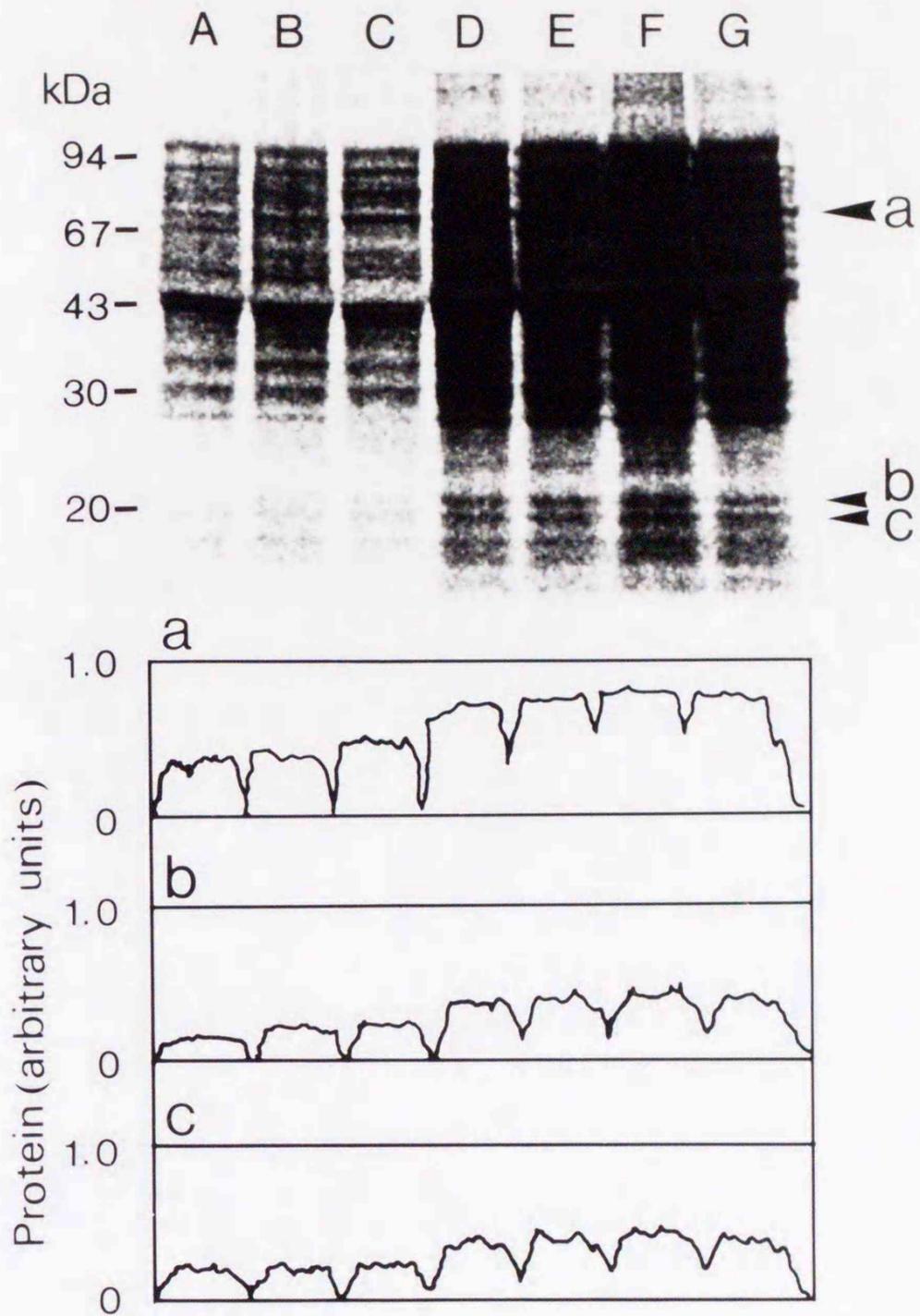
3) 温度25℃及び37℃で培養した自由生活期幼虫における恒常型熱ショック蛋白質70の産生：温度変化によって産生が増大した分子量70kDa蛋白質の性状を明らかにするため、温度25℃及び37℃で培養した自由生活期L₃とヒトHSP70/HSC70モノクローナル抗体との反応性を調べた（図IV-4）。モノクローナル抗体は、両者の分子量70 kDa蛋白質の1スポットのみを認識し、温度37℃で形態変化の認められた虫体ではより強く反応した。



図IV-1 温度25°C (A) 及び37°C (B) で培養したベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫の産生蛋白質の比較. 標識蛋白質は二次元電気泳動で分離した後, オートラジオグラフィーを実施した. 図Bにおける矢印は, それぞれ温度変化によって産生が増大した分子量70kDa蛋白質 (大きな矢印) 及び2つの複合体よりなる16~22kDaの低分子量領域蛋白質 (小さな矢印) を示す. ゲルのpIは左側が塩基性, 右側が酸性を示す. 分子量マーカーは左側にキロダルトン (kDa) で示した.

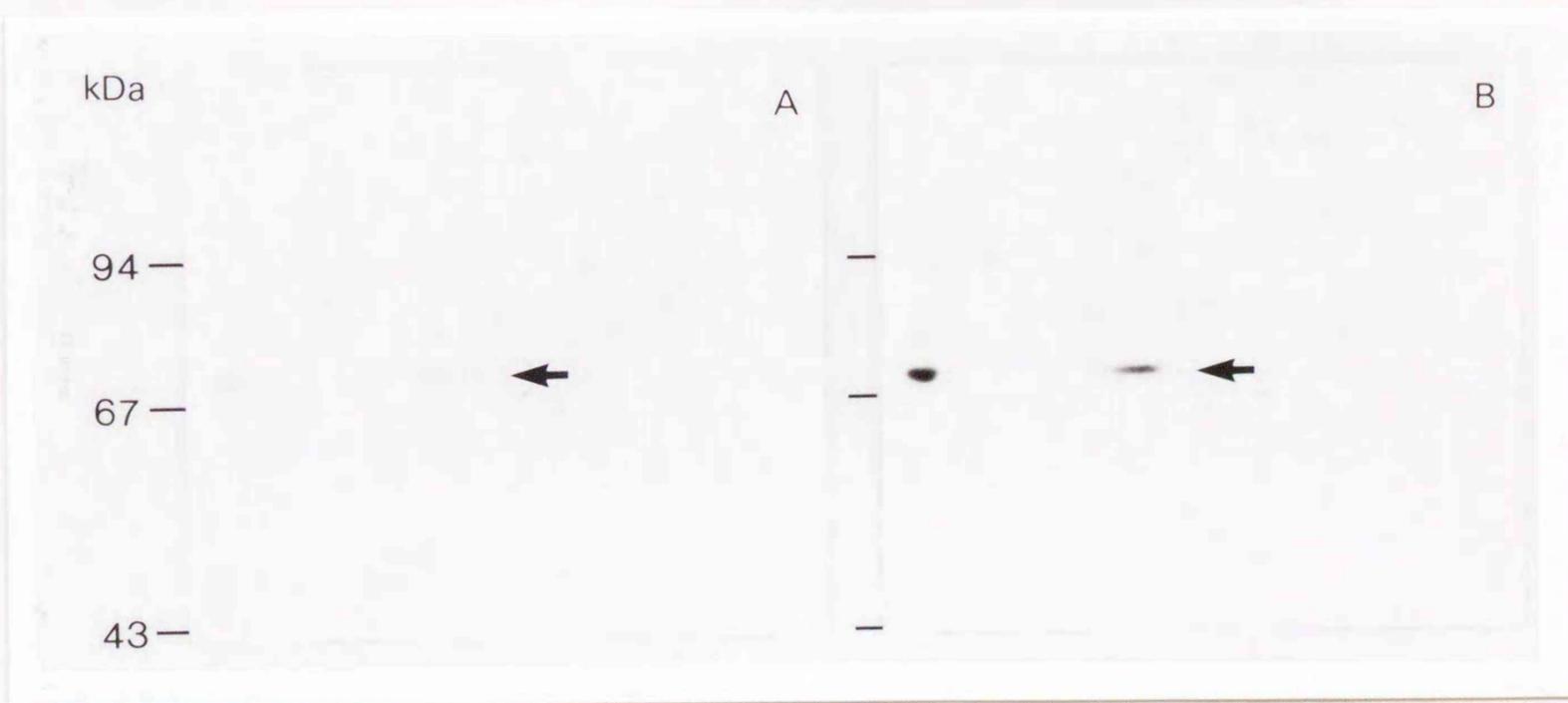


図IV-2 培養後16時間におけるベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫の形態変化の比較. A: 温度25°Cで培養した虫体, B: 温度37°Cで培養した虫体.



