

図 1 肺吸虫の生活環

成虫はイヌ科やネコ科の動物の肺に寄生し、虫卵が生まれる。喀痰や糞便とともに外界に出た虫卵が孵化してミラシジウムと呼ばれる幼虫が泳ぎだし、淡水産の巻貝に寄生する。貝のなかで一定の発育を遂げるとセルカリアという幼虫になり、第2中間宿主であるカニ類に寄生し、終宿主に食べられるのを待つ。(図中の成虫・虫卵・メタセルカリアの写真は、国立感染症研究所・寄生動物部の杉山広博士にご提供いただいた、ウエステルマン肺吸虫の3倍体型である)

では、メタセルカリアはまず小腸内から腹腔に出て腹壁筋内に侵入して発育し、再び腹腔に現れ、横隔膜から胸腔、そして肺実質に侵入して成熟する。肺実質に達するには感染してから3~4週間、肺内で成熟して産卵を開始するにはさらに4~8週を要する。つまり感染してから2カ月以上経ってから肺の症状が出るわけである。

日本国内に分布しているのはウエステルマン肺吸虫(染色体が3倍体のものと2倍体の

ものがある)と宮崎肺吸虫である。このなかではウエステルマン肺吸虫の3倍体型がヒトに最もよく適応しており、典型的には肺で成熟して喀痰中に虫卵が検出される。ウエステルマン肺吸虫の2倍体型と宮崎肺吸虫は、虫体は幼若なまま経過し、虫卵はあまり産生されないという。これらの肺吸虫の中間宿主および終宿主、ヒトへの感染源を表1にまとめた¹⁾。

表 1 わが国に分布する肺吸虫の生活環とヒトへの感染源

	ウエステルマン肺吸虫 (3倍体型)	ウエステルマン肺吸虫 (2倍体型)	宮崎肺吸虫
終宿主	ヒトなど	タヌキ、キツネ、イヌなど	イタチ、タヌキ、イノシシなど
第1中間宿主	カワニナ	カワニナ	ホラアナミジンナなど
第2中間宿主	モクズガニ	サワガニ	サワガニ
おもな感染源	モクズガニ、イノシシ	サワガニ	サワガニ



図 2 酔蟹

ときに在日外国人がこのような食品から肺吸虫に感染する。

③ 感染源

ウエステルマン肺吸虫の3倍体型では、モクズガニとイノシシ肉がおもな感染源である。モクズガニは地方によってモクゾウガニ、ズガニ、ヤマタロウなどさまざまな名前で呼ばれ、それぞれの地で郷土料理として親しまれている。塩ゆで、雑炊、みそ汁、カニご飯などあり、肉よりも、甘い風味の内臓を楽しむカニである。ちなみに上海の秋の味覚として有名な上海ガニはモクズガニの同属異種でシナモクズガニという。

わが国では通常モクズガニは生では食べないが、漬してカニ汁にする際の味見などで加

熱不十分なままメタセルカリアを摂取して感染する。一方、中国や朝鮮半島ではカニを生のまま酒漬け、醤油漬け、あるいはキムチ漬けにした料理があり(図2)、海外からこのような食品を持ち込んで感染した例がある。また、国内でもモクズガニの老酒漬けからの感染が報告されている。フィリピンやタイなどでも同様の料理法がみられるので、海外での感染について注意が必要である。

イノシシの筋肉内にはウエステルマン肺吸虫の幼若な虫体がとどまっていることがあり、これを生のまま食べて感染する。イノシシ肉に肺吸虫がいるという知識は比較的広まっていて、たいてい焼いたり鍋にするが、

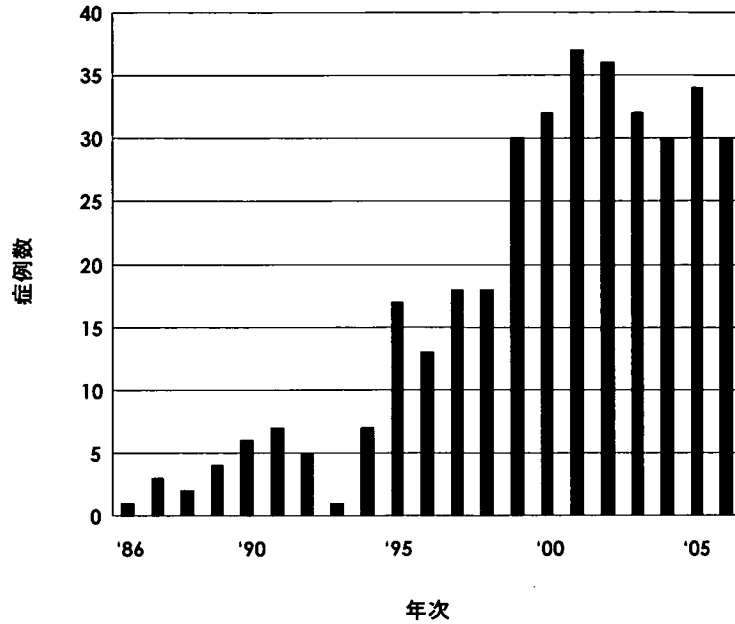


図 3 宮崎大学寄生虫学が診断に関わった肺吸虫症例

それでも発生していることから、加熱が不十分であったか、あるいはシカ肉のような他の獣肉からの感染が起こっているのかもしれない。イノシシ肉は美味であるので、どうしても生で食べたいというときには、確実に凍結させて筋肉内のメタセルカリアを死滅させてしまうのがよい。

ウエステルマン肺吸虫の2倍体と宮崎肺吸虫では、サワガニが感染源として重要である。料理屋のお造りに添えて出される飾り用のサワガニを食べてしまったり、不十分な加熱のサワガニの空揚げから感染したりする。また、小児が川遊びしていて捕まえたサワガニを口にしたり、喘息の民間療法でサワガニのしぼり汁を飲むことで患者が発生したりもしている²⁾。

4 頻度と疫学

肺吸虫症は、1950年代に行われた調査では北海道および東北の一部を除いた全国各地で見られ、なかでも中国、四国、九州地方が流行地であった。その後、1950年代から60年代にかけて激減したが、1990年代から南九州を中心に新規患者が増加し、再興感染症として重要になってきている。

宮崎大学医学部(旧宮崎医科大学)寄生虫学は1986年から2006年までに350例以上の肺吸虫症の診断に関わってきたが、90年代前半まではひと桁であった症例数が90年代後半から急速に増え、2000年前後からほぼ年間30~40例になっている(図3)。これらは九州、特に宮崎、鹿児島などの南九州に集中しており、ほとんどがウエステルマン肺吸虫症である。宮崎大学で把握している症例がわ

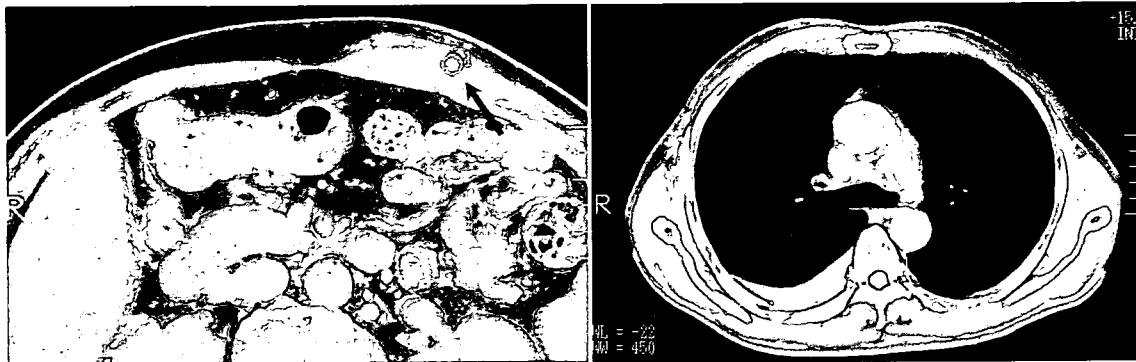


図4 ウエステルマン肺吸虫症の経過中にみられた皮下腫瘍

73歳，男性，腹部の皮下腫瘍を訴えて受診。初診時には胸部に異常なかったが，10日後に胸水の貯留を認め，血清学的にウエステルマン肺吸虫症と診断された。シカ肉の生食があった。(岐阜県白川病院症例)

が国全体に占める正確な割合は不明だが，国立感染症研究所によると，同研究所・寄生動物部へ検査依頼された患者血清のうち，肺吸虫症と診断されたものは1995～2002年の8年間で76例であった³⁾。このことから，国内では年間数十例程度の新規患者が発生していると考えてよいものと思われる。

5) 症 状

感染初期は症状のないことが多いが，時に腹壁筋内に侵入した幼虫が移動性の皮下腫瘍をつくることもある(図4)。また，体内移行過程で肺以外のいろいろな臓器に迷入することもあり⁴⁾，腸間膜，肝臓，腎臓，リンパ節，横隔膜，縦隔洞，泌尿生殖器などさまざまな臓器から肺吸虫は見つかっている。ただたいは自覚症状がなく，外科手術の際の病理学的検索で偶然見つかる。

胸腔内に侵入してからは，胸水貯留や気胸といった胸膜病変が最初の主な所見となり，咳嗽や発熱，あるいは胸痛などを訴えて受診する(図5)。ただし，多量の胸水貯留がある

にもかかわらずまったく自覚症状がなかったり，検診で胸部X線異常陰影を指摘されてはじめて感染に気づくことも意外に多い。胸水中には多数の好酸球があり，診断のきっかけになる。初発症状が肺吸虫症を思わせない例でも，経過途中で胸水貯留が出現してくることがある⁵⁾。

