

免疫応答によって誘導される腸管粘膜バリアー機能 ～寄生線虫感染系による解析～

石 渡 賢 治

熱帯医学講座

(受付 平成 29 年 2 月 25 日)

THE INTESTINAL MUCOUS MEMBRANE BARRIER FUNCTION LED BY IMMUNE RESPONSES: ANALYSIS WITH A GASTROINTESTINAL NEMATODE MODEL

Kenji ISHIWATA

Department of Tropical Medicine

A mucous membrane of the intestinal tract absorbs nutrition and forms a barrier that prevents colonization, multiplication, and invasion by pathogens. The barrier consists of a monolayer of epithelium and viscous mucus, the elements of which are secreted from the epithelium; the balance of the barrier components are controlled by immunity. Most intestinal parasites infect chronically and often re-infect. However, in several experimental murine models of infection, worms undergo immune-mediated expulsion. These models also confirm protection against re-infection. The mucous membrane barrier function analyzed with a *Nippostrongylus brasiliensis*/rat system was further examined with mice that are available for various immunological tools. In mice, helper T type 2 cell-derived interleukin 13 activated signal transducer and activator of transcription 6 through interleukin 4 receptors on goblet cells, and the activation led to the up-regulation of sialyltransferase expression, which resulted in the production of sialic acid-linked mucins. This process was correlated with the expulsion of *N. brasiliensis* from the small intestine. Changes in mucus mediated by the immune response of helper T type 2 cells, including the production of sialomucins, prevented the colonization of *N. brasiliensis* onto the mucous membrane. However, the physiological effects of the changed mucus on the worms will remain a future research subject. The immune-mediated elimination performed by the mucous membrane barrier may not be perfect; however, the understanding of the barrier function for worm expulsion achieved with murine models can be applied to other intestinal infections.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2017;132:109-118)

Key words : mucous membrane barrier, immune, intestinal nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*, experimental murine model

I. はじめに

免疫は、自己・非自己の認識に基づいて非自己を排除する生体の恒常性維持機構の一つである。異物の認識がそのベースにある点で炎症と異なる。地球上の生物は進化の過程で多様性を獲得し、その生活様式も多彩である。その一部に、他の生物の体表あるいは体内に存在して生活している生物群がある。宿を提供している生物を宿主、宿を

借りている生物を寄生体という。この両者の関係で、寄生体の方が生存の場や栄養などをとることで利益を得る一方、宿主は不利益あるいは害を受けている場合を“狭い意味での寄生”という。さらに、寄生体が生体内に侵入し、定着して増殖することを感染としている。感染によって宿主に病的な症状が引き起こされた場合を感染症といい、この寄生体（病原体）を生体から排除しようとして免疫が進化の過程で発展してきたと考えられ

る。

生物は、生体内に侵入した寄生体に対して免疫を進化させてきたが、寄生体の侵入を防ぐバリアーシステムも同時に形成してきた。多くの水棲動物の体表はヌルヌルとした粘液で覆われている。この粘液は体表を物理・化学的な損傷から保護しているだけでなく、寄生体の体表での定着・増殖や生体内への侵入を防いでいる。陸上がりした生物群の体表は乾燥に耐え寄生体の侵入に対しても強固な皮膚を備えたが、皮膚以外の体表を覆う粘膜部分は粘液が保護しさらに粘膜の保水作用をも担っている。とくに腸管粘膜は、栄養を吸収するという役割から一層の立方上皮が腸管腔と生体内を画している。腸管粘膜を覆う粘液は栄養の吸収を妨げることなく、粘膜上皮とともに寄生体の侵入を阻止するバリアー機能を担っている。主成分であるムチンによる粘液の粘性・弾性が物理的なクッション性と粘着による排除作用をもち、さらに抗菌物質や酵素等が化学的に寄生体の増殖を抑えている。免疫は、粘膜上皮のターンオーバーや粘液の組成・量を調節することで腸管粘膜のバリアー機能を維持している。

“寄生虫”と呼ばれる寄生体は、単細胞生物の原虫と多細胞生物の蠕虫（線虫、吸虫、条虫および鉤頭虫を含む）とに分けられる。人の寄生虫を含む多くは長期間寄生し続ける。これは、宿主を殺すことなく、しかしながら宿主の免疫応答によって排除されないように、長い寄生生活の歴史の中で寄生虫が培ってきた方策の結果と捉えられる。腸管に寄生する寄生虫は慢性感染どころか、再び何度も感染しうる。免疫応答が誘導されないわけではないが、腸管においては寄生虫に対する再感染防御免疫が成立し難いようである。しかしながら、ネズミを用いた実験感染では多くの腸管寄生線虫が感染後2～3週で排除され、再感染に対して効率よく排除する。ネズミの腸管寄生線虫の排除がどのように発現しているのかを明らかにすることで、人の腸管寄生虫症さらには腸管感染症への対処法が大きく変わると考えられる。ここでは、腸管寄生線虫感染系を用いて明らかにできた粘膜バリアー機能を概説する。

