

Cryptosporidium parvum の SCID マウスにおける侵入過程の電子顕微鏡的観察

梅宮 梨可¹, 福田 稔², 藤崎 幸蔵³, 松井 利博⁴

(¹杏林大・保健学研究科, ²杏林大・医・電頭, ³帯畜大・原虫研, ⁴杏林大・医・感染症)

Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum*
in severe combined immunodeficiency mice

Rika UMEMIYA¹, Minoru FUKUDA², Kozo FUJISAKI³ and Toshihiro MATSUI⁴

(¹Grad. Sch. Health Sci., Kyorin Univ., ²Lab. Electron Microsc., Kyorin Univ. Sch. Med., ³NRCPD,
Obihiro Univ. Agr. Vet. Med., ⁴Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med.)

SUMMARY

Cryptosporidium parvum mainly invades the intestinal epithelium and causes watery diarrhea in humans and calves. However, the invasion process has not yet been clarified. In the present study, the invasion process of *C. parvum* in severe combined immunodeficiency (SCID) mice was examined. Infected mice were necropsied and the ilea were

observed by scanning and transmission electron microscopy. In addition, ruthenium red staining was used to observe changes in the microvillus membrane that resulted from the invasion of *C. parvum*. Scanning electron micrographs showed elongation of the microvilli around the parasite. The microvilli were shown to be along the surface of the parasite. Transmission electron microscopy confirmed that the invading parasites were located among microvilli. Parasites were seen in a parasitophorous vacuole formed by the microvillus membrane. The parasite pellicle attached to the host cell membrane, and then the pellicle and host cell membrane became unclear. Subsequently, the pellicle structure became more complex and formed a feeder organelle. Invasion of the parasite was not observed in either a microvillus or the cytoplasm of the host cell. We have showed that *C. parvum* invades among the microvilli, is covered with membranes derived from numerous microvilli, and develops within the host cell.

【目的】 *Cryptosporidium* は coccidium に属する原虫で、哺乳類に寄生する種のうち、*Cryptosporidium parvum* はヒトやウシに感染してクリプトスポリジウム症を引き起こすことが知られている(1)。クリプトスポリジウム症の主な症状は激しい水様性下痢で、発熱、腹痛、嘔吐などを伴うが、有効な治療薬や感染源である oocyst の消毒剤がまだ開発されていない(2)ため、原虫の生物学的性状を調べることは、それらを開発するうえでも重要と考える。*C. parvum* の主な寄生部位は小腸上皮細胞の微絨毛であることが知られている(3)が、詳細な侵入過程は不明である。そこで、*C. parvum* のマウス回腸における寄生状態および侵入過程を走査型ならびに透過型電子顕微鏡で観察した。さらに、虫体の付着・侵入に伴う宿主細胞膜の変化を観察するために、上皮細胞表面の糖衣 glycoalyx をルテニウムレッド (RR) 染色で検出した。

【材料と方法】 原虫は、SCID マウスで継代維持しているウシ由来 *C. parvum* の oocyst を供試した。*C. parvum* 感染 SCID マウスの糞便を回収し、oocyst をシヨ糖液重層遠心浮遊法により濃縮した。SCID マウス(5~10週齢、雄)に $10^7 \sim 10^8$ 個の oocyst を経口投与し、6、12、18時間後ならびに40、100日後に剖検した。それらの回腸を2.5%グルタルアルデヒド・2%パラホルムアルデヒドで前固定し、1%オスミウム酸で後固定を行った。脱水、凍結乾燥後、金をコーティングし、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したサンプルについては、前固定を2.5%グルタルアルデヒドで行い、後固定を1%オスミウム酸で行った。なお、

RR 染色では、RR を加えた前・後固定液を用いた。脱水後、エポキシ樹脂で包埋し、超薄切片を作製して酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で二重染色した。

【結果と考察】 SEM 像では、虫体が存在する上皮細胞の微絨毛が伸長していた。高倍像では、多数の微絨毛が虫体表面に沿って認められ、それらが非常に伸長していた。表面が隆起状を呈していた虫体や、虫体の上部が開口していたものも存在した。TEM 像では、侵入時の虫体の両側に宿主細胞の微絨毛が認められ、虫体は微絨毛と微絨毛の間に位置していた。これらの微絨毛は、周辺の微絨毛に比べて細く、あるいは薄くなっていた。これは、通常隙間なく配列している微絨毛の間に虫体が付着し、宿主細胞質を押し込むように侵入していたためであると考えられた。虫体が伸長した微絨毛によって完全に覆われると、parasitophorous vacuole が形成された。その後、虫体膜が宿主細胞膜に付着して膜構造が不明瞭になり、この付着面は RR 陰性を示した。つまり、虫体膜と宿主細胞膜との融合が進むにしたがって、微絨毛表面の糖衣が消失したと考えられる。虫体を覆った膜の横断面には、外膜と内膜との間に点状の構造物が存在し、これは微絨毛の横断面で見られたものと類似していた。また、RR 陽性の部分が数カ所認められ、それらは融合した微絨毛の名残ではないかと考えられた。虫体と宿主細胞の付着面における膜の融合がさらに進行すると feeder organelle が形成され、宿主細胞膜の下には dense band が見られた。以上のことから、*C. parvum* は微絨毛の間に付着して侵入し、宿主細胞の微絨毛に覆われて parasitophorous vacuole を形成し、その中で发育する

ことが明らかになった。なお、coccidium である *Toxoplasma* や *Eimeria* は宿主の上皮細胞質内に侵入して寄生するのに対し、*Cryptosporidium* の細胞質内への侵入はまったく認められなかった。それらの原虫とは apical complex の構成や侵入時に分泌する物質が異なるのではないかと考えられた。

[文献]

- 1) Shimura, K. (2002) Japanese Journal of Veterinary Parasitology 1: 21-30.
- 2) Petri, W. A. Jr. (2003) Trends in Parasitology 19: 523-526.
- 3) Smith, H. V., Rosely, A. B., and Grimason, A. M. (2005) Trends in Parasitology 21: 133-142.