虫体が肺実質内に侵入し虫嚢が形成されて成熟すると，咳嗽，喀痰，胸痛，呼吸困難などがあらわれ，胸部X線上，結節影，浸潤影などの陰影が出現する。しかし，やはり無症状だったり画像所見にくらべて症状が軽いものが多い。

6) 診 断

肺吸虫症に特有な症状はなく，家族内の誰かが診断されたとか，あるいは初めから川ガニやイノシシの生食が明らかになっているとき以外は，いきなり本症を疑ってかかるケースは少ない。

胸部の画像所見でも肺吸虫症に特徴的といえるものはなく，結節影，浸潤影，空洞形成，

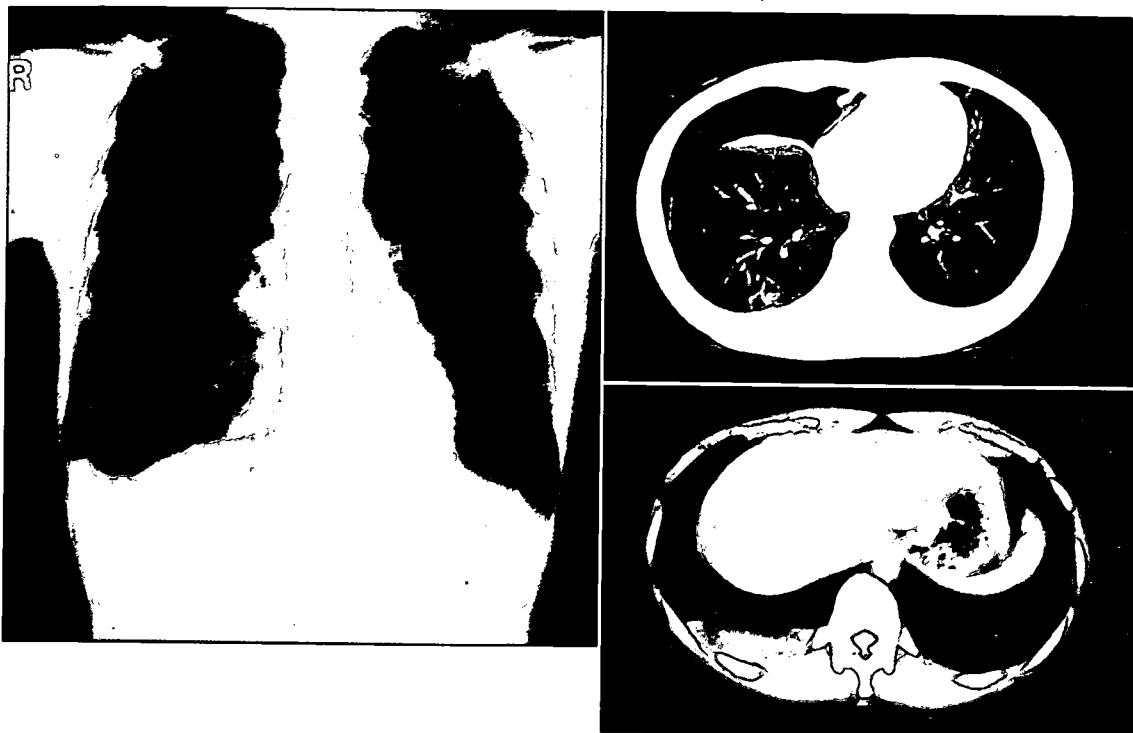


図 5 胸水貯留と気胸が同時にみられたウエステルマン肺吸虫症

この症例 (30 代, 女性) は発熱, 咳嗽, 胸痛で受診し, 血清学的にウエステルマン肺吸虫症と診断された。同居の夫と義理の父親はまったく自覚症状がなかったが, それぞれ胸水貯留と胸膜肥厚がみられ, やはり抗体検査によりウエステルマン肺吸虫症と診断された。イノシシ料理, シカの刺身を食べていた。(岐阜県白川病院症例)

胸水貯留など多彩である。ただ, 最近是比较的早期に診断がつくことが多いので, 頻度としては胸水貯留が多くなっているようである^{6)~8)}。胸部の症状に末梢血好酸球増多や IgE 上昇を伴っている場合, また胸水中に好酸球が多数認められた場合には肺吸虫症を疑って, モクズガニ, サワガニ, イノシシ肉の生食歴がないか, あるいは流行地への渡航歴がないかなどを確かめる必要がある。

寄生虫疾患における確定診断は, 虫体あるいは虫卵の直接証明がもっとも信頼できるが, 近年の症例は感染虫体数が少なく, しかも早期に発見されることが多いためか, 虫卵

の検出率は高くない。現在, 肺吸虫症の診断でもっとも力を発揮しているのは酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) を用いた血清診断である。肺吸虫症の場合, 抗体反応がきわめて強いので, 抗体検査で見逃すことはほとんどない。血清や胸水等の抗体検査は (株) エスアールエルやいくつかの大学の寄生虫学教室で可能である。寄生虫感染を疑ったら最寄りの寄生虫学関連の施設に問い合わせるのがよい。宮崎大学医学部寄生虫学でも寄生虫症に関する相談と血清診断に対応しているので, ホームページ等をご覧いただきたい。

7 治療と予防

肺吸虫症の治療はウエステルマン肺吸虫か宮崎肺吸虫かに関係なく、プラジカンテル(ピルトリシド) 75 mg/kg/日, 分3, 2~3日の内服が有効である。添付書には20 mg/kg/日, 分2, 投与とあるが, この量では肺吸虫症に対する治療としては不十分であり, 遷延する可能性がある。遷延して肺の器質変化が不可逆になり, 最終的に外科治療を余儀なくされた例もある⁹⁾。胸水貯留がある例では, 投薬前に胸水をできる限り除いておいた方がよい。服薬後, 最初に臨床症状, 画像所見が改善し, 徐々に抗体価が低下する。治療3カ月後を目途に治療効果の判定のため抗体価のチェックを行うのがよい。

肺吸虫症の予防は, カニやイノシシ肉を生で食べないことにつぎる。イノシシ肉は確実に凍結されていれば火を通さなくてもメタセルカリアは死滅するが, 野生動物であるだけになんらかのウイルスをもっている可能性があるので, 生食は避けた方が無難であるかも知れない。肺吸虫症は食品由来の疾患であるだけに, ときに家族内発症や小規模な集団感染を起こす。診断が確定したら, 同時に感染源になった食品を食べた人も受診し検査することを勧めるべきである。

おわりに

肺吸虫は, 生活環が完結するためには野生の哺乳類, 淡水産の巻貝や甲殻類を必要とすることから, 清流の保たれた豊かな自然があれば存在することができない。わが国で肺

吸虫症が発生しているということは, とりもなおさず, サワガニやモクズガニの棲める河川, イノシシ等の野生動物が住める森が残っているということを意味する。肺吸虫は人獣共通感染症とはいっても, 野生動物の食べ方にさえ注意すれば感染は防げる。肺吸虫のいる豊かな自然環境をこれからの世代に残してゆきたいものである。

文 献

- 1) 吉田幸雄, 有蘭直樹. 図説人体寄生虫学, 第7版 南山堂 2006 ; 161-7.
- 2) Okamoto, M. et al. A case of severe paragonimiasis miyazakii with lung and skin lesions showing massive egg production in sputum and faeces. Japanese Journal of Parasitology 1993 ; 42 : 429-33.
- 3) 病原微生物検出情報 IASR, 2004 ; 25 : 121-2.
- 4) Sasaki, M. et al. Active hepatic capsulitis caused by Paragonimus westermani infection. Internal Medicine 2002 ; 41 : 661-3.
- 5) 大井康徳ほか: 好酸球性髄膜炎で発症したウエステルマン肺吸虫症. Clinical Parasitology 1999 ; 10 : 124-6.
- 6) Mukae, H. et al. Clinicoradiologic features of pleuropulmonary Paragonimus westermani on Kyusyu Island, Japan. Chest 2001 ; 120 : 514-20.
- 7) Nawa, Y. Re-emergence of paragonimiasis. Internal Medicine 2000 ; 39 : 353-4.
- 8) Nakamura-Uchiyama, F. et al. Paragonimiasis : a Japanese perspective. Clinical Chest Medicine 2002 ; 23 : 409-20.
- 9) Tomita, M. et al. A case of chronic pleural empyema by Paragonimus westermani infection resistant to chemotherapy and cured by surgical decortication. Japanese Journal of Parasitology 1996 ; 45 : 242-6.