図IV-3 分子量70kDa及び低分子量領域蛋白質の経時的産生量の変化. 上図: SDS-PAGEで分離した標識蛋白質のオートラジオグラム. 自由生活期 L_3 はアイソトープ添加前に以下に示した時間及び温度で培養後, 2時間 ^{35}S -メチオニンの代謝標識を行った. A: 温度 25°C . 1時間, B: 33°C . 1時間, C: 37°C . 30分, D: 37°C . 1時間, E: 37°C . 2時間, F: 37°C . 4時間, G: 37°C . 8時間. 分子量70kDa (a) 及び低分子量領域 (b, c) の蛋白質はそれぞれ矢頭で示した. 分子量マーカーは左側にキロダルトン (kDa) で示した.

下図: デンシトメーターによる分子量70kDa (a) 及び低分子量領域 (b, c) の蛋白質産生量の変化.



図IV-4 温度25℃ (A) 及び37℃ (B) で16時間培養した自由生活期幼虫における抗ヒトHSP70/HSC70モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法による解析. 電気泳動に供した蛋白質はそれぞれ 2×10^4 の虫体から得たものを二次元電気泳動を用いて分離した. 矢印は交差反応が確認された分子量70kDaの蛋白質を示す. 転写膜のpIは左側が塩基性, 右側が酸性を示す. 分子量マーカーは右側にキロダルトン (kDa) で示した.

4. 考察

第Ⅲ章では、温度37°Cで培養したベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃は、形態的变化だけでなく、構成蛋白質及び抗原性においても感染ラットの皮下組織から回収した寄生期L₃と同一であったことを述べた。今回の研究では、自由生活期L₃を寄生期L₃に発育させる *in vitro* 培養系を用いて、発育過程における蛋白質の産生を調べた。その結果、形態変化にともなって熱ショック蛋白質と思われる分子量70kDaの産生が顕著に増大していることが確認され、また、あらたに2つの複合体よりなる分子量16~22kDa（低分子量領域蛋白質）の産生が認められた。

熱ショック蛋白質は正常な生理的条件下でも存在することが知られている。なかでも、分子量70kDa付近の熱ショック蛋白質で構成する一群（HSP70ファミリー）は、温度変化時のみだけに産生される熱誘導型（HSP70）と、温度変化の有無にかかわらず産生される恒常型（HSC70）の2型が知られている（43）。今回の研究で用いたHSP70モノクローナル抗体は、温度25°Cあるいは37°Cで培養した自由生活期L₃のどちらとも反応したことから、この分子量70kDaの蛋白質はHSC70関連蛋白質であることが示された。一方、HSP70ファミリーの蛋白質は、分子シャペロン（23, 31）とも呼ばれ、蛋白質の折りたたみや、会合など他の蛋白質の構造形成を介助する役目を果たしている。土壌に生息するベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃（37, 42）は、常に様々な侵襲にさらされていると考えられることから、自由生活期L₃のHSC70関連蛋白質の産生は、虫体の恒常性維持にかかわる重要な役割を果たす蛋白質の1つであると考えられた。

近年、寄生虫の分化・発育過程においてHSP70ファミリーの蛋白質が重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている（32, 41, 81）。Rothsteinら（60）の報告によれば、*Brugia malayi*の雌成虫におけるHSP70の産生は、生殖器内の卵母細胞や第4, 8期の分裂細胞胚に集中していたことを確認し、HSP70が発育初期の個体形成に不可欠な蛋白質であろうと推察している。また、すでに線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用いた研究では、個体及び器官形成の初期段階にHSC70の産生が著しく増加することが確認されている（55）。今回の研究において、ベネズエラ糞線虫のHSC70関連蛋白質の産生は、温度25°Cで培養した虫体と比べて37°Cの方が顕著であっ

たことから、形態変化の間に増大することが示唆された。この蛋白質の産生増大と虫体頭部の球状化との関係は不明であるが、糞線虫の個体器官形成を調べる上で今後の興味ある検討課題と思われた。

今回の研究で、2つの複合体よりなる低分子量領域の蛋白質が温度37℃で培養した自由生活期L₃で確認された。熱ショックによって産生される低分子量領域蛋白質は、すでにくつつかの線虫類で報告されている(17, 35, 61)。今回確認された2D-PAGEによる低分子量領域蛋白質のスポットの移動パターンは、*B. pahangi* (17, 35)で確認されているものと非常に類似していた。また、これらの蛋白質は、第II及びIII章に記載したように、宿主から回収された寄生期L₃及び温度37℃で3日間培養した自由生活期L₃においても確認されていた。Pauliら(56)によって、ショウジョウバエ(*Drosophila*)では組織内の増殖及び分化のステージと低分子量領域蛋白質の産生とが一致することが述べられている。これらのことから、おそらく今回の低分子量領域蛋白質の産生は、虫体の発育に重要な役割を果たしているものと考えられた。

ベネズエラ糞線虫自由生活期L₃は、劇的な温度変化に対してなんら損傷もなく発育し体内の環境に適応する。今回の研究で虫体での産生場所は特定できなかったが、熱ショック蛋白質の産生が認めれたことから、温度変化から虫体の損傷を守る上で重要な役割を果たしている因子の1つが熱ショック蛋白質70であると考えられた。

5. 要旨

前章で、ベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃を寄生期L₃に発育させる *in vitro* の培養系を確立したことを述べた。そこで虫体の発育にどのような蛋白質が関与するのか、³⁵S-メチオニンを用いて温度25℃及び37℃の培養条件下で自由生活期L₃を代謝標識し、産生蛋白質の解析を行った。その結果、自由生活期L₃が寄生期L₃へと形態変化する間に、熱ショック蛋白質70関連蛋白質と考えられる分子量70kDa蛋白質の産生増大、及びあらたに2つの複合体よりなる分子量16~22kDa（低分子量領域蛋白質）の産生が確認された。分子量70kDaの蛋白質は、ヒト熱ショック蛋白質70に対するモノクローナル抗体と交差反応を示した。これらのことより、ベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃から寄生期L₃への発育には恒常型熱ショック蛋白質70及び低分子量領域蛋白質が関与していることが示唆された。

第V章

ベネズエラ糞線虫の自由生活期幼虫における 熱ショック蛋白質70関連遺伝子の発現とその性状

1. 序文

第IV章では、ベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃が寄生期L₃に発育する間に、HSP70関連蛋白質の産生が増大することを述べた。一般に、HSP70ファミリーの遺伝子は、ストレス状態のみならず平常時にも発現されていることが多くの生物種で確認されている。また、すでに*Drosophila*などの細胞を用いて、HSP70遺伝子の転写から蛋白質産生に至る過程が明らかにされてきている(7, 26, 55)。

真核生物のHSP70をコードする遺伝子は、多重家族遺伝子群を構成し、発現形式によって誘導型と恒常型の2型に分けられている。近年、寄生虫学領域においても多くの寄生虫でHSP70関連遺伝子が単離され、正常な発育に関与する遺伝子の1つであることが示唆されている(8, 51, 67)。また、それらの遺伝子構造が明らかになるにつれ遺伝学的にも興味ある知見が得られている(22, 68)。しかしながら、糞線虫など経皮感染によって宿主に侵入する土壌伝搬性の寄生線虫においては、HSP70関連遺伝子についての研究はこれまで全く行われていない。

本章では、温度37°Cで培養した自由生活期L₃のmRNAを用いて作製したcDNAライブラリーよりHSP70関連遺伝子のクローニングを試み、その性状及び温度25°C及び37°Cで培養した自由生活期L₃における発現過程について検討した。

2. 材料と方法

供試寄生虫：供試したベネズエラ糞線虫株，培養及び核酸の抽出に用いた自由生活期L₃は，第I章に記載した通りである。

虫体の培養：第III章に記載した方法に準じて行った。培養終了後，虫体はダルベッコ改変イーグル液で3回洗浄した後ペレットとし，直ちに液体窒素で凍結させ-80°Cで保存した。

