

Sandra Ines Juarez Garrido 論文内容の要旨

主論文

In Vitro Cultivation and Electron Microscopy Characterization of
Trachipleistophora anthropophthera Isolated from the Cornea of an AIDS Patient
(エイズ患者の角膜から分離した *Trachipleistophora anthropophthera* の試験管内培養と
電子顕微鏡による形態学的特徴)

SANDRA I. JUAREZ, CHATURONG PUTAPORNTIP, SOMCHAI JONGWUTIWES,
AKITOYO ICHINOSE, TETSUO YANAGI and HIROJI KANBARA

The Journal of Eukaryotic Microbiology (Accepted for publication, 2005 年)

長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系専攻
(指導教授 : 神原廣二教授)

諸言

Microsporidium 微胞子虫は無脊椎動物や脊椎動物の広範囲の種にわたって、それらの細胞内に寄生する真核生物に属し、分類学上 Microspora 門に 143 属、1,200 種を有する。微胞子虫類の分類は現在まだ完成されていないが、*Nosema*、*Vittaforma*、*Brachiola*、*Pleistophora*、*Encephalitozoon*、*Enterocytozoon*、*Trachipleistophora* などの 8 属の微胞子虫類が人に感染し、免疫不全患者の日和見感染症の原因となる。

AIDS 患者の角膜に感染していた微胞子虫の長期試験管内培養法を確立し、それから得た材料を用いてその種が *Trachipleistophora anthropophthera* であることを電顕による微細構造から明らかにした。

対象と方法

(1) 培養条件の検討 :

当該微胞子虫に感染していたタイ国の AIDS 患者の角膜剥離生検の断片を得て、まずマウス由来線維芽細胞培養基に植え、37℃、5%CO₂ 条件下で 5% 仔牛と 5% 牛胎児血清 (FBS) 加 MEM 培養液中での培養に成功した。それを用いて支持細胞の種類 (計 8 種類) や FBS 濃度 (2 種類) 、温度 (2 種類) などの培養条件を変化させることで、当該微胞子虫の試験管内での最適培養条件を検索した。なお、培養条件の比較検討には一定時間内に培養フラスコ中に放出される孢子数を指標とした。

(2) 形態学的観察 :

培養フラスコの培養液中に放出された孢子を遠心沈殿で収集し、光学顕微鏡学的には直接位相差顕微鏡で、あるいは各種染色液で染色後観察した。また同じ材料をもとに透過型電顕 TEM と走査型電顕 SEM で微細構造を調べた。

結果

(1) 至適培養条件

比較した支持細胞は成体マウスの脳由来線維芽細胞 (AMB), 新生児マウスの脳由来線維芽細胞 (NMB), 同じく骨格筋由来線維芽細胞 (NMSM), 同じく皮膚由来線維芽細胞 (NMS), Human colorectal adenocarcinoma 細胞 (Caco2), 昆虫由来の3種の細胞 (Sf-21, TN5, BmN) の8種であったが, この中で NMB 細胞を用いた場合最も多くの胞子を産出した。3種の昆虫細胞では微胞子虫の増殖はみられなかった。

昆虫細胞を除いては 26 と 37 の二者の温度条件を比較した。26 度でも線維芽細胞内での増殖は可能であったが, 低温であるために線維芽細胞の増殖が微胞子虫による細胞の崩壊に追いつかないため, 2週間以上の培養が継続できなかった。

FBS 濃度は 2% と 10% とを比較したところ, 2%の方が胞子の放出が優れていた。

(2) 形態学的特徴

(2-1) 光学顕微鏡レベル

Sporophorous vesicle (SPOV) で取り囲まれた胞子が培養フラスコの倒立顕微鏡で観察できたことから当該感染微生物が微胞子虫類であることがわかった。Giemsa, Chromotrope 2R や Calcofluor White M2R 染色から当該微胞子虫の SPOV 中の発育状況と増殖が観察できた。8個ないしそれ以上の胞子 (3.7 - 4.0 x 2.0 - 2.3 μm の楕円形) を入れた SPOV と 2個の胞子 (1.7 - 2.2 x 1.6 - 2.0 μm の円形) を入れた SPOV とがあり, 前者を polysporous vesicle (Type I), 後者を bisporous vesicle (Type II) と呼ぶ。この2種類の SPOV と 2種類の胞子を同時に観察できたが, これは *Trachipleistophora anthropophthera* の特徴である。

(2-2) 電子顕微鏡レベル

支持細胞の細胞質内に感染した微胞子虫の meronts と sporonts の両者の発育段階と増殖状態を透過型電顕で詳細に観察できた。それらは単核性であり, 電子密度の高い surface coat で囲まれていることなどは当該微胞子虫が *Trachipleistophora anthropophthera* の決め手となる特徴であった。

考察

AIDS 患者の角膜に感染していた微胞子虫を試験管内で長期培養するためには 5%CO₂ と 37 度の条件下で培養液は 2%FBS 加 MEM, 支持細胞は NMB 細胞の組み合わせが最適培養条件になる。この条件を参考にすれば多量の微胞子虫を供給できるため, 研究材料が容易に確保できる。

微胞子虫への FBS 濃度の影響として 2%の方が 10%より増殖を促すのは, 10%の場合, 微胞子虫よりむしろ支持細胞への増殖を促すためであるらしい。つまり, 微胞子虫の増殖が促進されるのは, 支持細胞の分裂増殖が抑制されているが, しかし, 細胞数が減った場合にのみ元の数に復帰するぐらいのゆるやかな増殖力を性質とした支持細胞が当該微胞子虫の培養に適していることが判明した。

線維芽細胞以外の腸管上皮細胞, 哺乳類以外の樹立細胞 (昆虫細胞) への感染力もしくは増殖性, あるいは 37 より低い温度の嗜好性などを調べてみたが, 最終的には 37 度の哺乳類由来細胞に当該微胞子虫がもっとも親和性を示したため, 本来当該微胞子虫が自然界で感染している動物等の感染源の予想はできなかった。しかしながら, 26 度の増殖も可能な事実は両生類や魚類等の変温動物が感染源であることも示唆している。