寄生虫疾患と好酸球・好塩基球

丸山治彦¹⁾

〔SUMMARY〕 蠕虫性疾患で末梢血中の好酸球が増多することはよく知られているが、好酸球が寄生虫を破壊するのにどれほど貢献しているのかは、特に臨床症例の場合ははっきりしていない。イヌ回虫症などでは、感染数が少なければ自然治癒することもあり、ある程度有効であろうと推測できる。対して肺吸虫症では、薬剤で治療しない限り治らない。好塩基球の寄生虫感染における役割は長く不明であったが、サイトカインの産生源としての重要性が認識されつつある。〔臨床検査 51:1047-1052, 2007〕

〔KEYWORDS〕 幼虫移行症, 自然免疫, 獲得免疫

はじめに

好酸球と好塩基球は、どちらもアレルギー性疾患の病態形成にかかわっていることは広く知られている。寄生虫疾患においては、好酸球が虫体の破壊に役立っているとされるのに対し、好塩基球の役割はあまりわかっていない。少なくとも寄生虫疾患の症例で末梢血中の好塩基球が増加することはない¹⁾。しかしながら、マウスを用いたモデル寄生虫感染の系では、好酸球はもちろんのこと、好塩基球と性質のよく似た顆粒球である肥満細胞の感染防御における役割はかなり理解されつつある。好塩基球については、近年、防御反応を起こすために必要なサイトカインの重要なソースであることが知られてきた。本稿では、人体寄生虫症例における好酸球と、マウスモデルで明らか

になった好酸球や好塩基球などの自然免疫系細胞の寄生虫感染防御における役割について述べたい。

人体寄生虫疾患と好酸球

「好酸球といえば寄生虫」というのは比較的よく知られているが、この場合の寄生虫とは、吸虫、条虫、線虫などの多細胞性の寄生虫(いわゆる蠕虫)のことであって、単細胞性のマラリア原虫やトキソプラズマ、赤痢アメーバやランブル鞭毛虫などの原虫類の感染では、好酸球の増加はみられず、感染防御における役割も知られていない。

それでは蠕虫感染ならばいつでも好酸球が増加するかという点、そういうわけでもなく、好酸球増多は虫が人体の体組織に侵入して寄生する場合に限られている。例えば、アユを生食して感染する寄生虫に横川吸虫というのがあるが、この虫は小腸粘膜の表面に吸着しているだけで、組織内へもぐっていかない。したがって、横川吸虫症では、かなり寄生数が多く下痢をするようになっても、好酸球増多は見られない。また、日本海裂頭条虫(広節裂頭条虫も同じ)は最も大きな人体寄生虫の1つであるが、これも組織侵入性はなく、末梢血の好酸球は増多しない。

一方、日本海裂頭条虫と比較的近縁の条虫である Manson 裂頭条虫に感染すると(Manson 孤虫症)、好酸球増多が多く例で見られる。この虫は人体内では腸管から外に出て、皮下組織を始め

1) MARUYAMA Haruhiko 宮崎大学医学部感染症学講座寄生虫学分野・教授

表1 わが国において好酸球増多がみられる主な寄生虫疾患

	寄生虫	主な感染源	好酸球増多	特徴的所見
線虫	広東住血線虫*	マイマイ・カタツムリ	+++	髄膜炎
	イヌ回虫・ブタ回虫*	トリのレバー	+++	肺・肝の結節影、ときに眼内迷入
	アニサキス*	サバ・イカ	-	胃炎・腸炎
	顎口虫*	淡水魚・カエル・ヘビ	+/-	皮膚爬行疹
	旋尾線虫タイプX*	ホタルイカ	+/-	皮膚爬行疹・腸閉塞
条虫	マンソン孤虫*	淡水魚・カエル・ヘビ	+	移動性皮下腫瘍
吸虫	肺吸虫	サワガニ・イノシシ	+++	胸水・気胸
	肝蛭	水辺の草・牛レバー	+++	肝異常陰影

* 幼虫移行症の原因となる寄生虫。

とする体内のいろいろなところを移動する性質があり、症状としては移動性の皮下腫瘍が最も多い。ひも状の虫体は肉眼で容易に見つけられるので、しばしば手術で摘出される。

好酸球増多には寄生虫体数も重要な因子である。イヌ回虫症(トキソカラ症)は高度の好酸球増多を示す疾患として知られており、典型的な症例の場合、肺や肝臓に多発性の好酸球主体の結節性病変を形成し、末梢血好酸球は白血球の20~50%かそれ以上を占める。ところが、眼内寄生で発症した場合(眼トキソカラ症)、寄生虫体数は眼内の1匹かごく少数にすぎないことが多く、好酸球増多はないのが普通である。経皮的に感染するイヌ鉤虫のような寄生虫の場合も、1回の感染数は少ないので、末梢血の好酸球増多はみられない。

幼虫移行症と好酸球

好酸球増多が起こるのは、蠕虫類が体組織に侵入するときに限られると述べたが、それでは、それはどのような種類の寄生虫によって引き起こされるのであろうか。実は寄生虫は、そのほとんどが腸管寄生虫であり、成虫は宿主の腸管に住んでいる。ところが、成虫は腸管にいても、幼虫の段階では腸管外寄生するものが圧倒的に多い。例えば回虫は、ヒトが成熟虫卵を飲み込むと腸内で孵化した幼虫がそのままそこで成熟するのではなく、小腸から肝臓、そして肺へと移動し、気道から消化管へ移って小腸へたどり着く。このような幼虫の行動は「体内移行」と呼ばれる。回虫類だけでなく、感染実験に用いられるネズミ類の腸管寄生線虫のベネズエラ糞線虫や *Nippostrongylus*

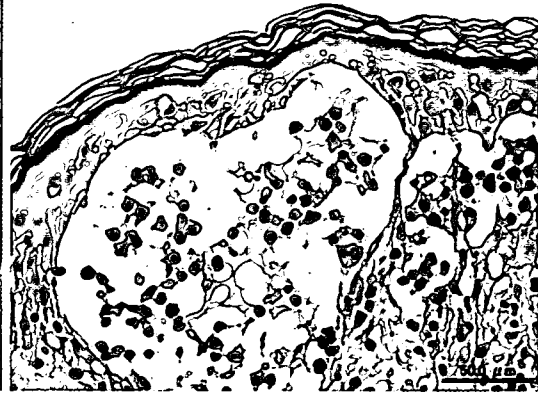
brasiliensis も同様に体内移行する。また、幼虫のときには中間宿主に寄生する条虫類のような虫では、中間宿主では例外なく腸管外寄生である。

つまり、好酸球増多が起きるのは幼虫に寄生されているときとっていいのであり、わが国の場合、そのほとんどは野生動物や家畜などの寄生虫が原因の、人獣共通寄生虫による「幼虫移行症」であるといってよい。幼虫移行症とは、人体内で成虫になれない蠕虫類の幼虫が体内のいろいろな組織を動き回って引き起こす一群の疾患のことをいう。かつてはイヌ回虫症とほぼ同義語であったが、現在では原因寄生虫には多くのものが含まれている。ヒトへの感染は食品を介して起こることが多く、淡水魚や獣、鳥類の生食での感染が多い(表1)。

幼虫移行症の症状は多彩で、寄生虫がどこに存在しているかが症状を決める。一般に寄生虫が実質臓器を移行するときは内臓幼虫移行症といい、皮下を移行して移動性の皮疹や皮下腫瘍を形成するときは皮膚幼虫移行症というが、互いに移行することもある。例えば旋尾線虫タイプXやドロレス顎口虫による幼虫移行症では、虫体は皮下を移動したり、消化管壁にもぐり込んで炎症性のイレウスを起こす。イヌ回虫症やブタ回虫症では肺や肝臓の異常陰影を伴った好酸球増多が典型的で、心筋炎や脊髄炎、眼症のかたちをとることもある²⁾。

好酸球による組織寄生虫の殺滅

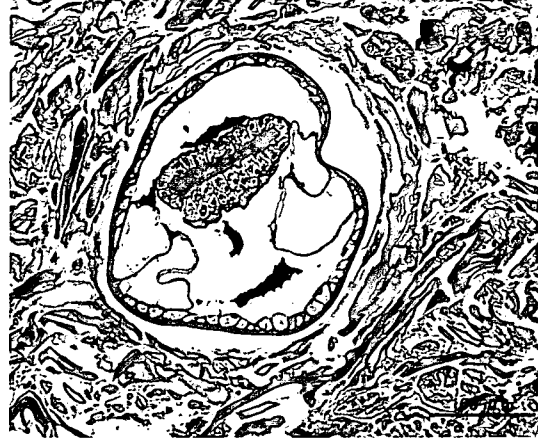
幼虫移行症の生検組織標本を見ると、虫体周囲あるいは虫体を通ったとおぼしき痕には好酸球が



a/b
c

図1 ドロレス顎口虫による皮膚幼虫移行症の皮疹(a)と生検組織像(b, c)

皮膚組織には好酸球の浸潤が認められる(画像は国立病院機構嬉野医療センター皮膚科の陳文雅先生のご厚意による)。



多数浸潤しており、好酸球は、組織内の寄生虫を殺滅しようと虫体周囲に集まっていると考えられる(図1)。それでは好酸球は、効率よく虫体を殺滅できているのであろうか。

マウスを用いたモデル感染系では、好酸球が組織中の虫体を破壊するかどうかは、寄生虫と宿主の組み合わせによって決まることがわかっている。マウスに、広東住血線虫(ラットの寄生虫、マウス内では成熟できない)を感染させると幼虫は体内移行をするが、虫体周囲に激しい好酸球性炎症が起きて幼虫は死滅する。つまり、広東住血線虫にとってマウスは「不適合宿主」である。一方、マウス内で成熟できる寄生虫(*N. brasiliensis* やベネズエラ糞線虫など)の感染では、組織移行する幼虫の周囲には好酸球が浸潤するが、多くの幼虫は殺されることなく最終的な寄生部位である小腸に到達して成熟する。これらの寄生虫は、マウスの好酸球をあまり強くは刺激しないのである。実際、好酸球活性化因子であるインターロイキン(interleukin: IL)-5を強制発現させたIL-5

トランスジェニックマウスでは、高度に活性化された好酸球によって、*N. brasiliensis* やベネズエラ糞線虫でも、ほとんどの虫体は幼虫段階で破壊されてしまう。