II. 腸管寄生線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* と宿主の適応免疫応答

腸管免疫を解析するツールとして用いられている *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914) Lane 1923は、線虫の生物学においても草分け的な存在である¹⁾ (Fig. 1A)。 *N. brasiliensis* は、1914年にTravassosによってブラジルのリオデジャネイロのドブネズミ *Rattus norvegicus* より見いだされた²⁾。横川も1920年にアメリカ合衆国のボルチモアのドブネズミより報告し、1922年にはその発育と形態を詳細に観察している³⁾。 *N. brasiliensis* は、自然界ではドブネズミの小腸に普通に見られる線虫である⁴⁾。したがって実験動物としてラット *R. norvegicus* が用いられてきたが⁵⁾、マウスにも寄生できる株が得られてからはマウスを用いて解析されることが多くなった⁶⁾。経皮的に侵入した感染幼虫は血行・リンパ行性に肺へゆき、肺で一回脱皮した後に気管を上行して咽頭より飲み込まれ小腸に定着する (Fig. 1B)。小腸でもう一度脱皮して急速に成熟し、雌は感染後5日頃より産卵する。ラットでは皮下への感染幼虫接種後14日には、成虫は宿主免疫応答によって小腸からほとんど排除されてしまう。マウスにおいても、感染後5日頃より産卵を認める点で同様であるが、排除は9～10日と比較的早期に認める。この排除時期の違いは、両動物種で *N. brasiliensis* の認識メカニズムに相違があることに起因する可能性がある⁷⁾。

マウスを用いた実験結果から、 *N. brasiliensis* の

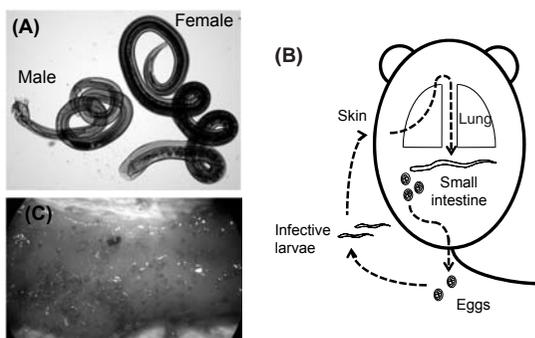


Fig.1. *Nippostrongylus brasiliensis* and its life cycle. (A) A pair of adult *N. brasiliensis* worms, (B) Life cycle of *N. brasiliensis*, (C) *N. brasiliensis* in the small intestine of a rat 5 days postinfection.

小腸からの排除は1)抗体に依存せず⁸⁾, CD4陽性T細胞に依存すること⁹⁾, 2)Interleukin (IL)-4受容体の細胞内伝達物質Signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6)に大きく依存していること¹⁰⁾, しかも3)腸管組織を構成する細胞で発現しているIL-4受容体にIL-13が結合すること(IL-4とIL-13はIL-4受容体を共有している)が排除により関与していること^{11,12)}が明らかにされている。IL-4, IL-5およびIL-13などのサイトカインを産生するCD4陽性T細胞はT helper type 2 (Th2)細胞と呼ばれ, この細胞応答をTh2応答という。蠕虫感染ではTh2応答が惹起され, 産生されたサイトカインによって, 末梢血好酸球増多や高IgEが誘導される。このIL-13/IL-4受容体/Stat6経路は, 腸管寄生線虫の排除に必須であることが複数の実験的腸管寄生線虫感染系で証明されている¹³⁻¹⁴⁾。しかしながら, 腸管組織構成細胞におけるStat6の活性化以降のどの経路が*N. brasiliensis*の小腸からの排除に直接関与しているのかについては明らかとされてこなかった。

III. *N. brasiliensis* 感染における粘液の解析

*N. brasiliensis*成虫は, 小腸上部を好適寄生部位とし絨毛間に定着している(Fig. 1C)。したがって, 粘液の中で生活しているとも言え, その影響をまともに受けると考えられる。実際, ラット小腸からの*N. brasiliensis*の排除は, 免疫によって増量した粘液が抗体や補体とともに成虫を包み込んで小腸から流し去ることによって考えられてきた¹⁵⁾。また組織化学的な解析から, 排除時期に酸性かつ硫化したムチンを産生する杯細胞が多くなることが報告されている¹⁶⁾。ムチンは骨格となるコア蛋白に多数の糖鎖が結合している糖蛋白で, 数百万Daの分子量を呈する。コア蛋白は, セリン, スレオニンおよびプロリンを多く含むアミノ酸から

構成される多数の繰り返しドメインを持つのが特徴で, セリンまたはスレオニン残基にN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が結合することでO-グリコシド結合型糖鎖を形成する。糖鎖を特異的に認識して結合するレクチンを用いて組織学的に解析すると, 排除時期にムチンの糖鎖末端構造に変化が見られ¹⁷⁾, 排除にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の付加が関与していることが明らかにされた¹⁸⁾。これらラットによる成果を踏まえ, さらにマウスを用いて粘液の解析を進めた。

マウスにおいてもラットと同様に*N. brasiliensis*の排除時に粘液の増量を認めた(Ishiwata et al. in preparation)。マウスの小腸切片にレクチンを反応させると, *N. brasiliensis*を排除する時期に杯細胞内ムチンへのLFAとUEA-1の結合性が増強した(Table 1)。GlcNAcに結合するGS-IIの結合性にほとんど変化はなかった。LFAの結合増強はラットでも認められている¹⁷⁾。LFAはシアル酸, UEA-1はフコースをそれぞれに認識して結合するレクチンであることから, マウスにおいてはムチンの糖鎖末端にシアル酸とフコースが存在することが排除と関係することが示された。そこで, 抗マウスCD4モノクローナル抗体(mAb)を投与してCD4陽性細胞を欠失させたマウス, 抗マウスCD4mAb投与に加えてリコンビナントマウスIL-13(r-mIL-13)を投与したマウスおよび遺伝的にStat6を欠損させた(Stat6 KO)マウスを用いて解析した(Table 2)。すると, *N. brasiliensis*の排除に相関したのはLFAの結合性, すなわちシアル酸の発現のみであり, それはStat6依存性であった。UEA-1の結合性は感染で誘導され, 排除の可否に影響されなかった。このことから, *N. brasiliensis*の排除にムチンの糖鎖末端にシアル酸の付加が関与することが示された。