核酸の抽出：乳鉢内に液体窒素を満たし，この中に直接，凍結虫体を入れホモジナイズした後，RNA及びDNAを以下の方法によって抽出した。RNAはグアニジン酸チオシアネート法を用いて，ゲノムDNAはSDS/プロテナーゼK（半井化学，京都）を用いてSambrookら（63）の方法に準じて抽出した。

アガロース電気泳動：ゲル電気泳動は，Sambrookら（63）の方法に準じて行った。ゲルの作製及び電気泳動に使用した緩衝液はTAE緩衝液 [40 mM トリス-酢酸，1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA），pH 8.0] であった。ゲルはアガロース（GIBCO BRL，USA）を用いて目的に応じてその濃度を変えた。

cDNAライブラリーの構築：全RNAよりオリゴ(dt)ラテックス（宝酒造，Oligotex-dt30〈Super〉）を用いてmRNAを回収した後，cDNA合成キット（Stratagene，USA）によってcDNAを合成した。cDNAライブラリーはプロトコールに従ってラムダZAP II ベクター（Stratagene，USA）を用いて構築した。

スクリーニング：スクリーニングはSambrookら（63）に準じて，コロニーハイブリダイゼーション法により³²P標識したヒトHSP70B遺伝子プローブ（StressGen，SPD-925，Canada）を用いて行った。放射性プローブは，ヒトHSP70遺伝子プローブのHind III 消化断片をアガロース電気泳動した後，ゲルから切り出しメガプライムDNAラベリングシステム（Amersham，UK）を用いて³²P-dCTP（Dupont，USA）標識して作出した。

塩基配列の解析：ラムダZAP II に挿入されているcDNAクローンを*E. coli* XL-1 Blueにて増殖させ，プロトコールに従ってファージミドを作製した。最終的にファージミドよりプラスミドを作製し，塩化セシウム密度勾配遠心法にて分離精製した。cDNAクローンの塩基配列の決定はLark社（USA）に依頼し，ジデオキシ法によって実

施した。得られたクローンの塩基配列はコンピュータプログラム (GENETYX-MAC, USA) を用いて解析した。

サザンブロット法による解析：ゲノムDNAを各種の制限酵素消化で消化した後、0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、Sambrookら (63) らの方法に準じてナイロン膜 (GeneScreen Plus, Dupont, USA) に転写した。転写膜はハイブリダイゼーション液 [硫酸デキストラン, 1×Denhart's 溶液, 0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)] 中でさらに一晩反応させ、³²P標識したプローブを添加したハイブリダイゼーション液で一晩反応させた。最終的に転写膜は0.1%SDSを含む2×SSC (150 mM塩化ナトリウム, 15 mM酢酸ナトリウム, pH 7.0) を用いて15分間2回及び0.1%SDSを含む0.2×SSCを用いて15分間2回洗浄し、-70°Cで2日間フィルム (X-OMATA AR, Kodak, USA) に露光させオートラジオグラフィーを実施した。なお、ハイブリダイゼーション及び洗浄時の温度条件は目的によって変えた。

ノーザンブロット法による解析：RNAは以下の変性試薬を用いて処理分離した。すなわち、変性試薬 [42%(v/v)ホルムアミド, 20 mM 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS) 及び17.5%ホルムアルデヒド] に5 µgのRNAを混和し65°Cで10分間反応後、20%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルを用いて電気泳動用緩衝液 (20 mM MOPS, 5 mM 酢酸ナトリウム及び1 mM EDTA) 中で分離した。分離したRNAはナイロン膜 (GeneScreen Plus, Dupont, USA) に転写し、ハイブリダイゼーション溶液中 [5×SSCP (150 mM塩化ナトリウム, 10 mMリン酸二水素ナトリウム, 1 mM EDTA), 50%ホルムアミド, 5×Denhart's溶液, 1.0%SDS, 10%硫酸デキストラン] にて一晩反応させた後、³²P標識したプローブと一晩反応させた。転写膜は2%SDSを含む2×SSC P及び、2%SDSを含む0.2×SSCPにて65°Cで20分間2回ずつ洗浄した後、サザンブロット法に準じて3日間オートラジオグラフィーを実施した。

サザンブロット法及びノーザンブロット法に用いた放射線プローブの作出：塩基配列の決定したcDNAクローンのEcoRI-XhoI断片 (図V-3) をアガロースゲル電気泳動後、ゲルから切り出しメガプライムDNAラベリングシステム (Amersham, UK) を用いて³²P-dCTP (Dupont, USA) で標識した。

3. 成績

1) 熱ショック蛋白質70関連cDNAのクローニング及び塩基配列の決定：ラムダZAP IIベクターを用いて構築したcDNAライブラリーはフェージ力価 5×10^5 PFU/mlであった。このライブラリーより、ヒトHSP70遺伝子プローブとハイブリダイズした4つの陽性クローンが得られた。そこでこれらのクローンを *in vivo excision* した後、それぞれをプローブにしてベネズエラ糞線虫のゲノムのサザンブロット法による解析を実施したところ、全て同じパターンの成績を得たので、全長の最も長いクローン (pSH70-1) について塩基配列を決定した。

全長1,705bpのpSH70-1の全塩基配列を図V-1に示した。GenBankデータベースを用いた解析によって、pSH70-1の塩基配列は、これまでに報告されているヒト、マウス、ラットなどの哺乳動物細胞、*C. elegans*及び*D. melanogaster*などのHSP70遺伝子との間でいずれも70%以上の高い相同性を認めた。また、塩基配列より推定される3通りのアミノ酸配列について、SWISS PROTデータベースによる解析を実施したところ、推定アミノ酸配列の1つは、ヒト(21)、*C. elegans*(70)及び*D. melanogaster*(62)のHSC70との間でそれぞれ86%、85%及び82%と高い相同性を示した(図V-2)。

2) ゲノムDNAにおけるpSH70-1の性状：自由生活期L₃より得たゲノムDNAを3種の制限酵素で消化した後、pSH70-1のEcoRI-XhoI断片をプローブにサザンブロット法による解析を実施した(図V-3)。pSH70-1は、EcoRI及びBglII消化したDNAでは単一の断片と、また、HindIII消化したものでは約9.6kbと441bpの2本の断片と反応したことから、推定されるpSH70-1のゲノム上の遺伝子は単一コピーで存在することが示された(図V-3-A)。しかし、ハイブリダイゼーションを温度45°Cで実施した場合、目的とした遺伝子を含む断片以外に、微弱な反応を示す数本の断片が確認された(図V-3-B)。

3) 温度25°C及び37°Cで培養した自由生活期幼虫におけるpSH70-1の発現量の比較：温度及び時間を変えて培養した自由生活期L₃より、全RNAを抽出した後、ノーザンブロット法を用いてpSH70-1の発現を解析した(図V-4)。pSH70-1は虫体の培養温度及び時間にかかわらず、3.2kbのmRNAと反応した。オートラジオグラムより推定され

pSH70-1	IRHETKMRETAAYLGQPVTDAVVTPAYFNDSQRQATKDAGAIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKGATERNVLI	FDL	80
HuK.I.....KT..N.....T.....VGA.....		201
C.eKK...F.EPT.....T.....HG.....		201
D.mK.....KT..N..I.....T.....AVG.....		201
pSH70-1	YGGGTFDVSVLTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVTHFVNEFKRKHKKDLSSNPRALRRLRTACERAKRTLSSTQ		160
HuI.....N..IA.....I.E.K..V.....		281
C.eI.....N..CA.....A.....NE....C.		281
D.mI.S.D.....L....Q.....TT.K.....		281
pSH70-1	ASIEIDSLFDGIDFYTNI TRARFEELCADLFRNTMDPVEKALRDAKMDKGQVHDI VL VGGSTRIPKVQKLLSDFFSGKEL		240
HuYE.....S.....N....G.L.....L.S.I.....I...Q...N....		361
C.eE.....S.....S.....S.....L.....		361
D.mE.T...S.....N....S.....L.SVI.....R..Q.L.N....		361
pSH70-1	NKSINPDEAVAYGAAVQAAI LSGDKSEAVQDLLLDDVAPLSLGIETAGGVMTALIKRNTTIPTKTSQTFTTYADNQPGVL		320
HuN.....T.....V.....QT.....S.....		441
C.eL.....A.....S.....		441
D.mH....QE.....T.....SV.....QT.....S.....		441
pSH70-1	IQVYEGERAMTKDNNLLGKFELSGIPPAPRGVPIEVTFDIDANGILNVSQDKSTGKQNKITITNDKGRLSKEEIERMV		400
HuT.....V.....E.....D.....		521
C.eT.....AKQ.....D.F..DD.....		521
D.mT.LER..N.E.....D.....		521
pSH70-1	NDAEKYKADDEKQRDRVSAKNALESYCFNMKQTLDEKVKDKIPADDVKKVIEKCDEILHWLESNQSAEKEEFEDRQKEL		480
Hu	QE.....E.....K..S..S...A...A.V....LQG..NDE.KQ.ILD..N..IN..DK..T.....HQ....		601
C.e	..E.....A.K..IG...G...A..L..I...L...SPE.K..IED.....K..D...T.....SQ..D.		601
D.m	E....RNE....KETIA...G.....A..DEDN..T..SDS.RTTILD..N.YIK..DA..L.D...Y.H....		601