面白いのはイヌ回虫の場合で、この寄生虫はIL-5によって活性化された好酸球によっても、正常マウスの好酸球以上に破壊されることはない。イヌ回虫は回虫の仲間、仔犬の中では成熟して成虫になるが、ネズミやトリなどの動物が虫卵を飲み込むと体内移行の途中で発育が止まり、筋肉や中枢神経内に長期にわたって寄生を続ける(図2)。そしてこのような感染動物をメス犬が食べると、メス犬の中でも幼虫は生存し続け、妊娠時に胎仔に移行してやっと小腸に達し成熟できる。つまりイヌ回虫の幼虫にとってマウス内に長期間いることは種の保存上有利なので、たとえ好酸球が活性化されても、それに耐えるようになっていると考えられる³⁾。

人体症例でどのようなことが起こっているのかは、マウスのモデル感染ほどははっきりしていな

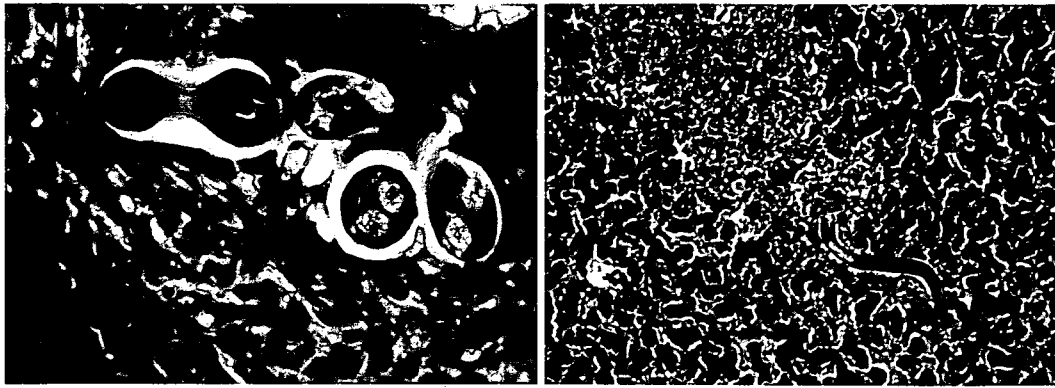


図2 トリの肝臓に認められたイヌ回虫の幼虫
 このようなトリレバーを生食して、イヌ回虫に感染し、内臓幼虫移行症を発症する。

い。しかしながら、例えばトキソカラ症では、感染数が少なければ好酸球は幼虫を殺滅でき、感染数が多いと幼虫は生き続けてなかなか感染は終息しない、ということと言えるようである。定期健康診断や食欲不振などをきっかけに受診し、末梢の好酸球増多と抗トキソカラ抗体陽性で診断されるようなトキソカラ症がある。その場合、好酸球と抗体だけが有意の所見で、肺や肝臓は画像上まったく正常なものでは、抗寄生虫薬を用いた治療をしなくても好酸球数が正常化していくことがある。これに対し、肺や肝臓に多発性の結節影があったり呼吸器症状があるものは、抗寄生虫薬を服薬しない限り、症状は収まらず好酸球数も低下しない。一般に症状の激しい症例ではトリやウシのレバ刺しなどを好んで食べていることが多く、感染数が多いものと考えられる。肺吸虫症や肝蛭症では高度の好酸球増多が起こり、虫体周囲には多数の好酸球が浸潤しているが、ブラジカンテルなどの薬剤で治療しない限り感染は終息しない。肺吸虫や肝蛭は、好酸球によって容易には破壊されないようである。実際、マウスの活性化好酸球も、肝蛭を殺滅することはできない³⁾。

肥満細胞と腸管寄生虫の排除

肥満細胞は好塩基性の顆粒を持った細胞で、細胞表面にIgE レセプターを持っており、好塩基球が組織内に入ったものと考えられていることが多い。だが実際は、好塩基球とは細胞の分化は別系統であり、共通する部分はいくつかの別物と考

えた方がよい⁴⁾。しかしながら、マウスのモデル感染の系で、寄生虫感染後に小腸粘膜に現れる肥満細胞が寄生虫を排除する仕組みはよく研究されているので、ここで簡単に紹介したい。

マウスやラットなどの実験動物では肥満細胞は大きく2つのグループに分けられ、1つは結合織肥満細胞、もう1つは粘膜肥満細胞という。結合織肥満細胞は感染の有無とは関係なく全身に存在するが、粘膜肥満細胞は寄生虫感染などのときだけ、T細胞依存性に骨髄の前駆細胞から分化して粘膜に出現する。顆粒内容物にも差があり、結合織肥満細胞はヘパリンやヒスタミンを、粘膜肥満細胞はヘパリンではなくコンドロイチン硫酸を持つ。ヒトでは粘膜肥満細胞と結合織肥満細胞の区別ははっきりしていない。

ベネズエラ糞線虫という腸管寄生線虫は、宿主であるマウスやラットの腸管粘膜に寄生していて、粘膜からの脱出と再侵入を繰り返している(図3)。イメージ的には、絨毛から絨毛を縫うように渡り歩いていると考えればわかりやすい。マウスでの感染の場合、感染10日後くらいに粘膜に粘膜肥満細胞が増加してくると成虫は排除されてしまうが、排除に際して虫体はダメージを受けおらず、正常マウスの腸管に移入すると、粘膜に侵入して寄生することができる。なぜ寄生能力は十分なのに排除されるかという点、正常粘膜であれば、この虫は口から分泌した粘着性のある接着物質で上皮表面に結合して、それから侵入するのだが、粘膜肥満細胞が上皮層に存在すると、肥満細胞顆粒から放出されたコンドロイチン硫酸が



図3 感染ラットの腸管粘膜で脱出と再侵入を繰り返しているベネズエラ糞線虫の成虫
粘膜肥満細胞増多が起きると再侵入に失敗して虫体は排除される。

接着物質と上皮細胞の結合を阻害して虫は上皮細胞に接着できなくなり、引き続いて起こるはずの上皮へのもぐり込みもできなくなってしまうのである⁵⁾。ベネズエラ糞線虫の成虫は、腸管粘膜を休みなく前進し続けていて、上皮からの脱出と再侵入を繰り返しているため、粘膜肥満細胞が出現すると、絨毛上皮に再侵入しようとしたときに上皮へ接着できずに滑ってしまい、虫体は粘膜に侵入できず排除されていく。これは、病原体を殺さずに滑らせて体内から排出するという、極めてエレガントな防御機構といえるだろう。

Th2 免疫応答における好酸球と好塩基球

寄生虫感染における病理像の特徴はアレルギーと似通っており、いわゆる Th2 優位の炎症である。マウスの Th2 応答では、抗原によって刺激された T 細胞は、IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 などのサイトカインを分泌する。これらのサイトカインには、好酸球や肥満細胞、B 細胞に作用し、それぞれの分化、増殖、活性化を引き起こす活性があるので、寄生虫感染マウスでは、好酸球増多、粘膜肥満細胞増多、高 IgE 血症がみられる。人体寄生虫症例でも、好酸球増多と高 IgE 血症はセットで現れることが多い。

従来は、寄生虫感染時に増えてくる好酸球や肥満細胞などの自然免疫系の細胞は、あくまでも寄生虫を排除するためのエフェクターであって、免疫応答自体の方向付けや調節、エフェクター細胞

の誘導と活性化は、Th2 細胞の役目であると考えられてきた。ところが近年になり、Th2 型免疫応答のエフェクター作用にとって重要な IL-4 や IL-5, IL-13 などのサイトカインは Th2 細胞だけで作られるのではなく、むしろそれ以上に自然免疫系に属する好酸球や好塩基球、あるいは系統不明の骨髄由来細胞が産生源として重要であることがわかってきた⁶⁾。IgE の産生は Th2 細胞由来の IL-4/IL-13 に全面的に依存するが、それ以外のエフェクター機能は、自然免疫系の細胞(好酸球や好塩基球など)が産生するサイトカインに依存しているのである。

マウスにおける *N. brasiliensis* 感染の系で、Th2 細胞の分化にとって重要な感染初期の IL-4 のソースは何かということが、長い間議論的であった。NKT 細胞、あるいは好酸球ということが言われていたが、最近、感染後早い段階で、T 細胞でも B 細胞でもなく、分化マーカーを持たない c-kit 陽性の細胞が所属リンパ節に現れ、IL-4, IL-5, IL-13 の Th2 サイトカインを産生していることがわかった⁷⁾。この細胞群の出現は IL-25 に依存しており、IL-25 欠損マウスでは寄生虫の排除が有意に遅れる。そして、これらの細胞のサイトカイン産生能は、それだけでも十分に寄生虫を排除できるほどである。通常、c-kit 陽性細胞といえば血液幹細胞、肥満細胞、Cajal の間細胞であるが、寄生虫感染後に出現するこの細胞群の本体はまだ不明である。

また、感染中期になってくると好塩基球が肺や肝臓などに現れ、そのほとんどが IL-4 を産生し

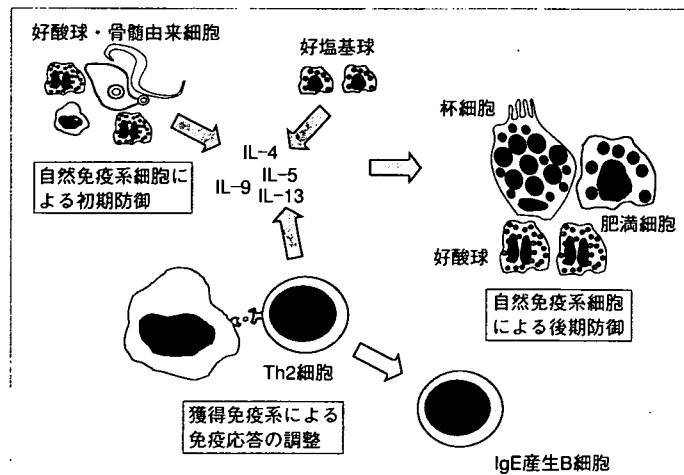


図4 寄生虫に対する免疫応答における好酸球と抗塩基球
好酸球や抗塩基球といった自然免疫系細胞は、単なるエフェクターではなく、T細胞と同程度に免疫応答を調節し、自然免疫系細胞の活性化を行っている。ただし、B細胞のIgEへのクラススイッチはT細胞が独占的に行っている。