レクチンは糖鎖の結合様式をも認識して結合している。シアル酸の異なる結合様式を認識するレ

Table 1. Lectin-binding profiles of villous goblet cells

Lectin	Binding specificity	Day 8 postinfection
<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin	α and β N-acetylglucosamine	no change
<i>Glycine max</i> agglutinin	α and β N-acetylgalactosamine	no change
<i>Limax flavus</i> agglutinin	sialic acid	increased
<i>Sophora japonica</i> agglutinin	β N-acetylgalactosamine	no change
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin	α -fucose	increased

クチンの結合性を調べると、Gal β 1-4GlcもしくはGal β 1-4GlcNAcに α 2-3の形でシアル酸が結合することが排除と相関した (Table 3). さらに、シアル酸の α 2-3の形での結合を触媒するシアル酸転移酵素 (Table 4) のうち、腸管に発現しうるST3Gal IIIとIVの発現を遺伝子レベルで調べたところ、ST3Gal IVの発現増強の方が*N. brasiliensis*の排除と相関した (Ishiwata et al. in preparation). また、ST3Gal IVを遺伝的に欠損したマウスでは*N. brasiliensis*の排除が遅延した. 興味深いことに、杯細胞数の増多とシアル酸およびST3Gal IVの発

現はr-mIL-13の投与だけでも誘導され、Stat6依存性であった. 感染マウスの小腸粘液中のシアル酸含有糖鎖の質量分析においても、r-mIL-13依存性にSda抗原の発現を認めた¹⁹⁾. このSda抗原は、Gal β 1-4GlcNAcに α 2-3の形で結合したシアル酸という糖鎖構造そのものである²⁰⁾.

以上のことから、Th2細胞由来のIL-13が腸管上皮に発現するIL-4受容体/Stat6経路を介して、杯細胞においてシアル酸転移酵素の発現増強を誘導し、ムチンの糖鎖末端へのシアル酸付加が起こることが*N. brasiliensis*の排除に関与することが示

Table 2. Percentages of the lectin-binding villous goblet cells at day 8 postinfection

Mice	Treatment	Infection	Expulsion	<i>Limax flavus</i> agglutinin	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin
Wild type	No	No	-	+	+
	No	Yes	Yes	++++	++++
	α -CD4 mAb	No	-	+	+
	α -CD4 mAb	Yes	No	+++	++++
Stat6 KO	α -CD4 mAb + r-mIL-13	Yes	Yes	++++	++++
	No	No	-	++	+
	No	Yes	No	++	+++
	No	Yes	No	++	+++

Percentage of the lectin-binding villous goblet cells: +, <10%; ++, 10%–19%; +++, 20%–49%; +++++, 50%–69%; ++++++, >70%.

Abbreviations: α -CD4 mAb, anti-mouse CD4 monoclonal antibody; r-mIL-13, recombinant mouse interleukin 13; Stat6 KO, signal transducer and activator of transcription 6 knock-out

Table 3. Structural requirements for recognition by 3 sialic acid-binding lectins and the number of lectin-binding villous goblet cells at day 8 postinfection

Lectin	Linkage	Underlying saccharide	Treatment	
			α -CD4 mAb	α -CD4 mAb + r-mIL-13
<i>Limax flavus</i> agglutinin	All			
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	α 2-6	Gal or GalNAc	+++	+++
<i>Maackia amurensis</i> agglutinin	α 2-3	Gal β 1-4Glc (NAc)	+	+++

Number of lectin-binding villous goblet cells: +, <6; ++, 6–10; +++, 11–16.

Abbreviations: α -CD4 mAb, anti-mouse CD4 monoclonal antibody; r-mIL-13, recombinant mouse interleukin 13; Gal, galactosamine; Glc, glucosamine; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GlcNAc, N-acetylglucosamine

Table 4. Mouse β -galactoside α 2,3-sialyltransferases

Enzyme	Substrate	Expression organs
ST3Gal I	Gal β 1,3GalNAc	spleen, salivary gland
ST3Gal II	Gal β 1,3GalNAc	brain, spleen, heart, kidney, liver (embryonic stage)
ST3Gal III	Gal β 1,3(4)GlcNAc	all
ST3Gal IV	Gal β 1,4(3)GlcNAc	all
ST3Gal V	lactosylceramide	brain, liver
ST3Gal VI	Gal β 1,4(3)GlcNAc	heart, placenta, liver

ST, sialyltransferase; Gal, galactosamine; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GlcNAc, N-acetylglucosamine

された (Fig. 2).

IV. Th2応答によって誘導された粘液の*N. brasiliensis*排除へのかかわり

タイプ2サイトカインであるIL-13によって粘液の量と質が変化することを明らかにしたが、この粘液は*N. brasiliensis*の排除にどのようにかかわっているのだろうか？排除時期のマウス小腸内*N. brasiliensis*は、ラット小腸内でのように粘液に包み込まれて排除されているようにはみえない。可能性として、以下の二つが考えられた：1) *N. brasiliensis*の小腸絨毛への定着に負にかかわる、2) *N. brasiliensis*自体への生理的障害作用。はじめに、前者について検討した。

感染後5日頃より小腸組織は浮腫性となり、粘液産生が増多してくる。しかし、この時期の粘液には排除能がない。感染後5日に駆虫薬を投与して感染を終息させた翌日、外科的に小腸に移入しても、移入された*N. brasiliensis*は定着する (Fig. 3)。ラットですでに示されているように¹⁸⁾、粘液の量ではなく質の変化が排除に必要であることがマウ