511

pSH70-1	EGICNPIITKMYGAAGGAPGGMPGGGAPGGASGAEGSGPTIEVD*FLLSFSRSLF*TDFFDWLDFLY*LLYK*VK*NI
Hu	.KV.....L.QS...M.....FPG...
C.e	..LAK.DLS.L.Q.....-P.A.....
D.m	..V.....L.Q...FP.....

632

図V-2 pSH70-1の推定アミノ酸配列と他の生物種における恒常型熱ショック蛋白質70のアミノ酸配列との比較. Hu: ヒト(21), C.e: *Caenorhabditis elegans* (70), D.m: *Drosophila melanogaster* (62). (.) : pSH70-1のアミノ酸配列と同一であることを示す. (-) アミノ酸の欠失配列を示す.

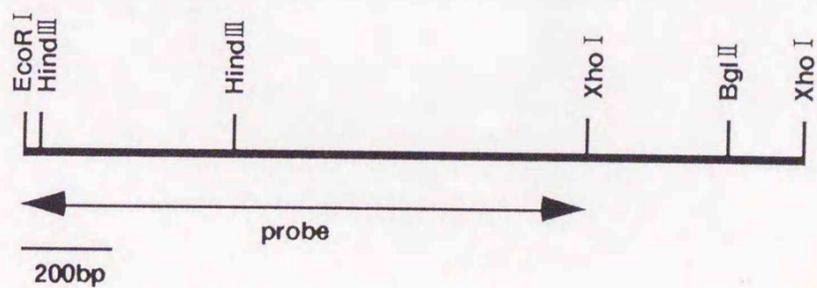
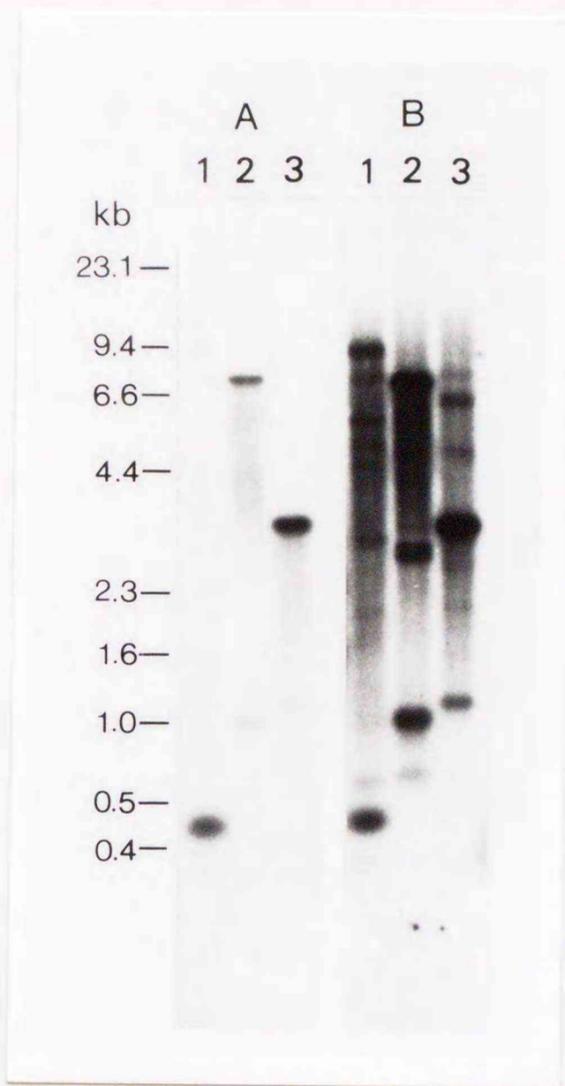
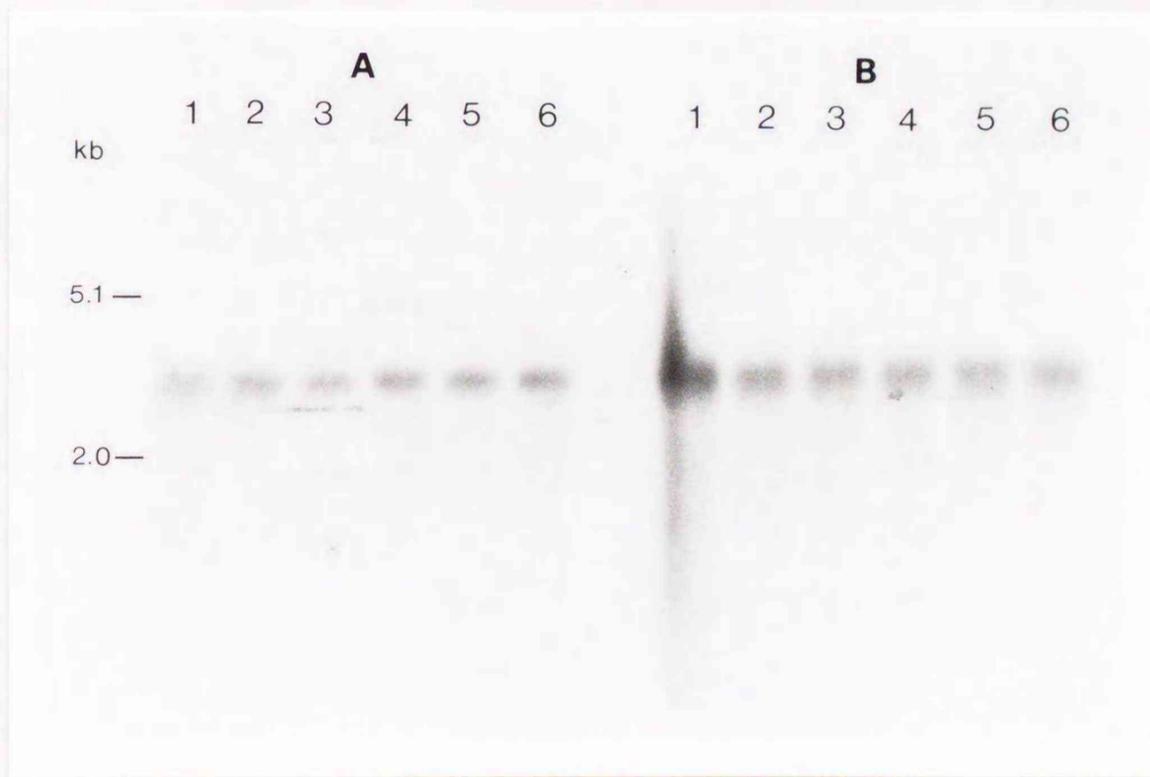


図 V - 3 ベネズエラ糞線虫ゲノムDNAのサザンブロット法による解析及びゲノムDNA消化に用いた制限酵素のpSH70-1における切断部位。

ゲノムDNA量の10 μ gを用いて以下の制限酵素で消化した後、電気泳動を実施した。レーン1: *Hind* III, 2: *Eco*R I, 3: *Bgl* II. サイズマーカーは左側にキロベース (kb) で示した。A: 温度65°Cで実施したハイブリダイゼーション。B: 温度45°Cで実施したハイブリダイゼーション。



図V-4 温度25°C (A) 及び37°C (B) で培養したベネズエラ糞線虫自由生活期幼虫におけるpSH70-1の発現. 自由生活期L₃は温度25°C及び37°Cにおいて以下に示す期間培養後した後, 全RNAを抽出した. 1: 30分, 2: 1時間, 3: 2時間, 4: 4時間, 5: 8時間, 6: 16時間. 各レーンには5 μ gの全RNAを用いた. サイズマーカーは左側にキロベース (kb) で示した.