ていることが知られるようになった⁸⁾。好塩基球由来のIL-4は、Th2応答を増強すると考えられる。以上のように、獲得免疫系のT細胞がサイトカインを産生し、そのサイトカインによって活性化された自然免疫系の細胞が寄生虫を排除するという単純な図式が通用しなくなってきた(図4)。ヒトのフィラリア症でも、IL-4の主な産生細胞はT細胞ではなく好塩基球であるという報告がある⁹⁾。今後、自然免疫系と獲得免疫系のかかり合いについて、大幅に見直す必要があるであろう。

おわりに

寄生虫疾患における好酸球、好塩基球の役割は、実験動物では知見が蓄積されているが、あくまでモデル感染系の話であり、現実の感染症でどうなっているのかは実はよくわかっていない。国内では蠕虫性疾患は決して多くないが、動物由来の回虫による幼虫移行症、あるいは肺吸虫症は比較的多いので、これらの疾患の臨床研究を通して、好酸球や好塩基球という謎に満ちた白血球の生物学的意義が明らかになっていくであろう。

文献

1) Mitre E, Nutman TB : Lack of basophilia in human

parasitic infections. Am J Trop Med Hyg 69 : 87-91, 2003

2) Osoegawa M, Matsumoto S, Ochi H, et al : Localised myelitis caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum* masquerading as an isolated spinal cord tumour. J Neurol Neurosurg Psychiatry 70 : 265-266, 2001

3) Ovington KS, Behm CA : The enigmatic eosinophil : investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 92 (Suppl 2) : 93-104, 1997

4) Warner JA, Kroegel C : Pulmonary immune cells in health and disease : mast cells and basophils. Eur Respir J 7 : 1326-1341, 1994

5) Maruyama H, Yabu Y, Yoshida, A, et al : A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. J Immunol 164 : 3749-3754, 2000

6) Voehringer D, Reese TA, Huang X, et al : Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. J Exp Med 203 : 1435-1446, 2006

7) Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, et al : Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. J Exp Med 203 : 1105-1116, 2006

8) Min B, Prout M, Hu-Li J, et al : Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. J Exp Med 200 : 507-517, 2004

9) Mitre E, Taylor RT, Kubofcik J, et al : Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections. J Immunol 172 : 2439-2445, 2004

Amount of cholesterol in host membrane affects erythrocyte invasion and replication by *Babesia bovis*

K. OKUBO, N. YOKOYAMA*, N. TAKABATAKE, M. OKAMURA† and I. IGARASHI

National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

(Received 23 July 2006; revised 6 October 2006; accepted 10 October 2006; first published online 6 December 2006)

SUMMARY

Cholesterol is a major component of the erythrocyte membrane. In the present study, we investigated the effects of cholesterol reduction in host bovine erythrocytes (RBC) on the growth of *Babesia bovis*, a major bovine haemoprotozoan. An *in vitro* growth assay with bovine RBC that had been prepared by pre-treatment with a cholesterol depletion agent (methyl- β -cyclodextrin, MCD) showed that the culture with 5 mM MCD-treated RBC inhibited the growth of *B. bovis* significantly as compared with that with the control RBC. In further experiments, the treatment with 5 mM MCD was proved to suppress both activities of the parasite, erythrocyte invasion and replication within the infected RBC. In contrast, a slight reduction in the membrane cholesterol by 1 mM MCD treatment promoted both their growth and erythrocyte invasion activity. These results indicate that erythrocyte invasion and replication by *B. bovis* are affected by the amount of cholesterol in the host erythrocyte membrane.

Key words: *Babesia bovis*, cholesterol, erythrocytes.

INTRODUCTION

Babesia bovis, a tick-transmitted haemoprotozoan, grows asexually within bovine erythrocytes (RBC) and causes a severe disease characterized by fever, anaemia, haematuria, and hypotensive shock syndrome, with occasional death in the infected cattle (Kuttler, 1988; Homer *et al.* 2000). The disease, called bovine babesiosis, often results in great economic loss in the livestock industry worldwide (Brown and Palmer, 1999). For the successful development of novel control measures against babesiosis, the biological mechanism whereby *B. bovis* infects the host RBC and asexually replicates within the infected RBC should be clearly elucidated (Yokoyama *et al.* 2005, 2006).

Cholesterol is a major component of the erythrocyte membrane and occupies more than 30% of the total weight of erythrocyte membrane lipids (Yawata, 2003). It plays important roles in the homeostatic stabilities of membrane fluidity and permeability (Yawata, 2003) as well as in raft formation (Simons and Ikonen, 1997). The membrane cholesterol can be removed by treatment with methyl- β -cyclodextrin (MCD), a cholesterol-depleting agent (Christian *et al.* 1997; Niu and Litman, 2002);

however, MCD never binds to or permeates the treated RBC (Ohtani *et al.* 1989). In *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*, cholesterol reduction in the host cell membrane is known to inhibit their growth in host cells (Coppens *et al.* 2000; Samuel *et al.* 2001). For both parasites, host cholesterol is considered to be a crucial component for the formation of their parasitophorous vacuole membrane within the infected cells (Lauer *et al.* 2000; Coppens and Joiner, 2003). However, the biological association of the cholesterol reduction with the asexual growth of *Babesia* parasites had not been studied yet. In the present study, we describe the effect of cholesterol reduction in host bovine RBC on the *in vitro* growth of *B. bovis*.

MATERIALS AND METHODS

In vitro cultivation of *B. bovis*

The Texas strain of *B. bovis* was cultured in purified bovine RBC with a serum-free GIT medium (Wako Pure Chemical Industrial, Ltd, Osaka, Japan) as described previously (Bork *et al.* 2005).

Cholesterol reduction in the bovine erythrocyte membrane

To reduce the amount of cholesterol in the erythrocyte membrane, bovine RBC were treated with MCD (Sigma, St Louis, MO, USA) as described below. An MCD stock solution of 5 mM was first

* Corresponding author: Tel: +81 155 49 5649. Fax: +81 155 49 5643. E-mail: yokoyama@obihiro.ac.jp

† Present address: Laboratory of Zoonoses, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Towada, Aomori 034-8628, Japan.

Table 1. Cholesterol concentrations of MCD-treated RBC

	Concentration of cholesterol (mean \pm s.d.) (mg/1 $\times 10^9$ cells)	Percentage (%)†
PBS-treated RBC	3.75 \pm 0.091	100
1 mM MCD-treated RBC	3.72 \pm 0.062	99
3 mM MCD-treated RBC	3.41 \pm 0.067*	91
5 mM MCD-treated RBC	3.05 \pm 0.118**	81
5 mM MCD + Cholesterol	3.79 \pm 0.034	100.9

† The percentage of each concentration to the concentration of PBS-treated RBC.

* $P=0.007$, ** $P=0.001$ (versus control concentration).

prepared by dissolving 66 mg of MCD in 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS) or a GIT medium and then sterilized by filtrating with a 0.25 μ m filter (Toyo Roshi, Tochigi, Japan). Working media containing the indicated concentrations of MCD were prepared by diluting the stock solution with the PBS or GIT medium. For the reduction of membrane cholesterol, 2×10^9 bovine RBC were washed with PBS and incubated in 1 ml of PBS containing the indicated concentrations of MCD for 30 min at 37 °C. The treated RBC were washed with PBS again and subjected to an *in vitro* growth assay or invasion test as described below. On the other hand, the working MCD suspended in the GIT medium was used for an *in vitro* replication test.

Water-soluble cholesterol (free cholesterol) (Sigma) was used to prepare the cholesterol-complex form of MCD, which is inactive for the reduction of membrane cholesterol in contrast to that of the non-conjugated form of MCD (Christian *et al.* 1997). Briefly, 1, 3, and 5 mM MCD were pre-mixed with 37, 112, and 187 μ g/ml of the free cholesterol, respectively, and then used for the treatment of bovine RBC. In our preliminary experiment, pre-treatment of host RBC with the indicated concentrations of the prepared MCD-cholesterol complex showed no effect on the original amount of membrane cholesterol (data not shown, Table 1). These complex-treated RBC were also used as a control, together with a PBS-treatment control, for the *in vitro* growth assay.

The cholesterol concentration of the MCD-, MCD-cholesterol complex-, or PBS-treated RBC was tested on the hypotonically lysed RBC. Briefly, 1×10^9 cells of the treated RBC were lysed with a 5 mM phosphate buffer, pH 7.4, and washed with the buffer until the haemoglobin pigment disappeared (Okamura *et al.* 2005). Finally, the cholesterol concentrations of the erythrocyte ghosts were measured by using a Cholesterol E-test kit (Wako Pure Chemical Industrial, Ltd) according to the manufacturer's protocol.

In vitro growth assay with MCD-treated RBC

The *in vitro* growth assay with MCD-treated RBC was conducted according to a previously described

method (Okamura *et al.* 2005) with some modifications. Briefly, *B. bovis*-infected RBC were diluted with MCD-, MCD-cholesterol complex-, or PBS-treated RBC to obtain 1% parasitaemia in a mixture containing 80% of treated RBC and 20% of normal cells. The 50 μ l erythrocyte mixture was subsequently suspended in 450 μ l of the GIT medium and incubated in a 48-well tissue-culture plate (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) in a humidified multi-gas water-jacket incubator at 37 °C. At 24 h post-initiation of the culture, each parasitaemia was determined and translated to percentage growth relative to the control parasitaemia of the culture with PBS-treated RBC. The assay was carried out in triplicate for each concentration of MCD in 3 separate experiments.

In vitro invasion and replication tests using high-voltage pulsing

The effect of reducing the amount of cholesterol in MCD-treated RBC was evaluated on erythrocyte invasion by *B. bovis* in an *in vitro* invasion test using high-voltage pulsing as described previously (Franssen *et al.* 2003; Okubo *et al.* 2006) with some modifications. Briefly, after *B. bovis*-infected RBC were suspended in equal volumes of a GIT medium, the mixture of 400 μ l was subjected to 5 intermittent (10 sec, 0 °C) high-voltage pulses (1.5 kV, 400 Ω , 25 μ F) in the Bio-Rad Gene Pulser II (Hercules, CA, USA) with a 0.2 cm pulser cuvette (Bio-Rad). After washing with the GIT medium, the pellet was re-suspended with 300 μ l of the GIT medium and transferred into a 96-well tissue-culture plate (Nunc A/S) with the MCD- or PBS-treated RBC at a 10% packed cell volume. After incubation at 37 °C for 30 min, the number of infected RBC was counted out of a total of 5000 RBC in Giemsa-stained smears. The invasion activity was calculated as the relative percentage of the number of infected RBC in the culture with MCD-treated RBC to that in the culture with the PBS control. On the other hand, the effect of reducing the amount of membrane cholesterol in infected RBC was also evaluated on the replication of intraerythrocytic *B. bovis* using the high-voltage pulsing method. After the high-voltage pulsing, the

purified parasites were suspended onto normal RBC and incubated at 37 °C as described above. At 1 h post-initiation of the culture, the infected RBC were washed with the GIT medium and incubated in the presence of the indicated concentrations of MCD in the GIT medium at 37 °C for 5 h. After incubation, Giemsa-stained smears were prepared, and the replication activity was calculated as the ratio of the number of divided parasite-containing RBC to the entire population of infected RBC, among which more than 500 cells of the infected RBC were monitored. These assays were carried out in triplicate for each concentration of MCD in 3 separate experiments.

Statistical analysis

Differences in all percentages were statistically analysed using an independent Student's *t*-test at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ as the values representing a significant difference.

RESULTS

Effect of cholesterol reduction on the *in vitro* growth of *B. bovis*

First, the reductions in the cholesterol concentrations were evaluated in the membranes of 1, 3, and 5 mM MCD-treated RBC. As shown in Table 1, the membrane fractions of 1, 3, and 5 mM MCD-treated RBC (1×10^9 cells) had cholesterol contents of 3.72, 3.41, and 3.05 mg, respectively, indicating that approximately 1, 9, and 19% of the normal membrane cholesterol (3.75 mg/ 1×10^9 cells) were depleted by treatment with 1, 3, and 5 mM MCD, respectively. On the other hand, treatment with 5 mM MCD-cholesterol complex showed almost the same concentration of membrane cholesterol as that of the PBS-treatment control (Table 1). Additionally, treatment with 1 and 3 mM MCD-cholesterol complex did not change the original concentration (data not shown) that was shown in the PBS control. Because the treatment with 10 mM MCD resulted in haemolysis of the treated RBC during incubation (data not shown), the 1, 3, and 5 mM MCD-treated RBC were selected for the subsequent experiments.

Next, the effects of a cholesterol reduction were studied on the *in vitro* growth of *B. bovis* with the MCD-pre-treated RBC (Fig. 1). The inhibitory effect on their growth was significant in the culture with 5 mM MCD-treated RBC (Parasitaemia (Pa) = 2.81%) compared with the control PBS-treated RBC (Pa = 3.81%) ($P < 0.05$), while the culture with 1 mM MCD-treated RBC significantly promoted the parasite's growth (Pa = 4.57%) ($P < 0.05$) (Fig. 1). On the other hand, pre-treatment of the cultured RBC with 1, 3, and 5 mM MCD-cholesterol complex did not show any significant difference on the growth of parasites as compared to that of the PBS control

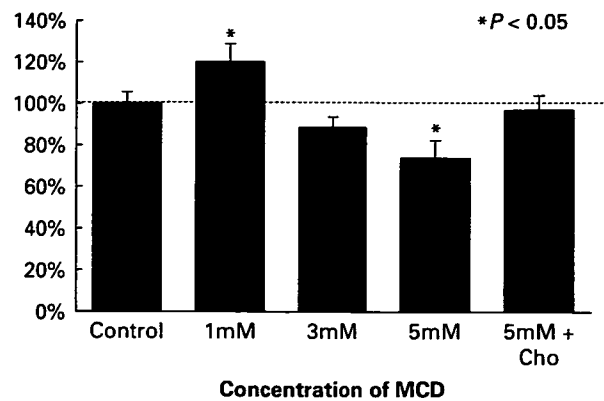


Fig. 1. Effect of MCD-treated RBC on the *in vitro* growth of *Babesia bovis*. Relative values are expressed as the percentage of parasitaemia in the culture with MCD pre-treated RBC compared to that in the control culture with PBS-treated RBC in an *in vitro* growth assay. Each value represents the mean \pm standard deviation (S.D.) in 3 separate trials. The asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between the MCD-treated and control cultures. Cho: cholesterol.

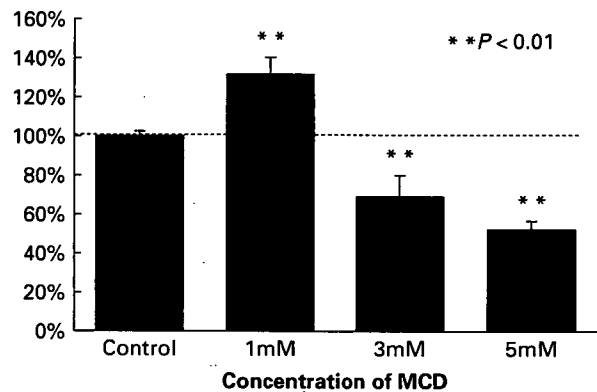


Fig. 2. Effect of MCD-treated RBC on erythrocyte invasion by *Babesia bovis*. Relative values are expressed as the percentage of parasitaemia in the culture with MCD pre-treated RBC compared to that in the control culture with PBS-treated RBC in an *in vitro* invasion test. Each value represents the mean \pm S.D. in 3 separate trials. The double asterisks indicate significant differences ($P < 0.01$) between the MCD-treated and control cultures.

(5 mM treatment, Fig. 1; 1 and 3 mM treatments, data not shown). These findings indicated that the growth of the parasite was positively influenced by the amount of host membrane cholesterol, but not by other unknown effects of MCD. During the cultivations, the applied RBC did not rupture even in the culture with 5 mM MCD-treated RBC (data not shown).

Effects of a cholesterol reduction on the invasion and replication activities by *B. bovis*

In order to study the effects of cholesterol reduction on the growth of *B. bovis* in more detail, we carried

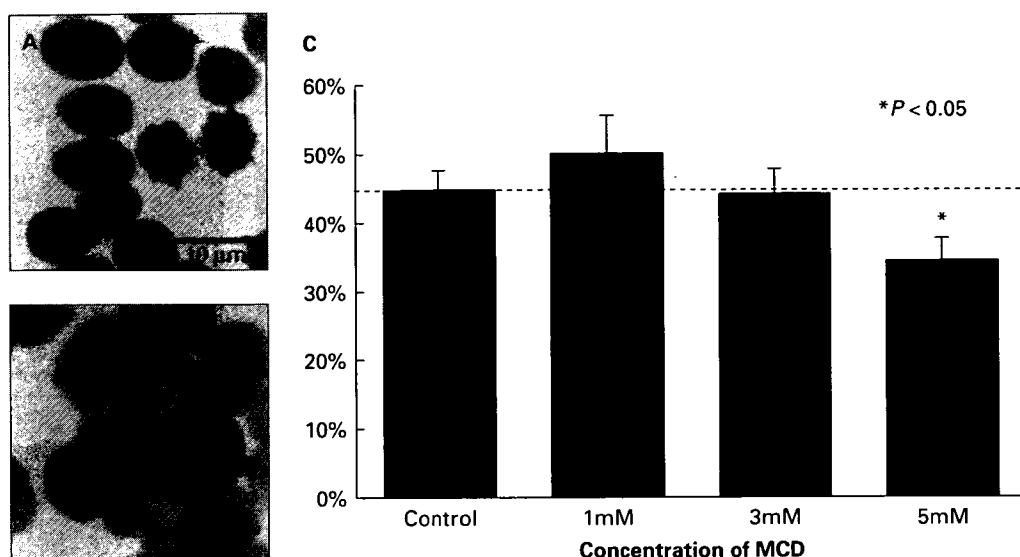


Fig. 3. (A) Intraerythrocytic *Babesia bovis* after the incubation of purified parasites with normal RBC at 1 h. (B) *B. bovis* parasites after further 6 h incubation. The arrowheads and arrow indicate the ring-formed and divided parasites within the infected RBC, respectively. (C) Effect of MCD treatment on *B. bovis* replication. Relative values are expressed as the rates of divided parasite-containing RBC to all infected RBC. Each value represents the mean \pm s.d. in 3 separate trials. The asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between the MCD-treated and control RBC.

out *in vitro* invasion and replication tests. In the *in vitro* invasion test, the invasion activity of the parasite was significantly inhibited in the 3 and 5 mM MCD-treated RBC ($P_a = 1.24$ and 0.94% , respectively) ($P < 0.01$) compared with that in the control PBS-treated RBC ($P_a = 1.79\%$) (Fig. 2). In contrast, the 1 mM MCD-treated RBC enhanced the activity of *B. bovis* invasion ($P_a = 2.35\%$) (Fig. 2) in a manner similar to that observed in the *in vitro* growth assay (Fig. 1).

To examine the effects of cholesterol reduction on the intraerythrocytic replication by *B. bovis*, an *in vitro* replication test was carried out. When the purified parasites were incubated in normal RBC for 1 h, all parasites within the infected RBC were observed as a ring forming on the stained smears (Fig. 3A). At 1 h post-initiation of the culture, the GIT medium was replaced with an MCD-containing medium, and the cultures were further incubated for 5 h. After incubation, the rates of divided parasite-containing RBC (Fig. 3B) to all infected RBC were determined as shown in Fig. 3C. Supplementation with 5 mM MCD had a significant inhibitory effect on the parasite's replication ($P < 0.05$) compared with the control rate in the normal GIT medium. On the other hand, the media with 1 and 3 mM MCD did not show any significant effect, although the replication activity slightly increased in the 1 mM MCD-supplemented culture.

DISCUSSION

In the present study, the effects of cholesterol reduction in the host erythrocyte membrane were demonstrated on the *in vitro* growth of *B. bovis* using

MCD-treated bovine RBC. In addition to its biochemical role as a cholesterol scavenger, MCD is also known as a cholesterol donor by forming a complex with cholesterol (Christian *et al.* 1997). We therefore determined in the preliminary study, the optimal mixture rate of MCD and free cholesterol to prepare the complete MCD-cholesterol complex that does not influence the original amount of normal membrane cholesterol. The treatment with 5 mM MCD removed approximately 19% of the membrane cholesterol, but the 5 mM MCD-cholesterol complex did not change the membrane cholesterol content, indicating that the non-conjugated MCD functioned as a cholesterol scavenger, while the MCD-cholesterol complex prepared in the present study functioned as neither cholesterol scavenger nor donor on the equilibrium balance. Importantly, cholesterol reduction significantly led to growth inhibition of *B. bovis*. In general, cholesterol is in a dynamic equilibrium between the RBC and the culture medium (Yawata, 2003); however, since the GIT medium contains low concentrations of cholesterol (0.019 ± 0.001 mg/ml), incidental influence of the medium cholesterol may be excluded in the present study. The cholesterol reduction in the host erythrocyte membrane must therefore directly influence the growth effect.

More detailed investigations of *in vitro* invasion and replication tests revealed that the growth inhibitory effect was mainly due to the direct inhibition of the parasite's erythrocyte invasion activity. Compared with the results of the *in vitro* growth assay, the *in vitro* invasion test showed greater effects of MCD on the inhibition of parasites, especially with regard to the 3 mM MCD treatment. This difference would result from the experimental

procedures i.e. in the invasion test, all RBC had been treated with MCD and used to evaluate the direct effect on the parasite invasion; in the growth assay, however, 80% of all RBC had been pre-treated with MCD, while the other 20% remained as untreated RBC in the culture with *B. bovis*. Since the *B. bovis* parasite preferably invades intact RBC, the MCD effect was weaker in the growth assay than it was in the invasion test. Because a reduction in membrane cholesterol increases the fluidity of the erythrocyte membrane (Yawata, 2003), it could be assumed that the RBC were more pliable. As a result, *B. bovis* might not be able to invade these pliable RBC efficiently. In addition, the *in vitro* replication test revealed that the 5 mM MCD treatment of the infected RBC also influenced the intraerythrocytic replication of *B. bovis*. Because the reduction in membrane cholesterol causes an increase in the permeability to H₂O and other hydrophilic micromolecules (Deuticke and Ruska, 1976), the change in an intraerythrocytic environment might influence the replication of *B. bovis*. In *P. falciparum* and *T. gondii*, the cholesterol of the host cell membrane is known to be a crucial component of their parasitophorous vacuole membrane (Coppens and Joiner, 2003; Lauer *et al.* 2000). In *Babesia* parasites, however, the parasitophorous vacuole exists only when parasites invade the RBC but then disappears relative to their growth (Igarashi *et al.* 1988). Further study is required to understand the exact role of membrane cholesterol in the invasion and replication phases by *Babesia* parasites.

Interestingly, 1 mM MCD-treated RBC promoted both the invasion activity and growth of *B. bovis*. In the replication test, 1 mM MCD also had a positive effect on parasite replication although the difference from the control was not significant. One possible explanation for this discrepancy is that there is an ideal amount of membrane cholesterol, especially for *B. bovis* invasion to host RBC. Reduction of host membrane cholesterol is known to cause an improvement of erythrocyte deformability (Shiga *et al.* 1990). Possibly, intact RBC without MCD treatment are too resistant from the viewpoint of erythrocyte deformability for efficient invasion by *B. bovis*. However, after treatment of the RBC with 1 mM MCD, the RBC achieved adequate hardness, which possibly made them suitable for invasion by the parasites. On the other hand, 3 or 5 mM MCD treatment is considered to make the RBC too pliable for efficient invasion. Efficient invasion of *B. bovis* would have a positive effect on the parasite's growth.

In conclusion, erythrocyte invasion and replication by *B. bovis* are influenced by the amount of cholesterol in the host erythrocyte membrane. These findings provide useful information to further understand the biological mechanism of the asexual growth of *Babesia* parasites.

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science, the Industrial Technology Research Grant Program from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) of Japan, Grants from Promotion of Basic Research Activities for Innovative Biosciences (PROBRAIN), and The 21st Century COE Program (A-1), Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

REFERENCES

- Bork, S., Okamura, M., Matsuo, T., Kumar, S., Yokoyama, N. and Igarashi, I. (2005). Host serum modifies the drug susceptibility of *Babesia bovis* *in vitro*. *Parasitology* **130**, 489–492.
- Brown, W. C. and Palmer, G. H. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology Today* **15**, 275–281.
- Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research* **38**, 2264–2272.
- Coppens, I. and Joiner, K. A. (2003). Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 3804–3820.
- Coppens, I., Sinai, A. P. and Joiner, K. A. (2000). *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *The Journal of Cell Biology* **149**, 167–180.
- Deuticke, B. and Ruska, C. (1976). Changes of nonelectrolyte permeability in cholesterol-loaded erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **433**, 638–653.
- Franssen, F. F., Gaffar, F. R., Yatsuda, A. P. and De Vries, E. (2003). Characterization of erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites efficiently released from their host cell after high-voltage pulsing. *Microbes and Infection* **5**, 365–372.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., 3rd, Krause, P. J. and Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Review* **13**, 451–469.
- Igarashi, I., Aikawa, M. and Kreier, J. P. (1988). Host cell-parasite interactions in babesiosis. In *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (ed. Ristic, M.), pp. 53–70. CRC Press, Florida.
- Kuttler, K. L. (1988). Worldwide impact of babesiosis. In *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (ed. Ristic, M.), pp. 1–22. CRC Press, Florida.
- Lauer, S., Vanwye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B. U., Hiller, N. L., Mohandas, N. and Haldar, K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *The EMBO Journal* **19**, 3556–3564.
- Niu, S. L. and Litman, B. J. (2002). Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: Effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition. *Biophysical Journal* **83**, 3408–3415.
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. and Pitha, J. (1989). Differential effects of alpha-, beta-, and

- gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* **186**, 17–22.
- Okamura, M., Yokoyama, N., Wickramathilaka, N. P., Takabatake, N., Ikehara, Y. and Igarashi, I.** (2005). *Babesia caballi* and *Babesia equi*: Implications of host sialic acids in erythrocyte infection. *Experimental Parasitology* **110**, 406–411.
- Okubo, K., Wilawan, P., Bork, S., Okamura, M., Yokoyama, N. and Igarashi, I.** (2006). Calcium-ion is involved in erythrocyte invasion by equine *Babesia* parasites. *Parasitology* **133**, 289–294.
- Samuel, B. U., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M. and Haldar, K.** (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 29319–29329. DOI: 10.1074/jbc.M1101268200
- Shiga, T., Maeda, N. and Kon, K.** (1990). Erythrocyte rheology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **10**, 9–48.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature, London* **387**, 569–572.
- Yawata, Y.** (2003). *Cell Membrane*, Wiley-Vch Verlag, Weinheim Germany.
- Yokoyama, N., Kumar, S., Bork, S., Okamura, M. and Igarashi, I.** (2005). Molecular approaches for the development of babesial vaccines. In *Asian Parasitology, Toxoplasmosis and Babesiosis in Asia* (ed. Yano, A., Nam, H- W., Anuar, K. A. and Shen, J.), pp. 214–223. AAA Committee, The Federation of Asian Parasitologists, Chiba, Japan.
- Yokoyama, N., Okamura, M. and Igarashi, I.** (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology* **138**, 22–32.

Research brief

Babesia bovis: Effects of cysteine protease inhibitors on *in vitro* growth

Kazuhiro Okubo, Naoaki Yokoyama*, Yadav Govind¹, Andy Alhassan, Ikuo Igarashi

National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

Received 5 January 2007; received in revised form 22 March 2007; accepted 23 April 2007

Available online 1 May 2007

Abstract

In the present study, we examined the effects of four kinds of cysteine protease inhibitors (E64, E64d, leupeptin, and ALLN) on the *in vitro* asexual growth of *Babesia bovis*. Of these, only the lipophilic inhibitors, E64d and ALLN, were found to effectively inhibit the growth of *B. bovis*. In further experiments, E64d, but not ALLN, significantly suppressed the parasite's invasion of host erythrocytes, while both chemicals, especially ALLN, inhibited the parasite's replication within the infected erythrocytes. These data suggested the presence of cysteine protease(s) derived from *B. bovis*, in which the protease(s) would play important roles in the erythrocyte invasion and/or replication processes of the parasite.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: *Babesia bovis*; Cysteine protease; Inhibitor; Invasion; Replication

Babesia bovis, an obligatory intraerythrocytic parasite of the phylum Apicomplexa, is a major causative agent of bovine babesiosis, which causes severe clinical symptoms, such as fever, anemia, and cerebral dysfunctions, in cattle due to their asexual growth (Homer et al., 2000). The disease often results in great economic losses in the livestock industry worldwide (Brown and Palmer, 1999), and effective strategies are desired for eradicating babesiosis.

Cysteine proteases are known to play vital roles in the growth of several protozoan parasites. In *Trypanosoma* spp., for example, the cysteine protease-specific inhibitors impair their host cell invasion and arrest the intracellular development (Meirelles et al., 1992) or kill the cultured blood stream forms of the parasites (Troberg et al., 1999). In *Plasmodium* spp., several protozoan cysteine proteases are involved in the erythrocyte invasion (Greenbaum et al., 2002), the degradations of hemoglobin and erythrocyte cytoskeletal proteins (Sijwali and Rosenthal, 2004; Takakuwa, 2001), and the final erythrocyte rupture for

their egression (Wickham et al., 2003). Cysteine protease inhibitors have been studied for the development of new chemotherapeutic measures for trypanosomiasis (Engel et al., 1998), malaria (Olson et al., 1999), schistosomiasis (Wasilewski et al., 1996), and leishmaniasis (Das et al., 2001). However, no cysteine protease has been reported in *Babesia* parasites, except for “cys1,” which is a cathepsin-like cysteine protease found in *Babesia (Theileria) equi* (Eakin et al., 1990; Holman et al., 2002; Mehlhorn and Schein, 1998).

In the present study, we examined the inhibitory effects of four commercial cysteine protease inhibitors, E64 (*trans*-Epoxy-succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane), E64d ((2*S*,3*S*)-*trans*-Epoxy-succinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester), leupeptin, and ALLN (*N*-acetyl-leucine-leucine-norleucinal), on the *in vitro* asexual growth of cultured *B. bovis*. These inhibitors are known to inhibit thiol proteases, such as calpain and cathepsin, but only leupeptin can also inhibit serine proteases (Carole and Kuan, 1998). Furthermore, E64d and ALLN have membrane permeability, while E64 and leupeptin do not (Holman et al., 2002). These four inhibitors have been widely used in the research of the cysteine proteases of many protozoa, including a *Plasmodium* parasite (Dahl and Rosenthal, 2005), which is closely related to the *Babesia* parasite.

* Corresponding author. Fax: +81 155 49 5643.

E-mail address: yokoyama@obihiro.ac.jp (N. Yokoyama).

¹ Present address: Department of Epidemiology and Preventive Medicine, College of Veterinary Science, Pandit Deendayal Upadhyaya Veterinary University, Mathura 281001, UP, India.

The Texas strain of *B. bovis* was cultured in purified bovine erythrocytes (RBCs) using a serum-free GIT medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) as described previously (Bork et al., 2005). The growth-inhibition test of four cysteine protease inhibitors followed previously described methods for measuring the drug activity (Okubo et al., 2006a; Bork et al., 2003) with some modifications. Briefly, infected RBCs were diluted with non-infected RBCs to obtain 0.5% parasitemia. Fifty microliters of the infected RBC mixture was subsequently suspended in 450 μ l of a culture medium supplemented with 1 (or 20)–220 μ M of E64, E64d, leupeptin, or ALLN. The suspension was placed in a 48-well culture plate (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) and then incubated in a humidified multigas water-jacketed incubator at 37 °C in 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ for 3 days. In parallel, normal cultures, which were added with the same final volume of DMSO (solvent) instead of each chemical, were prepared as the control. The culture medium was replaced daily with 450 μ l of the fresh medium containing the indicated concentration of each chemical.

Out of the four tested cysteine protease inhibitors, only the lipophilic inhibitors, E64d and ALLN, significantly affected the asexual growth of *B. bovis* at the concentration of 50 μ M (Fig. 1). On the other hand, the hydrophilic inhibitors, E64 and leupeptin, did not affect the growth of the parasite in the range of 20–200 μ M (Fig. 1; data not shown). The IC₅₀ values of E64d and ALLN were calculated to be 29.9 and 25.1 μ M, respectively, on the basis of the inhibitory rates (%) of E64d and ALLN at various concentrations within 1–220 μ M (Table 1). These data suggest that *B. bovis* has cysteine protease(s). On the other hand, E64 and leupeptin did not show any effects on the asexual growth of *B. bovis* in the present study. One possible explanation

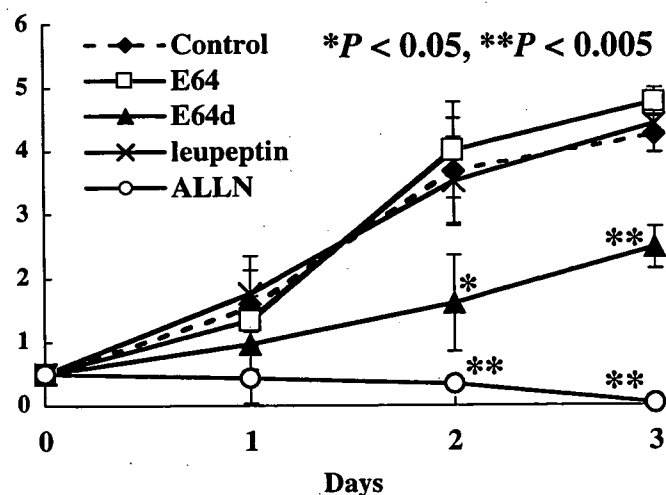


Fig. 1. Effects of four cysteine protease inhibitors on the *in vitro* growth of *B. bovis*. Each value represents the mean \pm standard deviation (SD) in three wells for each 50 μ M chemical (E64, E64d, leupeptin, or ALLN) in three separate experiments. The asterisks indicate significant differences (* P < 0.05, ** P < 0.005) between the inhibitor- and DMSO control-treated parasitemia analyzed using an independent Student's *t*-test.

Table 1
Growth inhibitory effects of E64d and ALLN

Conc. (μ M)	Inhibitory rate (Mean \pm SD) (%) ^a	
	E64d	ALLN
220	96.7 \pm 1.0	ND
200	95.2 \pm 1.1	98.1 \pm 1.8
150	88.6 \pm 6.5	95.3 \pm 4.7
100	83.5 \pm 3.3	98.5 \pm 2.7
50	56.5 \pm 1.4	90.9 \pm 11.0
40	54.3 \pm 2.1	78.2 \pm 10.7
30	49.5 \pm 7.4	58.4 \pm 3.9
20	46.0 \pm 11.0	20.4 \pm 0.9
10	29.6 \pm 8.6	19.8 \pm 7.7
5	14.1 \pm 25.1	7.1 \pm 11.6
1	0 \pm 19.8	0.2 \pm 4.4
Control	0 \pm 4.1	0 \pm 7.8
IC ₅₀ ^b	29.9 μ M	25.1 μ M

^a Inhibition rate of drug treatment was determined at day 2 of culturing, comparing to the control parasitemia; $[1 - (\text{drug-treated parasitemia} / \text{control parasitemia})] \times 100$. ND; No date.

^b The values of 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of E64d and ALLN were calculated on day 2 of the cultivation by interpolation after curve fitting.

nation of the negative results is that the target cysteine protease(s) might exist in the parasite's body; therefore, the membrane non-permeable agents could not reach it. Another possible explanation is that the E64 and leupeptin inhibited the target cysteine protease(s) but the protease(s) did not play an essential role in the asexual growth of the parasite. In *P. falciparum*, for example, targeted disruption of the cysteine protease, falcipain 1, did not influence their asexual growth (Saliha et al., 2004).

Next, we investigated the effects of E64d and ALLN on the erythrocyte invasion of *B. bovis* by an *in vitro* invasion test using high-voltage pulsing, as described previously (Okubo et al., 2006a; Franssen et al., 2003), with some modifications. Briefly, after *B. bovis*-infected RBCs were suspended in an equal volume of a GIT medium, the mixture of 400 μ l was subjected to five intermittent (10 s, 4 °C) high-voltage pulses (1.5 kV, 400 Ω , 25 μ F) in a Bio-Rad Gene Pulser II (Hercules, CA, USA) with a 0.2 cm pulser cuvette (Bio-Rad) to rupture all of the infected and non-infected RBCs exclusively and prepare extraerythrocytic (free) parasites. The samples were then suspended in a GIT medium supplemented with E64d or ALLN at the indicated concentrations (20, 50, and 100 μ M) or with the same final concentration of DMSO for the control. After a low centrifugation at 700g for 3 min, the pellet was resuspended in the same medium supplemented with E64d, ALLN, or DMSO and then transferred into a 96-well culture plate (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) with non-infected RBCs at a 10% packed cell volume. After the incubation at 37 °C for 1 h, the number of infected RBCs was counted out of a total 5000 RBCs in the Giemsa-stained smears, and the invasion efficiency was calculated as the percentage of parasitemia in the culture with E64d or ALLN to that with a DMSO medium control (100%).