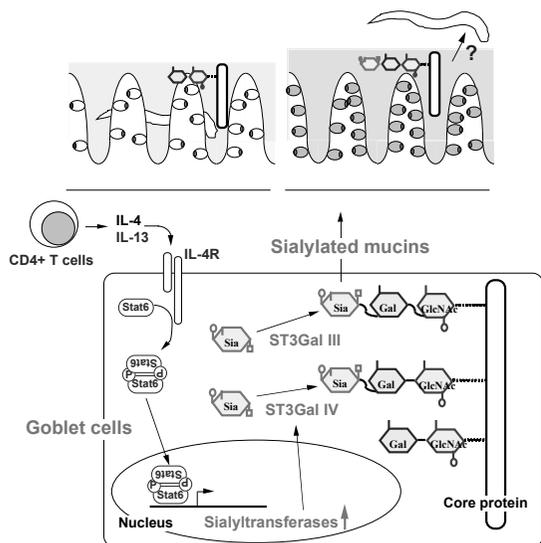


Fig. 2. Diagram of the suggested pathway of immune-mediated structural changes of mucins in goblet cells. The CD4-positive T cell (T helper type 2 cell; Th2 cell) derived interleukin (IL) 13 binds IL-4 receptor expressed on goblet cells, and activates signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6). The signal up-regulates transcription of sialyltransferases (ST3Gal III and IV) and production of sialic acid-linked mucins that correlates well with adult *N. brasiliensis* expulsion from the small intestine in mice.

スでも確認された。

マウスは経皮感染後10日には小腸から*N. brasiliensis*を排除する。この時期の小腸はTh2応答によって変化した粘液によって覆われている。そこで、この時期のマウス小腸に外科的に*N. brasiliensis*を移入した (Fig. 4)。移入後、継続的に小腸内に存在する*N. brasiliensis*を数えると、6時間まではある程度数が回収されたが、12時間後に回収数が半減し、18時間後にはほとんど回収されなくなった (Fig. 5A)。18時間後の組織切片で杯細胞から盛んにムチンが放出されている像が観察されたことから、この時期に再度*N. brasiliensis*を外科的に移入したが、再度移入した*N. brasiliensis*の排除は認められなかった (Fig. 6)²¹⁾。この結果は、免疫によって誘導されたムチンが放出されているにもかかわらず、*N. brasiliensis*が定着できることを示している。しかしながら、急速に腸管を凍結させた組織切片で*N. brasiliensis*の存在様式を調べると、未感染マウスの小腸に移入された*N. brasiliensis*は移入後4時間で腸陰窩まで深く

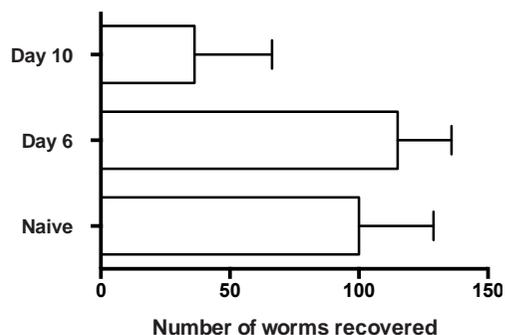


Fig. 3. Day 6 mucus is unable to expel implanted *N. brasiliensis*. Infected mice were dewormed on days 5 and 9 postinfection and then underwent surgical implantation of *N. brasiliensis* into the duodenum on days 6 and 10 postinfection, respectively. Implanted worms were recovered 12 hours later. Bars indicate SD.

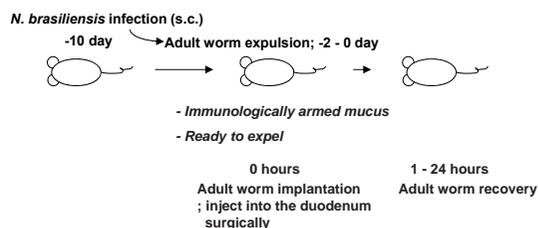


Fig. 4. Experimental design to examine effects of immune-mediated structural changes of mucins on surgically implanted *N. brasiliensis*.

入り込んでいるのに対して、感染後10日の小腸に移入された *N. brasiliensis* の多くは腸管腔に、一部は絨毛上に存在することがわかった (Fig. 7A, B). このことは、免疫によって誘導された粘液が *N. brasiliensis* の絨毛への定着を阻止していることを示唆する。では、一体なぜ *N. brasiliensis* は6

時間経っても回収されるのであろうか？ 因みに、駆虫薬であるパモ酸ピランテル (ニコチン受容体作動薬で脱分極性神経筋遮断薬として作用する) を投与すると、4時間でほとんどの *N. brasiliensis* は小腸から排除される (Fig. 8).