るその発現量は温度25℃で培養した自由生活期L₃よりも37℃で培養した虫体の方が増加していた。

... (faint text) ...

... (faint text) ...

... (faint text) ...

... (faint text) ...

4. 考察

熱ショック蛋白質遺伝子は、生物の種間を越えてその遺伝子構造がよく保存されているため、すでに単離されているショウジョウバエや大腸菌のHSP遺伝子を用いて、目的とする生物種のHSP遺伝子の単離が実施されている(9, 33)。今回の研究では、ヒトのHSP70遺伝子プローブを用いてベネズエラ糞線虫自由生活期L₃のcDNAライブラリーをスクリーニングし、他の生物種で報告されているHSP70と塩基配列及びアミノ酸レベルで高い相同性を示すクローンpSH70-1を得た。pSH70-1より予想されるゲノム上の遺伝子は単一コピーとして存在し、また、3.2kbのmRNAを発現していることが確認された。しかしながら、pSH70-1の塩基配列内にはポリ(A)テイル及び終止コドンは認められたものの、コード領域の上流側に開始コドンは確認されなかった。これらのことから、今回単離したpSH70-1は、ベネズエラ糞線虫のHSP70関連遺伝子の5'端コード領域の一部が欠損したものであると考えられた。

真核生物においてHSP70の類似蛋白質がいくつも存在する(44)ことから、HSP70ファミリーと呼ばれる集団が形成されている。そのため、HSP70を産生する遺伝子は多重家族遺伝子群を構成することになり、ゲノムDNAを用いたサザンブロット法による解析によって、しばしば微弱な複数のバンドが検出される(25)。今回の研究でも、pSH70-1をプローブとしたベネズエラ糞線虫DNAのサザンブロット法による解析によって、目的とする遺伝子を含む断片以外にもハイブリダイズする断片が認められた。このことから、ベネズエラ糞線虫でも、pSH70-1の他にいくつかのHSP70関連遺伝子が存在することが示唆された。

第IV章においてベネズエラ糞線虫におけるHSC70の存在を明らかにした。本章ではそれらの蛋白質を産生すると考えられるpSH70-1を単離した。pSH70-1は、ノーザンブロット法による解析によって自由生活期L₃の培養温度に関係なく恒常的に発現され、その発現量は25°Cから37°Cで温度依存性に増加していることが確認された。これらのことから、pSH70-1は発育に関与するHSC70関連遺伝子の一部を含むものと思われた。

しかし、今回の研究では、第IV章で述べた自由生活期L₃のHSC70とpSH70-1の産生する蛋白質が同一であるかどうか不明である。真核生物においては、HSC70関連遺伝

子は複数存在する(44)ことが知られているため、今後の研究課題として、pSH70-1のコード領域の全長について解析し、蛋白質の相違について調べる必要があると考えられた。

ベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃は、経皮感染によって宿主の体内に侵入する。感染時、虫体は劇的な温度変化に直面するにもかかわらず、なんら損傷もなく宿主体内の環境に適応し寄生期L₃として発育する。今回単離したpSH70-1から推定されるHSC70関連遺伝子は、虫体に備えられたストレス回避機構、すなわち、環境への適応及び形態変化の誘導に関与する遺伝子の1つであることが示唆された。

5. 要旨

温度37°Cで培養したベネズエラ糞線虫自由生活期L₃のmRNAよりcDNAライブラリーを作製し、ヒトHSP70遺伝子をプローブに用いたスクリーニングによって、全長1,705bpのクローン(pSH70-1)を得た。塩基配列の解析結果より、pSH70-1の塩基配列は、これまで報告されている哺乳動物のHSP70遺伝子との間には70%以上の高い相同性を示した。また、塩基配列上に終止コドンは確認されたが開始コドンは認められなかった。しかし、推定される3通りのアミノ酸配列内の1つは、これまでに報告されているヒト及び線虫などのHSC70との間に高い相同性を認めた。次に、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確認された。また、ハイブリダイゼーションの温度を下げることによって、多重家族遺伝子群の存在を示唆する複数の微弱な反応を示す断片が認められた。さらに、温度25°C及び37°Cで培養した自由生活期L₃の全RNAを用いてノーザンブロット法を実施したところ、pSH70-1は3.2kbのmRNAと反応することが確認された。自由生活期L₃をどちらの温度で培養してもmRNAの発現が認められたものの、その発現量は温度25°Cより37°Cの方が多いたことがオートラジオグラムより推察された。

以上より、今回単離した1,705bpの塩基配列は、HSC70関連遺伝子の一部と考えられた。また、すでに前章で述べたように自由生活期L₃を温度37°Cで培養することによって寄生期L₃へと発育したことから、ベネズエラ糞線虫のHSC70関連遺伝子は、その発育に関与する遺伝子の1つであることが示唆された。

総括

ベネズエラ糞線虫の自由生活期L₃から寄生期L₃への発育に関する研究を行い、以下の成績を得た。

1) ベネズエラ糞線虫感染スナネズミでは、虫卵を長期に排出し成虫の持続感染が成立することを確認した。これにより、スナネズミを用いた本虫の長期継代法を確立した。

2) 自由生活期L₃、寄生期L₃及び成虫の構成蛋白質は、自由生活期L₃と寄生期L₃とでは大きく異なっていたのに対して、寄生期L₃と成虫ではほぼ同一であった。自由生活期L₃は外界の自由生活を営んでおり、一方、寄生期L₃及び成虫は宿主体内の寄生生活を営んでいることから、構成蛋白質の違いは虫体を取り巻く環境に深く関係するものと考えられた。

3) 自由生活期L₃を温度37°Cで培養することによって、虫体の形態が宿主より回収した寄生期L₃とほぼ同一形態にまで変化した。これに対して、温度25°Cではなんら形態上の変化は認められなかった。また、形態変化の認められた虫体について構成蛋白質及び抗原性状を解析したところ、これらの性状は、感染ラットから回収した寄生期L₃とほぼ同一であった。これらのことから、自由生活期L₃から寄生期L₃への発育には温度25°Cから37°Cへの温度変化が重要な役割りを果たしているものと考えられた。

4) 寄生期L₃に特徴的な形態は、自由生活期L₃の培養後16時間に確認された。そこで、ラジオアイソトープを用いて自由生活期L₃を温度25°C及び37°Cで16時間代謝標識し産生蛋白質を解析したところ、温度変化によって顕著なHSC70の産生増大及びあらたに低分子量領域蛋白質が産生されていることが確認された。これらのことから、自由生活期から寄生期L₃への発育にはHSC70及び低分子量領域蛋白質が関与するものと考えられた。

5) 温度37°Cで培養した自由生活期L₃のmRNAをラムダZAP II クローニングベクターに挿入してcDNAライブラリー構築し、既知のHSP70遺伝子をプローブにスクリーニングを実施したところ、ハブリダイズしたcDNAを4クローンを得た。

6) 得られた4クローンのうち全長の最も長いpSH70-1について全塩基配列を決定

した。pSH70-1の塩基配列は他の生物種で報告されているHSP70遺伝子との間に高い相同性が認められたが、5'端コード領域の一部が欠損しており完全長のcDNA遺伝子ではなかった。しかし、推定されるアミノ酸配列の内の1つは、他の生物種ですでに報告されているHSC70との間に高い相同性を示した。

7) pSH70-1をプローブにしてベネズエラ糞線虫のゲノムを用いてサザンブロット法による解析を実施したところ、pSH70-1はゲノム上に単一コピーで存在することが確認された。また、ハイブリダイゼーションの温度を下げることによって複数の断片が検出されたことから、多重家族遺伝子群の存在が示唆された。

8) pSH70-1をプローブに用いたノーザンブロット法による解析から、pSH70-1は自由生活期L₃の培養温度に関係なく発現していたが、温度37°Cで培養した虫体におけるその発現量は、25°Cのそれと比較して増加していたことから、ベネズエラ糞線虫のHSC70関連遺伝子は、自由生活期L₃から寄生期L₃への発育に關与する遺伝子の1つであることが示唆された。

参考文献

1. Abadie, S. H. 1963. The life cycle of *Strongyloides ratti*. *J. Parasitol.* 49: 241-248.
2. Abe, T. and Nawa, Y. 1987. Localization of mucosal mast cell in W/W^v mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. *Parasite Immunol.* 9: 477-485.
3. Ash, L. R. and Riley, J. M. 1970. Development of *Brugia pahangi* in the jird, *Meriones unguiculatus*, with notes on infections in other rodents. *J. Parasitol.* 56: 962-968.
4. Atkinson, B. G. and Atkinson, K. H. 1982. *Schistosoma mansoni*: One- and two-dimensional electrophoresis of protein synthesized *in vitro* by males, females, and juveniles. *Exp. Parasitol.* 53: 26-38.
5. Barrett, J. 1986. Developmental aspects of metabolism in parasites. pp. 105-110. *In: Proceedings of the 6th International Congress of Parasitology* (Howell, M. J. ed), Australian Academy of Science.
6. Bianco, A. E., Favaloro, J. M., Burkot, T. R., Culvenor, J. G., Crewther, P. E., Brown, G. V., Anders, R. F., Coppel, R. L., and Kemp, D. J. 1986. A repetitive antigen of *Plasmodium falciparum* that is homologous to heat shock protein 70 of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8713-8717.
7. Bienz, M. and Pelham, H. R. B. 1987. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv. Genet.* 24: 31-72.
8. Bock, J. H. and Langer, P. J. 1993. Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62: 187-198.
9. Bond, U. and Schlessinger, M. J. 1987. Heat-shock proteins and development. *Adv. Genet.* 24: 1-29.

10. Bonner, T. P. 1979. Initiation of development in vitro of third-stage *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Parasitol.* 65: 74-78.
11. Brumpt, E. 1934. *Precis de Parasitologie*. 6th ed. Masson et Cie, Paris.
12. Campbell, W. C. 1982. Efficacy of the avermectins against filarial parasites: A short review. *Vet. Res. Commun.* 5: 251-262.
13. Caruso, M., Sacco, M., Medoff, G., and Maresca, B. 1987. Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 1: 151-158.
14. Chowdhury, N., Korenaga, M., Mimori, T., and Tada, I. 1985. *In vitro* culture of *Strongyloides ratti* larvae. *Jpn. J. Parasitol.* 34: 229-235.
15. Dawkins, H. J. S., Mitchell, G. F., and Grove, D. I. 1982. *Strongyloides ratti* infections in congenitally hypothyroid (nude) mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 60: 181-186.
16. Dawkins, H. J. S. 1989. *Strongyloides ratti* infections in rodents: value and limitations as a model for human strongyloidiasis. pp. 287-332. *In: Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man* (Grove, D. I. ed), Taylor and Francis, London.
17. Devaney, E., Egan, A., Lewis, E., Warbrick, E. V., and Jecock, R. M. 1992. The expression of small heat shock proteins in the microfilaria of *Brugia pahangi* and their possible role in development. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 209-218.
18. Douvres, F. W. and Urban, J. F. Jr. 1987. Nematoda except parasite of insects. pp. 318-378. *In: In vitro methods for parasite cultivation* (Taylor, A. E. R. and Baker, J. R. eds.), London, Academic Press.
19. Dulbecco, R. and Freeman, G. 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396-397.
20. Dunn, S. D. 1986. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the

- recognition of proteins of Western blots by monoclonal antibodies.
Anal. Biochem. 157: 144-153.
21. Dworniczak, B. and Mirault, M. -E. 1987. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res.* 15: 5181-5197.
 22. Eckert, V., Sanchez, L., Cochrane, A., and Enea, V. 1992. *Plasmodium cynomolgi*: The hsp 70 gene. *Exp. Parasitol.* 75: 323-328.
 23. Ellis, J. 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378-379.
 24. 藤田紘一郎. 1988. フィラリアあるいは糞線虫の感染と成人T細胞白血病およびAIDSウイルス増殖との関連. *医学のあゆみ* 147: 544
 25. Giebel, L. B., Dworniczak, B. P., and Bautz, E. K. F. 1988. Developmental regulation of a constitutively expressed mouse mRNA encoding a 72-kDa heat shock-like protein. *Dev. Biol.* 125: 200-207.
 26. Gething, M. -J. and Sambrook, J. (1992): Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.
 27. Grove, D. I., Warton, A., Northern, C., and Papadimitriou, J. M. 1987. Electron microscopical studies of *Strongyloides ratti* infective larvae : loss of the surface coat during skin penetration. *J. Parasitol.* 73: 1030-1034.
 28. Hansen, E. and Hansen, J. W. 1978. Nematoda parasitic in animals and plants. pp. 227-277. *In: Methods of cultivating parasites in vitro* (Taylor, A. E. R. and Baker, J. R. eds.), Academic Press, London.
 29. Hasegawa, H., Orido, Y., Sato, Y., and Otsuru, M. 1988. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Strongyloididae) collected from *Rattus norvegicus* in Naha, Okinawa, Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 37: 429-434.
 30. Hattori, Y., Tada, I., and Nagano, K. 1968. A further study on the migration *Strongyloides ratti* in host animals. *Jpn. J. Parasitol.* 17: 343.
 31. Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. 1993. Molecular chaperone functions

- of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 349-384.
32. Hunter, K. W., Cook, C. L., and Hayunga, E. G. 1984. Leishmanial differentiation *in vitro*: Induction of heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 125: 755-760.
 33. Hunt, C. and Calderwood, S. 1990. Characterization and sequence of a mouse *hsp70* gene and its expression in mouse cell lines. *Gene* 87: 199-204.
 34. Iscove, N. N. and Melchers, F. 1978. Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 147: 923-933.
 35. Jecock, R. M. and Devaney, E. 1992. Expression of small heat shock proteins by the third-stage larva of *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 219-226.
 36. Kawazu, S., Sugimoto, C., Kamio, T., and Fujisaki, K. 1992. Antigenic differences between Japanese *Theileria sergenti* and other benign *Theileria* species of cattle from Australia (*T. buffeli*) and Britain (*T. orientalis*). *Parasitol. Res.* 78: 130-135.
 37. Kean, B. H., Mott, K. E., and Russell, A. J., 1978. Tropical medicine and parasitology. pp. 325-345. Classic investigations. Vol. II. Cornell University Press, London.
 38. Klei, T. R., McVay, C. S., Dennis, V. A., Coleman, S. U., Enright, F. M., and Casey, H. W. 1990. *Brugia pahangi*: Effects of duration of infection and parasite burden on lymphatic lesion severity, granulomatous hypersensitivity, and immune responses in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* 71: 393-405.
 39. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 40. Laemmli, U. K. and Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 80: 575-599.
 41. Lawrence, F. and Robert-Gero, M. 1985. Induction of heat shock and

- stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 4414-4417.
42. Levine, N. D. 1980. Tylenchorides and Rhabditioids. pp. 56-74 In:
Nematode parasites of domestic animals and of man, Burgess Publishing
Company, Minnesota.
43. Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55:
1151-1191
44. Lindquist, S. and Craig, E. A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu.
Rev. Genet.* 22: 631-677.
45. Maresca, B. and Carratu, L. 1992. The biology of the heat shock
response in parasites. *Parasitol. Today* 8: 260-266.
46. McKerrow, J. H., Brindley, P., Brown, M., Gam, A. A., Staunton, C.,
and Neva, F. A. 1990. *Strongyloides stercoralis*: Identification of a
protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae.
Exp. Parasitol. 70: 134-143.
47. Mimori, T., Korenaga, M., Chowdhury, N., and Tada, I. 1982. Growth and
morphological changes of *Strongyloides ratti* in rats. *Jpn. J.
Parasitol.* 31: 361-368.
48. Mimori, T., Nawa, Y., Korenaga, M., and Tada, I. 1982. *Strongyloides
ratti*: Mast cell and goblet cell responses in the small intestine of
infected rats. *Exp. Parasitol.* 54: 366-370.
49. Moqbell, R. and Denham, D. A. 1977. *Strongyloides ratti*: I.
Parasitological observations on primary and secondary infections in
the small intestine of rats. *J. Helminthol.* 51: 301-308.
50. 名和行文. 1989. ネズミ糞線虫感染をモデルとした宿主免疫応答の解析. 遺伝.
43: 56-58.
51. Neumann, S., Ziv, E., Lantner, F., and Schechter, I. 1992. Cloning and
sequencing of an hsp70 gene of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem.
Parasitol.* 56: 357-360.
52. Newport, G., Culpepper, J., and Agabian, N. 1988. Parasite heat-shock