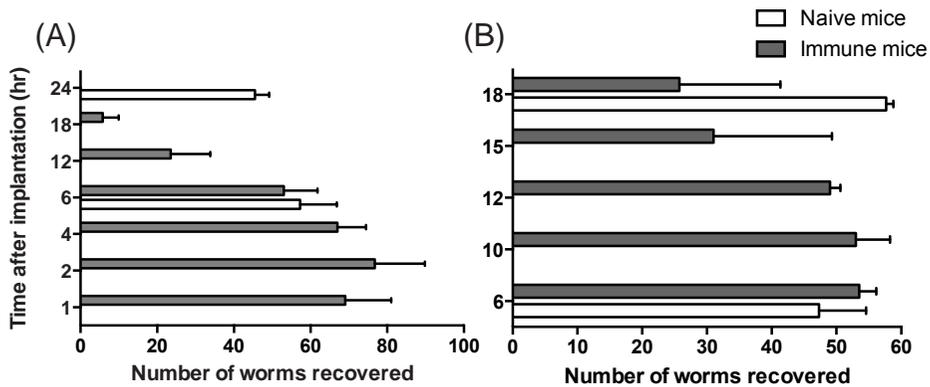


Fig. 5. Temporal colonization of surgically implanted *N. brasiliensis* in immunologically armed mucus. Recipient mice were infected subcutaneously with *N. brasiliensis* 10 days earlier, and the worms were expelled from the small intestine at the time of implantation. Adult worms were implanted when after the mice had been anesthetized with ketamine (A) or hydrochloric acid medetomidine (B); they were then recovered at the indicated time. Ketamine is a short-acting drug, and hydrochloric acid medetomidine is a long-acting drug. Bars indicate SD.

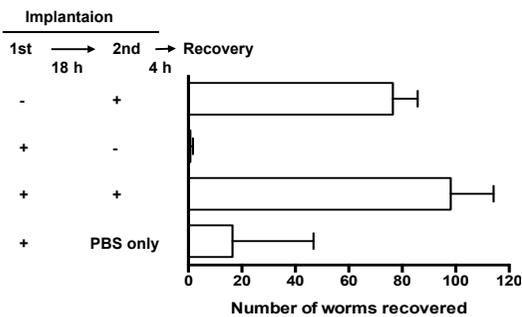


Fig. 6. Surgically implanted *N. brasiliensis* can colonize a small intestine that discharges immunologically armed mucus. To induce goblet cells to discharge immunologically changed mucins, adult *N. brasiliensis* worms were surgically implanted into the duodenum of mice that had been infected with the same nematode 10 days earlier. Eighteen hours later, the mice were again implanted with adult *N. brasiliensis*. Implanted worms were recovered and counted 4 hours later. Phosphate buffered saline (PBS) was administered as a control. Bars indicate SD²¹⁾.

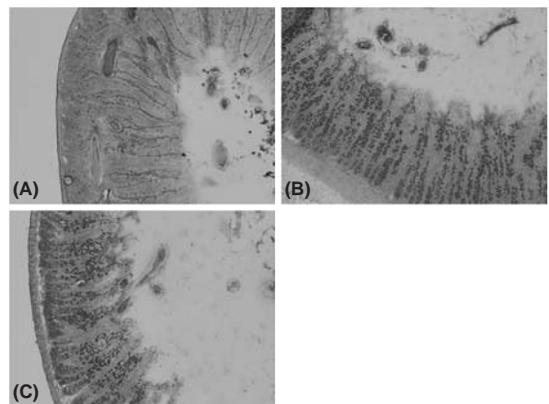


Fig. 7. Implanted adult *N. brasiliensis* was received by a naïve small intestine in its crypts, but was refused by an immune small intestine. Adult *N. brasiliensis* was implanted surgically into a mouse's small intestine. Four hours later, the tissue was quickly frozen in liquid nitrogen, embedded in OCT compound, frozen again in liquid nitrogen, and cut with a cryostat. After fixation with Carnoy's fixative, the sections were reacted with periodic acid-Schiff and counter-stained with hematoxylin. (A), a section of a naïve mouse; (B), a section of a mouse infected with *N. brasiliensis* 10 days earlier; (C), a section of a mouse infected with *N. brasiliensis* 10 days earlier and treated with an $\alpha 2$ -adrenoceptor agonist (medetomidine) just after implantation.

V. 蠕動運動との協調

絨毛に定着できず腸管腔に存在する *N. brasiliensis* はなぜ排除されないのだろうか？腸管への外科的移入のための麻酔の作用時間が長いほど定着時間が長くなること (Fig. 5A, B) をヒントに、麻酔薬の腸管生理への影響をイミダゾール系鎮静・鎮痛剤のドミトールを用いて検討した。主成分の塩酸メドミジンは、強力で選択性の高い $\alpha 2$ -アドレナリン受容体作動薬で、低用量で筋弛緩を伴った鎮静・鎮痛作用を示す。この選択的 $\alpha 2$ 作動薬の胃腸管に対する作用には、1) シナプス前膜からのアセチルコリンと、おそらくその他の腸管神経刺激物質の遊離を減少させて間接的に平滑筋活

性を低下させることと、2) 腸管内腔へのNaと水の分泌の抑制がある。

感染後10日の小腸への *N. brasiliensis* 移入直後にドミトールを投与し8時間後に回収すると、その数は未感染マウスの小腸から回収される数とほぼ同じであった。ドミトール投与後15分に拮抗剤のアンチセダン(主成分は塩酸アチパメゾール)を投与すると、回収される数は移入直後にアンチセダンを単独投与した群とほぼ等しかった (Ishiwata et al. in preparation)。ドミトール投与後4時間の *N. brasiliensis* の存在様式を観察すると、やはり多くの *N. brasiliensis* は腸管腔に存在し、一部絨毛の先端部分に認められた (Fig. 7c)。 *N. brasiliensis* の腸管内分布を定量化するために、矢状に開いた小腸をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で洗って腸管腔に存在する *N. brasiliensis* を回収し、その後37°Cで2時間静置して絨毛に絡みついている *N. brasiliensis* を回収した。感染後10日の小腸への移入では、4時間後、8時間後と回収 *N. brasiliensis* 数の減少を認めたが、移入後4時間にドミトール処理するとその4時間後(移入8時間後)の回収数はドミトール処理した時期(移入4時間後)とほとんど同じであった (Fig. 9)。 *N. brasiliensis* の腸管内分布でみると、移入後4時間では管腔に1/3、絨毛部分に2/3であったが、その時点でドミトール処理を行った後4時間では、管腔に5/6、絨毛部分に1/6であった。ドミトール処理後、絨毛に絡みついていた *N. brasiliensis* は次第に絨毛か

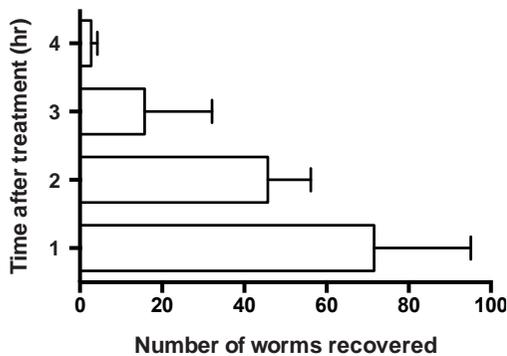


Fig.8. Most *N. brasiliensis* are expelled by 4 hours after pyrantel treatment. Pyrantel (2 mg/head) was orally administered to mice infected with *N. brasiliensis*, and worms were recovered from the small intestine after the indicated time. Bars indicate SD.

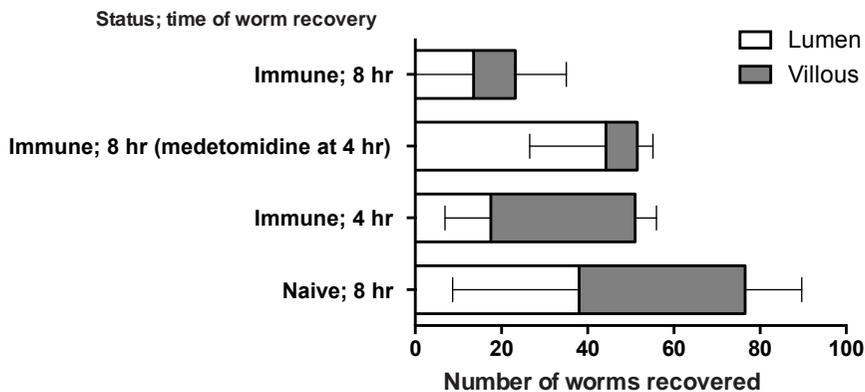


Fig.9. Medetomidine suppressed expulsion of implanted *N. brasiliensis* from the small intestine of immune mice but allowed the worms to dislodge from the villi to the intestinal lumen. Adult *N. brasiliensis* worms were implanted surgically into duodenum of mice. Medetomidine was administered 4 hours after implantation. The small intestine was opened longitudinally and washed in phosphate buffered saline (PBS) at 37°C to collect worms from the lumen, then incubated at 37°C for 2 hours with the Baermann apparatus to isolate worms from the mucosa (villi). Bars indicate SD.

ら離れ管腔に移動するが、管腔にあっても排除されないために、結果としてほぼ同数の回収となったと考えられる。この実験系でドミトール処理による腸管の蠕動運動をみたところ、免疫によって蠕動運動の亢進が認められ、さらにこの亢進がドミトール処理によって未感染マウスでの動き以下まで抑制されることがわかった (Fig. 10A)。また、管腔内の水分量の減少も確認された (Fig. 10B)。これらのことから、選択的 $\alpha 2$ 作動薬のドミトールによって管腔内への水の分泌が抑制されたにも

かかわらず外科的に移入された *N. brasiliensis* は絡みついていた絨毛から管腔に離れ、しかしながら蠕動運動の抑制によって小腸からの排除を免れていることが考えられた。

感染幼虫の経皮感染後8日にドミトール処理をして9日に小腸内 *N. brasiliensis* を回収すると、生理食塩水処理 (対照) をしたものではほとんど回収されないのに対して、ドミトール処理では多くの *N. brasiliensis* が回収され、その多くは管腔に存在していた (Fig. 11)。以上の結果は、免疫応答

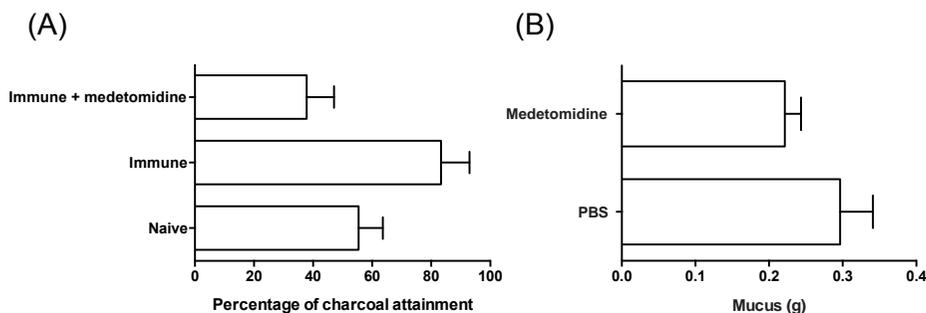


Fig.10. Medetomidine suppressed the peristaltic motion of the small intestine which was up-regulated by immune responses and the amount of liquid materials expressed as mucus on the small intestine. (A) Mice underwent surgical implantation of adult *N. brasiliensis* into the duodenum. Medetomidine was administered after implantation. Four hours later, charcoal suspension was administered orally. After 20 minutes, mice were sacrificed, and the lengths of the small intestine and of the charcoal attainment were measured. Data represent ratio of charcoal attainment to the small intestine. Bars indicate SD. (B) Four hours after implantation, the amount of liquid materials (mucus) on the interior surface of the small intestine was measured. Phosphate buffered saline (PBS) was administered as a control. Bars indicate SD.

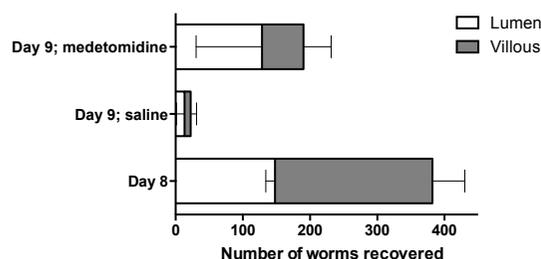


Fig.11. Medetomidine suppressed the expulsion of subcutaneously infected *N. brasiliensis* from the small intestine of mice. Mice that had been subcutaneously infected with *N. brasiliensis* were treated with medetomidine on day 8 postinfection, and adult worms were recovered separately from the lumen and mucosa on day 9 postinfection. Saline was used as a control. Bars indicate SD.

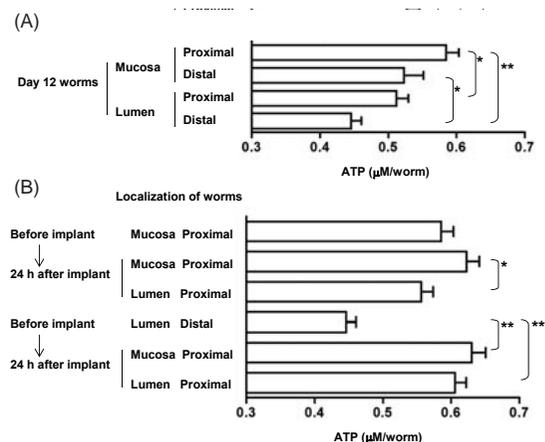


Fig.12. Adult *N. brasiliensis* dislodges from its preferred site with intact energy metabolism activity. (A) The ATP values of individual male worms obtained from the small intestine of rats on day 12 postinfection. (B) Day 12 worms were obtained from the proximal mucosa and distal lumen of donor rats and transferred to the small intestine of naive rats. After 24 hours, the worms recovered from each location indicated were assayed. Bars indicate SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ ²²⁾.

によって変化した粘液の存在下では *N. brasiliensis* は絨毛への定着が阻害され、亢進された蠕動運動によって排除されることを示唆している。

VI. Th2 応答によって誘導された粘液の *N. brasiliensis* への生理的障害作用

小腸への外科的移入実験において、未感染マウスへの移入後4時間ではほとんどの *N. brasiliensis* は絨毛深くに定着しているが (Fig. 7A), 8時間となると管腔に存在する割合が増してくる (Fig. 9)。しかしながら、移入後18~24時間経っても排除されない (Fig. 5)。未感染マウスでは、管腔に遊離しても腸蠕動で排除されることはないようである。Th2 応答によって誘導された粘液には、粘膜への定着阻止作用に加えて *N. brasiliensis* 自体への生理的障害作用の可能性も考えられた。

小腸上部粘膜に定着する *N. brasiliensis* は、腸管腔の流れや腸蠕動に逆らうためにエネルギーを必要としている。生理的障害はこのエネルギー量に反映されると考え、ATP 量としての評価を試みた²²⁾。この実験においては、絨毛と管腔および小腸上部と下部での *N. brasiliensis* の ATP 量を比較する上で存在部位の相違が大きくなるラットを宿主として用いた。感染後12日 (排除期) のラットにおいて、絨毛に定着している *N. brasiliensis* と管腔に存在する *N. brasiliensis* の ATP 量は、小腸上部と下部にかかわらず後者の方が有意に低かった (Fig. 12A)。小腸下部管腔では小腸上部絨毛のほぼ75%となっていた。これらの *N. brasiliensis* を未感染ラット小腸へ外科的に移入すると、どちらも小腸上部の絨毛に定着した。それらの ATP 量は、移入前の小腸上部絨毛に定着していた *N. brasiliensis* の ATP 量とほぼ同等であった (Fig. 12B)。 *N. brasiliensis* は好氣的エネルギー代謝をしている。低酸素濃度条件下で培養すると、ATP 量の低下を認めた²²⁾。小腸下部に遊離した *N. brasiliensis* の ATP 量低下は小腸下部の酸素濃度の低さに由来しているようである。これらのことから、小腸上部絨毛からの遊離はエネルギー代謝活性の障害によらないと考えられた。

より直接的な粘液の作用を調べるために、ラットあるいはマウスの排除期の小腸粘液とともに培

養した *N. brasiliensis* をマウスの小腸に外科的に移入しても、その定着率は対照の PBS と違いは見られなかった。Th2 応答によって誘導された粘液への外科的移入実験の結果からは、粘液が単に *N. brasiliensis* の絨毛への定着を物理的に阻止しているだけとは考えにくい。移入された *N. brasiliensis* は、定着を阻止されつつも暫くは腸蠕動に抗っているように見えるが、その分子レベルのメカニズムは明らかにできていない。

VII. おわりに

実は、実験感染でラットに一度に多数の *N. brasiliensis* を感染させると免疫が誘導され排除が起きるが、ごく一部は寄生し続ける。また、極少数の感染を連日行っても排除は起きてこない。再感染においても、多くは排除されるものの、通常よりもサイズが小さいながら生き残る *N. brasiliensis* がある⁵⁾。これが、ほとんどの野生のドブネズミに *N. brasiliensis* の寄生を認める理由と解釈されている。自然界ではドブネズミは一度に多数の感染など受けることはなく、頻回にわたり極少数の感染を受けているので、 *N. brasiliensis* は排除されずに寄生し続けているのである。「内なる外」の腸管では、生体にとって不都合なものはいつでも「粘液とともに流し落とす」という手段が可能なので、生体外の少数の寄生体の存在はそれほど脅威ではないのかもしれない；ヒトの呼吸器では“流し上げ戻さねばならない”から極めて厄介である。近年、腸管の常在菌の生体への作用が急速に明らかになりつつある。常在菌からの刺激で免疫能が育まれ、さらにいくつかの疾病との関与も報告されている²³⁾。腸管免疫は常在菌と上手く付き合うことで粘膜バリアー機能を発揮している。寄生虫感染においても少数感染では症状は出ない。ひょっとして、少数の寄生虫感染は生体にとって良き刺激、“益”になっているのかもしれない。腸管免疫応答は敢えて完全排除としないのか。さしずめ、少数感染は許容範囲として、共存 (共生) せよということなのだろうか？問題は、多数感染で症状が出ているにも関わらず排除が誘導されないことである。実験感染で粘膜バリアー機能を解析してゆくことがひとつの解決策を提示できるものと期

待している。

著者の利益相反 (conflict of interest : COI) 開示 :

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Kassai T. Handbook of *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda). Budapest: Akademiai Kiado; 1982. pp.257.
- 2) Travassos L. Trichostrongylideos braziliensis (3. nota previa). Brazil Medico. 1914; 28: 325-327.
- 3) Yokogawa S. The development of *Heligmosomum muris* Yokogawa, a nematode from the intestine of the wild rat. Parasitology. 1922; 14: 127-166.
- 4) Haley AJ. Biology of the rat nematode *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914). I. Systematics, hosts and geographic distribution. J Parasitol. 1961; 47: 727-732.
- 5) Ogilvie BM, Jones VE. *Nippostrongylus brasiliensis*: A review of immunity and the host/parasite relationship in the rat. Exp Parasitol. 1971; 29: 138-177.
- 6) Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodent models. Annu Rev Immunol. 1997; 15: 505-533.
- 7) Ishiwata K, Nakao H, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y. Immune-mediated damage is not essential for the expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* adult worms from the small intestine of mice. Parasite Immunol. 2002; 24: 381-386.
- 8) Jacobson RH, Reed ND, Manning DD. Expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from mice lacking antibody production potential. Immunology. 1977; 32: 867-874.
- 9) Katona IM, Urban JF Jr, Finkelman FD. The role of L3T4⁺ and L_{yt}-2⁺ T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. J Immunol. 1988; 140: 3206-3211.
- 10) Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M et al. IL-13, IL4R α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. Immunity. 1998; 8: 255-264.
- 11) Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Schopf L, Madden KB, Finkelman FD. Cutting edge: IL-4 receptor expression by non-bone marrow-derived cells is required to expel gastrointestinal nematode parasites. J Immunol. 2001; 167: 6078-6081.
- 12) Ramalingam TR, Pesce JT, Sheikh F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Wilson MS, et al. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor α 1 chain. Nature Immunol. 2008; 9: 25-33.
- 13) Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF Jr. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. Curr Opin Immunol. 1999; 11: 420-426.
- 14) Finkelman FD, Urban JF Jr. The other side of the coin: The protective role of the T_H2 cytokines. J Allergy Clin Immunol. 2001; 107: 772-780.
- 15) Miller HRP. Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. Parasitology. 1987; 94: S77-S100.
- 16) Koninkx JFJG, Mirck MH, Hendriks GCJM, Mouwen JMVM, van Dijk JE. *Nippostrongylus brasiliensis*: Histochemical changes in the composition of mucins in goblet cells during infection in rats. Exp Parasitol. 1988; 65: 84-90.
- 17) Oinuma T, Abe T, Nawa Y, Kawano J, Suganuma T. Glycoconjugates in rat small intestinal mucosa during infection with the intestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. In: Mestecky J, editor. Advances in Mucosal Immunology. New York, Plenum Press; 1995. p. 975-978.
- 18) Ishiwata K, Uchiyama F, Maruyama H, Kobayashi T, Kurokawa M, Nawa Y. Glycoconjugates and host-parasite relationship in the mucosal defense against intestinal nematodes. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Beienstock J, McGhee JR. eds. Mucosal Immunology. San Diego: Academic Press; 1999. p. 925-933.
- 19) Tsubokawa D, Ishiwata K, Goso Y, Nakamura T, Hatta T, Ishihara K, et al. Interleukin-13/interleukin-4 receptor pathway is crucial for production of Sdⁿ-sialomucin in mouse small intestinal mucosa by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. Parasitol Int. 2017; 66(6): 731-734.
- 20) Tsubokawa D, Goso Y, Kawashima R, Ota H, Nakamura T, Nakamura K, et al. The monoclonal antibody HCM31 specifically recognises the Sdⁿ tetrasaccharide in goblet cell mucin. FEBS Open Bio. 2012; 2: 223-233.
- 21) Ishiwata K, Watanabe N. Primed mucins allow attainment and adhesion, but prevent establishment of challenged adult *Nippostrongylus brasiliensis* in the small intestine in mice. 11th International Congress of Parasitology – ICOPA XI. Glasgow, August, 2006 Medimond International Proceedings 453-456.
- 22) Ishiwata K, Watanabe N. *Nippostrongylus brasiliensis*: Reversibility of reduced-energy status associated with the course of expulsion from the small intestine in rats. Exp Parasitol. 2007; 117: 80-86.
- 23) Honda K, Littman DR. The microbeta in adaptive immune homeostasis and disease. Nature. 2016; 535: 75-84.