- proteins. *Parasitol. Today* 4: 306-312.
53. Northern, C. and Grove, D. I. 1987. Antigenic analysis of *Strongyloides ratti* infective larvae and adult worms. *Immunol. Cell Biol.* 65: 231-239.
54. O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., and O'Farrell, P. H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.
55. Palter, K. B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A. M., and Craig, E. A. 1986. Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp 70 cognate proteins. *Mol. Cell Biol.* 6: 1187-1203.
56. Pauli, D., Tonka, C. - H., Tissieres, A., and Arrigo, A. -P. 1990. Tissue-specific expression of the heat shock protein HSP27 during *Drosophila melanogaster* development. *J. Cell Biol.* 111: 817-828.
57. Pawlowski, Z. S. Epidemiology, prevention and control. pp. 233-249. *In* : Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man (Grove, D. I. ed), Taylor and Francis, London.
58. Petronijevic, T. and Rogers, W. P. 1983. Gene activity and the development of early parasitic stages of nematodes. *Int. J. Parasitol.* 13: 197-199.
59. Polla. B. S. 1991. Heat shock proteins in host-parasite interactions pp. A38-A41. *In*: Immunoparasitology Today (Ash, C, and Gallagher eds.) , Elsevier Trends Journals, Cambridge.
60. Rothstein, N. and Rajan, T. V. 1991. Characterization of an hsp70 gene from the human filarial parasite, *Brugia malayi* (Nematoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 229-238.
61. Russnak, R. H., Jones, D., and Candido, E. P. M. 1983. Cloning and analysis of cDNA sequences coding for two 16 kilodalton heat shock proteins (hsps) in *Caenorhabditis elegans*: homology with the small hsps of *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 11: 3187-3205.
62. Rubin, D. M., Mehta, A. D., Zhu, J., Shoham, S., Chen, X., Wells, Q.

- R., and Palter, K. B. 1993. Genomic structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* HSC70 genes. *Gene* 128: 155-163.
63. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
64. Sato, Y. and Toma, H. 1990a. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Int. J. Parasitol.* 20: 57-62.
65. Sato, Y. and Toma, H. 1990b. Effects of spleen cells and serum on transfer of immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in hypothyroid (nude) mice. *Int. J. Parasitol.* 20: 63-67.
66. Schad, G. A. 1989. Morphology and life history of *Strongyloides stercoralis*. pp. 85-104. In: Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man (Grove, D. I. ed.), Taylor & Francis, London.
67. Searle, S., Campos, A. J. R., Coulson, R. M. R., Spithill, T. W., and Smith, D. F. 1989. A family of heat shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.* 17: 5081-5095.
68. Searle, S. and Smith, D. F. 1993. *Leishmania major*: Characterization and expression of a cytoplasmic stress-related protein. *Exp. Parasitol.* 77: 43-52.
69. Selkirk, M. E., Denham, D. A. Partono, F., and Maizels, R. M. 1989. Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in Brugian filariasis. *J. Immunol.* 143: 299-308.
70. Snutch, T. P., Heschl, M. F. P., and Baillie, D. L. 1988. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: a molecular genetic characterization. *Gene* 64: 241-255.
71. Speare, R. 1989. Identification of species of *Strongyloides*. pp. 11-83. In: Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man (Grove, D. I. ed.), Taylor & Francis, London.
72. Sugimoto, C., Kawazu, S., Kamio, T., and Fujisaki, K. 1991. Protein analysis of *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* piroplasms by

- two-dimensional polyacrylamide electrophoresis. *Parasitology* 102: 341-346.
73. Sutton, C. A., Shirley, M. W., and Wisher, M. H. 1989. Characterization of coccidial proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 99: 175-187.
74. Tada, I., Mimori, T., and Nakai, M. 1979. Migration route of *Strongyloides ratti* in albino rats. *Jpn. J. Parasitol.* 28: 219-227
75. Taira, N. and Ura, S. 1991. Sudden death in calves associated with *Strongyloides papillosus*. *Vet. Parasitol.* 39: 313-319.
76. Taira, N., Minami, T., and Smitanon, J. 1991. Dynamics of faecal egg counts in rabbits experimentally infected with *Strongyloides papillosus*. *Vet. Parasitol.* 39: 333-336.
77. Taira, N., Nakamura, N., Tsuji, N., Kubo, M., and Ura, S. 1992. Sudden death of calves by experimental infection with *Strongyloides papillosus*. I. Parasitological observations. *Vet. Parasitol.* 42: 247-256.
78. Taylor, A. E. R. and Baker, J. R. 1968. The cultivation of parasites *in vitro*. Oxford and Edinburgh, Blackwell Scientific Publications.
79. Tweedie, S., Grigg, M. E., Ingram, L., and Selkirk, M. E. 1993. The expression of small heat shock protein homologue is developmentally regulated in *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 149-154.
80. Uchikawa, R., Nojima, H., and Sato, A. 1989. The effects of single and repeated inoculations of various larval doses on *Strongyloides ratti* burden and distribution in rats. *J. Parasitol.* 75: 577-584.
81. Van Der Ploeg, L. H. T., Giannini S. H., and Cantor, C. R. 1985. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 228: 1443-1445.
82. Wertheim, G. 1970. Growth and development of *Strongyloides*

- venezuelensis* Brumpt, 1934 in the albino rat. *Parasitology* 61: 381-388.
83. Wertheim, G. 1970. Experimental concurrent infections with *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* in laboratory rats. *Parasitology* 61: 389-395.
84. Wiest, P. M., Olds, G. R., and Bowen, W. D. 1991. *Schistosoma mansoni*: Protein phosphorylation during transformation of cercariae to schistomula. *Exp. Parasitol.* 73: 214-222.
85. Young, R. A. 1990. Stress proteins and immunology. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 401-420.

謝辞

本稿を終えるに臨み始終御指導を頂いた農林水産省家畜衛生試験場研究第一部原虫第一研究室長（現国際農林水産業研究センター国際研究情報官）藤崎幸蔵博士に謹んで感謝の意を表します。

適切な御助言と御協力を頂いた研究第一部原虫第一研究室の神尾次彦博士，河津信一郎博士，同細菌第二研究室の関崎 勉博士及び生体防御部生物物理研究室の大田方人研究員に深謝するとともに，実験遂行にあたり御協力頂いた研究第一部寄生虫研究室，原虫第一研究室，原虫第二研究室，細菌第二研究室及び企画連絡室衛生検査科写真室の皆様に感謝します。

また本論分の校閲と御指導を頂いた北海道大学獣医学部神谷正男教授，小沼 操教授，渡邊智正教授及び奥祐三郎助教授に深謝します。

Studies on the development from free-living larvae to
parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*

Naotoshi Tsuji

National Institute of Animal Health

Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Strongyloides venezuelensis, a natural parasite of rats, has been used as an experimental model for the study of human and animal strongyloidiasis. *Strongyloides* possesses two different life-phases in its life cycle i.e., free-living and parasitic phases. Third-stage larvae (L₃), which are free-living penetrate the skin, migrate to the lung and finally develop into adult worms in the small intestine. Exposure of the L₃ to a dramatic change in temperature during infection prompted us to investigate larval response to heat.

Heat shock proteins (HSP) display a high level of evolutionary sequence conservation and are classified into several families based on the molecular size. Among these families, HSP 70 has been associated with the protecting the larvae from adverse environmental factors, larval differentiation and normal larval development.

Development of free-living L₃ to the parasitic stage is a critical phase in the life-cycle of *Strongyloides*. However, the biological and biochemical mechanisms required to adapt to new environmental conditions from the free-living to the parasitic stage of *Strongyloides* spp. still remain unknown.

This study is focused on the developmental process from free-living L₃ to the parasitic stage of *S. venezuelensis*. The results of this study were summarized as follows:

1. Establishment of a method for a longer passage of *Strongyloides venezuelensis* strain in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)

Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) were infected with 1×10^2 , 1×10^3 or 1×10^4 free-living L₃ to determine the duration of fecal egg output. Eggs per gram of feces (EPG) were counted chronologically and adult worms in the small intestine were recovered on 100 days after infection. Changes of EPG in Mongolian gerbils infected with 1×10^4 free-living L₃ also were observed for 450 days. EPG was stable since the peak value noted on 9 or 10 days after the infection in each dose. The EPG and number of worms recovered were dependent on the dose. The high EPG value continued for 450 days. These results demonstrate that the Mongolian gerbils allowed a long lasting parasitism of *S. venezuelensis* and *Strongyloides venezuelensis*-mongolian gerbil systems were useful for long passage of *S. venezuelensis* strain.

2. Protein analysis of *Strongyloides venezuelensis* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Free-living L₃ and parasitic stage L₃ in the lung and adult worms in the small intestine were analysed for protein by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). The free-living L₃ were differentiated from the other two stages of parasite by 13 stage-specific spots, whereas the L₃ in the lung and the adult worms were identical to each other in spot patterns except for 6 spots. It was considered that these differences among the developmental stages were dependent on the environment of the larvae/worms.

3. *In vitro* development of *Strongyloides venezuelensis* free-living third-stage larvae to the parasitic third-stage larvae of by temperature shift

Free-living L₃ were cultured in Dubecco's modified eagle's medium at 25 °C

and 37 °C , and development to the parasitic stage was evaluated using morphological, protein and antigenicity criteria. Few larvae cultured at 25 °C showed development, whereas in most of the larvae cultured at 37 °C , there appeared characteristic morphological changes such as a bulb-like head and droplets under the cuticle with an increase of body width of the larvae. The results obtained from 2D-PAGE revealed that the protein spot patterns of the larvae cultured at 25 °C and 37 °C were differentiated by 17 specific spots. In addition, Western blot analysis combined with 2D-PAGE for reaction with serum obtained from infected rat revealed that protein spots showing immunodominant antigen at 37 °C were almost the same as those of the larvae recovered from the rats rather than those of the larvae at 25 °C .

These results strongly suggest that a temperature shift from 25 °C to 37 °C has an important role in the development of free-living L₃ to the parasitic L₃ of *S. venezuelensis*. The culture system established in the present study was useful for biological and biochemical studies of the development from the free-living to the parasitic stage of *Strongyloides species*.

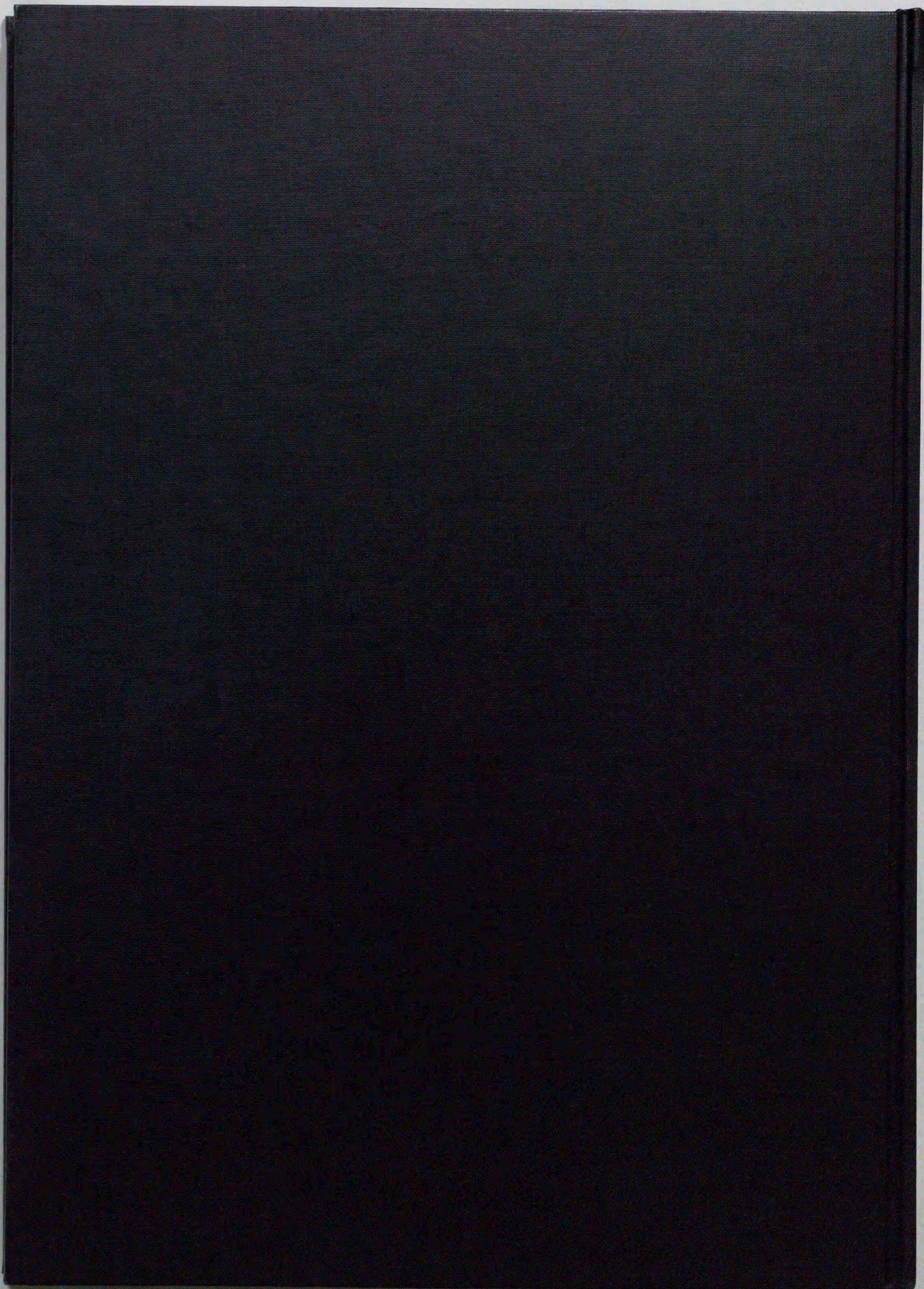
4. Expression of heat shock proteins during transformation from free-living third-stage larvae to parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*

Comparison of protein profile labelled with [³⁵S]-methionine of free-living L₃ cultured at 25 °C and 37 °C with a marked morphological transformation revealed an increase of 70 kDa protein and new appearance of two complexes between 16 kDa and 22 kDa proteins at 37 °C . The 70 kDa protein cross-reacted with monoclonal antibody against the human heat shock protein 70, was constitutively expressed. These proteins synthesized during the transformation of the free-living L₃ to parasitic L₃ might be crucial biochemical events that regulate infectivity of the parasite for the host.

5. Expression and characterization of heat shock protein 70 gene in free-living third-stage larvae of *Strongyloides venezuelensis*

A partial-length of heat shock protein 70 (HSP70) gene was cloned from cDNA library constructed λ ZAP II vector from mRNA of free-living L₃. The human HSP 70 gene was used for the library screening. A gene pSH70-1 had homology with more than 70% other HSP70 genes recorded in the GenBank data base. One of three deduced amino acid sequence showed high homology to heat shock cognate 70 (HSC70) of other organisms stored in the SWIS PROT data base. Southern blot analysis using pSH70-1 as probe was consistent with the pSH70-1 being present in one copy per genome. However, several bands under the low stringent conditions suggested that the gene was a member of the HSP70 multigene family. Northern blot analysis using the pSH70-1 as probe revealed that the expression of 3.2 kb mRNA, which was constitutively expressed was increased in the transformation from free-living to parasitic stage.

These results suggest that the *S. venezuelensis* HSC70 like gene is associated with the transformation from free-living L₃ to the parasitic L₃ in this parasite.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

	Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
A 1									
2									
3									
4									
5									
6									
M 8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
B 17									
18									
19									

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak