

Trypanosoma equiperdum 自然感染馬および
実験感染マウスに関する病理学的研究

令和 5 年

(2023 年)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科

獣医学専攻博士課程

田中 佑典

**Pathologic investigations on *Trypanosoma equiperdum*
naturally infected horses and experimentally infected mice**

2023

TANAKA Yusuke

Doctoral Program of Veterinary Science

Graduate School of

Animal and Veterinary Sciences and Agriculture

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

目次

序論	1
第I章	<i>Trypanosoma equiperdum</i> 自然感染馬で認められた末梢神経炎の免疫組織学的解析4
第II章	<i>Trypanosoma equiperdum</i> 実験感染雌マウスに関する病理学的解析17
第III章	<i>Trypanosoma equiperdum</i> 実験感染雄マウスに関する病理学的解析：生殖器病変を中心として32
第IV章	<i>Trypanosoma equiperdum</i> のマウス性交感染モデル確立に向けた予備的検討52
総合考察	60
結論	65
謝辞	67
参考文献	68
ABSTRACT	82
図表	85

序論

溝疫は、トリパノソーマ科トリパノソーマ属サリバリア類トリパノズーン亜属に属する *Trypanosoma equiperdum* によって引き起こされる、ウマ科動物の致死性原虫病である (OIE, 2013; Gizaw *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018)。自然界では、ウマ、ロバ、ラバで発生の報告があるが、ウマはロバやラバに比べて特に感受性が高く、重症化しやすいとされている (OIE, 2013)。 *T. equiperdum* は、感染馬の膣粘液や精液に混じり性交の際にウマ科動物間で伝播され、溝疫罹患馬は生殖器の浮腫、皮疹、顔面の麻痺、四肢の麻痺、および貧血などの多様な症状を呈しながら、数ヶ月～数年単位で徐々に衰弱していき、死亡率は約 50%と推定されている (OIE, 2013; Schlafer and Foster, 2016)。このように致死的な疾病である溝疫は、日本での発生は報告されていないものの、カザフスタンやパキスタンから中国、モンゴルにかけてのアジア諸国、エチオピアやナミビアなどのアフリカ諸国などの発展途上国において蔓延しており、大きな経済被害を与えている (Gizaw *et al.*, 2017)。重度汚染国の一つであるモンゴルで、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を用いて行われた直近の疫学研究では、国全体で 4.8%、地域によっては 10%以上のウマが、感染が疑われる状況にあることが明らかになっており、その経済被害は 10 億円以上にのぼると推定されている (Mizushima *et al.*, 2020)。このような途上国における経済被害にもかかわらず、溝疫罹患馬に対する有効な治療法は確立されておらず、疾病の清浄化を目指す場合は罹患馬の摘発および淘汰が唯一の手段である。また、 *T. equiperdum* が性交により感染をするという特性から、主な予防法として衛生管理された精液を用いた人工授精が挙げられている (OIE, 2013)。しかし溝疫の蔓延国において、ウマは乳や肉などを産生する家畜としての側面に加えて、信仰や伝統といった文化においても重要な位置を占めており、罹患馬の摘発および淘汰を徹底して清浄化を目指す方針は非現実的である。また人工授精を遂行できる技術・機器

の双方が不足しているのが現状である。これらの背景から、治療法の確立が強く望まれてきた。

T. equiperdum と近縁な種として同様の亜属には、ヒトにアフリカ睡眠病を引き起こす *T. brucei gambiense* および *T. b. rhodesiense*、様々な家畜動物にトリパノソーマ症（ナガナ病やスーラ病）を引き起こす *T. b. brucei* や *T. evansi* が含まれる。これらの原虫はツェツェバエをはじめとする吸血昆虫により伝播され、媒介昆虫の生息する国々ではこれらトリパノソーマ症の蔓延により大きな被害を受けてきた (Maudlin, 2006; Desquesnes *et al.*, 2022)。特に、ヒトの睡眠病は 1900 年代前半から中盤にかけて、世界保健機関が把握しているだけで年間 30,000 人以上の死亡例が確認されていた。しかし、1900 年代後半より媒介昆虫の対策を主戦略とした効率的な予防法および迅速な診断法が確立され、治療薬が開発されると死亡者数は 1990 年代より 3000 人前後とかつての 10 分の 1 ほどの低い値で推移している (Franco *et al.*, 2014; Kennedy, 2019)。この背景には、自然発生例の病理学的解析が活発に行われるとともに、睡眠病の臨床症状や病変を再現した実験動物モデルの確立とそれらを用いた実験病理学的研究が盛んに行われ、睡眠病の病態が明らかにされてきたことが挙げられる (Bouteille *et al.*, 1998; Antoine-Moussiaux *et al.*, 2008; Rodgers *et al.*, 2019)。

したがって、溝疫においても有効な治療法を確立する上で、溝疫の病態や原因原虫である *T. equiperdum* の寄生戦略を理解することは重要である。しかし、自然発生例の病理解析は数件の症例報告に限られている (Vulpiani *et al.*, 2013; Mungun-Ochir *et al.*, 2019; Yasine *et al.*, 2019a)。また、溝疫罹患馬が示す症状や病態を再現した実験動物モデルは未確立で、病態解明を目的とした実験病理学的研究は行われておらず、溝疫の病態には多くの不明な点が残されてきた。*T. equiperdum* は、他のトリパノソーマ属の原虫とその性質を大きく異にしていることが知られている。その例として、*T. equiperdum* は性交によって伝播されることや、中枢神経に病変を形成しないこと、宿

主の血液中に出現する期間が短いとされ”tissue parasite”と形容されることなどが挙げられる (Barrowman, 1976; OIE, 2013; Ahmed *et al.*, 2018)。これらの理由から、ヒトの睡眠病で得られた知見を媾疫に外挿することは困難である。

本研究では、いまだ不明な点が多く残される媾疫の病態解明、および *T. equiperdum* の寄生戦略の解明を目的に、自然発生例の病理学的解析、および媾疫の病態再現マウスモデルの確立とその病理学的検索を実施した。第 I 章では、媾疫罹患馬が示す多様な臨床症状の中でも、媾疫が引き起こす経済被害の中で大きな要因となっている顔面麻痺や四肢の麻痺といった神経症状の病理発生機序の解明を目的に、自然発生例から採材された全身の末梢神経を免疫組織学的に解析した。第 I 章で得られた結果から、さらなる媾疫の病態解明には、罹患馬の病態を再現する実験動物モデルの確立が必要と考えた。そこで第 II 章ではモンゴルで新たに分離され、寒天培地に適応させた *T. equiperdum* IVM-t2 株をマウスに腹腔内投与で感染させ、感染マウスを病理学的に解析し、罹患馬が呈する臨床症状や組織病変と比較検討した。第 III 章では、第 II 章で確立したマウスモデルを用いて、雄マウスの生殖器における *T. equiperdum* の寄生部位を明らかにするとともに、生殖器病変を病理学的に解析し、*T. equiperdum* の寄生および伝播戦略を考察した。第 IV 章では自然界における *T. equiperdum* の伝播経路である性交感染をマウスで再現可能か検討した。

67

第 I 章

68

Trypanosoma equiperdum 自然感染馬で認められた

69

末梢神経炎の免疫組織学的解析

70

緒言

溝疫罹患馬は、数カ月～数年の長期間の経過を辿りながら徐々に衰弱していく。この慢性消耗性の臨床経過は、主に3つの臨床ステージに大別され、それぞれのステージで特徴的な症状が認められる。ステージ1では外陰部や包皮といった外部生殖器の浮腫を認め、さらに進行したステージ2では、皮膚病変や神経症状を、ステージ3ではそれらの症状に加えて重度な貧血、悪液質、および一般状態の高度な悪化が認められる (Claes *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2018)。罹患馬がステージ2あるいはステージ3で呈する神経症状は、顔面の麻痺や後肢の麻痺が最も一般的であり (Hagos *et al.*, 2010b; Vulpiani *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2018)、これらの症状は採食を困難にさせ運動能力の著しい低下を招く。したがって罹患馬が呈する神経症状は、罹患馬の生活の質を低下させるだけでなく、溝疫が馬産業に与える経済被害の主要因ともなっている。過去の神経症状を呈した溝疫罹患馬の症例報告では、罹患馬の中樞神経に肉眼的および組織学的に病変は認められなかった一方で、症状と関連する部位の末梢神経にリンパ球およびマクロファージ主体の炎症細胞浸潤、一部では軸索変性も認めたことを報告しており、溝疫特有の神経症状はこれらの末梢神経病変に起因すると考えられている (Pascucci *et al.*, 2013; Mungun-Ochir *et al.*, 2019)。しかし、これら末梢神経病変において、浸潤する炎症細胞の詳細なサブタイプを免疫組織学的に検索した先行研究はなく、その病理発生機序についても不明である。

マクロファージは細胞性免疫と液性免疫の双方で重要な役割を担う単核食細胞系の一つである (Oakes, 2021)。トリパノソーマ症を含む様々な原虫感染症においても例外ではなく、マクロファージは原虫に対する宿主免疫の中で重要な位置を占めている (Wink *et al.*, 2011)。近年、マクロファージの様々な機能が明らかになるにつれ、その機能に基づいてマクロファージは、M1 または M2 マクロファージの2種類に大別される

95 ようになってきた。M1 マクロファージは貪食能に優れ、炎症性サイトカインを分泌す
96 るため炎症促進マクロファージとも呼ばれ、炎症初期に多く認められる。一方 M2 マ
97 クロファージは炎症抑制マクロファージともよばれ、炎症抑制サイトカインを分泌
98 し、傷害された組織の修復を担うため、炎症の後期や慢性炎症病巣に多く認められる
99 ([Sica and Mantovani, 2012](#); [Atri et al., 2018](#))。

100 本章では、溝疫罹患馬の全身の末梢神経で認められた末梢神経炎について、免疫染
101 色により浸潤する炎症細胞のサブタイプを同定した。得られた末梢神経炎の免疫組織
102 学的性状を、臨床ステージ間で、さらに神経症状と関連している末梢神経および関連
103 していない末梢神経間で比較し、溝疫罹患馬で認めた末梢神経炎の病理発生機序を考
104 察した。

105

106

107

125

剖検時に採材された末梢神経は、15%中性緩衝ホルマリンで固定した後、定法に従いパラフィン包埋され、厚さ $3\mu\text{m}$ に薄切、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後、組織検査に供された。

各個体から採材された末梢神経に浸潤する炎症細胞の種類を特定するために免疫染色を実施した。なお本研究では、症例 1 では顔面神経および正中神経、症例 2 では顔面神経、三叉神経、および坐骨神経、症例 3 では顔面神経、症例 4 では顔面神経および坐骨神経を免疫組織学的解析に使用した。本章で使用した抗体の詳細、各抗体で用いた抗原賦活化法は Table 1 に示す通りである。抗 CD3、CD20、Granzyme B、Iba1 抗体を用いてそれぞれ T リンパ球、B リンパ球、NK 細胞、マクロファージを鑑別し、さらに T リンパ球は抗 CD4 および CD8 抗体を用いて CD4⁺T リンパ球と CD8⁺T リンパ球を鑑別した。また、マクロファージを M1 マクロファージと M2 マクロファージに鑑別するために、M1 マクロファージマーカーの抗 iNOS 抗体、および M2 マクロファージマーカーの抗 Arginase および CD204 抗体を用いた免疫染色を行った (Lee, 2019; Zhang *et al.*, 2021)。抗原賦活化後、内因性ペルオキシダーゼ除去のために 3%過酸化水素水で室温 10 分間処理をした。さらに非特異反応を軽減させるために、室温 20 分間 1%ブロッカー溶液 (DS ファーマバイオメディカル、大阪、日本) で処理をした。その後 1 次抗体希釈液をマウントし 4°C で一晩反応させた。抗原の検出と標識の視覚化にはそれぞれ、ヒストファインシンプルシステイン MAX-PO キット (ニチレイ バイオサイエンス、東京、日本) および 3'3'-ジアミノベンジジン発色試薬 (ニチレイ バイオサイエンス) を用いた。本実験では、陽性コントロールにはウマのリンパ節、胸腺、または肺炎組織を用いた。陰性コントロールには、一次抗体の希釈液の代わりに、一次抗体の産生動物に応じてマウスの正常血清 (Dako, Glostrup, Denmark) またはウサギの正常血清 (Dako) を使用した。末梢神経に浸潤する炎症細胞の優位なサブタイプを比較するために、それぞれの組織切片において炎症の最も深刻な病巣を選定

151 し、オリンパス社の BX51 顕微鏡および DP72 カメラを用いて、対物レンズ 20 倍の写
152 真を 5 枚撮影した。各写真で少なくとも 100 個の炎症細胞をカウントし、それぞれの
153 抗体の陽性細胞の割合を++: 20%以上、+: 5-20%、±: 5%未満、-: 陽性細胞なしの 4 段
154 階で評価した。なお、症例 4 は、評価した組織切片上で炎症細胞の数が症例 1-3 と比
155 較して少なかったため、5 視野の合計数で算出した。

156

結果

臨床情報および臨床ステージ分類

症例 1 は、7 歳の雄で包皮の浮腫が認められたが、それ以外の著変は認められなかった。症例 2 は、9 歳の雌で生前に右眼瞼および右耳の下垂が認められた。右側の下唇は軽度に麻痺を呈し、採食が軽度に困難であった。また、右側の上唇挙筋の萎縮により、鼻口部の正中線は左側に変位していた。症例 3 は、4 歳の雌で両側の耳介下垂および口唇の麻痺を呈していた。症例 4 は、9 歳の雄で、生殖器の浮腫、両側の口唇の麻痺、両後肢の麻痺が認められ、自力起立困難で、沈鬱を示し消瘦も顕著であった。剖検時には全身の脂肪組織で膠様萎縮も観察された。以上のことから、各症例の臨床ステージは症例 1 がステージ 1、症例 2 および症例 3 はステージ 2、症例 4 はステージ 3 と分類した。

検索に用いた末梢神経の神経症状との関連

臨床情報より、症例 2 の顔面神経（右側）および三叉神経（右側）、症例 3 の顔面神経、症例 4 の顔面神経および坐骨神経を神経症状と関連ある末梢神経、症例 1 の顔面神経および正中神経、症例 2 の坐骨神経を神経症状と関連のない末梢神経と判断した（Table 2）。

各症例の末梢神経炎の有無

症例 1-3 では、いずれの末梢神経でも末梢神経炎および周囲結合組織において末梢神経周囲炎が認められた。末梢神経炎では、浸潤する炎症細胞は大部分が神経上膜および周膜に分布しており、内膜から神経線維束間における炎症細胞浸潤も散見された（Figure 1a-d）。また、症例 2 および 3 の末梢神経においては、神経症状と関連する末

梢神経（症例 2 および 3 の顔面神経または三叉神経）では軸索変性も観察された（Figure 1e）。症例 4 では、症例 1-3 とは異なり末梢神経およびその周囲結合組織に浸潤する炎症細胞の数は少量であった。神経線維間のスペースは拡張し同部には好酸性の漿液性物質が認められ、浮腫を呈していた（Figure 1f）。なお、今回検索に用いた 4 症例いずれの末梢神経でも、シュワン細胞の増殖や大小不同な軸索径が混在するといった、傷害された末梢神経の再生像は認められなかった。また、いずれの末梢神経の炎症巣でも、虫体は組織学的に検出されなかった。

浸潤する炎症細胞の同定

浸潤する炎症細胞は、症例 1-4 の全例で CD3 陽性 T リンパ球、CD20 陽性 B リンパ球、Iba1 陽性マクロファージであった（Figure 2; Table 2）。マクロファージの大部分は CD204 および Arginase に陽性を示し、iNOS 陽性細胞は認められないか、認められてもわずかであった（Figure 3a, b）。この傾向は症例 1-4 の全ての末梢神経で共通していたが、特に症例 2 の顔面神経や三叉神経、症例 3 の顔面神経といった神経症状に関連する神経で Arginase 陽性細胞が多数認められた。また、CD4⁺および CD8⁺T リンパ球を鑑別したところ、症例 1-3 では、CD3 に陽性を示した T リンパ球のうち大部分は CD8 にも陽性を示す T リンパ球であり、CD4 陽性の T リンパ球はほとんど認められなかった（Figure 3c, d）。なお症例 4 では、CD4、CD8、Granzyme B 陽性細胞はいずれも観察されなかった。また、神経症状と関連する末梢神経、関連しない末梢神経双方においても、マクロファージのサブタイプは Arginase または CD204 陽性マクロファージが iNOS 陽性マクロファージよりも多く、T リンパ球のサブタイプは CD8 陽性 T リンパ球が CD4 陽性 T リンパ球よりも多かった（Table 2）。

考察

マクロファージはその機能や役割から、主に M1 マクロファージと M2 マクロファージに大別されるが、双方のサブタイプがともにトリパノソーマを含む寄生虫感染症をはじめ、細菌やウイルス感染症の際の宿主免疫において重要な役割を担っている (Liu *et al.*, 2014)。これらの感染症では、感染初期には貪食能力に優れ、炎症性サイトカインを産生して炎症を促進する M1 マクロファージが優位なサブタイプである。しかし、炎症が進行していくと徐々に、抗炎症性サイトカインを産生して、炎症を抑制する能力に優れる M2 マクロファージが優位なサブタイプとなる。この M2 マクロファージの機能は、免疫の過剰な作用を抑制し、炎症による傷害組織の修復や残存する正常組織を保護するために有効である (Sica and Mantovani, 2012; Atri *et al.*, 2018)。本研究で用いた症例は、症例 1 がステージ 1（初期ステージ）、症例 2 および 3 がステージ 2（後期ステージ）、症例 4 がステージ 3（末期ステージ）に臨床的に分類された。これらの臨床ステージに関わらず、全例の末梢神経にマクロファージの浸潤が認められた。さらに浸潤するマクロファージのサブタイプは、ステージ 1 の症例 1 からステージ 3 の症例 4 までの全例の末梢神経で M2 マクロファージが主体で、M1 マクロファージの浸潤はわずかであった。特に臨床的にステージ 1 の症例、またステージ 2 でも神経症状に関連のない末梢神経ですでに M2 マクロファージ主体の慢性炎症の性質を示していることは興味深い所見である。すなわち、溝疫罹患馬が呈する神経症状は感染後期から末期（ステージ 2 または 3）で見られる症状だが、末梢神経炎は神経症状を呈するよりもかなり以前の感染後比較的早い段階ですでに生じていた可能性が考えられた。

M2 マクロファージは、炎症において傷害された組織の修復に重要な役割を担っているが (Sica and Mantovani, 2012; Atri *et al.*, 2018)、今回、神経症状と関連する末梢神経で

は軸索変性が散見されたものの、いずれの末梢神経でも再生性変化は認められなかった。近年、M2 マクロファージが炎症を誘発する可能性もあることが指摘されている。特に慢性蠕虫感染マウスを用いた先行研究では、抗炎症性サイトカインに持続的にさらされると M2 マクロファージの攻撃的な機能が活性化される可能性を示している (Mylonas *et al.*, 2009)。しかし、これらのマクロファージの機能の変化を免疫組織学的に鑑別する研究は不足しているのが現状であり、梅毒罹患馬の末梢神経に浸潤する M2 マクロファージの詳細な機能や役割は不明である。M2 マクロファージはサイトカインシグナルによって炎症を抑制するだけでなく促進する可能性が指摘されてはいるものの、その機能にかかわらず長期間持続する慢性炎症における優位な表現型であるという認識は先行研究間でも一致している (Arnold *et al.*, 2007; Mylonas *et al.*, 2009; Sica and Mantovani, 2012; Xu *et al.*, 2013)。以上のことより、梅毒罹患馬で認められた末梢神経炎において、浸潤する M2 マクロファージの詳細な意義は不明だが、いずれにせよそれら末梢神経炎は慢性炎症の性質を帯びるものであると考えられる。

CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞はともに、原虫感染に対する免疫反応に重要である (Allen and Liu, 2004)。本研究では、T リンパ球の浸潤が目立った症例 1-3 では共通して、CD4 陽性 T リンパ球の浸潤はわずかであり、大部分が CD8 陽性 T リンパ球であった。一般的に CD8⁺T リンパ球は、細胞内病原体、とくにトリパノソーマ原虫の中では *T. cruzi* のような細胞内寄生原虫に寄生された細胞を攻撃するのに有効である (Tarleton *et al.*, 1992; Tarleton, 2015)。しかし、*T. equiperdum* の細胞内寄生は報告されておらず、また、*T. equiperdum* の *in vitro* 培養でも増殖・複製のための細胞内発育ステージは必要としないことが示されている (Suganuma *et al.*, 2016)。*T. equiperdum* と同様に完全細胞外寄生の *T. b. brucei* や *T. congolense* では、CD8⁺T リンパ球とトリパノソーマとの関係について、CD8⁺T リンパ球が宿主体内の原虫を攻撃するために重要であるほか、CD8⁺T リンパ球由来の IFN- γ をトリパノソーマ原虫が増殖に利用しているといっ

た報告がされている (Olsson *et al.*, 1992; Pentreath, 1995; Mwangi *et al.*, 2005; Coustou *et al.*, 2010; Laperchia *et al.*, 2016; Onyilagha and Uzonna, 2019)。しかし、本章で検索した媾疫罹患馬の末梢神経では、虫体は組織学的に認められず、CD8⁺T リンパ球優位な浸潤の意義については明らかにできなかった。

これまで媾疫罹患馬の末梢神経炎を病理組織学的に検索した研究 (Pascucci *et al.*, 2013; Mungun-Ochir *et al.*, 2019; Yasmine *et al.*, 2019a)では、いずれも末梢神経病巣から虫体を組織学的に検出できていない。ただし、末梢神経炎を認めた末梢神経組織から抽出した DNA から、*T. equiperdum* の DNA が増幅されたことが報告されている (Pascucci *et al.*, 2013; Yasmine *et al.*, 2019a)。これらの背景から、媾疫罹患馬の末梢神経炎は、末梢神経に侵入した原虫に対する宿主の免疫応答の結果なのか、あるいは別の可能性 (*T. equiperdum* 感染が引き金となった自己免疫疾患など) に起因するものなのかについては依然として不明のままである。医学領域では、*Campylobacter jejuni* やサイトメガロウイルスなど様々な病原体の感染が契機となり引き起こされる末梢神経炎として、ギランバレー症候群が知られている。ギランバレー症候群患者の末梢神経病巣に病原体自体は検出されておらず、病理発生機序として感染を契機とした自己免疫異常が強く疑われている (Pytel and Anthony, 2021)。傷害神経では T リンパ球の浸潤を特徴とするが、大部分が CD4⁺T リンパ球とされている (Shen *et al.*, 2018)。本章で検索した媾疫罹患馬の末梢神経では、いずれの症例の炎症巣でも免疫染色にて CD8 陽性の T リンパ球が主体であったことから、媾疫罹患馬の末梢神経炎はギランバレー症候群とは異なる病態であると推察された。

以上より、媾疫罹患馬で認められる末梢神経炎において、浸潤する炎症細胞のうちマクロファージに着目すると、その大部分が M2 マクロファージであることが明らかになった。このマクロファージの免疫組織学的性状は、臨床ステージを問わず共通しており、臨床的に初期ステージの罹患馬の末梢神経炎でもすでに慢性炎症の性質を帯

275 びていることが明らかになった。しかし、末梢神経炎の病理発生機序の解明には至ら
276 ず、さらなる自然発生例の解析を継続する必要がある。また病理発生解明を達するに
277 あたり、末梢神経炎を再現する実験動物モデルを用いた実験病理学的解析も併せて実
278 施していく必要があると考えられた。
279

小括

本章では、媾疫罹患馬が呈する神経症状および末梢神経炎の病理発生機序を明らかにすることを目的に、媾疫と診断されたウマ4頭の末梢神経を免疫組織学的に解析した。媾疫罹患馬4頭を、それらが呈した症状を元に、病期を反映する臨床ステージ1から3の3段階に分類した。さらに、それぞれのウマの末梢神経を神経症状と関連する末梢神経あるいは神経症状と関連しない末梢神経に大別し、末梢神経に浸潤する炎症細胞の種類を免疫組織学的に同定し、比較した。

その結果、臨床ステージおよび神経症状との関連性に関わらず全例でTリンパ球、Bリンパ球およびマクロファージ主体の炎症細胞浸潤が認められた。さらに、Tリンパ球はCD8陽性Tリンパ球が、マクロファージはArginase陽性またはCD204陽性のM2マクロファージがそれぞれ主要なサブタイプであることが明らかになった。

マクロファージのサブタイプとしてM2マクロファージが優勢であることは、本研究で認められた末梢神経炎が慢性炎症であることを示唆するものである。神経症状を示さない、臨床的にステージ1に分類される症例でも、すでに慢性炎症を示唆する炎症病巣が認められた。したがって、媾疫罹患馬が神経症状を示すのは感染後期～末期（ステージ2-3）であるが、末梢神経炎は感染の比較的早い段階ですでに起きている可能性が考えられた。本研究で得られた知見は、今後、媾疫罹患馬の神経症状を緩和する対症療法や治療法を確立していく上で、重要な情報になると思われる。

299

第 II 章

300

Trypanosoma equiperdum 実験感染雌マウスに関する

301

病理学的解析

緒言

医学領域におけるトリパノソーマ感染症として、*T. b. gambiense* または *T. b. rhodesiense* によって引き起こされる睡眠病が知られている。これら原虫は自然界ではヒトにのみ感染し、患者の多くは致死性の経過を辿る (Maudlin, 2006; Desquesnes *et al.*, 2022)。しかし、1900 年代前半より、睡眠病に罹患した患者の病理学的解析による病態の解明が進むとともに、マウスを中心とした実験動物を用いた解析も積極的に行われ、これら実験動物を用いた研究は自然例の解析のみでは得られない知見を提供し、睡眠病の病態解明に大きく貢献してきた (Bouteille *et al.*, 1998; Antoine-Moussiaux *et al.*, 2008; Rodgers *et al.*, 2019)。

本研究の第 I 章では、媾疫罹患馬が示す神経症状に着目し、その原因となる末梢神経炎の病理発生機序を解明することを目的に自然発生症例を病理学的に解析したが、残念ながら病態の全容解明には至らなかった。また神経症状以外にも、媾疫罹患馬は外部生殖器の浮腫や皮疹といった様々な症状を示し、過去の症例報告では、これら病巣はそれぞれ組織学的に、生殖器の炎症および浮腫、皮膚の真皮炎によって特徴づけられることが示されている (OIE, 2013; Pascucci *et al.*, 2013; Yasine *et al.*, 2019a)。しかし、第 I 章で取り扱った末梢神経炎を含め、これらの病変がどのように引き起こされるのかは不明のままである。さらに *T. equiperdum* は、他のトリパノソーマ原虫と比較すると宿主の末梢血に寄生している期間が短く”tissue parasite”と形容されるが、血中を除く罹患馬のどこの臓器および組織に寄生しているかは組織学的に解明されていない (OIE, 2013; Ahmed *et al.*, 2018)。これらの解明には、自然発生例の解析を継続して実施していくとともに、ヒトの睡眠病と同様に、媾疫の臨床経過や罹患馬が示す症状や病変を再現するマウスモデルを用いた研究が必要である。

これまで原虫の増幅などを目的に、マウスに *T. equiperdum* を投与する実験は数例行われてきたが、マウスは多くの *T. equiperdum* 株に非感受性であり、投与しても感染は成立しない (Gizaw *et al.*, 2017; Pascucci *et al.*, 2013)。一部の株は、マウスに感染が成立するものの、感染マウスは一過性の原虫血症を呈し、感染後 2~8 日で死亡する (Hagos *et al.*, 2010a; Perrone *et al.*, 2018; Gillingwater, 2019)。したがって、マウスに感染が成立し、かつ瘧疾罹患馬が示す数カ月単位の長期間の臨床経過を再現できる *T. equiperdum* 株は知られていない。また、過去のマウスへの *T. equiperdum* 感染は、原虫の増幅が主目的であり (OIE, 2013)、感染マウスの病理組織学的解析は行われていない。

これまでマウスに投与されてきた *T. equiperdum* 材料は瘧疾罹患馬の血液を希釈して調製されたものであった (Perrone *et al.*, 2009; Hagos *et al.*, 2010a; Pascucci *et al.*, 2013; Perrone *et al.*, 2018)。そのような中、近年菅沼らによって瘧疾罹患馬の生殖器粘膜スワブから *T. equiperdum* を分離し、アガロース寒天培地を用いて培養する手技が確立された (Suganuma *et al.*, 2016)。*In vitro* で培養可能な *T. equiperdum* 株の樹立により、安定的かつ定量的な投与材料の調製が可能となった。今回の研究では、この手技を用いてモンゴルの瘧疾罹患馬の生殖器粘膜スワブから分離培養された *T. equiperdum* IVM-t2 株を使用した。

様々な近交系マウスの中でも BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスは、ヒトの睡眠病をはじめとするトリパノソーマ症に関する *in vivo* 研究で最も使用されてきたマウス系統である。これらの近交系マウスは *T. b. rhodesiense*、*T. b. gambiense*、*T. b. brucei*、*T. evansi*、*T. congolense* といった様々なトリパノソーマ原虫の感染実験に使用されてきたが、感染させる原虫の種類または株によっても BALB/c マウスと C57BL/6 マウスで生存期間が大きく異なっている (Antoine-Moussiaux *et al.*, 2008)。また、この 2 系統間の病原体に関する感受性差は、ウイルスや細菌の感染実験でも報告されている (Cheers *et al.*, 1978; Henderson *et al.*, 2015)。 *T. equiperdum* IVMt2 株のマウスへの病原性が不明で

349 あったため、今回は BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスの 2 系統の近交系マウスを
350 使用した。本章では、この 2 系統のマウスに *T. equiperdum* IVMt2 株を腹腔内投与で感
351 染させ、末梢血原虫数、肉眼病変、組織病変について検討した。さらに溝疫罹患馬で
352 報告されている組織病変と比較し、溝疫罹患馬で認められる病変の再現性についても
353 考察した。

材料および方法

本研究で用いたトリパノソーマ

アガロース寒天培地で培養された *T. equiperdum* IVM-t2 株を使用した。この *T. equiperdum* 株は、媾疫の重度汚染国の一つであるモンゴルにおいて、媾疫罹患馬の特徴的な臨床症状である下唇の麻痺および陰囊と包皮の浮腫 (OIE, 2013) を呈した雄ウマの尿道スワブから分離され、菅沼らの確立した手技 (Suganuma *et al.*, 2016) に基づいて寒天培地に適応させたものである。なお、本原虫は、トリパノズーン亜属に特異的なプライマーである TBR プライマー (Masiga *et al.*, 1992; Ashour *et al.*, 2013) およびシーケンエンス解析により、トリパノズーン亜属であること、*T. equiperdum* と遺伝学的に近縁な種である *T. evansi* type A の遺伝子マーカーである Ro Tat 1.2 VSG (Urakawa *et al.*, 2001) が陰性であることが確認されている。現状 *T. equiperdum* と *T. evansi* を明確に区別できる PCR プライマーや遺伝子マーカーが確立されていないが、これらの分子生物学的解析結果、本馬が呈していた臨床症状、尿道スワブから分離された原虫であった点から、本原虫は *T. equiperdum* と特定された。

感染実験

6 週齢の雌の BALB/c マウス (BALB/cAJcl) および C57BL/6 マウス (C57BL/6JJcl) の 2 種類の近交系マウスを株式会社日本クレア (東京、日本) から導入した。1 週間の馴致期間の後、それぞれの系統で 6 匹ずつを感染群とし、グルコース加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1×10^7 parasites/ml に調製した *T. equiperdum* IVM-t2 株を 0.1 ml 腹腔内に投与した。それぞれの系統で残りの 5 匹には、対照群として上述した投与材料の溶媒として用いた PBS を 0.1 ml 腹腔内に投与した。投与日より 1-2 日間隔で、2% イソフルラン吸入麻酔下でマウスの尾先端部を剪刀で 1 mm 程度切断し、同部より 1

μl 血液を採取し、グルコース加 PBS で 100 倍希釈後、セルカウンター用チャンバー
スライドを用いて末梢血中の原虫数を評価した。なお、採血時に体重測定も併せて実施した。感染実験期間は 60 日とし、60 日間の実験終了時に生存していたマウスは 5% 以上のイソフルランによる吸入麻酔下で心臓より採血を行い安楽殺の処置が施された。実験期間中に顕著な運動量低下・沈鬱および体重減少を示した一部のマウスについても、人道的配慮を行い上記の手法で都度安楽殺した。いずれのマウスも安楽殺後速やかに剖検に供され、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、消化管、子宮、膣、脳、脊髄、坐骨神経、および背部皮膚を採材し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。なお、背部皮膚は 60 日間生存したマウスのみから採材された。脊髄は、椎骨および脊髄をまとめてホルマリン固定し、その後モールス液中で 2 日間脱灰作業を行い、第 7 頸髄および第 3 腰椎相当部で脊髄および椎骨を合わせた横断面を切り出してその後の検査に適用した。

組織学的解析

ホルマリン固定後の臓器は、一般的な手技にしたがってパラフィン包埋後、約 3 μm に薄切され HE で染色後、組織学的検査に供された。各臓器および組織における炎症細胞浸潤の程度を -: 炎症細胞の浸潤を認めない、+: 軽度かつ限局的に炎症細胞の浸潤を認める、++: 炎症細胞浸潤は軽度だが、多巣性に病巣が認められる、+++: 重度かつび慢性に炎症細胞浸潤が認められる、の 4 段階で評価した。また坐骨神経の組織検査では、炎症の程度に加え軸索変性の有無も評価し、HE 染色で評価困難な場合には Luxol Fast Blue (LFB) -HE 染色も適宜行った。

各臓器および組織における *T. equiperdum* の寄生の有無を明らかにするために、抗 *T. equiperdum* ウサギ血清を用いた免疫染色を実施した。さらに、一部の組織切片には、浸潤する炎症細胞を同定することを目的として抗 CD3 (clone SP7, 1:400, Abcam,

402 Cambridge, UK) 抗体および抗 Iba1 (Polyclonal, 1:500, Wako, 大阪) 抗体を用いた免疫
403 染色を実施した。免疫染色の手技および用いた陰性コントロールは、第 I 章で記した
404 ものと同様である。また、抗 *T. equiperdum* ウサギ血清を用いた酵素抗体法の免疫染色
405 では、一部の臓器では非特異反応が強く出たことから、その場合は蛍光免疫染色も併
406 用した。蛍光免疫染色の際は、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-
407 rabbit IgG (1:400, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を使用し 37°C で 1 時間反応
408 させた。対比染色として 4'6-diamino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA,
409 USA) で核を染色した。

結果

生存率、増体重率、原虫血症、および肉眼病変

BALB/c マウス感染群では 6 匹のうち 5 匹が実験期間の 60 日間生存し、1 匹は状態良好であったものの、感染 31 日目の採血時の麻酔事故で死亡した。BALB/c マウス感染群の増体重率をみても、対照群と比較して明らかな差は認められなかった (Figure 4)。一方で C57BL/6 マウス感染群では、6 匹のうち 3 匹が実験期間の 60 日間生存したものの、3 匹は感染 12 日目に死亡または、沈鬱および運動量減少により安楽殺された。12 日目に死亡した C57BL/6 マウス感染群の 3 匹は、60 日間生存した感染群や対照群のマウスと比較して、著しい体重減少が認められた (Figure 4)。実験期間を通して生存した 3 匹の C57BL/6 マウス感染群のうち、2 匹のマウスで、背部皮膚の脱毛および発赤をそれぞれ 31 日目、43 日目から実験終了の 60 日目まで認めた。最初の原虫血症は、BALB/c マウス感染群全頭で 10 日目に、C57BL/6 マウス感染群では 5 匹が 8 日目に、残り 1 匹が 10 日目に検出された。その後、末梢血原虫数は周期的に増減を繰り返しながら 60 日目まで両系統の感染群マウスで継続的に検出された (Figure 5)。

組織学的解析

感染群のマウスの全身臓器および組織で検出された病変の概要は、Table 3 に記載した通りである。坐骨神経の周囲炎は、BALB/c マウス感染群全頭で、C57BL/6 マウス感染群 5 匹で認められた。組織学的に重度 (+++) に分類される末梢神経周囲炎は、C57BL/6 マウス (3/6 匹) で BALB/c マウス (1/6 匹) よりも高頻度に認められた。これら坐骨神経の病巣では、マクロファージおよびリンパ球を主体とする炎症細胞の浸潤が周膜および坐骨神経周囲の結合組織で認められた (Figure 6a)。周膜から周囲結合組織に炎症が分布する一方で、神経内膜や神経線維間には炎症細胞の浸潤は認めら

れなかった。いずれのマウスでも顕著な軸索変性は観察されなかった。また、皮膚の真皮などを走行する末梢神経など、他臓器の組織標本中で認められた末梢神経断面でも、同様に周膜から周囲結合組織における炎症細胞の浸潤が認められ、内膜や神経線維に著変は認められなかった。

膣炎は、BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウス両系統の感染群全頭で、様々な程度で認められた。軽度 (+) および中程度 (++) に組織学的に分類された膣炎では、粘膜固有層および筋層の血管周囲に炎症細胞浸潤を認め、重度 (+++) に分類された膣炎では、炎症細胞が粘膜固有層から筋層にかけてび漫性に浸潤していた (Figure 6b)。浸潤する炎症細胞は大部分がリンパ球、マクロファージが主体であり、わずかに形質細胞浸潤も伴っていた (Figure 6c)。

背部皮膚の発赤および脱毛を認めた 2 匹の感染群の C57BL/6 マウスでは、病変部では組織学的に、真皮から皮下組織においてび漫性の浮腫、およびマクロファージとリンパ球の浸潤が認められた。同部では、対照群の皮膚と比較すると毛包や皮脂腺などの皮膚付属器が萎縮し、数も減少していた (Figure 6d)。BALB/c マウス感染群ではいずれのマウスでも肉眼的な皮膚病変は認められなかったが、皮膚を組織検査した感染群 5 匹のうち 2 匹で、中程度のマクロファージとリンパ球の真皮および皮下組織への浸潤が観察された。

肝臓では、血管周囲へのリンパ球、マクロファージ、および少数の形質細胞の浸潤が、3 匹の BALB/c マウス感染群および 5 匹の C57BL/6 マウス感染群で認められた。

この炎症の程度は、BALB/c マウスでは限局的で軽度である傾向があった一方で、C57BL/6 マウスではより重度、広範囲に及んでおり、一部の個体では肝細胞の巣状壊死も伴っていた (Figure 6e)。肝臓と同様の血管周囲への炎症細胞浸潤は、軽度～中程度の範囲で BALB/c マウスまたは C57BL/6 マウス感染群の腎臓、心臓、および肺で散見された。脾臓では炎症細胞の浸潤や壊死はいずれの感染群マウスでも認められな

かったが、白脾髄の濾胞過形成および髄外造血（Figure 6f）が全ての BALB/c マウス感染群で、5 匹の C57BL/6 マウス感染群で認められた。なお、感染群マウスの消化管、子宮、脳および脊髄に明らかな組織学的病変は認められなかった。対照群では、BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスのいずれの臓器でも、感染群で認められたような炎症巣や脾臓の濾胞過形成および髄外造血は観察されなかった。

剖検時に、2 匹の BALB/c マウスおよび 5 匹の C57BL/6 マウスで末梢血から原虫が検出された。これらのマウスでは、組織学的および免疫組織学的に原虫が、心外膜（BALB/c: 0/2 匹、C57BL/6: 1/5 匹）、坐骨神経周膜および周囲の結合組織（BALB/c: 2/2 匹、C57BL/6: 5/5 匹）（Figure 7a）、膈（BALB/c: 2/2 匹、C57BL/6: 5/5 匹）（Figure 7b）、背部皮膚の真皮および皮下組織（BALB/c: 1/1 匹、C57BL/6: 2/2 匹）（Figure 7c-e）といった炎症細胞浸潤が認められた部位で観察された。また、剖検時に原虫血症を呈していなかったマウスでも、虫体が心外膜（BALB/c: 2/4 匹、C57BL/6: 0/1 匹）、坐骨神経周膜および周囲の結合組織（BALB/c: 3/4 匹、C57BL/6: 0/1 匹）、膈（BALB/c: 0/4 匹、C57BL/6: 1/1 匹）、背部皮膚の真皮および皮下組織（BALB/c: 1/4 匹、C57BL/6: 1/1 匹）といった炎症細胞浸潤が認められた部位で観察された。剖検時に原虫血症を呈していたかどうかに関わらず、BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスの坐骨神経周囲の結合組織、および肉眼的に発赤と脱毛を認めた C57BL/6 マウスの背部皮膚の皮下組織で、組織学的に検出された虫体は多かった。また、これら組織中で認められた虫体は、感染期間中末梢血中で認められた虫体（Figure 7f）と同様に、トリパノソーマに特有の屈曲した長紡錘形の形態をとっていた。なお、対照群ではいずれの系統のマウスでも虫体は検出されなかった。

考察

T. equiperdum はウマ科動物に感染し、瘧疫を引き起こす。瘧疫に罹患した動物は、1-2 カ月、長いものでは数年間にもおよぶ長期の臨床経過を辿りながら徐々に衰弱していく (OIE, 2013; Vulpiani *et al.*, 2013)。過去に様々な *T. equiperdum* 株をマウスに投与する実験が行われてきたが、多くの株はマウスに感染することができず (Pascucci *et al.*, 2013; Gizaw *et al.*, 2017)、また感染が成立してもマウスは一過性の原虫血症を呈し 2-8 日で死亡するなど非常に急性の経過を辿ることが報告されている (Hagos *et al.*, 2010a; Gillingwater, 2018; Perrone *et al.*, 2018)。したがって、これまでの感染マウスでは、瘧疫罹患馬が呈する数カ月単位の臨床経過を再現することができていなかった。本研究では、感染群の BALB/c マウス 5/6 匹 (1 匹は麻酔事故で死亡) および C57BL/6 マウス 3/6 匹が実験期間の 60 日間を通して生存し、それらマウスでは周期的に増減を繰り返す原虫血症が実験期間を通して観察された。これらの結果から、*T. equiperdum* IVM-t2 株は BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスに少なくとも 60 日間は感染することができると考えられた。*T. equiperdum* は、他のトリパノソーマ属の原虫と比較して宿主の末梢血に出現する期間が短いとされているが (OIE, 2013; Gizaw *et al.*, 2017)、ウマを用いた感染実験で定期的に末梢血原虫数を評価した研究では、感染馬は周期は一定ではないものの増減を繰り返す原虫血症を呈することが報告されている (Hagos *et al.*, 2010a; Hébert *et al.*, 2017)。したがって、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスで認められた原虫血症の動態は、過去に瘧疫罹患馬で報告されたものと類似性を持つものであった。また、剖検時に末梢血中に原虫が検出されたかどうかにかかわらず、組織学的に虫体は心外膜、坐骨神経周囲の結合組織、膣、背部皮膚の真皮および皮下組織に認められた。したがって、これらの臓器および組織は、*T. equiperdum* IVM-t2 株のマウス内における寄生部位と推定された。

本章では、マウスに確実に感染を成立させることを目的に腹腔内投与で原虫を感染させた。自然界では、*T. equiperdum* は性交によって伝播され、生殖器内腔の原虫は生殖器粘膜から宿主組織へと侵入し、血流によって全身臓器および組織へと拡散されていくと考えられている (OIE, 2013; Gizaw *et al.*, 2018)。ただし、ウマを用いた感染実験の報告では、*T. equiperdum* を経膣・子宮感染させた場合と、静脈内投与で感染させた場合の臨床経過、原虫血症の推移、病変の分布を比較し、これらにおいて感染経路の違いによる明確な差がないことが報告されている (Yasine *et al.*, 2019b)。本研究では、腹腔内投与で感染させたマウスで様々な病変が認められたが、少なくともウマでは感染経路によって病態が大きく異なることはないため、腹腔内投与で感染させたマウスを解析することは意義があるものと思われる。

媾疫罹患馬の特徴的な臨床症状として、外部生殖器の浮腫、皮膚のプラーク状病変、貧血、神経症状があげられる (OIE, 2013)。過去のマウスを用いた *T. equiperdum* の感染実験では、感染マウスは急性期に貧血を呈したことが報告されているが、それ以外の臨床症状については検討されていない (Hagos *et al.*, 2010a; Perrone *et al.*, 2018)。本研究では、ヘマトクリット値を測定していなかったものの、両系統の感染群のマウスで組織学的に脾臓に髄外造血が認められたことから、感染群のマウスは慢性的な貧血に陥っていたものと推察された。また、媾疫罹患馬が示す皮膚のプラーク病変は、“trypanosoma sand”とも形容され、組織学的に真皮に寄生する原虫と顕著な炎症反応により特徴づけられている (Scacchia *et al.*, 2011)。本研究では、C57BL/6 マウス感染群の一部の個体で、背部皮膚の脱毛と発赤が認められた。同部では組織学的に真皮と皮下組織に炎症と原虫の寄生を認め、過去に報告されている媾疫罹患馬の“trypanosoma sand”の組織病変と類似するものであった。ただし、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスでは、皮膚の真皮に加え皮下脂肪における原虫の寄生と炎症反応が認められた。ヒトの睡眠病マウスモデルの先行研究では、全身の脂肪組織が血中以外の虫体の潜伏感

染部位として報告され、原虫が宿主の脂肪組織を栄養源として寄生していることが明らかにされている (Trindade *et al.*, 2016)。媾疫罹患馬の脂肪組織中における原虫の寄生の有無は評価されてこなかったが、感染マウスで皮下脂肪にも寄生が認められたことから、*T. equiperdum* も脂肪組織を寄生部位として利用している可能性が考えられた。今後、媾疫罹患馬の皮膚病変を解析する際は、皮下組織にも焦点を当てて実施していく必要がある。

媾疫罹患馬の雌性生殖器病変は、組織学的に子宮炎および膣炎によって特徴付けられ、炎症の分布は組織学的に粘膜固有層および筋層、一部で粘膜上皮に分布する (Pascucci *et al.*, 2014; Yasmine *et al.*, 2019a)。本研究では、BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスともに子宮に著変は認められなかったものの、多くの感染群マウスで膣の粘膜固有層および筋層に炎症巣が検出された。ただし、媾疫罹患馬と異なり、膣の上皮に病変は認められなかった。本研究では、マウスに *T. equiperdum* を腹腔内投与で感染させ、膣までは血流にのって原虫が到達したものと考えられる。一方で自然界では、*T. equiperdum* は、性交によって伝播されると生殖器粘膜より侵入し、血流に入ると推察されている (OIE, 2013)。したがって、本研究のマウスとウマにおける膣の炎症巣の病変分布の違いは、感染経路の違いに起因する可能性があると考えられた。

感染群の BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウス双方の坐骨神経では、周膜および神経周囲の結合組織で原虫の寄生と炎症細胞浸潤が認められた。一方で、神経内膜や神経線維間に炎症細胞の浸潤や原虫の寄生は認められなかった。すべての感染群のマウスで画一的に評価した末梢神経は坐骨神経のみであったが、皮膚の組織切片などで観察された末梢神経でも周膜や周囲結合組織への炎症細胞浸潤が観察されており、坐骨神経のみでなく、全身の末梢神経で同様の変化が起きている可能性も考えられた。ただし、媾疫罹患馬で認められる末梢神経病変では、リンパ球やマクロファージ主体の炎症細胞の神経周膜への浸潤に加えて、神経線維間への浸潤も認められる。また、こ

れら炎症巣からは組織学的に虫体は認められない (Mungun-ochir *et al.*, 2019; Yasmine *et al.*, 2019a)。したがって、溝疫罹患馬と *T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスの末梢神経病変は、炎症細胞の浸潤する場所や、組織学的に検出される原虫の有無といった観点から異なる性質のものと考えられた。

溝疫罹患馬が後期ステージ以降で呈する神経症状は、末梢神経の炎症自体ではなく、その結果に起因する軸索の腫大や断片化といった軸索変性によって引き起こされると推察されている (Mungun-Ochir *et al.*, 2019)。本研究では、いずれの感染群マウスでも後肢麻痺などの神経症状は認められず、また対照群と比較して明らかな軸索変性も観察されなかった。したがって、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスは、溝疫罹患馬の末梢神経病変を完全には再現するものではないと考えられた。

今回の実験感染により、*T. equiperdum* IVM-t2 株は BALB/c 雌マウスおよび一部の C57BL/6 雌マウスに少なくとも 60 日間といった長期間感染することのできる稀有な株であることが明らかになった。またそれら感染マウスでは、第 I 章で着目した末梢神経炎と同様の神経炎は認められなかったものの、膣炎や皮膚炎が観察され、これらの病変は溝疫罹患馬が呈する組織病変と組織学的に類似するものであった。*T. equiperdum* IVM-t2 株感染雌マウスは、溝疫罹患馬で認められる慢性的な臨床経過や、組織病変の一部を再現できることから、溝疫の病態の一部を再現できるマウス感染モデルとして有用な系となると考えられた。

小括

新たにモンゴルで分離され、寒天培地で培養可能となった *T. equiperdum* IVM-t2 株を腹腔内投与でマウスに感染させた結果、*T. equiperdum* IVM-t2 株は BALB/c マウスおよび一部の C57BL/6 マウスに少なくとも 60 日間という長期間感染することのできる稀な株であることが明らかになった。感染マウスでは、媼疫罹患馬で報告されているものと同様の、周期的に増減を繰り返す原虫血症が検出された。また組織学的に、媼疫罹患馬の皮膚病変や生殖器病変と一部共通点を持つ皮膚炎および膣炎が感染マウスで認められた。ただし、当初、病態の再現を目指した媼疫罹患馬が示す神経症状や、その原因となる末梢神経病変の再現には至らなかった。以上のことより、*T. equiperdum* IVM-t2 株を腹腔内投与で感染させた BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスは、媼疫罹患馬が示す臨床症状および組織病変の一部を再現することが可能であり、今後 *T. equiperdum* の寄生戦略や媼疫の病態解明を念頭においた病理学的あるいは原虫病学的 *in vivo* 研究において貴重なマウスモデルとなると考えられた。

588

第 III 章

589

Trypanosoma equiperdum 実験感染雄マウスに関する

590

病理学的解析：生殖器病変を中心として

591

諸言

Trypanosoma equiperdum と遺伝学的に近縁な種として、*T. brucei brucei*、*T. b. gambiense*、*T. b. rhodesiense*、および *T. evansi* が知られている (Gizaw *et al.*, 2017)。 *T. equiperdum* 以外のこれらの 4 種のトリパノソーマ原虫は、吸血昆虫により媒介される (Auty *et al.*, 2015; Büscher *et al.*, 2017)。一方で *T. equiperdum* は性交によってのみ伝播され、これまで吸血昆虫を介した伝播は報告されていない (OIE, 2013)。さらに、*T. b. brucei*、*T. b. gambiense*、*T. b. rhodesiense*、および *T. evansi* は、宿主血液内を主な寄生部位とするため、末梢血中から頻繁に原虫が検出される一方で、*T. equiperdum* はそれら原虫と比較して、末梢血中から検出される頻度が低いとされている。これらのような *T. equiperdum* 特有の性質から、*T. equiperdum* は、他のトリパノソーマ原虫とは大きく異なる寄生戦略を獲得していると考えられている (Gizaw *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018)。

媾疫罹患馬の生殖器病変を病理組織学的に解析した症例報告では、マクロファージおよびリンパ球主体の炎症細胞浸潤を特徴とする精巣炎および精巣上体炎が認められ、さらにそれら臓器から、リアルタイム PCR により *T. equiperdum* の DNA が増幅されたことを報告している (Yasine *et al.*, 2019a)。また、別の先行研究では、媾疫罹患雄ウマの精液から虫体が検出されたことが報告されている (Ahmed *et al.*, 2018)。しかし、すべての性交の度に原虫の伝播が起こるわけではなく、罹患馬が呈する数カ月単位の長い臨床経過の中で、いつ、どのようにして原虫が精液中に出現するのかは不明である (OIE, 2013; Gizaw *et al.*, 2017)。

我々は第 II 章で、*T. equiperdum* IVM-t2 株がマウスに長期間持続的に感染できる稀有な株であること、また感染雌マウスは媾疫罹患雌ウマが呈する生殖器の組織病変の一部を再現できることを示した。しかし、*T. equiperdum* は雌ウマだけでなく雄ウマの生

殖器にも炎症を引きこす (Yasine *et al.*, 2019a)。さらに、原虫の性交による伝播は、雌
ウマから雄ウマよりも、雄ウマから雌ウマへの伝播の方がより頻繁に起こるとされて
いる (OIE, 2013; Gizaw *et al.*, 2017)。したがって、*T. equiperdum* 感染雌マウスだけでな
く、感染雄マウスの生殖器病変を病理学的に解析することは、*T. equiperdum* の伝播機
序や寄生戦略を解明する上で重要な研究課題である。そこで第 III 章では、*T.*
equiperdum 感染雄マウスの生殖器病変を病理組織学的に解析し、媾疫罹患馬が呈する
生殖器の組織病変の再現性を評価した。さらに得られた結果から、*T. equiperdum* の伝
播機序を考察した。

また、貧血は媾疫罹患馬の特徴的な臨床症状であり (OIE, 2013)、これまで感染マウ
スでは急性期に貧血を呈したことが報告されている (Hagos *et al.*, 2010a; Perrone *et al.*,
2018)。しかし長期間感染したマウスでも同様に貧血が再現されているかについては報
告がない。第 II 章で *T. equiperdum* IVM-t2 株に 60 日間感染させた雌マウスでは、組織
学的に脾臓で髄外造血が認められたことから、感染マウスは貧血に陥っていたものと
推察された。そこで本章で行った感染実験では、感染実験期間中ヘマトクリット値を
測定し、持続的にマウスが貧血に陥っているかどうかについても検討した。

材料および方法

感染実験

6 週齢、雄の BALB/c マウス (BALB/cAJcl) および C57BL/6 マウス (C57BL/6JJcl) をそれぞれ 11 匹、株式会社日本クレアから導入した。10 日間飼育室に馴致した後、各マウス系統の 8 匹を感染群として、グルコース加滅菌 PBS を溶媒として 1×10^7 parasites/ml に調製した *T. equiperdum* IVM-t2 株を 0.1 ml 腹腔内投与した。対照群として、各マウス系統の 3 匹には滅菌 PBS を 0.1 ml 腹腔内投与した。感染実験の期間は、最初に原虫血症のピークが検出されてから 30 日間とした。末梢血中の原虫数を評価するために、感染材料投与後から 1-2 日間隔で尾静脈から採血を行い、第 II 章と同様の方法で原虫数をカウントした。この採血時に、体重測定も実施した。さらに、7 日間隔で尾静脈からヘマトクリット管 (Hirschmann, Eberstadt, Germany) を用いて約 $70 \mu\text{l}$ の採血を行い、12,000 rpm で 10 分間遠心を行い、ヘマトクリット値を測定した。原虫血症の値、体重、およびヘマトクリット値は平均値 \pm 標準偏差で示し、体重およびヘマトクリット値は感染群と対照群の値の差を Welch の *t* 検定で評価した。実験期間終了後、第 II 章と同様の方法で安楽殺を行い、剖検を行った。なお、実験期間中に沈鬱および運動量減少、著しい体重減少を認めた場合は、その日に安楽殺を実施し、直ちに剖検を行った。剖検時、雄性生殖器 (精巣、精巣上体、精囊、前立腺) を含む全身組織を採材し、10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。これら臓器は固定後、常法に従いパラフィンに包埋、薄切され、HE で染色し組織検査に供された。

免疫組織学的解析

組織中の原虫を検出するために、抗 *T. equiperdum* ウサギ血清を用いた免疫染色を行った。また、一部の組織切片では非特異反応が強く出たことから蛍光免疫染色も合わ

せて実施した。また、本章の以降の解析で使用した一次抗体の詳細は、Table 4 に記載した通りである。精巣上体に浸潤する炎症細胞の種類を特定するために、抗 CD3、抗 PAX5 (B リンパ球マーカー)、抗 Iba1、および抗 FOXP3 (制御性 T 細胞マーカー) 抗体を用いた免疫染色を実施した。精巣上体に浸潤するマクロファージのサブタイプを特定するために、M1 マクロファージのマーカーである抗 iNOS 抗体、および M2 マクロファージのマーカーである抗 CD204 抗体 (Lee, 2019; Zhang *et al.*, 2021)を用いた免疫染色を実施した。また、M1 マクロファージの分泌するサイトカインの一種である Tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Martinez *et al.*, 2006; Oakes, 2021)に対する免疫染色および蛍光免疫染色を行うために、抗 TNF- α 抗体を使用した。精巣上体管の基底膜構造を描出するために、抗 laminin 抗体を用いた蛍光免疫染色を実施した。さらに抗 Zonula occludens-1 (ZO-1)抗体を用いた免疫染色を行い、血液-精巣上体関門の構造が保持されているか評価した。精巣上体において、抗 caspase-3 抗体および抗 cytokeratin-19 抗体を用いた免疫染色を行い、アポトーシスに陥っている細胞の検出、および精巣上体管内でアポトーシスに陥っていた細胞の由来の同定を行った。なお、対照群の精巣上体の組織切片においても抗 CD3、PAX5、Iba1、FOXP3、laminin、ZO-1、および caspase-3 抗体を用いた免疫染色あるいは蛍光免疫染色を行い、感染群の結果と比較した。

免疫染色の手技は第 I 章で記述した通りである。ただし、FOXP3 の免疫染色では、二次抗体としてビオチン標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) およびホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (1:400, Dako, Glostrup, Denmark) をそれぞれ室温 30 分間反応させた。抗 iNOS および CD204 抗体の産生動物はマウスであったため、これら抗体を用いた免疫染色では Mouse on Mouse Polymer IHC Kit (Abcam, Cambridge, UK)を用いた。精巣上体の組織切片上で、アポトーシスに陥った上皮細胞と血液-精巣上体関門の崩壊の関連性を評価するために、抗 caspase-3 および ZO-1 抗体を用いた酵素抗体法に

よる二重免疫染色を実施した。二重免疫染色では、最初に抗 caspase-3 抗体を用いた免疫染色を DAB 発色で実施した後、抗体除去処理および抗原賦活化を兼ねて 97°C15 分間クエン酸マイクロウェーブで処理し、抗 ZO-1 抗体を用いた免疫染色を行った。ZO-1 の陽性反応は、VIP Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories)を用いて行い、メチルグリーン (Vector Laboratories) で対比染色を実施した。蛍光免疫染色では、抗ウサギ IgG (H+L) Fluorescein (1:400, Vector Laboratories) または Alexa Fluor 594-conjugated 抗ウサギ IgG (1:400, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を二次抗体として使用し、37°Cで 1 時間反応させた。それぞれの陰性コントロールには、一次抗体の産生動物に応じてウサギまたはマウスの正常血清 (Dako) と置き換えた。

免疫染色結果の半定量的解析

精巣上体における Iba1、iNOS、および TNF- α の免疫染色切片において、陽性反応を示した面積を算出し、精巣上体に浸潤するマクロファージの量を半定量的に解析した。1 枚の切片あたり、Olympus BX51 顕微鏡、DP72 カメラ、および 20 倍の対物レンズを用いて 5 枚の写真を撮影し、Fiji ソフトウェア (Schindelin *et al.*, 2012)を用いて、免疫染色に陽性を示す面積を算出し、平均値 \pm 標準偏差 (μm^2)で算出した。また、精巣上体における caspase-3 陽性を示す精巣上体管上皮細胞の数を、Olympus BX51 顕微鏡の対物レンズ 20 倍 10 視野でカウントし、平均値 \pm 標準偏差で算出した。感染群および対照群間での免疫染色における陽性面積、および caspase-3 陽性の上皮細胞の数は、Welch の *t* 検定で比較した。

C57BL/6 マウスの感染群は、実験初期ステージおよび実験後期ステージに分類し、ステージ間で結果を比較した。実験初期ステージは、感染後 10 日目に沈鬱のため安楽殺の対象となった 3 匹を、実験後期ステージは感染後 24 日目に沈鬱を呈し安楽殺の対象となった 1 匹および実験期間終了まで生存した 2 匹を含めた。

704

705 精巣上体におけるアポトーシスに陥った細胞の検出

706 精巣上体におけるアポトーシスに陥っている細胞を検出することを目的に、抗

707 caspase-3 抗体を用いた免疫染色に加え、Apoptosis in situ Detection Kit Wako (Wako, 大

708 阪, 日本)を用いて検討を行った。本キットは、Terminal deoxynucleotidyl transferase-

709 mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)法に基づいたものであり、パラフィン

710 包埋組織切片上で、アポトーシスに陥っている細胞を検出するものである。本キット

711 を用いた染色後、メチルグリーンで対比染色を行った。

712

結果

生存率、増体重率、原虫血症、およびヘマトクリット値

感染群の全ての BALB/c マウスは実験終了時（感染後 38 日目）まで生存した。一方で感染群の C57BL/6 マウスは、8 匹のうち 6 匹が感染後 10、13、17、24 日目に、沈鬱および体重減少を呈したため安楽殺され、2 匹が実験終了時まで生存した。両系統のマウス全体で比較すると、感染群と対照群の増体率に統計学的な有意差は認められなかった（Figure 8）。感染群の BALB/c マウスでは、最初の原虫血症が 2 匹で感染後 3 日目に、6 匹で感染後 6 日目に検出された。C57BL/6 マウスでは、全ての感染群マウスが感染後 6 日目に最初の原虫血症を呈した。両系統の全ての感染群マウスで、最初の原虫血症のピークは 8 日目であり、その後周期的に増減を繰り返す原虫血症が、実験終了時または実験期間途中で安楽殺されるまで継続的に認められた（Figure 9）。また、両系統の全ての感染群マウスでは、最初の原虫血症のピークが認められて以降、対照群よりも持続的にヘマトクリット値は低値を示した（Figure 10）。特に BALB/c マウスで感染後 15、22、29 日目の測定時、C57BL/6 マウスで感染後 8、15、36 日目の測定時には、感染群のヘマトクリット値は対照群のものよりも有意に低い値を示した。また感染群間では、BALB/c マウスよりも C57BL/6 マウスの方が、持続的にヘマトクリット値は低い値を示していた。

組織学的検索

感染群マウスの雄性生殖器のうち、両系統の全ての感染群の精巣上体で、精巣上体の頭部、体部、および尾部にかけてび慢性に広がる精巣上体炎が認められた。精巣上体間質には多量の炎症細胞が浸潤し、対照群の精巣上体と比較して間質の幅は拡大していた（Figure 11a-f）。なお、精巣上体炎の程度については、マウス系統間で明らか

な差は認められなかった。BALB/c マウス 1 匹および C57BL/6 マウス 2 匹（感染後 10 および 38 日目に安楽殺した個体）では、精巣上体炎に加えて、精巣上体管の組織構造の崩壊と精子肉芽腫の形成が認められた（Figure 12a）。また、一部の精巣上体管では、核が濃縮し、好酸性を増し凝集した細胞質を持つ球状化した上皮細胞が孤在性から散在性に観察された（Figure 12b）。精巣上体管内には凝集したクロマチンを有する核と、両染色性の凝集した細胞質を持つ円形細胞が散見された（Figure 12c）。これらの組織学的変化は、両系統の対照群では認められなかった。

精巣上体以外では、生殖器周囲の脂肪組織において、多巣性の中程度から重度の炎症細胞浸潤が全ての感染群マウスで認められた。この脂肪織炎の程度は、BALB/c マウスと C57BL/6 マウス間で明らかな差は認められなかったが、2 匹の C57BL/6 マウスでは脂肪壊死も伴っていた。なお、全ての感染群マウスで精巣、精囊、および前立腺の実質に著変は認められなかった。生殖器以外のその他の臓器における病変の分布は、第 II 章で報告したものと同様の分布であった。簡潔に記載すると、肝臓、腎臓、心臓、および肺に軽度から中程度の、坐骨神経周膜および周囲の結合組織、皮膚の真皮および皮下組織には中程度から重度の炎症細胞の浸潤を認めた。なお、腸管、膀胱、および脳には明らかな組織学的変化は認められなかった。対照群の全てのマウスの全身組織には明らかな病変は観察されなかった。

雄性生殖器におけるトリパノソーマの寄生部位

抗 *T. equiperdum* ウサギ血清を用いた免疫染色および蛍光免疫染色により、感染群で認められた精巣上体炎の部位と一致して、精巣上体間質に多量の原虫の寄生が認められた（Figure 13a）。間質の血管内には虫体は認められなかった。間質で認められた虫体は、トリパノソーマ特有の屈曲した長紡錘形の形態をしていた（Figure 13b）。また、蛍光免疫染色では、精巣上体間質で多数の陽性反応が検出されたことに加え、少

数ではあるものの、精巣上体管内にも陽性反応が認められた (Figure 13c)。虫体に対する陽性反応は精巣上体に加えて、生殖器周囲脂肪組織の脂肪織炎が認められた部位でも検出された。一方で、精巣、精嚢、および前立腺の実質では、感染群全てで免疫染色および蛍光免疫染色のいずれにおいても陽性反応は認められなかった。

精巣上体に浸潤する炎症細胞サブタイプの同定

両系統の感染群マウスで、精巣上体間質に浸潤する炎症細胞の大部分が Iba1 に陽性であり、CD3、PAX5、あるいは FOXP3 に陽性を示す炎症細胞は認められないか、認められたとしてもごくわずかであった (Figure 14a-d)。両系統の対照群マウスの精巣上体間質でもごく少数の Iba1 陽性細胞が検出されたものの、Iba1 に陽性を示す精巣上体間質の面積を比較したところ、両系統で感染群の方が、対照群よりも統計学的に有意に高い値を示していた (Figure 15)。また、C57BL/6 マウスの感染群の中では、実験期間初期ステージおよび後期ステージの間で、Iba1 陽性面積に統計学的に有意な差は認められなかった (Figure 15)。

感染群の精巣上体間質には、iNOS 陽性マクロファージおよび CD204 陽性マクロファージの双方が浸潤していた (Figure 16a, b)。iNOS 陽性を示す精巣上体間質の面積は、BALB/c マウスで最大で、C57BL/6 マウス実験後期ステージ、C57BL/6 マウス実験初期ステージの順で大きい傾向にあった (Table 5)。同様の傾向は、iNOS 陽性面積と Iba1 陽性面積の比率を比較した際にも認められた (Table 5)。両系統の感染群マウスで認められた精子肉芽腫周囲には、肉芽腫を取り囲むように Iba1 陽性マクロファージが浸潤しており (Figure 16c)、これらマクロファージは iNOS には陰性で (Figure 16d)、CD204 には陽性を示した (Figure 16e)。TNF- α に対する免疫染色では、陽性反応は多巣性からび漫性に、両系統の感染群の精巣上体間質で観察された (Figure 16f)。TNF- α に陽性を示した精巣上体間質の面積は、BALB/c マウスで最大で

C57BL/6 マウス実験後期ステージ、C57BL/6 マウス実験初期ステージの順で続いた。

しかし、いずれの群間を比較しても統計学的な有意差は認められなかった (Table 5)。

精巣上体管の組織構造の崩壊

抗 laminin 抗体を用いた蛍光免疫染色では、対照群の精巣上体では、精巣上体管の基底膜が連続する一重の膜構造として鮮明に描出されたのに対し (Figure 17a)、感染群の精巣上体では、基底膜構造は不連続で不鮮明であった (Figure 17b)。

対照群では、精巣上体に caspase-3 陽性反応は検出されなかった (Figure 18a) 一方で、感染群では多数の caspase-3 陽性反応が認められた (Figure 18b)。caspase-3 に陽性を示したのは、大部分が精巣上体管の上皮細胞であったが、一部の間質に浸潤する炎症細胞でも陽性反応を示した。また、精巣上体管内に認められた円形細胞も caspase-3 で陽性に染色された (Figure 18c)。これら円形細胞は、精巣上体管上皮細胞のマーカである cytokeratin 19 にも陽性を示した (Figure 18d)。caspase-3 に陽性を示す精巣上体管の上皮細胞の数は、いずれの感染群 (BALB/c マウス、C57BL/6 マウス実験初期ステージ、C57BL/6 マウス実験後期ステージ) 間でも明らかな差は認められなかった (Table 5)。Apoptosis in situ Detection Kit Wako を使用した染色では、対照群ではアポトーシス細胞は検出されなかった (Figure 18e)。一方で、感染群では陽性反応が上皮細胞を中心に、間質の炎症細胞および精巣上体管内で認められた円形細胞でも認められた (Figure 18f)。この結果は、caspase-3 陽性細胞の分布と一致するものであった。

対照群の精巣上体では、ZO-1 陽性反応は精巣上体管の上皮細胞の管腔側の細胞膜で認められ、それらは連続する一重の膜のように精巣上体管内腔の表面を覆っていた (Figure 19a)。一方で感染群では、精巣上体管で認められる ZO-1 の陽性反応は不連

809 続であり、一部で消失していた。抗 caspase-3 および抗 ZO-1 抗体を用いた二重染色で
810 は、ZO-1 陽性反応の消失は、多くの場合で caspase-3 に陽性を示す上皮細胞の集簇と
811 関連していた (Figure 19b)。ただし、caspase-3 陽性上皮細胞が認められない領域で
812 も、限局的に ZO-1 陽性反応の消失が認められる部分も存在した (Figure 19c)。

考察

本章では、*T. equiperdum* を感染させた BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスの雄性生殖器を病理組織学的に解析した。その結果、両系統の感染群で、間質への炎症細胞浸潤を特徴とする重度な精巣上体炎が認められることが明らかになった。過去の媾疫罹患雄ウマの症例報告では、間質の炎症細胞浸潤によって特徴付けられる精巣炎および精巣上体炎が認められたことが報告されている (Yasine *et al.*, 2019a; Yasine *et al.*, 2019b)。また、これらの組織から *T. equiperdum* の DNA が PCR により増幅されたことから、精巣や精巣上体に原虫が寄生していることが推察されている (Yasine *et al.*, 2019a; Yasine *et al.*, 2019b)。本研究の感染マウスで認められた精巣上体炎は、媾疫罹患雄ウマで報告された精巣上体炎と組織学的に類似するものであった。さらに、抗 *T. equiperdum* ウサギ血清を用いた免疫染色および蛍光免疫染色では、虫体は主に精巣上体間質の炎症巣に寄生していることが明らかになった。

本研究では全ての感染群マウスで精巣上体炎が認められた一方で、精巣や副生殖腺実質には組織学的に著変は認めず、免疫染色でも虫体は検出されなかった。媾疫罹患雄ウマの病理解析を行った先行研究では、罹患雄ウマの雄性生殖器では精巣炎と精巣上体炎が認められたことが報告されている。しかし、これら症例は自然発生病例であり、詳細な臨床経過は記載されていなかった (Yasine *et al.*, 2019a)。一般的に媾疫罹患馬が辿る臨床経過は数カ月単位の長い期間である (OIE, 2013)。一方で本研究では、全ての感染群マウスは感染後 40 日以内に安楽殺され剖検に供された。本研究の感染マウスいずれでも精巣炎は認められなかったが、その原因として、感染期間（臨床経過）の長さ、あるいはマウスおよびウマの *T. equiperdum* に対する感受性の違いに起因している可能性が考えられる。ただし、これまで媾疫罹患馬の生殖器の病理学的解析の先行研究は、数例の症例報告に限られていることを考慮すると、罹患雄ウマにおける精

837 巣炎および精巣上体炎の有病率を明らかにするための大規模な組織学的研究も必要で
838 ある。

839 精子は精巣の精細管で作られ、精巣上体管で徐々に成熟していく。精細管および精
840 巣上体管を構成する上皮細胞は、互いにタイトジャンクションにより結合し、血液-精
841 巣関門および血液-精巣上体関門を形成している。これらの関門が、精子が精巣間質や
842 精巣上体間質に侵入するのを防ぎ、宿主の免疫機構が精子に働くのを妨げている。し
843 たがって、精細管や精巣上体管の内腔は、宿主の免疫反応が及ばない免疫特権部位と
844 なっている (Hedger, 2011; Foster, 2016)。本章で実施した実験では、宿主の免疫から逃
845 れることのできる精巣上体管内に寄生するトリパノソーマはわずかであった。一方
846 で、精巣上体の間質には多量のトリパノソーマが寄生しており、同部には虫体に宿主
847 免疫が反応して多量のマクロファージが浸潤していた。さらに両系統のマウスの一部
848 の例の精巣上体炎では、精子肉芽腫の形成も伴っていた。精子肉芽腫は、精子が血液-
849 精巣関門あるいは血液-精巣上体関門を越えて間質に侵入した場合、宿主の免疫が精子
850 に働いた結果形成されるものである (Foster, 2016)。したがって、管腔内のトリパノソ
851 ーマ、および精子肉芽腫の形成といった組織所見は、血液-精巣上体関門の崩壊を示唆
852 する所見である。さらに、抗 ZO-1 抗体を用いた免疫染色では、感染群の精巣上体で
853 は多巢性に陽性反応が消失していた。ZO-1 は、血液-精巣上体関門を形成している精
854 巣上体管上皮細胞間のタイトジャンクションを形成する主要タンパク質の一種であ
855 る。抗癌剤ブスルファンの投与がマウスの精巣上体の機能に与える影響を検討した研
856 究や、ジカウイルス感染がマウスの生殖能力に与える影響を検討した先行研究でも、
857 精巣上体における ZO-1 の発現低下は、血液-精巣上体関門の機能低下と関連すること
858 が報告されている (Fang *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2021)。以上のことより、本研究の抗
859 ZO-1 抗体を用いた免疫染色の結果は、感染群マウスでは血液-精巣上体関門の機能が
860 低下していたことを支持するものである。

抗 CD3、PAX5、FOXP3、および Iba1 抗体を用いた免疫染色の結果より、感染群マウスの精巣上体間質に浸潤する炎症細胞は、大部分がマクロファージであることが明らかになった。一般的に、マクロファージはその機能から、M1 あるいは M2 マクロファージの 2 種類に大別される。M1 マクロファージは旺盛な貪食能と抗原提示能に優れ、炎症性サイトカインを分泌し、炎症を惹起する。一方で M2 マクロファージは炎症性サイトカインを分泌し、炎症を抑制するとともに、炎症で傷害された組織を修復する役割を担っている (Martinez *et al.*, 2006; Sica and Mantovani 2012; Atri *et al.*, 2018)。TNF- α は、M1 マクロファージから産生される炎症性サイトカインの一種である (Martinez *et al.*, 2006)。本章では、M1 マクロファージと M2 マクロファージの双方が、精巣上体間質に浸潤しており、それら炎症巣では、抗 TNF- α 抗体を用いた免疫染色で陽性反応が多巣性からび漫性に認められた。TNF- α は M1 マクロファージの他にも、肥満細胞あるいは T リンパ球によっても産生される場合がある (Oakes, 2021)。本研究では、精巣上体間質には肥満細胞は認められず、CD3 に陽性を示す T リンパ球は少数であったことから、精巣上体間質における TNF- α の産生源は、間質に浸潤している M1 マクロファージであると考えられた。

TNF- α は炎症を促進するサイトカインの一種であるが、その他の機能としてタイトジャンクションの機能を低下させる可能性があることが指摘されており、特にその関連性はヒトの炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease) で広く研究されている (Bhat *et al.*, 2019)。炎症性腸疾患は、消化管における難治性の糜爛と潰瘍が特徴であり、これらは粘膜免疫の不適切な活性化によって引き起こされると考えられている (Gill and Kakar, 2021)。具体的には、粘膜固有層における M1 マクロファージから分泌される TNF- α が、腸管粘膜の上皮細胞にアポトーシスを誘導させることが報告されている (Lissner *et al.*, 2015; Gill and Kakar, 2021)。さらに、TNF- α は、腸管粘膜の上皮細胞間のタイトジャンクションを構成するタンパク質を直接的に変性させ、タイトジャンクシ

885 ヨンの機能を低下させる可能性も指摘されている。このことは、炎症性腸疾患患者の
886 腸管上皮細胞における ZO-1 の発現が減弱あるいは消失していることから裏付けら
887 れている (Lissner *et al.*, 2015; Gill and Kakar, 2021)。また炎症性腸疾患の腸管に限ら
888 ず、ヒトの急性肺炎のマウスモデルにおける肺や、生殖毒性を有する物質を投与した
889 マウスの精巣をはじめとする、様々な臓器でも TNF- α が上皮細胞間の ZO-1 発現を低
890 下させることが報告されている (Mazzon and Cuzzocrea, 2007; Ghafouri-Fard *et al.*,
891 2021)。本研究の感染群マウスでは、アポトーシスに陥った精巣上体管の上皮細胞が多
892 巢性に認められた。また、抗 caspase-3 および ZO-1 抗体を用いた二重免疫染色では、
893 アポトーシスを起こした上皮細胞が集簇している部位で ZO-1 の陽性反応が低下また
894 は消失していたことが明らかになった。抗 TNF- α および抗 iNOS 抗体を用いた免疫染
895 色の結果も考慮すると、精巣上体間質に浸潤している M1 マクロファージから分泌さ
896 れた TNF- α が、精巣上体管の上皮細胞のアポトーシスを引き起こすことで、血液-精
897 巣上体関門が崩壊している可能性がある。また、アポトーシスに陥っている細胞の集
898 簇が認められない箇所でも ZO-1 陽性反応の低下が認められた。このことから、TNF-
899 α が上皮細胞の細胞膜に局在する ZO-1 の発現を、アポトーシスを介した間接的な影
900 響ではなく、直接的に低下させている可能性も考えられた。*T. equiperdum* の伝播戦略
901 を考えると、精巣上体間質に寄生しているトリパノソーマは精巣上体管腔内に侵入す
902 る必要があるが、その際にはトリパノソーマを攻撃するために浸潤してきた M1 マク
903 ロファージから分泌される TNF- α の組織侵襲能を利用している可能性が考えられた。
904 一般的に、炎症巣に浸潤するマクロファージのサブタイプは、炎症のステージによ
905 って大きく変化する。炎症の初期ステージには M1 マクロファージが主体となり、炎
906 症が進行し後期ステージとなると M2 マクロファージが優位なサブタイプとなる (Liu
907 *et al.*, 2014)。本研究では、C57BL/6 マウスの感染群のうち 6 匹が感染後 10-24 日に状態
908 悪化を理由に安楽殺され、2 匹が感染後 38 日目となる実験終了時まで生存した。しか

し、いずれの感染後日数で剖検に供されたマウスでも重度な精巣上体炎が認められ、また浸潤するマクロファージは M1 および M2 マクロファージの 2 つのサブタイプのマクロファージが混在していた。C57BL/6 マウスの感染群において、実験初期ステージ(感染後 10 日目で安楽殺された 3 匹)および実験後期ステージ(感染後 24 日目または 38 日目で安楽殺された 3 匹)の間で免疫染色の結果を比較すると、iNOS に陽性を示す面積、TNF- α に陽性を示す面積、および iNOS 陽性面積と Iba1 陽性面積の比率は全て、初期ステージよりも後期ステージで高い値を示した。いずれの感染後日数でも、精巣上体にはトリパノソーマの寄生が認められたことを考慮すると、トリパノソーマは少なくとも感染後 10 日目より精巣上体の間質に寄生し宿主の免疫反応を惹起するとともに、M1 マクロファージの持続的な浸潤および、優位なサブタイプが M2 マクロファージに完全に移行することを妨げている可能性が考えられた。

今回、感染群のうち 1 匹の BALB/c マウスおよび 2 匹の C57BL/6 マウス(感染後 10 日目または 38 日目に安楽殺された個体)で精子肉芽腫の形成が認められた。これらの精子肉芽腫は、感染後日数やマウス系統に関わらず、CD204 に陽性を示す M2 マクロファージでのみ囲まれていた。著者の知る限り、精子肉芽腫が形成される過程でそれを取り囲むマクロファージのサブタイプの変化を明らかにした先行研究はない。精子肉芽腫は一種の異物に対する宿主免疫の応答である。そのような免疫反応の中でもマクロファージは重要な役割を担うが、異物に対する免疫応答において、浸潤するマクロファージのサブタイプの種類や、それがどのように変化していくかについては研究間で差異があり、一定の知見が得られていないのが現状である (Martin and García, 2021)。したがって、感染群マウスで認められた精巣上体炎では M1 および M2 マクロファージ双方が間質に浸潤していた一方で、精子肉芽腫は M2 マクロファージでのみ囲まれていた理由については明らかにできなかった。いずれにせよ、感染後 10 日目のマウスですでに精子肉芽腫が認められたことから、少なくとも感染後 10 日目よりも以

933 前の、感染後から比較的早い段階ですでに精子肉芽腫が形成されていたことは興味深
934 い点である。

935 本章で行った感染実験では、実験期間中定期的にヘマトクリット値を評価したとこ
936 ろ、両系統のマウスで感染群は対照群よりも低いヘマトクリット値を継続的に示し
937 た。また、C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを比較すると、対照群では系統間で大き
938 な差はなかった一方で、感染群では C57BL/6 マウスでより低いヘマトクリット値を呈
939 した。したがって、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスでは、媾疫罹患馬が慢性的に呈
940 する主要な臨床症状の一つである貧血 (OIE, 2013; Gizaw *et al.*, 2017)を再現することが
941 可能であることが示された。また本章では、貧血の程度と原虫血症の増減との間に関
942 連性は認められなかった。これまで媾疫罹患馬が呈する貧血の病理発生機序は不明で
943 あるが、*T. equiperdum* に限らず貧血は他のトリパノソーマ症でも広く見られる臨床症
944 状である。特に *T. b. brucei* では研究が進められ、貧血の発症機序の解明が進んでい
945 る。*T. b. brucei* 感染動物では、虫体に対する免疫応答が作動すると、インターフェロ
946 ンを介し M1 マクロファージが活性化される。この M1 マクロファージ由来のサイト
947 カインが、虫体由来の物質とともに作用すると赤血球の寿命が短縮するほか、脾臓や
948 肝臓における M1 マクロファージの赤血球貪食を活性化し、これにより貧血が生じる
949 とされている (Stijlemans *et al.*, 2008; Stijlemans *et al.*, 2010; Musaya *et al.*, 2015; Stijlemans
950 *et al.*, 2018)。本章では、C57BL/6 マウス感染群では BALB/c マウス感染群よりも重度
951 な貧血を呈していた。C57BL/6 マウスは Th1 優位の、BALB/c マウスは Th2 優位の免
952 疫系を有しており、特に Th1 優位な C57BL/6 マウスは病原体感染時のインターフェロ
953 ン産生能および M1 マクロファージ活性化能が高いことが知られている (Mills *et al.*,
954 2000)。したがって、本章で認められた C57BL/6 マウスにおける重篤な貧血も、マウス
955 間の免疫系の違いによって引き起こされている可能性があり、*T. equiperdum* が宿主に
956 貧血を引き起こす機序についても、*T. b. brucei* と一部共通である可能性がある。ただ

957 し、本章では貧血の病理発生機序解明を試みたものではなく、また媾疫罹患馬での知
958 見も乏しいことから、貧血の病理発生機序解明にはさらなる研究が必須である。

小括

本章では、第 II 章で雌マウスに長期間感染が成立することが確認された *T. equiperdum* IVM-t2 株を雄マウスに感染させ、感染雄マウスが持続的に貧血を呈することを明らかにした。また、感染雄マウスの雄性生殖器を組織学的に検索したところ、梅毒罹患馬で認められる特徴的な雄性生殖器病変の一つである精巣上体炎と組織学的に類似する精巣上体炎が全ての感染マウスで認められた。さらに免疫組織学的な検討を行い、虫体はマウスの精巣上体間質に寄生していることを明らかにした。また感染マウスでは、管腔内にも少数の虫体が認められたこと、精巣上体管の上皮細胞がアポトーシスに陥っていること、血液-精巣上体関門を構成する ZO-1 の発現低下または消失が認められたこと、一部のマウスでは精子肉芽腫が形成されていたことなど、精巣上体-血液関門の破綻を示唆する複数の所見が認められた。精巣上体間質には、M1 マクロファージが多数浸潤し、M1 マクロファージが分泌する TNF- α に対する免疫染色でも陽性像が多巣性からび慢性に認められた。

自然界では *T. equiperdum* は性交によって伝播されることを考慮すると、マウスの精巣上体間質に寄生する虫体は血液-精巣上体関門を越えて管腔内に侵入する必要がある。本章で得られた結果より、その際にはトリパノソーマを攻撃するために浸潤してきた M1 マクロファージから分泌される TNF- α の組織侵襲能を利用している可能性が考えられた。

981

第 IV 章

982

Trypanosoma equiperdum のマウス性交感染モデル確立に

983

向けた予備的検討

984

緒言

トリパノソーマ属原虫の中でも、*T. equiperdum* は伝播に媒介昆虫を必要としない唯一のトリパノソーマ原虫であり、性交により伝播されることが特徴である (OIE, 2013; Ahmed *et al.*, 2018)。*T. equiperdum* の伝播は、感染雌ウマから雄ウマよりも、感染雄ウマから雌ウマでより高頻度に起こるとされてるが、原虫が生殖器から宿主の組織へと侵入する機序は不明である (Gizaw *et al.*, 2017)。

本研究の第 II および III 章では、腹腔内投与で *T. equiperdum* を実験的に感染させたマウスを病理組織学的に解析した。特に、第 III 章では、雄性生殖器に寄生する原虫が性交感染を成立させるために、組織の実質外に脱出する機序の一端について考察した。しかし、腹腔内投与で感染させたマウスは、原虫が宿主に侵入する機序を実験病理学的に解析するモデルとしては不十分である。原虫が宿主の組織に侵入する機序を明らかにするためには、*T. equiperdum* の自然界での感染経路と同様に、生殖器経由で原虫を感染させるマウスモデルの確立が望まれる。本章では、腹腔内投与で *T. equiperdum* に実験感染させた雄マウスを雌マウスと交配させ、原虫がマウス間で伝播されるか検討した。

1003 材料及び方法

1004

1005 感染実験

1006 6 週齢の BALB/c 雄マウス 5 匹および BALB/c 雌マウス 9 匹（雌雄ともに
1007 BALB/cAJcl）を株式会社日本クレアから導入した。1 週間の馴致期間の後、5 匹の雄
1008 マウスに *T. equiperdum* IVM-t2 株を 1×10^7 parasites/ml に調製した投与材料を 0.1 ml 腹
1009 腔内に投与した。感染後 10 日目まで第 II および III 章と同様の手技で末梢血原虫数を
1010 評価し、感染後 10 日目から 14 日間、それぞれの雄マウスを無処置雌マウス 1 匹と連
1011 続的に同居させた。同居解消後、雄マウスは第 II および III 章と同様の手法で安楽殺
1012 し、剖検を行い、雄性生殖器を採材した。雌マウスは、同居解消後 5 日間毎日、末梢
1013 血原虫数を評価し、その後同様の手法で安楽殺し、剖検を行い、雌性生殖器を採材し
1014 た。

1015 また性交以外で原虫が伝播される可能性を排除するため、感染雌マウスと無処置雌
1016 マウスの同居も、上述したスケジュールと合わせて行った。すなわち雌マウス 2 匹に
1017 1×10^7 parasites/ml に調製した *T. equiperdum* IVM-t2 株を 0.1 ml 腹腔内に投与し、感染後
1018 10 日目まで末梢血原虫数を評価した。感染後 10 日目から 14 日間無処置雌マウスと同
1019 居させた。同居解消後、腹腔内投与で感染させた雌マウスは安楽殺し、無処置雌マウ
1020 スは末梢血原虫数を同居解消後から 5 日間毎日評価した後安楽殺し、雌性生殖器を採
1021 材した。

1022

1023 組織学的解析

1024 採材された雄性および雌性生殖器は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従
1025 いパラフィンに包埋、薄切され HE で染色し組織検査に供された。HE 染色切片を用い
1026 た組織検査に加え、組織中の原虫を検出することを目的に、抗 *T. equiperdum* ウサギ血

- 1027 清を用いた免疫染色も併せて実施した。なお、免疫染色の手技は第 I 章に記したもの
- 1028 と同様であり、ネガティブコントロールにはウサギ正常血清 (Dako, Glostrup,
- 1029 Denmark) を使用した。

結果

腹腔内投与で感染させた雄マウス 5 匹のうち、1 匹が感染後 3 日目より、4 匹が感染後 5 日目から、無処置雌マウスと同居を開始する感染後 10 日目の測定まで、原虫血症が継続的に認められた。感染雄マウスと無処置雌マウスの同居解消後、雌マウスの末梢血原虫数を 5 日間連続的に評価したが、いずれのマウスからも虫体は検出されなかった。組織学的に、腹腔内投与で感染させた雄マウスでは、間質への炎症細胞浸潤を特徴とする精巢上体炎が全例で認められた (Figure 20a)。また、これらの精巢上体では、第 III 章と同様に上皮細胞にアポトーシス小体が散見された他、管腔内に脱落している円形細胞も観察された。腹腔内投与で感染させた雄マウスと同居させた雌マウスの膣および子宮では、いずれも著変は認められなかった (Figure 20b)。また、膣および子宮の実質や内腔においても免疫染色で虫体は検出されなかった。剖検および組織検査では、いずれの雌マウスでも妊娠は確認されなかった。

腹腔内投与で感染させた雌マウス、および無処置雌マウスの同居実験では、感染雌マウスで感染後 5 日目から同居を開始させる 10 日目まで継続的に原虫血症が認められた。腹腔内投与感染雌マウスと同居させた無処置雌マウスでは、同居解消後 5 日間原虫血症の有無を評価したが、いずれの測定日でも検出されなかった。組織学的に腹腔内投与感染マウスでは、第 II 章と同様に、固有層から筋層にかけてのび慢性の炎症細胞浸潤を特徴とする膣炎が認められた (Figure 20c) 一方で、同居させた無処置雌マウスの子宮および膣で著変は認められなかった (Figure 20d)。

考察

T. equiperdum をマウスに感染させる多くの先行研究は、原虫の増幅を目的としていたため、腹腔内投与で原虫をマウスに感染させている (Hagos *et al.*, 2010a; Perrone *et al.*, 2018; Gillingwater, 2019)。また本研究の第 II および III 章でも、マウスに感染を確実に成立させるために腹腔内投与で原虫を感染させた。したがって、自然界と同様の *T. equiperdum* の性交による伝播を、マウスを含めた実験動物で再現を試みた研究は行われていない。しかし、原虫の宿主組織への侵入機序解明という部分に焦点を当てると、性交により感染するマウスモデルを確立する意義は大きい。

マウスの発情周期は発情前期、発情期、発情後期、発情間期の 4 段階に区分され、4-5 日周期で繰り返される (Allen, 1922)。本章では、雌雄のマウスを 14 日間連続的に同居させており、雌マウスは同居間に発情期を 2-3 回迎えることが予想される。今回、いずれの雌雄のペアでも妊娠は確認されず、原虫の伝播も確認されなかった。*T. equiperdum* は自然界では性交によって伝播するが、原虫が常に生殖器内腔に寄生しているわけではなく、媾疫罹患馬と性交を行えば常に原虫が伝播されるわけではない (Vulpiani *et al.*, 2013; Gizaw *et al.*, 2017)。また、*T. equiperdum* が媾疫罹患馬の呈する長い臨床経過の中で、どの時期に生殖器内腔に侵入し、性交によって伝播されるかは不明である (Gizaw *et al.*, 2017)。今回、感染後 10 日目から 14 日間、感染雄マウスを無処置雌マウスと同居させたが原虫の伝播が成立しなかったことから、少なくともこの期間には雄マウスの生殖器内腔に虫体が出現しなかった可能性がある。マウス間で *T. equiperdum* の性交による伝播を成立させるためには、様々な感染ステージによる交配を試みていく必要があると考えられた。

雄マウスと雌マウスの連続同居にも関わらず交配が成立しない場合は、14 日目がペアの変更の目安とされている (Jimenez, 2014)。本章ではいずれのペアでも妊娠が成立

しなかったことを考慮すると、その原因は雄マウスおよび雌マウス間の相性による可能性は低く、雄マウスの生殖能力が低下している可能性が考えられた。精巣上体は、精巣で形成された精子が精巣上体管を通過する間に、受精能及び運動性を獲得する組織として重要である (Orgebin-Crist, 1967; Bedford, 1967)。精子は精巣上体管を通過する間に受精に備え、核や先体の形態、細胞内小器官の局在、および細胞膜の生化学的性状を変化させることが知られている (Cornwall, 2009)。これら精子の変化は主に精巣上体管を構成する上皮細胞から分泌されるタンパク質や、間質の血管から供給される様々な分子によって制御されている。これら分子の制御において、上皮細胞の中でも数が多く分泌能力の高い主細胞や、主細胞が形成する血液-精巣上体関門は重要な役割を担う (Turner *et al.*, 2003; Dubé and Cyr, 2012)。第 III 章で *T. equiperdum* 実験感染雄マウスでは、精巣に著変はなく精子の形成も認められた一方で、精巣上体では上皮細胞がアポトーシスに陥っていることが示され、血液-精巣上体関門の機能が低下している可能性が示唆された。本章でも、感染雄マウスでは、第 III 章の感染雄マウスで認められた精巣上体炎と同様の組織学的特徴を有する精巣上体炎が認められ、これら精巣上体の病変は、少なくとも剖検に供された時点では精子の成熟およびマウスの生殖能力に影響を及ぼす可能性がある。一方で梅毒罹患雄ウマでは、精巣上体炎が認められることが報告されているが (Yasine *et al.*, 2019a)、精巣上体炎が繁殖能力に与える影響については検討されていない。今後マウス間で *T. equiperdum* の性交による伝播を成立させるためには、精巣上体炎と雄マウスの繁殖能力との関連性の評価も必要であると考えられた。

小括

腹腔内投与によって *T. equiperdum* を感染させた雄マウスを、無処置雌マウスと交配させるために 2 週間同居させ、*T. equiperdum* の性交によるマウス間の伝播を試みた。しかし、同居解消後、雌マウスの末梢血から原虫は検出されず、また膣および子宮に組織学的に炎症や原虫は観察されなかった。またいずれの雌マウスでも妊娠は確認されなかった。一方で腹腔内投与で感染させた雄マウスでは、第 III 章と同様の精巢上体炎が認められた。今回、妊娠が成立しなかった理由として、精巢上体炎が精子の成熟に影響を及ぼし生殖能力を低下させた可能性が考えられた。

今回、感染後 10 日目から 14 日間と非常に限られた期間を交配期間として設定したが、少なくともこの期間には雄マウスの生殖器内腔に虫体が出現しなかった可能性も考えられる。今後、*T. equiperdum* のマウス性交感染モデルを確立するためには、感染から交配までの期間を検討するなどさらなる試行が必要であるほか、*T. equiperdum* が雄マウスの生殖能に与える影響を解析していく必要がある。

総合考察

媾疫は、*Trypanosoma equiperdum* の感染により引き起こされるウマ科動物のトリパノソーマ症である。罹患馬は、生殖器の浮腫や神経症状など多様な臨床症状を呈し、数カ月単位の慢性的な臨床経過の中で徐々に衰弱し、やがて罹患馬の半数以上が死亡する (OIE, 2013; Gizaw *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018)。媾疫の高い致死率や、罹患馬の衰弱といったことから、蔓延国では家畜産業が大きな打撃を受けているにも関わらず、適切な治療法が確立されていないのが現状である (OIE, 2013)。その背景に、媾疫罹患馬が呈する様々な症状や肉眼および組織病変の病理発生機序、さらに *T. equiperdum* の寄生戦略について不明な点が多く残されていることが挙げられる。本研究では、まず媾疫罹患馬が呈する症状のうち、ウマの家畜生産性や QOL (Quality of Life) に最も影響を及ぼす神経症状に着目し、その病理発生機序解明を目的に第 I 章の研究を実施した。第 I 章で自然発生例の解析を進める中で、さらなる詳細な解析のためには、これまで未確立であった媾疫罹患馬が呈する症状や病変の一部を再現するマウスモデルの確立とそれを用いた解析が必須であると考え、第 II、III、および IV 章の研究を実施した。

第 I 章では、媾疫に罹患したと診断されたウマ 4 例の末梢神経炎を解析したところ、臨床ステージ (Claes *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2018)に関わらず、また顔面麻痺や後肢の麻痺といった神経症状との関連に関わらず、浸潤する炎症細胞のサブタイプは同一で、T リンパ球では CD8 陽性 T リンパ球が、マクロファージは CD204 と Arginase 陽性の M2 マクロファージが主要なサブタイプであった。このうち特に M2 マクロファージは一般的には、炎症の後期ステージにおいて優位なサブタイプとなる炎症細胞である (Martinez *et al.*, 2006; Sica and Mantovani, 2012; Atri *et al.*, 2018)。今回、臨床ステージ 1 (初期ステージ) に分類されるウマの末梢神経や神経症状と関連しない末梢神

経でも M2 マクロファージが優位であった。したがって、神経症状は臨床ステージ 2 から 3 の感染後期から末期ステージで認められる臨床症状であるが (Hagos *et al.*, 2010b; Vulpiani *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2018)、末梢神経炎自体は感染後の比較的早い時期ですでに生じている可能性が考えられた。しかし、これら末梢神経炎の病理発生機序については明らかにできなかった。末梢神経炎をはじめとした媾疫罹患馬で認められる病変の病理発生機序を解明するためには、媾疫罹患馬特有の病変を再現する実験動物モデルの確立とそれを用いたさらなる解析が必要と考えられた。

第 II 章では、*T. equiperdum* IVM-t2 株に感染した BALB/c 雌マウスおよび一部の C57BL/6 雌マウスは、60 日間にわたって増減を繰り返す原虫血症を呈していたことから、この株は雌マウスに数カ月単位の長期間感染することのできる稀有な株であることが明らかになった。これらの感染マウスを病理組織学的に解析したところ、第 I 章で着目した末梢神経では、末梢神経の周膜および周囲結合組織にリンパ球およびマクロファージ主体の炎症細胞浸潤が認められ、周囲結合組織には多量の虫体が検出された。一方で、媾疫罹患馬で認められる末梢神経炎では、炎症細胞の浸潤は神経線維束間にまで及ぶなど (Pascucci *et al.*, 2013; Mungun-Ochir *et al.*, 2019; Yasmine *et al.*, 2019a)、炎症細胞の分布に相違があった。そのため、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスで認められた末梢神経病変は、媾疫罹患馬で認められる末梢神経炎とは異なる病理組織学的性状であった。罹患馬の膺炎は、組織学的に粘膜固有層から筋層に至るまでの多巢性の炎症細胞浸潤が特徴である。これら組織からは *T. equiperdum* の DNA が検出されていることから、虫体は膺に寄生していることが疑われている (Yasmine *et al.*, 2019a; Yasmine *et al.*, 2019b)。また、罹患馬の皮膚病変は、組織学的に真皮における炎症細胞の浸潤と虫体の寄生が特徴である (Scacchia *et al.*, 2011; Pascucci *et al.*, 2013)。*T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスでも、虫体の寄生を伴う膺炎、真皮および皮下組織に虫体の寄生を伴う皮膚炎が認められ、これらの組織学的特徴は媾疫罹患馬で認められ

るものと概ね一致していた。以上のことより、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染雌マウスは、媾疫罹患馬が呈する臨床症状および組織病変の一部を再現できることから、媾疫の病態を解明していくための有用なツールになると考えられた。

第 III 章では、*T. equiperdum* IVM-t2 株に感染した BALB/c 雄マウスおよび C57BL/6 雄マウスの雄性生殖器に着目し、感染マウスで認められる精巣上体炎の病理組織学的性状を明らかにした。媾疫罹患雄ウマでは、精巣上体炎や精巣炎が認められ、これら組織から *T. equiperdum* の DNA が検出されることが報告されているが、組織学的な研究は限られ、原虫の寄生部位は不明であった (Yasine *et al.*, 2019a)。今回、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染雄マウスでは、精巣上体間質に虫体が寄生していることが明らかにになった。*T. equiperdum* は性交によって伝播される (OIE, 2013)ことを考えると、精巣上体間質に寄生する原虫は精巣上体管腔内に侵入する必要がある。感染マウスの精巣上体では、精巣上体管の上皮細胞がアポトーシスを起こしており、上皮細胞間のタイトジャンクションを構成する主要タンパク質である ZO-1 (Fang *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2021)の免疫染色における陽性像が低下または消失していた。さらに、精子肉芽腫の形成や管腔内に虫体が検出されるなど、血液-精巣上体関門の破綻を示唆する所見が認められた。また、精巣上体間質に M1 マクロファージが多数浸潤しており、免疫染色にて M1 マクロファージが分泌する炎症性サイトカインの一種である TNF- α (Martinez *et al.*, 2006; Oakes, 2021)への陽性像が多巣性からび漫性に認められた。様々な疾患に関する先行研究では、TNF- α は上皮細胞にアポトーシスを起こし間接的に ZO-1 発現を低下させ、タイトジャンクションの機能を減弱させることが報告されている (Mazzon and Cuzzocrea, 2007; Lissner *et al.*, 2015; Gill and Kakar, 2021; Ghafouri-Fard *et al.*, 2021)。以上のことより、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染マウスの精巣上体でも TNF- α によりタイトジャンクション機能の減弱または消失が起きていると考えられた。すなわち、間質にいる原虫は、自身を攻撃するために浸潤してきた M1 マクロファージが分

泌する TNF- α の組織侵襲能を利用して、血液-精巣上体関門を破綻させて精巣上体管腔内に侵入していく可能性が考えられた。

今回、第 II 章では雌マウス、第 III 章では雄マウスを用いた感染実験を行ったが、雌雄ともに BALB/c マウスの方が C57BL/6 マウスに比べて高い生存率を示した。*T. equiperdum* 以外のトリパノソーマ属原虫のマウスを用いた感染実験では、感染マウスの死因として全身性の炎症反応症候群 (Shi *et al.*, 2003; Magez *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2006)、貧血、腎不全 (Menezes *et al.*, 2004)、または原虫の脳への浸潤による脳障害が挙げられている (Antoine-Moussiaux *et al.*, 2008)。*T. equiperdum* IVM-t2 株感染雌マウスおよび雄マウス共に、腎臓に腎不全を示唆する組織学的な変化はなく、脳にも原虫の浸潤は認められなかった。一方で第 II 章では感染雌マウスの脾臓で髄外造血が認められ、第 III 章では両系統の感染群で低ヘマトクリット値が検出され、特に C57BL/6 マウスでその値は低値を示した。したがって *T. equiperdum* IVM-t2 株感染 C57BL/6 雌マウスおよび雄マウスの死亡原因として、貧血が考えられた。

第 IV 章では、*T. equiperdum* の性交による伝播をマウスで再現することを試みた。性交による伝播は *T. equiperdum* の特性の一つであるが (OIE, 2013; Ahmed *et al.*, 2018)、感染雄マウスから雌マウスへ原虫の伝播は確認されなかった。構疫罹患雄ウマでも、虫体が精液中に出現する時期については明らかにされておらず (Gizaw *et al.*, 2017)、マウスで性交による原虫の伝播を再現するためには、感染から交配までの期間を検討するなどさらなる試行が必要と考えられた。したがって、現状では *T. equiperdum* の性交感染を再現するマウスモデルはなく、腹腔内投与で感染させたマウスが、今後の実験病理学的研究には有効であると考えられた。

本研究により、構疫罹患馬で認められる末梢神経炎は、臨床初期ステージですでに慢性炎症の性質を有することが明らかになったものの、本病変についてはマウスでも再現することができず、病理発生機序の解明にはさらなる自然発生例の解析を進める

- 1209 必要がある。また、*T. equiperdum* IVM-t2 株を腹腔内投与で感染させたマウスは、媾疫
- 1210 罹患馬が呈する臨床症状、雌雄の生殖器病変の一部、および皮膚病変を再現すること
- 1211 が可能であり、今後の *T. equiperdum* の寄生戦略や媾疫の病態を解明するにあたっての
- 1212 有用な研究ツールになると考えられた。

結論

第 I 章では、媾疫罹患馬で認められる末梢神経炎について、末梢神経に浸潤する炎症細胞の詳細なサブタイプを免疫組織学的に解析し、末梢神経炎の病理発生機序を明らかにすることを目的とした研究を実施した。浸潤する炎症細胞の主要なフェノタイプであったマクロファージに着目し、さらに詳細に区分したところ、M2 マクロファージが主体であることが明らかになった。この免疫組織学的性状は、臨床的なステージ分類であるステージ 1 から 3 の罹患馬の神経で一貫して同一であり、神経症状と関連する神経および関連しない神経間での比較でも同一であった。M1 マクロファージと比較して M2 マクロファージが優位な炎症は、慢性炎症を示唆するものである。媾疫の神経症状は、臨床ステージ後期から末期で認められる症状だが、末梢神経炎は初期ステージですでに慢性炎症の性質を帯びており、神経炎は感染の早い段階ですでに生じている可能性が考えられた。ただし、末梢神経炎の病理発生機序については不明のままであり、マウスモデルの確立とそれを用いた実験病理学的解析の必要性を痛感し、第 II 章以降の契機となった。

第 II 章の当初の目的は、媾疫の末梢神経炎の病理発生機序を解明するために、マウスでその病変を再現し解析を進めることであった。残念ながら末梢神経病変の再現には至らなかった。しかし、マウスに感染が成立する株の存在自体が稀な *T. equiperdum* の性質がある中、IVM-t2 株はマウスに最低 60 日間感染することのできる貴重な株であることを明らかにした。第 II 章では、ハンドリングや飼育の容易さ、および感染を確実に成立させるために、雌マウスに腹腔内投与で感染させ、感染マウスの全身組織を病理組織学的に解析した。その結果、媾疫罹患馬で認められる生殖器病変および皮膚病変と組織学的特徴を同じくする組織病変が、感染マウスの膣および皮膚で認められた。以上のことより、*T. equiperdum* IVM-t2 株感染雌マウスは、媾疫罹患馬が呈する

1237 数カ月単位の慢性的な臨床経過、および特徴的な組織病変の一部を再現できる貴重な
1238 系であることが示された。

1239 第 III 章では、*T. equiperdum* IVM-t2 株を雄マウスに感染させ、特に雄性生殖器に着
1240 目し、媾疫罹患雄ウマが呈する生殖器病変の再現性および、特徴的な臨床症状の一つ
1241 である貧血の再現性を検討した。その結果、実験期間を通してマウスは貧血を呈して
1242 いることが明らかになった。また、媾疫罹患雄ウマで認められる精巣上体炎と組織学
1243 的特徴を同一とする精巣上体炎が感染マウスでも認められ、罹患馬では明らかにされ
1244 てこなかった原虫の寄生部位を精巣上体の間質と特定した。さらに、間質に寄生する
1245 原虫が、他個体に伝播されるためには精巣上体管腔内に侵入する必要があるが、その
1246 際に原虫を攻撃するために浸潤してきた M1 マクロファージ由来のサイトカイン TNF-
1247 α のアポトーシス誘導などの組織侵襲能を利用している可能性が示唆された。

1248 第 IV 章では、*T. equiperdum* の性交による伝播をマウスで再現することを試みた。し
1249 かし、雄マウスから雌マウスへ原虫の伝播は成立しなかったことから、現状では *T.*
1250 *equiperdum* をマウスに感染させるためには、腹腔内投与によって感染させる手法が有
1251 効であると考えられた。

1252 本研究は、*T. equiperdum* 自然感染馬および実験感染マウスの解析を通して、媾疫の
1253 病態および *T. equiperdum* の寄生戦略の解明を試みたものである。これら解析を通し
1254 て、末梢神経炎の病態の一部が解明されたとともに、これまで未確立であった症状や
1255 病変の一部を再現できるマウスモデルを確立し、それら感染マウスの解析を通して *T.*
1256 *equiperdum* の寄生および伝播戦略について新たな仮説を提唱した。ただし、依然とし
1257 て媾疫の病態および *T. equiperdum* の寄生戦略については不明な点も多く、今後も自然
1258 発生例の解析、そして本研究で確立されたマウスモデルを用いた実験病理学的な解析
1259 を並行して行っていく必要があると考えられた。

謝辞

本研究の遂行に際し、一貫してご指導、ご鞭撻を賜りました古林与志安教授（帯広畜産大学獣医学研究部門家畜病理学研究室ならびに帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター）に深謝いたします。また、同大学獣医学研究部門獣医解剖学研究室の佐々木基樹教授、原虫病研究センターの横山直明教授および菅沼啓輔助教、家畜病理学研究室の堀内雅之助教（現所属：株式会社 栄養・病理学研究所）、渡邊謙一助教、小山憲司博士（現所属：株式会社 塩野義製薬 創薬開発研究所）、冨川明子さんには、本稿作成や研究実施において多岐にわたるサポートをしていただきました。心より感謝申し上げます。

また、モンゴル生命科学大学の Altanchimeg ADILBISH 博士、Mungun-Ochir BAYASGALAN 博士、Nyamdolgor URANBILEG 博士、Baatarjargal PUREVDORJ 博士、Soyolmaa GURDORJ 博士、Battur BANZRAGCH 博士、Battsetseg BADGAR 博士には、症例収集にあたり多大なご協力をいただきました。併せて感謝いたします。

参考文献

- 1275
- 1276
- 1277 Ahmed Y, Hagos A, Merga B, Soom AB, Duchateau B, Goddeeris BM, Govaere J. 2018.
- 1278 *Trypanosoma equiperdum* in the horse – a neglected threat? *Vlaams Diergen. Tijds.* **87**, 66-75.
- 1279
- 1280 Allen E. 1922. The oestrous cycle in the mouse. *Am. J. Anat.* **30**, 297-348.
- 1281
- 1282 Allen JE and Liu LX. 2004. Immunity to parasitic and fungal infections. pp. 469-496. *In:*
- 1283 *Immunology, Infection, and Immunity*. (Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM eds.), ASM Press,
- 1284 Washington DC.
- 1285
- 1286 Antoine-Moussiaux N, Magez S, Desmecht D. 2008. Contributions of experimental mouse
- 1287 models to the understanding of African trypanosomiasis. *Trends Parasitol.* **24**, 411-418.
- 1288
- 1289 Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, Rooijen N, Plonquet A, Gheradi RK, Chazaud B.
- 1290 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-
- 1291 inflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057-1069.
- 1292
- 1293 Ashour AA, El-Naga TRA, Barghash SM, Salama MS. 2013. *Trypanosoma evansi*: detection of
- 1294 *Trypanosoma evansi* DNA in naturally and experimentally infected animals using TBR(1) &
- 1295 TBR(2) primers. *Exp. Parasitol.* **134**, 109-114.
- 1296
- 1297 Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. 2018. Role of human macrophage polarization in inflammation
- 1298 during infectious diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1801.

1299

1300 Auty H, TorrSJ, Michoel T, Jayaraman S, Morrison LJ. 2015. Cattle trypanosomiasis: the
1301 diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. *Rev. Sci.*
1302 *Tech.* **34**, 587-598.

1303

1304 Barrowman PR. 1976. Observations on the transmission, immunology, clinical signs and
1305 chemotherapy of dourine (*Trypanosoma equiperdum* infection) in horses, with special reference
1306 to cerebro-spinal fluid. *Onderstepoort J. Ver. Res.* **43**, 55-66.

1307

1308 Bedford JM. 1967. Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from
1309 different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* **166**, 271-281.

1310

1311 Bhat AA, Uppada S, Achkar IW, Hashem S, Yadav SK, Shanmugakonar M, Al-Naemi HA.
1312 2019. Tight junction proteins and signaling pathways in cancer and inflammation: a functional
1313 crosstalk. *Front. Physiol.* **9**, 1942.

1314

1315 Bouteille B, Millet P, Enanga B, Me-Mezui J, Keita M, Jauberteau MO, Georges A, Dumas M.
1316 1998. Human African trypanosomiasis, contributions of experimental models. *Bull. Soc. Pathol.*
1317 *Exot.* **91**, 127-132.

1318

1319 Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. 2017. Human African trypanosomiasis. *Lancet.*
1320 **390**, 2397-2409.

1321

1322 Cheers C, Mckenzie IFC, Pavlov H, Waid C, York J. 1978. Resistance and susceptibility of
1323 mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. *Infect. Immun.*
1324 **19**, 763-770.

1325

1326 Claes F, Büscher P, Touratier L, Goddeeris BM. 2005. *Trypanosoma equiperdum*: master of
1327 disguise or historical mistake? *Trends Parasitol.* **21**, 316-321.

1328

1329 Cornwall GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update.*
1330 **15**, 213-227.

1331

1332 Coustou V, Guegan F, Plazolles N, Baltz T. 2010. Complete in vitro life cycle of *Trypanosoma*
1333 *congolense*: development of genetic tools. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e618.

1334

1335 Davaasuren B, Amgalanbaatar T, Musinguzi SP, Suganuma K, Otgonsuren D, Mossaad E,
1336 Narantsatsral S, Battur B, Battsetseg B, Xuan X, Inoue N. 2017. The evaluation of GM6-based
1337 ELISA and ICT as diagnostic methods on a Mongolian farm with an outbreak of non-tsetse
1338 transmitted horse trypanosomosis. *Vet. Parasitol.* **244**, 123-128.

1339

1340 Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungrana A, Dávila AM. 2001. Detection and identification of
1341 trypanosoma of African livestock through a single PCR based on international transcribed
1342 spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.* **31**, 610-614.

1343

1344 Desquesnes M, Gonzatti M, Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, Gimonneau G,
1345 Truc P, Herder S, Ravel S, Sereno D, Jamonneau V, Jittapalapong S, jacquiet P, Solano P,

1346 Berthier D. 2022. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasit. Vectors.* **15**,
 1347 64.
 1348
 1349 Dubé E and Cyr DG. 2012. The blood-epididymis barrier and human male fertility. *Adv. Exp.*
 1350 *Med. Biol.* **763**, 218-236.
 1351
 1352 Fang F, Ni K, Cai Y, Zhao Q, Shang J, Zhang X, Shen S, Xiong C. 2017. Busulfan
 1353 administration produces toxic effects on epididymal morphology and inhibits the expression of
 1354 ZO-1 and vimentin in the mouse epididymis. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20171059.
 1355
 1356 Foster RA. 2016. Male genital system. pp. 465-510. *In: Pathology of Domestic Animals. Vol 3*,
 1357 *6th ed.* (Maxie MG ed), Elsevier, St. Louis.
 1358
 1359 Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. 2014. Epidemiology of human African
 1360 trypanosomiasis. *Clin. Epidemiol.* **6**, 257-275.
 1361
 1362 Gahfour-Fard S, Shoorei H, Mohaqiq M, Raza SHA, Taheri M. 2021. The role of different
 1363 compounds on the integrity of blood-testis barrier; a concise review based on *in vitro* and *in*
 1364 *vivo* studies. *Gene.* **780**, 145531.
 1365
 1366 Gill RM and Kakar S. 2021. The gastrointestinal tract. pp. 753-822. *In: Pathologic Basis of*
 1367 *Disease, 10th ed.* (Kumar V, Abbas AK, Aster JC eds), Elsevier, St. Louis.
 1368

1369 Gillingwater K. 2018. *In vitro* and *in vivo* efficacy of Diamidines against *Trypanosoma*
1370 *equiperdum* strains. *Parasitology*. **145**, 953-960.

1371

1372 Gizaw Y, Megersa M, Fayera T. 2017. Dourine: a neglected disease of equids. *Trop. Anim.*
1373 *Health Prod.* **49**, 887-897.

1374

1375 Hagos A, Goddeeris BM, Yilkal K, Alemu T, Fikru R, Yacob HT, Feseha G, Claes F. 2010a.
1376 Efficacy of Cymelarsan and Diminasan against *Trypanosoma equiperdum* infections in mice
1377 and horses. *Vet. Parasitol.* **171**, 200-206.

1378

1379 Hagos A, Abebe G, Büscher P, Goddeeris BM, Claes F. 2010b. Serological and parasitological
1380 survey of dourine in the Arsi-Bale highlands of Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* **42**, 769-
1381 776.

1382

1383 Hébert L, Moumen B, Madeline A, Steinbiss S, Lakhdar L, Reet NV, Büscher P, Laugier C,
1384 Cauchard J, Petry S. 2017. First draft genome sequence of the dourine causative agent:
1385 *Trypanosoma equiperdum* strain OVI. *J. Genomics.* **5**, 1-3.

1386

1387 Hedger MP. 2011. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and
1388 epididymis. *J. Androl.* **32**, 625-640.

1389

1390 Henderson KS, Pritchett-Corning KR, Perkins CL, Banu LA, Jennings SM, Francis BC, Shek
1391 WR. 2015. A comparison of mouse parvovirus 1 infection in BALB/c and C57BL/6 mice:
1392 susceptibility, replication, shedding, and seroconversion. *Comp. Med.* **65**, 5-14.

1393

1394 Jimenez A. 2014. *Mouse Breeding colony management*. McGill University Animal Case

1395 Committee, Montreal.

1396

1397 Kennedy PGE. 2019. Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *J. Neurol.*

1398 **266**, 2334-2337.

1399

1400 Laperchia C, Palomba M, Etet PFS, Rodgers J, Bradley B, Montague P, Grassi-Zucconi G,

1401 Kennedy PGE, Bentivoglio M. 2016. *Trypanosoma brucei* invasion and T-cell infiltration of the

1402 brain parenchyma in experimental sleeping sickness; timing and correlation with functional

1403 changes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0005242.

1404

1405 Lee KY. 2019. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med. Biol. Sci. Eng.* **2**,

1406 1-5.

1407

1408 Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel L, Kühl AA, Erben U, May C, Schulzke J, Siegmund

1409 B. 2015. Monocyte and M1 macrophage-induced barrier defect contributes to chronic intestinal

1410 inflammation in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1297-1305.

1411

1412 Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. 2014. Macrophage polarization in inflammatory diseases.

1413 *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 520-529.

1414

Magez S, Truyens C, Merimi M, Radwanska M, Stijlemans B, Brouckaert P, Brombacher F, Pays E, Baetselier PD. 2004. P75 tumor necrosis factor-receptor shedding occurs as a protective host response during African trypanosomiasis. *J. Infect. Dis.* **189**, 527-539.

Martin KE and García AJ. 2021. Macrophage phenotypes in tissue repair and the foreign body response: implications for biomaterial-based regenerative medicine strategies. *Acta Biomater.* **133**, 4-16.

Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* **177**, 7303-7311.

Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.* **22**, 909-918.

Maudlin I. 2006. African trypanosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **100**, 679-701.

Mazzon E and Cuzzocrea S. 2007. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir. Res.* **8**, 75.

Menezes VT, Queiroz AO, Gomes MAM, Marques MAP, Jansen AM. 2004. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitol. Res.* **94**, 193-200.

1439 Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. 2000. M-1/M-2 macrophages and the
1440 Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166-6173.
1441
1442 Mizushima D, Amgalanbaatar T, Davaasuren B, Kayano M, Naransatsral S, Myagmarsuren P,
1443 Otgonsuren D, Enkhtaivan B, Davkharbayar B, Mungun-Ochir B, Baatarjargal P, Nyamdolgor
1444 U, Soyolmaa G, Altanchimeg A, Zoljargal M, Nguyen T, Battsetseg B, Battur B, Inoue N,
1445 Yokoyama N, Suganuma K. 2020. Nationwide serological surveillance of non-tsetse-
1446 transmitted horse trypanosomes in Mongolia. *Parasite Epidemiol. Control.* **10**, e00158.
1447
1448 Mungun-Ochir B, Horiuchi N, Altanchimeg A, Koyama K, Suganuma K, Nyamdolgor U,
1449 Watanabe K, Baatarjargal P, Mizushima D, Battur B, Yokoyama N, Battsetseg B, Inoue N,
1450 Kobayashi Y. 2019. Polyradiculoneuropathy in dourine-affected horses. *Neuromuscul. Disord.*
1451 **29**, 437-443.
1452
1453 Musaya J, Matovu E, Nyirenda M, Chisi J. 2015. Role of cytokines in *Trypanosoma brucei*-
1454 induced anaemia: a review of the literature. *Malawi Med. J.* **27**, 47-50.
1455
1456 Mwangi DM, Hopkins J, Luckins AG. 1996. *Trypanosoma congolense* infection in sheep:
1457 cellular phenotypes in lymph and lymph nodes associated with skin reactions. *J. Comp. Pathol.*
1458 **114**, 51-61.
1459
1460 Mylonas KJ, Nair MG, Prieto-Lafuente L, Paape D, Allen JE. 2009. Alternatively activated
1461 macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J.*
1462 *Immunol.* **182**, 3084-3094.

1463

1464 Nguyen T, Ruttayaporn N, Goto Y, Kawazu S, Sakurai T, Inoue N. 2015. A TeGM6-4r antigen-
1465 based immunochromatographic test (ICT) for animal trypanosomosis. *Parasitol. Res.* **114**,
1466 4319-4325.

1467

1468 Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RCA, Dávila AMR.
1469 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol.*
1470 *Res.* **95**, 186-192.

1471

1472 Oakes SA. 2021. Diseases of the immune system. pp. 189-266. *In: Pathologic Basis of Disease*,
1473 *10th ed.* (Kumar V, Abbas AK, Aster JC eds), Elsevier, St. Louis.

1474

1475 Office des Internationale Epizooties (OIE). 2018. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for*
1476 *Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*, 8th ed. OIE, Paris.

1477

1478 Olsson T, Bakhiet M, Kristensson K. 1992. Interactions between *Trypanosoma brucei* and
1479 CD8⁺ T cells. *Parasitol. Today.* **8**, 237-239.

1480

1481 Onyilagha C and Uzonna JE. 2019. Host immune responses and immune evasion strategies in
1482 African trypanosomiasis. *Front. Immunol.* **10**, 2738.

1483

1484 Orgebin-Crist MC. 1967. Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature.* **216**, 816-818.

1485

1486 Pascucci I, Provvido AD, Cammà C, Francesco GD, Calistri P, Tittarelli M, Ferri N, Scacchia
 1487 M, Caporale V. 2013. Diagnosis of dourine in outbreaks in Italy. *Vet. Parasitol.* **193**, 30-38.
 1488
 1489 Pentreath VW. 1995. Royal society of tropical medicine and hygiene meeting at Manson house,
 1490 London, 19 May 1994. Trypanosomiasis and the nervous system. Pathology and immunology.
 1491 *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**, 9-15.
 1492
 1493 Perrone TM, Gonzatti MI, Villamizar G, Escalante A, Aso PM. 2009. Molecular profiles of
 1494 Venezuelan isolates of *Trypanosoma* sp. By random amplified polymorphic DNA method. *Vet.*
 1495 *Parasitol.* **161**, 194-200.
 1496
 1497 Perrone T, Aso PM, Mijares A, Holzmüller P, Gonzatti M, Parra N. 2018. Comparison of
 1498 infectivity and virulence of clones of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*
 1499 Venezuelan strains in mice. *Vet. Parasitol.* **253**, 60-64.
 1500
 1501 Pytel P and Anthony DC. 2021. Peripheral nerves and skeletal muscles. pp. 1217-1240. In:
 1502 *Pathologic Basis of Disease, 10th ed.* (Kumar V, Abbas AK, Aster JC eds), Elsevier, St. Louis.
 1503
 1504 Rodgers J, Steiner I, Kennedy PGE. 2019. Generation of neuroinflammation in human African
 1505 trypanosomiasis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **6**, e610.
 1506
 1507 Scacchia M, Cammà C, Francesco GD, Provvido AD, Giunta R, Luciani M, Marino AMF,
 1508 Pascucci I, Caporale V. 2011. A clinical case of dourine in an outbreak in Italy. *Vet. Ital.* **47**,
 1509 473-475.

1510

1511 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Rietzsch T, Preibisch S,
1512 Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak, P,
1513 Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. **9**,
1514 676-682.

1515

1516 Schlafer DH and Foster HS. 2016. Female genital system. pp. 358-464. *In: Pathology of*
1517 *Domestic Animals. Vol 3, 6th ed.* (Maxie MG ed), Elsevier, St. Louis.

1518

1519 Shen D, Chu F, Lang Y, Geng Y, Zheng X, Zhu J, Liu K. 2018. Beneficial or harmful role of
1520 macrophages in Guillain-Barré syndrome and experimental autoimmune neuritis. *Mediators*
1521 *Inflamm.* **2018**, 4286364.

1522

1523 Sheng Z, Gao N, Fan D, Wu N, Zhang Y, Han D, Zhang Y, Tan W, Wang P, An J. 2021. Zika
1524 virus disrupts the barrier structure and absorption/secretion functions of the epididymis in mice.
1525 *PLoS Negl. Trop. Dis.* **15**, e0009211.

1526

1527 Shi M, Pan W, Tabel H. 2003. Experimental African trypanosomiasis: IFN-gamma mediates
1528 early mortality. *Eur. J. Immunol.* **33**, 108-118.

1529

1530 Shi M, Wei G, Pan W, Tabel H. 2006. Experimental African trypanosomiasis: a subset of
1531 pathogenic, IFN-gamma-producing, MHC-class II-restricted CD4⁺ T cells mediates early
1532 mortality in highly susceptible mice. *J. Immunol.* **176**, 1724-1732.

1533

1534 Sica A and Mantovani A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J. Clin.*
 1535 *Invest.* **122**, 787-795.
 1536
 1537 Stijlemans B, Vankrunkelsven A, Brys L, Magez S, Baetselier PD. 2008. Role of iron
 1538 homeostasis in trypanosomiasis-associated anemia. *Immunology.* **213**, 823-835.
 1539
 1540 Stijlemans B, Vankrunkelsven A, Caljon G, Bockstal V, Guilliams M, Bosschaerts T, Beschin
 1541 A, Raes G, Magez S, Baetselier PD. 2010. The central role of macrophages in trypanosomiasis-
 1542 associated anemia: rationale for therapeutical approaches. *Endocr. Metab. Immune. Disord.*
 1543 *Drug Targets.* **10**, 71-82.
 1544
 1545 Stijlemans B, Baetselier PD, Magez S, Ginderachter JAV, Trez CD. 2018. African
 1546 trypanosomiasis-associated anemia: the contribution of the interplay between parasites and
 1547 mononuclear phagocyte system. *Front. Immunol.* **9**, 218.
 1548
 1549 Suganuma K, Narantsatsral S, Battur B, Yamasaki S, Otgonsuren D, Musinguzi SP, Davaasuren
 1550 B, Battsetseg B, Inoue N. 2016. Isolation, cultivation and molecular characterization of a new
 1551 *Trypanosoma equiperdum* strain in Mongolia. *Parasit. Vectors.* **9**, 481.
 1552
 1553 Tarleton RL. 2015. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol.* **37**,
 1554 233-238.
 1555
 1556 Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. 1992. Susceptibility of beta 2-microglobulin-
 1557 deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature.* **356**, 338-340.

1558

1559 Thuy NT, Goto Y, Lun Z, Kawazu S, Inoue N. 2012. Tandem repeat protein as potential
 1560 diagnostic antigen for *Trypanosoma evansi* infection. *Parasitol. Res.* **110**, 733-739.

1561

1562 Trindade S, Rijo-Ferreira F, Carvalho T, Pinto-Neves D, Guegan F, Aresta-Branco F, Bento F,
 1563 Young SA, Pinto A, Abbeele JVD, Ribero RM, Dias S, Smith TK, Figueiredo KM. 2016.
 1564 *Trypanosoma brucei* parasites occupy and functionally adapt to the adipose tissue in mice. *Cell*
 1565 *Host. Microbe.* **19**, 837-848.

1566

1567 Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyem QAT. 2003. Association of segmentation of the
 1568 epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction.* **125**,
 1569 871-878.

1570

1571 Urakawa T, Verloo D, Moens L, Büscher P, Majiwa A. 2001. *Trypanosoma evansi*: cloning and
 1572 expression in *Spodoptera frugiperda* [correction of *fugiperda*] insect cells of the diagnostic
 1573 antigen RoTat1.2. *Exp. Parasitol.* **99**, 181-189.

1574

1575 Vulpiani MP, Carvelli A, Biologist DG, Iannino F, Paganico D, Ferri N. 2013. Reemergence of
 1576 dourine in Italy: clinical cases in some positive horses. *J. Equine Vet. Sci.* **33**, 468-474.

1577

1578 Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA,
 1579 Colton CA. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukoc. Biol.*
 1580 **89**, 873-891.

1581

1582 Xu W, Zhao X, Daha MR, Kooten C. 2013. Reversible differentiation of pro- and anti-
1583 inflammatory macrophages. *Mol. Immunol.* **53**, 179-186.
1584
1585 Yasmine A, Ashenafi H, Geldhof P, Brantegem LV, Vercauteren G, Bekana M, Tola A, Soom
1586 AV, Duchateau L, Goddeeris B, Govaere J. 2019a. Histopathological lesions in reproductive
1587 organs, distal spinal cord and peripheral nerves of horses naturally infected with *Trypanosoma*
1588 *equiperdum*. *BMC Vet. Res.* **15**, 175.
1589
1590 Yasmine A, Daha M, Ashenafi H, Geldhof P, Brantegem LV, Vercauteren G, Demissle T, Bekana
1591 M, Tola A, Soom AV, Duchateau L, Goddeeris B, Govaere J. 2019b. Tissue (re)distribution of
1592 *Trypanosoma equiperdum* in venereal infected and blood transfused horses. *Vet. Parasitol.* **268**,
1593 87-97.
1594
1595 Zhang C, Yang M, Ericsson AC. 2021. Function of macrophages in disease: current
1596 understanding on molecular mechanisms. *Front Immunol.* **12**, 620510.
1597

Abstract

Dourine is a protozoan disease in equids caused by infection with *Trypanosoma equiperdum*. *T. equiperdum* is transmitted by coitus, and affected horses manifest various clinical signs during the long-term clinical course of 1-2 months to several years. Since the mortality of affected horses is more than 50%, dourine causes significant economic damage to horse industry in developing countries. However, there is lack of studies aimed to elucidate the parasite strategies of *T. equiperdum* and the pathogenesis of various clinical signs and lesions observed in dourine affected horses. Therefore, the pathogenesis of dourine remains largely unknown. In human sleeping sickness caused by *T. brucei rhodesiense* and *T. b. gambiense*, pathological and parasitological studies of spontaneous cases and various multi-faceted murine infection models have been contributed to elucidate the pathogenesis of human sleeping sickness. The objective of the present studies was to elucidate the pathogenesis of dourine and the parasitic strategy of *T. equiperdum*, which remains largely unknown. In chapter I, I conducted immunohistochemical study of peripheral neuritis observed in dourine affected horses. In chapter II and III, I have established mouse infection models that reproduce some of the clinical signs and histological lesions observed in dourine affected horses. In chapter IV, I attempted to reproduce the sexual transmission of *T. equiperdum* in mice.

In chapter I, I focused on neurological signs of dourine, which observed in late to terminal stage of infection. Previous studies suggested that the neurological signs were probably attributed to the peripheral neuritis, however, the precise pathogenesis of the neuritis remains unclear. In this chapter, I identified the types of inflammatory cells infiltrating systemic peripheral neuritis observed in 4 dourine affected horses by immunohistochemistry, and compared those immunohistochemical natures between clinical stages of the affected horses

(early, late, or terminal stage). As results, the infiltrating inflammatory cells were T lymphocytes, B lymphocytes, and macrophages, regardless of the clinical stage. Among T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes were more predominant than CD4⁺ T lymphocytes. In macrophages, M2 macrophages were more predominant subtype than M1 macrophages. Those results indicated that the neuritis have natures of chronic inflammation. Also, those features were identical in all affected horses classified into early, late, or terminal stage. Therefore, while the neurological signs of dourine are clinically recognized in the late or terminal stage, peripheral neuritis may have already occurred in the acute stage of infection.

In chapter II, I have attempted to establish a mouse infection model that reproduces clinical signs and lesions including peripheral neuritis observed in dourine affected horses. Since mice are not susceptible to almost all *T. equiperdum* strains, mouse infection model of dourine has not been established. I infected female mice with *T. equiperdum* IVM-t2 strain, which is a newly isolated from dourine affected stallion in Mongolia, by intraperitoneal administration, and examined systemic organs of infected mice histopathologically. As results, infected mice developed periodic parasitemia during the experimental period (60 days). In those infected mice, peripheral neuritis similar to that found in affected horses were not observed. However, vaginitis and dermatitis with histological features similar to those found in affected horses were observed. Based on those findings, female mice infected with *T. equiperdum* IVM-t2 strain may be a valuable experimental model for future pathological and parasitological research.

In Chapter III, I focused on male genital lesions in mice infected with *T. equiperdum* IVM-t2 strain intraperitoneally, and examined the reproductive organs of infected male mice histopathologically. Also, since anemia is one of the characteristic clinical signs of dourine, I also examined the hematocrit value of infected mice. As results, infected mice were persistently

anemic throughout the experimental period (38 days). Histopathologically, epididymitis with histological features similar to those in dourine affected stallions were observed in infected mice. Many trypanosomes were detected in the epididymal interstitium, and few were detected within the lumen of epididymal ducts. A large number of M1 and M2 macrophages infiltrated into the interstitium, and positive reactions for TNF- α , which is cytokine from M1 macrophages, was detected multifocally by immunofluorescence in those foci. Also, the apoptotic epithelial cells were increased in number. The aggregation of apoptotic epithelial cells was frequently associated with the loss of stainability for ZO-1, a major protein that forms tight junctions between epididymal epithelial cells. Also, the formation of sperm granuloma was observed in some infected mice. Trypanosomes in the epididymal interstitium is needed to invade the lumen for sexual transmission. The present results suggest that trypanosomes in the interstitium induce the infiltration of macrophages that secrete TNF- α , and may impair the tight junctions of epididymal ducts by using the function of TNF- α , which induce apoptosis.

In chapter IV, to reproduce the sexual transmission of *T. equiperdum* between equids, I attempted sexual transmission of trypanosomes from male mice to female mice. Unfortunately, sexual transmission of the parasite between mice was not established. Thus, at this time, intraperitoneal administration is the most effective method to infect mice with *T. equiperdum*.

In conclusion, the present study revealed the part of the pathogenesis of peripheral neuritis observed in dourine affected horses by immunohistochemical investigations of spontaneous cases. Also, we established a mouse infection model that can reproduce some of the clinical signs and histological lesions observed in dourine affected horses. Additionally, histopathological examinations of epididymitis in infected male mice revealed new insights of the parasitic and transmission strategies of *T. equiperdum*.

1670

图表

1671

1672 **Table 1.** Antibodies used to investigate the perineuritis in dourine-affected horses

1673

Antibody	Species	Manufacturer	Clone	Dilution	Antigen retrieval
CD3	Mouse	Dako, Glostrup, Denmark	F7.2.38	1:100	Microwave ^a
CD4	Mouse	Washington State University, Pullman, WA, USA	HB61A	1:100	Immunosaver ^b
CD8	Mouse	Washington State University, Pullman, WA, USA	ETC142BA1	1:100	Immunosaver
CD20	Rabbit	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA	-	1:400	Immunosaver
Granzyme B	Rabbit	Spring Biosciences, Pleasanton, CA, USA	-	1:400	Microwave
Iba1	Rabbit	Wako, Osaka, Japan	-	1:500	Microwave
iNOS	Mouse	R&D systems, Minneapolis, MN, USA	2D2-B2	1:100	Microwave
Arginase	Rabbit	LSBio, Seattle, WA, USA	Polyclonal	1:400	Microwave
CD204	Mouse	Trans Genic, Kumamoto, Japan	SRA-E5	1:100	Microwave

1674

1675 a: Sodium citrate buffer pH6.0 in microwave at 97°C for 15 min

1676 b: Immunosaver (Nisshin EM, Tokyo, Japan) diluted solution (1:200) at 98°C for 45 min

1677

1678 **Table 2.** Immunohistochemical positive rates of lymphocytes and macrophages

1679

	Case 1		Case 2			Case 3	Case 4	
	Facial nerve	Median nerve	Facial nerve	Trigeminal nerve	Sciatic nerve	Facial nerve	Facial nerve	Sciatic nerve
Association with neurological signs ^a	-	-	+	+	-	+	+	+
Positive rates in each marker ^b								
CD3	+	+	+	++	++	++	±	±
CD4	-	±	±	-	+	±	-	-
CD8	+	+	+	++	++	++	-	-
CD20	+	+	+	++	++	++	±	±
Granzyme B	±	-	-	-	±	±	-	-
Iba1	++	+	++	++	++	++	±	+
iNOS	-	-	-	-	±	±	-	-
Arginase	+	+	++	++	+	++	+	+
CD204	±	±	+	±	+	+	±	±

1680

1681 a: +; the nerve is associated with neurological sign, -; not associated with neurological sign

1682 b: ++; positive cells are more than 20%; ++, 5-20%; +, ±; less than 5%, -; no positive cells

1683 **Table 3.** Degree of inflammation in BALB/c mice and C57BL/6 mice infected by intraperitoneal administration

1684

	Infected BALB/c				Infected C57BL/6			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Liver	3/6	3/6	0/6	0/6	1/6	2/6	2/6	1/6
Spleen	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Kidney (interstitium)	2/6	4/6	0/6	0/6	4/6	2/6	0/6	0/6
Kidney (renal pelvis)	3/6	3/6	0/6	0/6	4/6	1/6	1/6	0/6
Heart (epicardium)	2/6	4/6	0/6	0/6	4/6	2/6	0/6	0/6
Heart (endocardium)	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	1/6	0/6	0/6
Lung	2/6	4/6	0/6	0/6	3/6	2/6	1/6	0/6
Intestine	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Uterus	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Vagina	0/6	3/6	2/6	1/6	0/6	2/6	2/6	2/6
Brain	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Spinal cord	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Sciatic nerve	0/6	1/6	4/6	1/6	1/6	0/6	2/6	3/6
Skin	3/5	0/5	2/5	0/5	1/3	0/3	0/3	2/3

1685

1686 -; no inflammation, +; mild and focal inflammation, ++; moderate inflammation, +++; severe and diffuse inflammation

1687 **Table 4.** Antibodies used to investigate the nature of epididymitis in infected mice

1688

Antibody	Species	Manufacturer	Clone	Dilution	Antigen retrieval
CD3	Rabbit	Abcam, Cambridge, UK	SP7	1:400	Microwave ^a
PAX5	Rabbit	Thermo Fisher, Rockford, IL, USA	-	1:600	Immunosaver ^b
Iba1	Rabbit	Wako, Osaka, Japan	-	1:500	Microwave
FOXP3	Rat	eBioscience, San Diego, CA, USA	FJK-16s	1:200	Microwave
iNOS	Mouse	R&D systems, Minneapolis, MN, USA	2D2-B2	1:200	Target Retrieval Solution ^c
CD204	Mouse	Trans Genic, Kumamoto, Japan	SRA-E5	1:100	Microwave
TNF- α	Rabbit	Bioss, Boston, MA, USA	-	1:400	Immunosaver
Laminin	Rabbit	Abcam	-	1:200	Proteinase K ^d
ZO-1	Rabbit	Thermo Fisher	-	1:150	Microwave
Caspase-3	Rabbit	Abcam	-	1:500	Microwave
Cytokeratin 19	Rabbit	Abcam	-	1:100	Immunosaver

1689

1690 a: Sodium citrate buffer pH6.0 in microwave at 97°C for 15 min

1691 b: Immunosaver (Nisshin EM, Tokyo, Japan) diluted solution (1:200) at 98°C for 45 min

1692 c: Target Retrieval Solution (10x) (Dako, Glostrup, Denmark) at 121°C in pressure cooker for 5 min

1693 d: 0.02% proteinase K at 37°C for 30 min

Table 5. Semi-quantitative analysis of immunohistochemistry in the epididymitis

iNOS ^a	BALB/c mice	12154.467 ± 1998.004 μm ²	0.10<p
	C57BL/6 mice (early stage)	5509.867 ± 654.062 μm ²	
	C57BL/6 mice (late stage)	7325.1954 ± 1699.198 μm ²	
iNOS/Iba1 ^b	BALB/c mice	0.4325	0.10<p
	C57BL/6 mice (early stage)	0.2502	
	C57BL/6 mice (late stage)	0.3781	
TNF-α ^c	BALB/c mice	16055.532 ± 2716.662 μm ²	0.10<p
	C57BL/6 mice (early stage)	5532.467 ± 1449.591 μm ²	
	C57BL/6 mice (late stage)	8470.888 ± 1657.867 μm ²	
Caspase-3 ^d	BALB/c mice	10.022 ± 0.578	0.10<p
	C57BL/6 mice (early stage)	11.667 ± 0.976	
	C57BL/6 mice (late stage)	11.222 ± 1.378	

a: The area of positive reactions for immunohistochemistry for iNOS

b: The ratio of immunohistochemical positive area for iNOS and that for Iba1

c: The area of positive reactions for immunofluorescence for TNF- α

d: The number of caspase-3 positive epithelial cells of epididymal ducts

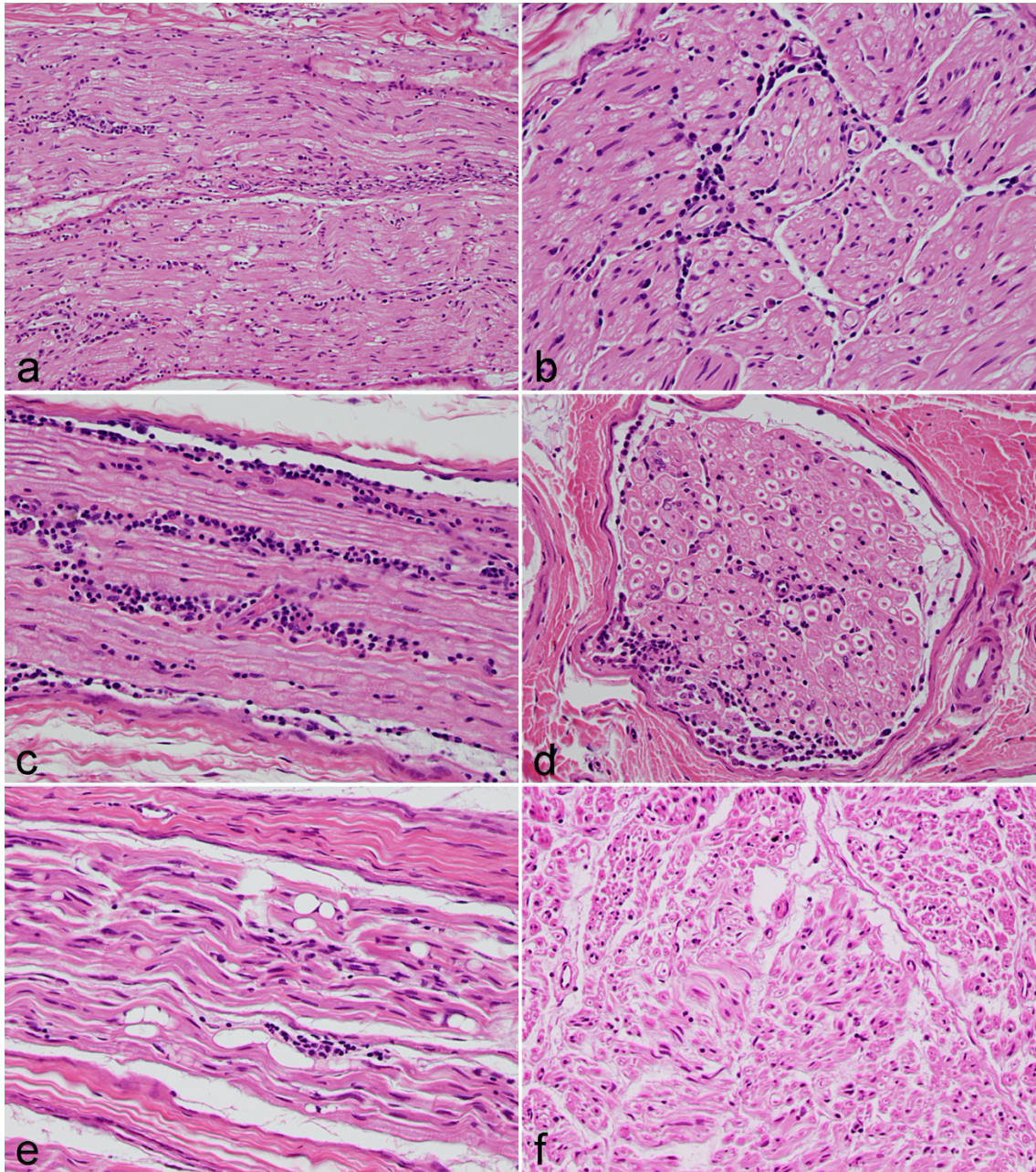


Figure 1. Peripheral nerves in dourine-affected horses at various clinical stages. (a, b) Longitudinal and transverse sections of median nerve, which is not associated with neurological sign, of Case 1 (classified as clinical stage 1). Inflammatory cells mildly infiltrate perineurium and between nerve bundles. Hematoxylin and eosin (HE) stain. (c, d) Longitudinal and transverse sections of sciatic nerve, which is not associated with neurological signs, of Case 2

1708 (classified as clinical stage 2). Inflammatory cells infiltrate perineurium, endoneurium and
1709 between nerve bundles. HE stain. (e) Longitudinal section of facial nerve related with facial
1710 paralysis of Case 3 (classified as clinical stage 2). In addition to inflammatory cells infiltration,
1711 axonal degeneration is also observed. HE stain. (f) Transverse section of sciatic nerve related
1712 with paralysis of hind limbs of Case 4 (classified as clinical stage 3). Edema is observed
1713 between nerve fibers. HE stain.

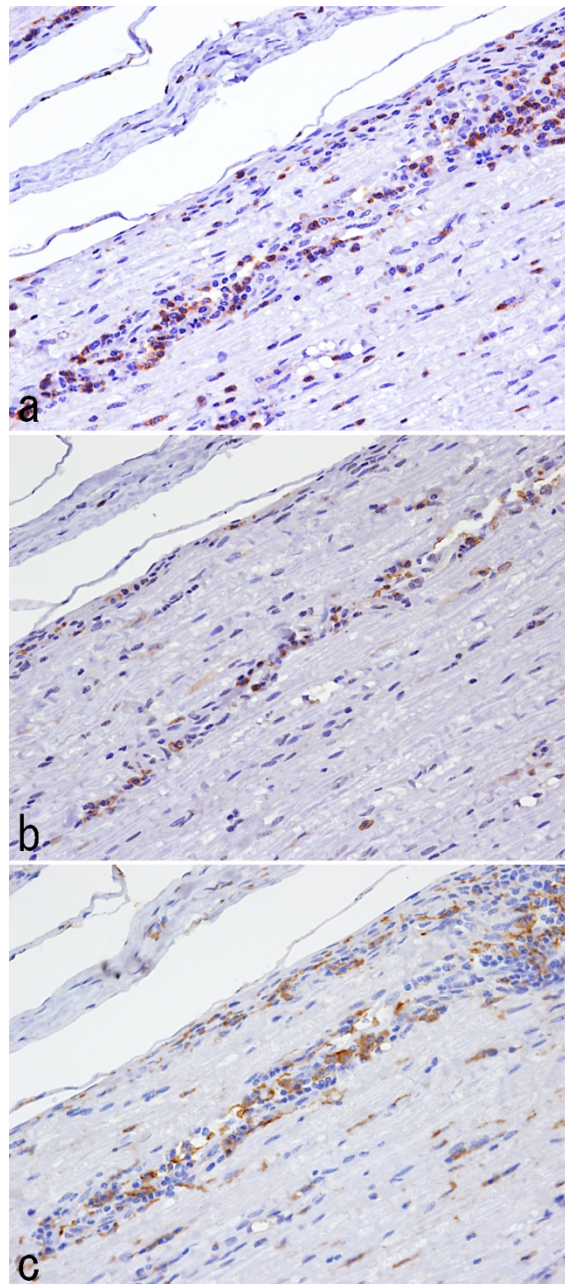


Figure 2. Trigeminal nerve of Case 2. The subtypes of Inflammatory cells infiltrating in the nerve are CD3 positive T lymphocytes (a), CD20 positive B lymphocytes (b), and Iba1 positive macrophages (c). Immunohistochemistry (IHC) for CD3 (a), CD20 (b), and Iba1 (c).

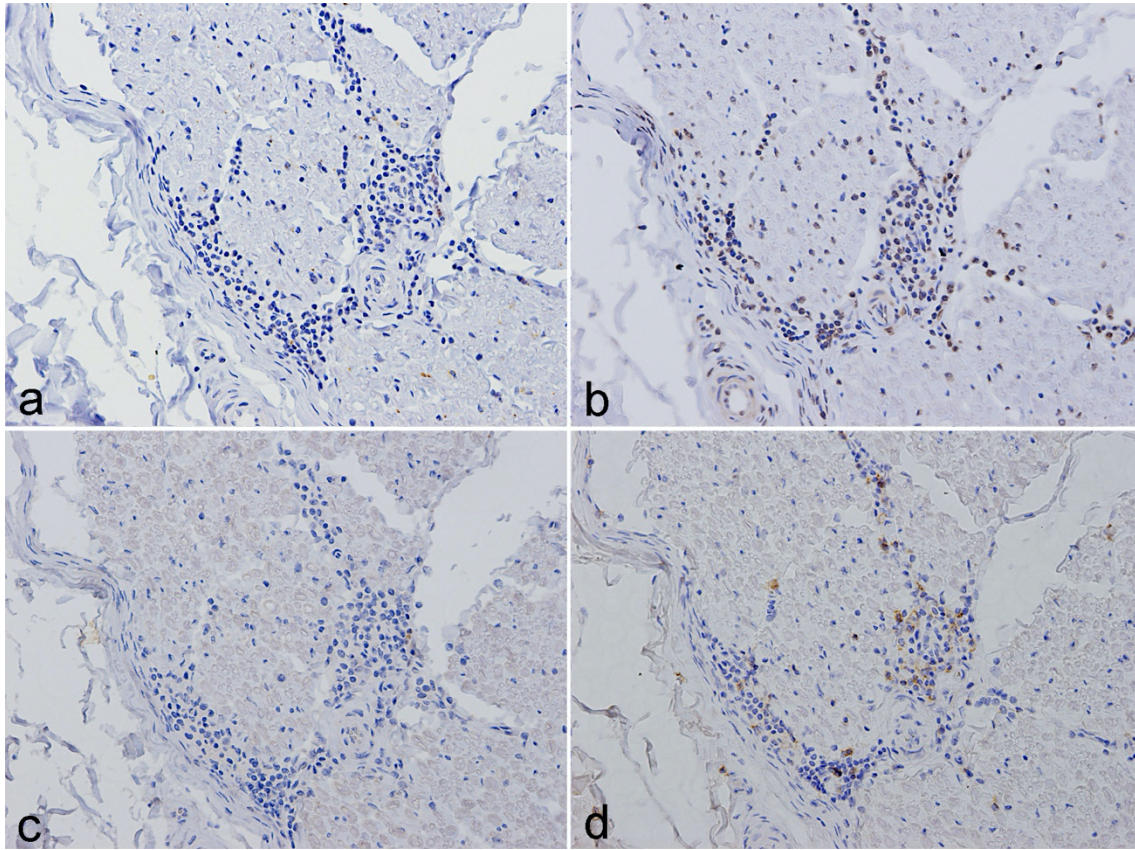
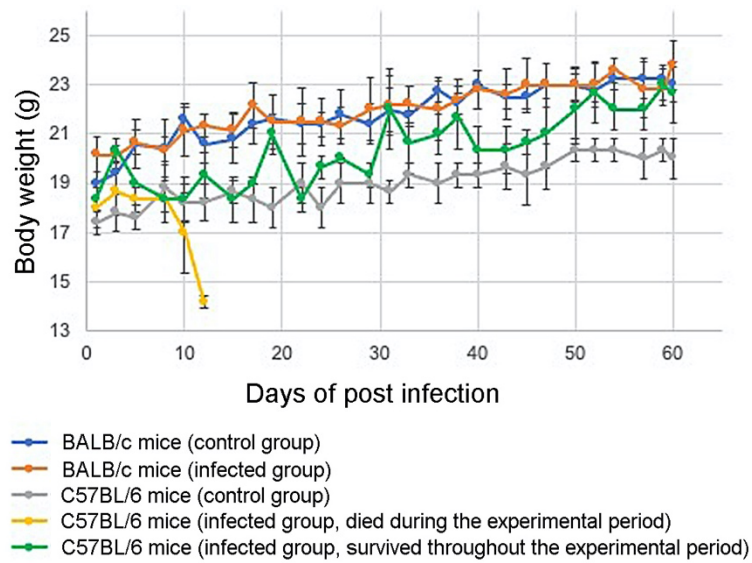


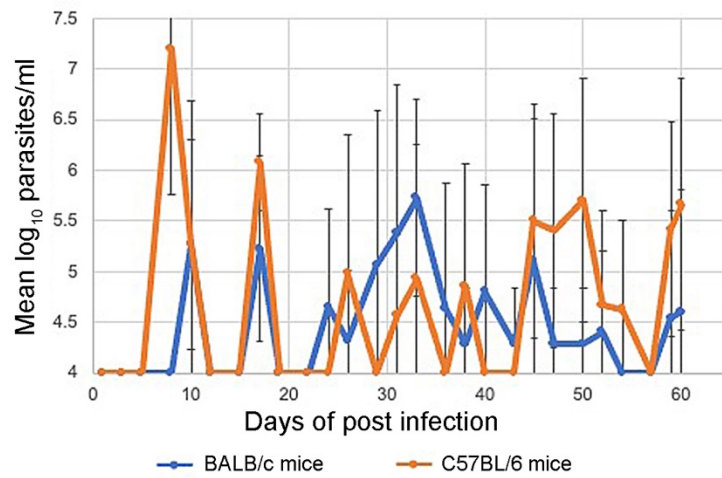
Figure 3. Facial nerve of Case 2. In macrophages, iNOS positive macrophages are rare (a), and the majority of macrophages are positively stained with arginase (b). In T lymphocytes, CD8 positive T lymphocytes (d) are more common than CD4 positive T lymphocytes (c). IHC for iNOS (a), arginase (b), CD4 (c), and CD8 (d).



1725

1726

1727 **Figure 4.** The transition of body weight of female BALB/c mice and C57BL/6 mice of infected
 1728 group (IG) and control group (CG) (mean value \pm standard deviation). In BALB/c mice, all
 1729 mice of IG and CG does not present weight loss during the experimental period. In contrast, 3
 1730 C57BL/6 mice in IG that died or were euthanized by 12 days of post infection (dpi) present
 1731 severe weight loss. Other C57BL/6 mice in IG and CG dose not present significant weight loss
 1732 by 60 dpi.



1733

1734

1735 **Figure 5.** The transition of parasitemia level of female BALB/c mice and C57BL/6 mice of IG

1736 (mean value \pm standard deviation, limit of detection is 1×10^4 parasites/ml). Periodic

1737 parasitemia is observed in both mouse strains.

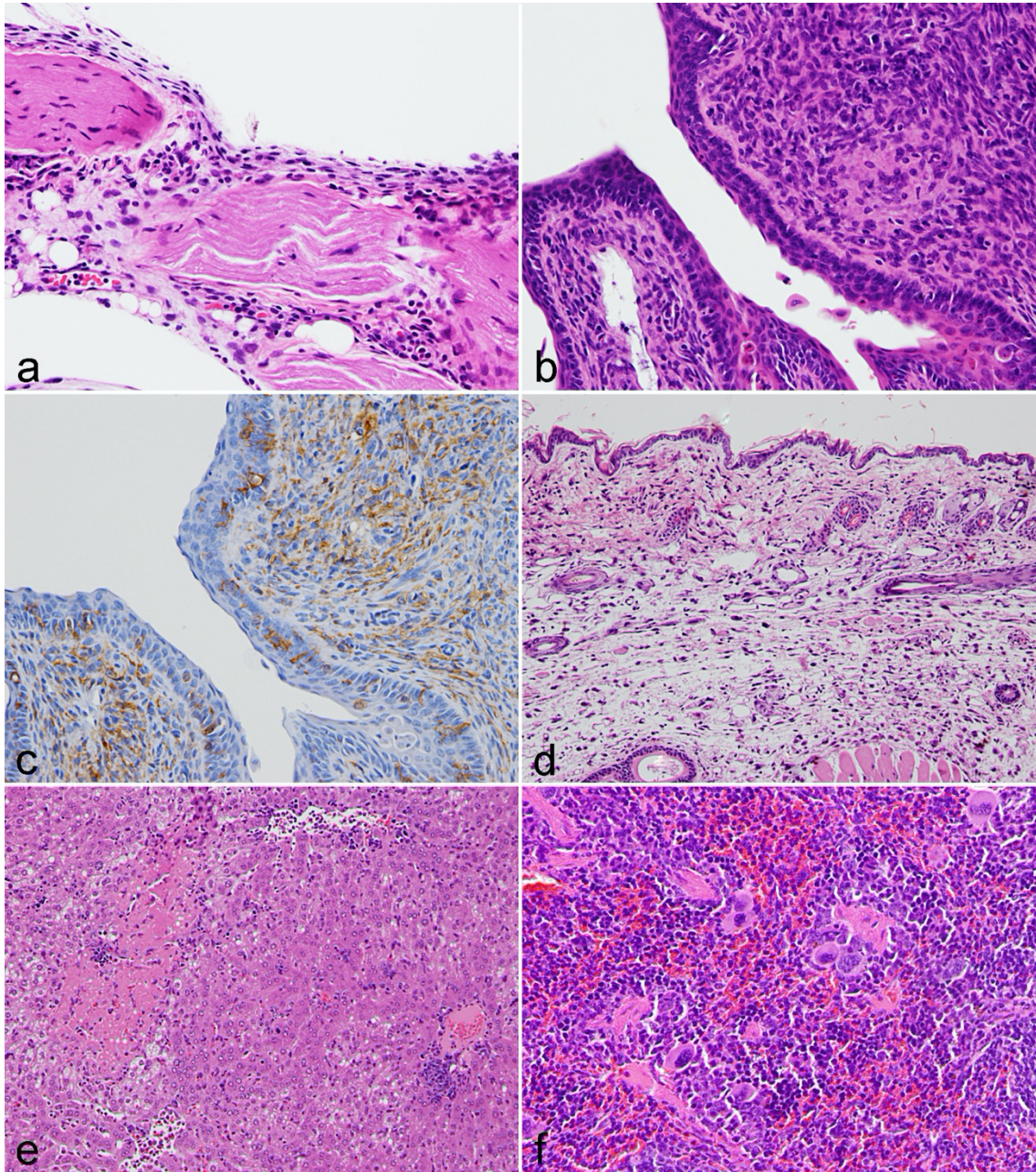


Figure 6. Histopathological lesions of female mice in IG. (a) Sciatic nerve of a BALB/c mouse in IG. Inflammatory cells are observed in the perineurium and surrounding connective tissue. HE stain. (b) Vagina of a C57BL/6 mouse in IG. Diffuse inflammation is observed in the lamina propria. HE stain. (c) Vagina of a C57BL/6 mouse in IG. The majority of inflammatory cells in the vagina are positively stained with Iba1, and are determined as macrophages. IHC for Iba1.

1745 (d) Skin of a C57BL/6 mouse in IG. Macrophages and lymphocytes infiltrate the dermis and
1746 subcutaneous tissue. Edema is also observed. The adnexal glands and hair follicles are
1747 decreased in number. HE stain. (e) Liver of a C57BL/6 mouse in IG. There are aggregations of
1748 lymphocytes with multifocal necrosis of hepatocytes. HE stain. (f) Spleen of a BALB/c mouse
1749 in IG. Extramedullary hematopoiesis is observed. HE stain.

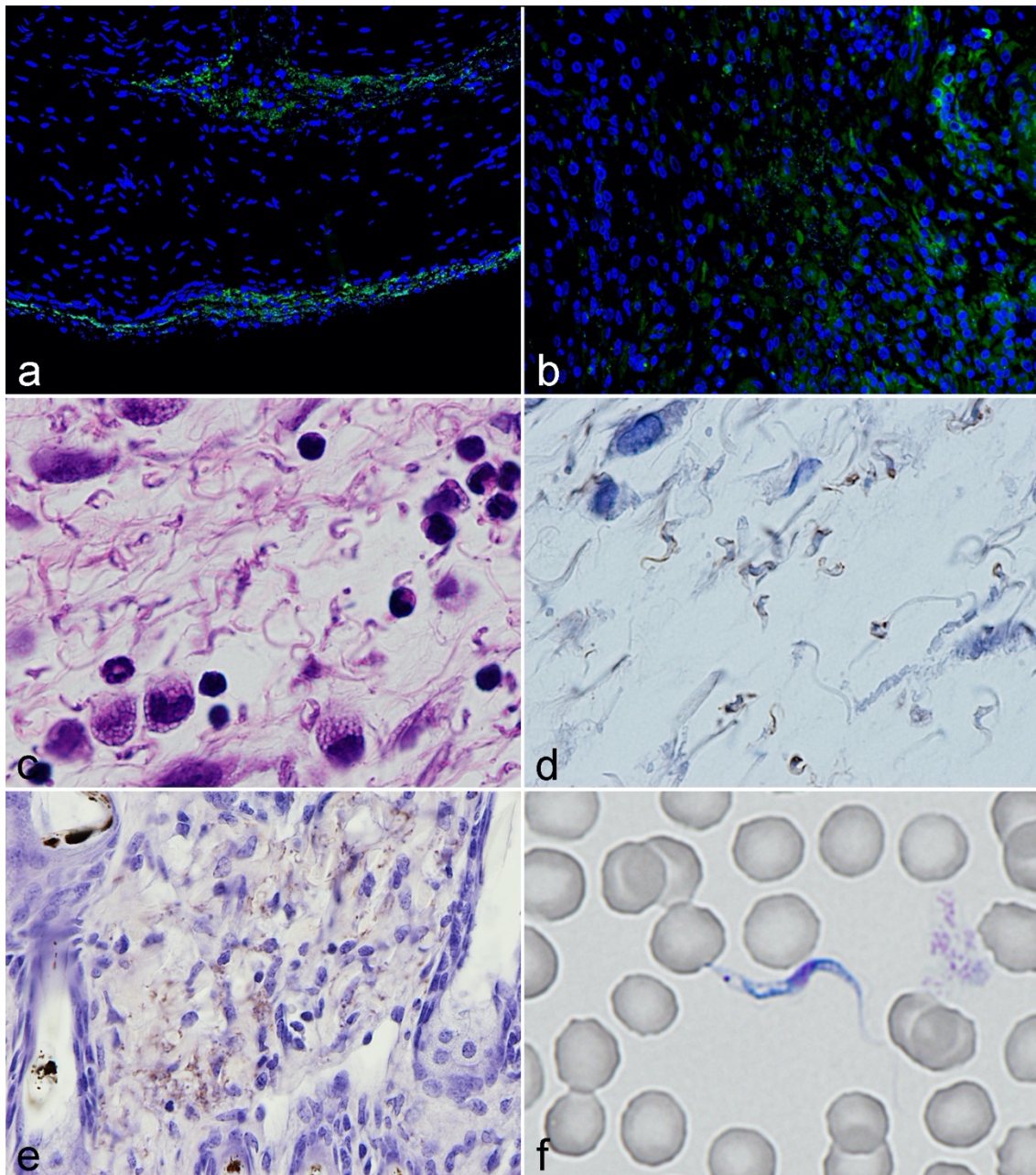


Figure 7. *Trypanosoma equiperdum* in the tissue of female BALB/c mice and C57BL/6 mice in IG. (a) Sciatic nerve of a C57BL/6 mouse in IG. Positive reactions are detected in the perineurium and surrounding connective tissue. Immunofluorescence (IF) for *T. equiperdum*. (b) Vagina of a C57BL/6 mouse in IG. In the lamina propria, positive reactions are observed. IF for *T. equiperdum*. (c) Skin of a C57BL/6 mouse in IG. A large number of trypanosomes are

1757 detected in the subcutaneous tissue. Those trypanosomes have a spindle-shaped body with
1758 streamlined and tapered shape. HE stain. (d) Skin of a C57BL/6 mouse in IG. Trypanosomes in
1759 the subcutaneous tissue are positively stained with anti-*T. equiperdum* antibody. IHC for *T.*
1760 *equiperdum*. (e) Skin of a C57BL/6 mouse in IG. Positive reactions are also detected in dermis.
1761 IHC for *T. equiperdum*. (f) Smear of peripheral blood of a BALB/c mouse in IG. Trypanosomes
1762 in peripheral blood have body form similar to those observed in subcutaneous tissue. Diff-Quick
1763 stain.

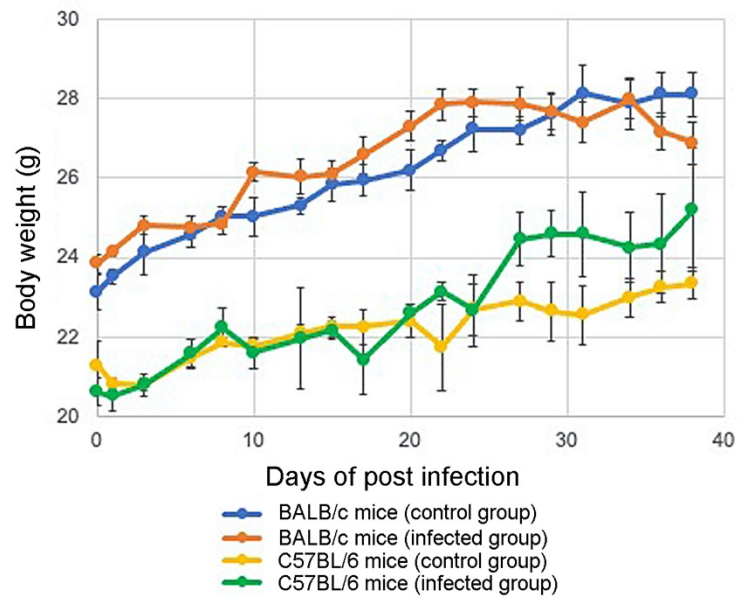
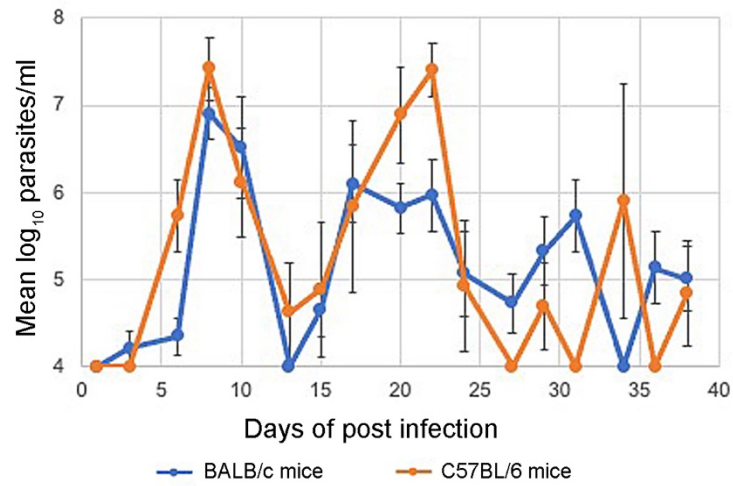


Figure 8. The transition of body weight of male BALB/c mice and C57BL/6 mice of IG and CG (mean value \pm standard deviation). In both mouse strains, there is no obvious difference in the rate of increase in body weight between IG and CG.



1769

1770

1771 **Figure 9.** The transition of parasitemia level of male BALB/c mice and C57BL/6 mice of IG
 1772 (mean value \pm standard deviation, limit of detection is 1×10^4 parasites/ml). The first peak in
 1773 parasitemia is detected at 8 dpi in both mouse strains, followed by periodic parasitemia for 30
 1774 days.

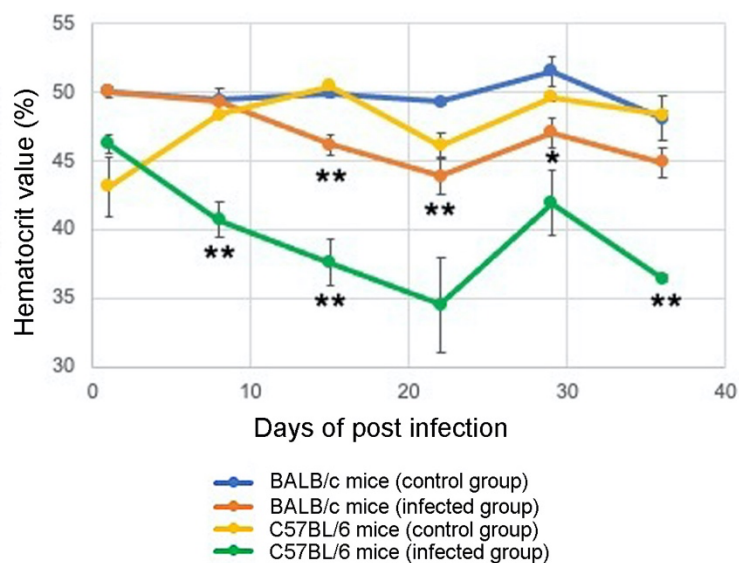


Figure 10. The transition of hematocrit value of male BALB/c mice and C57BL/6 mice of IG and CG (mean value \pm standard deviation). In both mouse strains, hematocrit values in IG are persistently lower than those in CG (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). Also, the differences are more apparent in C57BL/6 mice than in BALB/c mice.

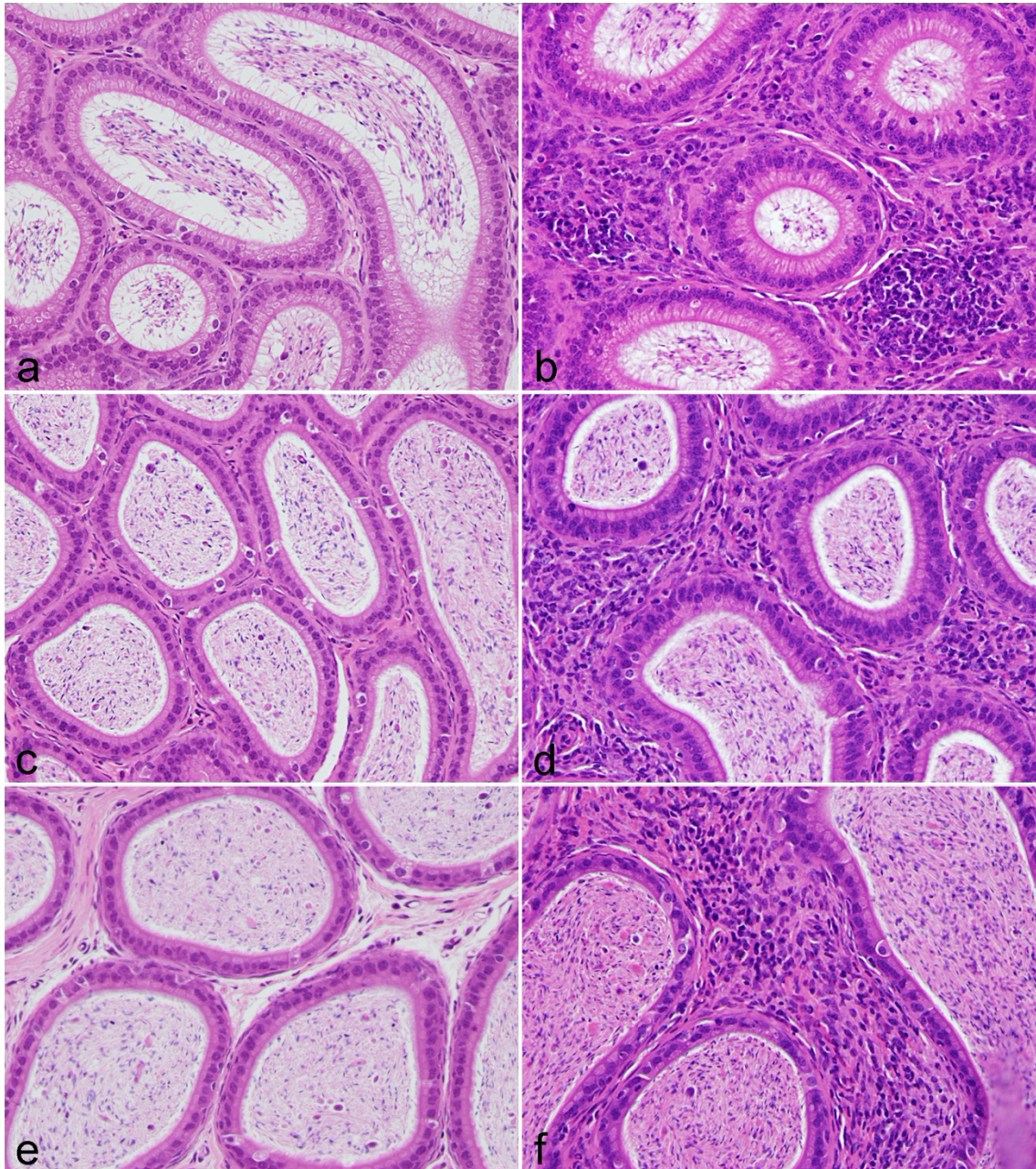


Figure 11. Epididymis of BALB/c mice in CG (a, c, e) and IG (b, d, f). In a CG mouse, there are no significant lesions in epididymal head (a), body (c), and tail (e). In an IG mouse, inflammatory cells infiltrate in the epididymal interstitium, and the area of interstitium is enlarged. The epididymitis is observed diffusely in epididymal head (b), body (d), and tail (f). HE stain.

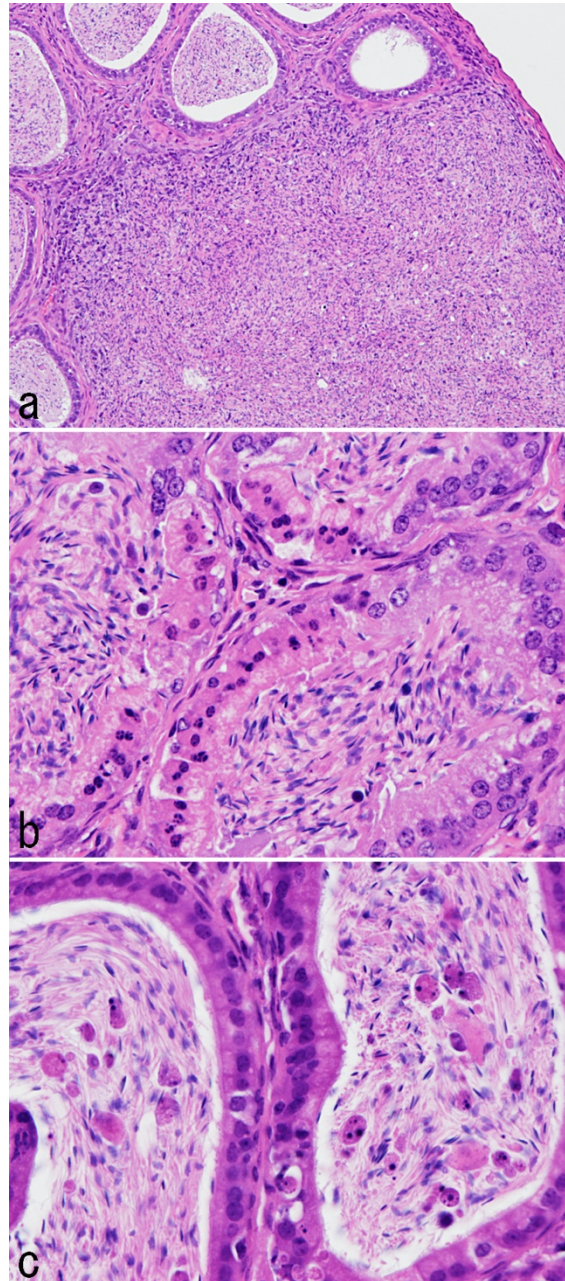


Figure 12. Epididymis of C57BL/6 mice in IG. (a) In addition to interstitial inflammation, the formation of sperm granuloma is observed. HE stain. (b) Focally, some epithelial cells of epididymal ducts have pyknotic nuclei and deeply eosinophilic, condensed cytoplasm. HE stain. (c) Round cells with aggregated chromatin and condensed cytoplasm are detected in the lumen of epididymal ducts. HE stain.

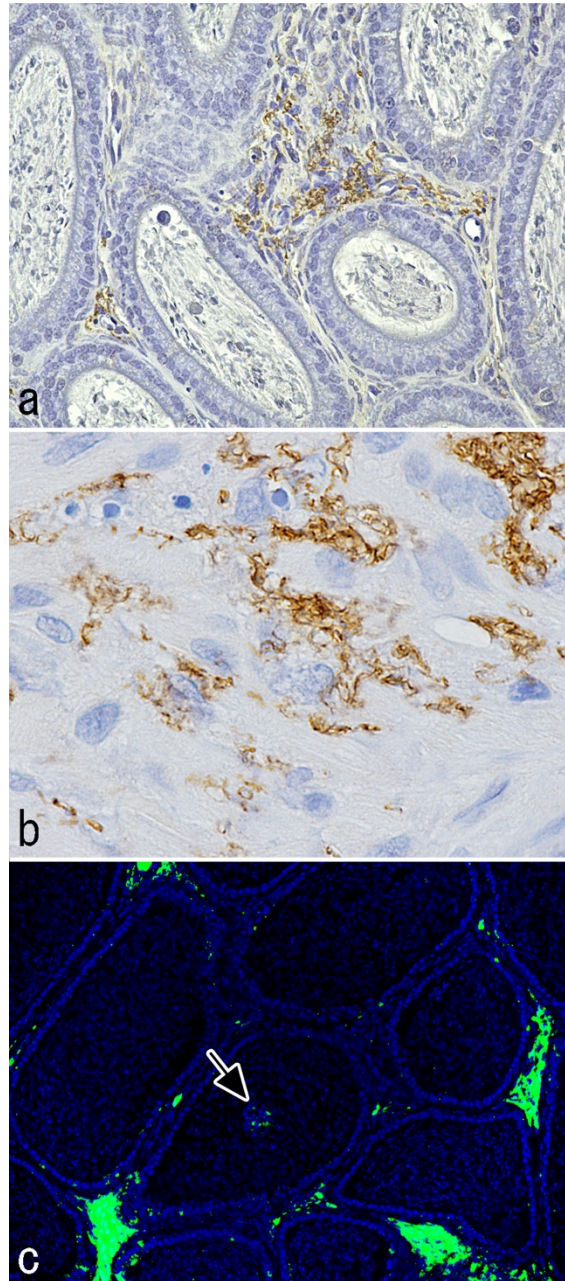


Figure 13. Epididymis of C57BL/6 mice in IG. (a) Many trypanosomes are detected in the epididymal interstitium. No trypanosomes are observed within the blood vessels of the interstitium. IHC for *T. equiperdum*. (b) Trypanosomes in the epididymal interstitium have spindle-shaped body with a streamlined and tapered shape. IHC for *T. equiperdum*. (c) In

1801 addition to diffuse positive reaction (green) in the interstitium, weak and focal positive reactions
1802 are also detected within the lumen (arrow). IF for *T. equiperdum*.

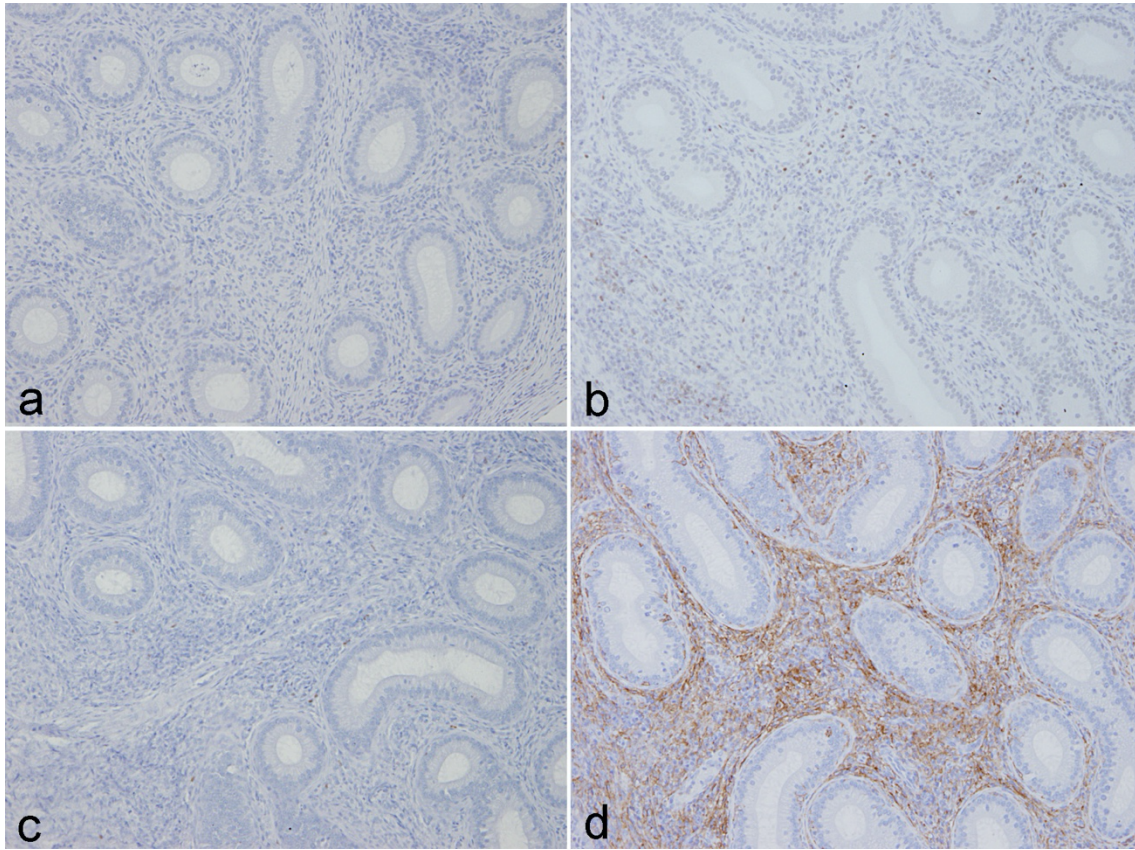


Figure 14. Epididymis of BALB/c mice in IG. While there are few CD3 (a), PAX5 (b), or FOXP3 (c) positive cells, inflammatory cells are strongly and diffusely stained with Iba1 (d). IHC for CD3 (a), PAX5 (b), FOXP3 (c) and Iba1 (d).

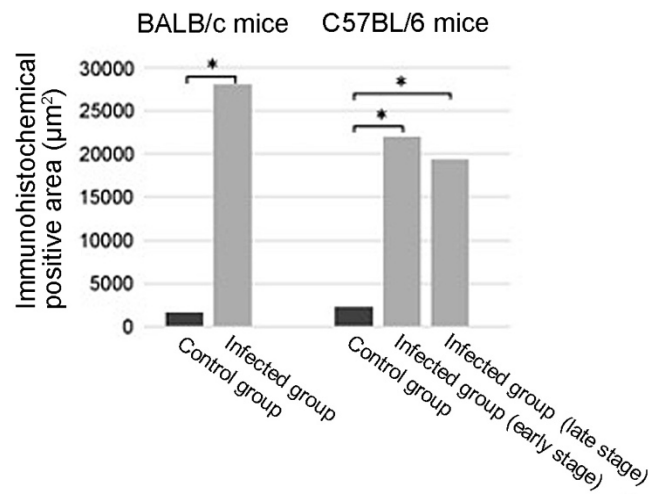


Figure 15. Semi-quantitative evaluation of IHC for Iba1 in epididymis. The immunohistochemical positive area for Iba1 of IG mice is significantly larger than those of CG mice in both mouse strains (* $p < 0.05$). Among the IG of C57BL/6 mice, there is no significant difference between early and late stage.

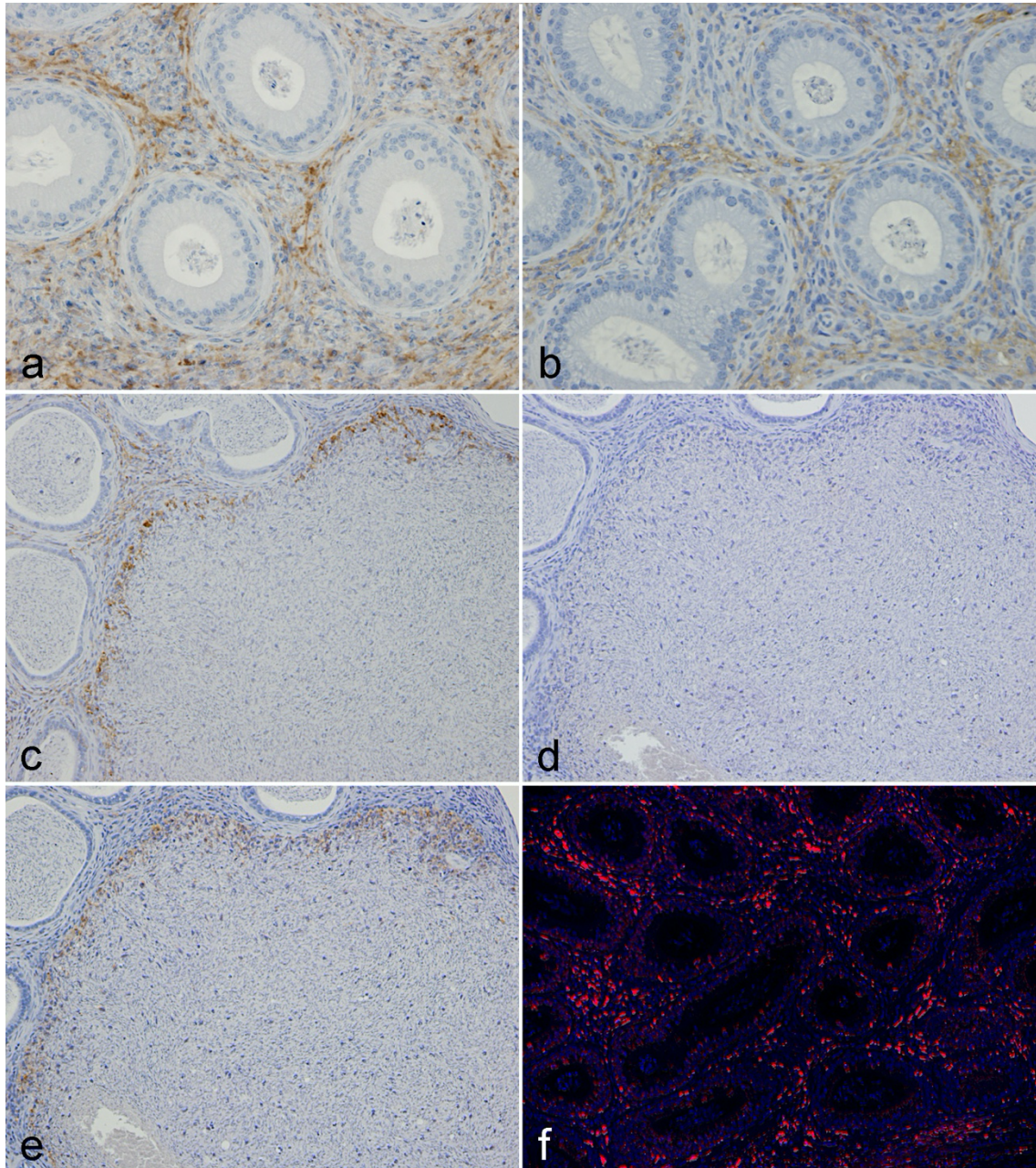


Figure 16. Epididymis of BALB/c mice (a, b) and C57BL/6 mice (c-f) in IG. (a, b) Both iNOS positive macrophages (a) and CD204 positive macrophages (b) infiltrate in the interstitium. IHC for iNOS (a) and CD204 (b). (c-e) The sperm granuloma is surrounded by Iba1 positive macrophages (c). Those macrophages are negative for iNOS (d), but positively stained with

1820 CD204 (e). IHC for Iba1 (c), iNOS (d), and CD204 (e). (f) The positive reactions for TNF- α
1821 (red) are multifocally detected in the interstitium. IF for TNF- α .

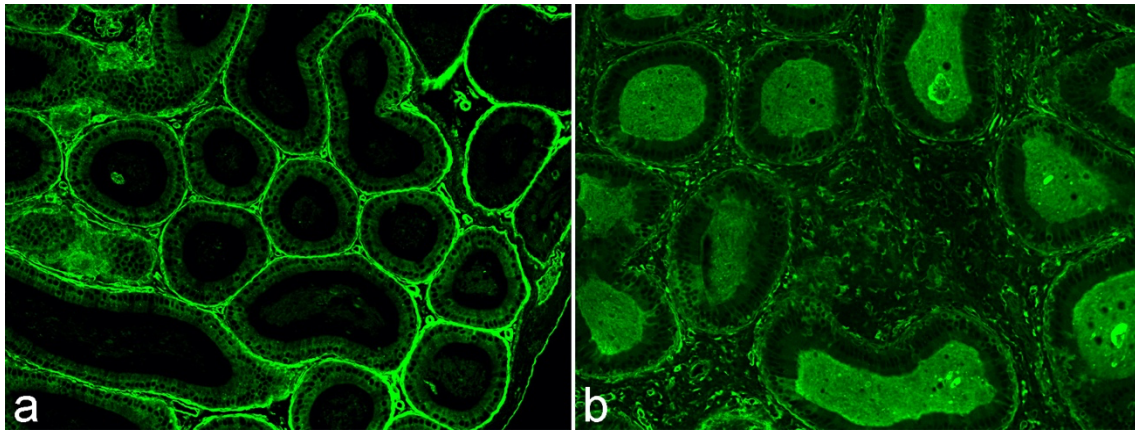


Figure 17. Epididymis of BALB/c mice in CG (a) and IG (b). The basement membrane of epididymal ducts in a CG mouse is clearly detected as a single membrane-like structure (a), while those in an IG mouse is indistinct and blurry (b). IF for laminin.

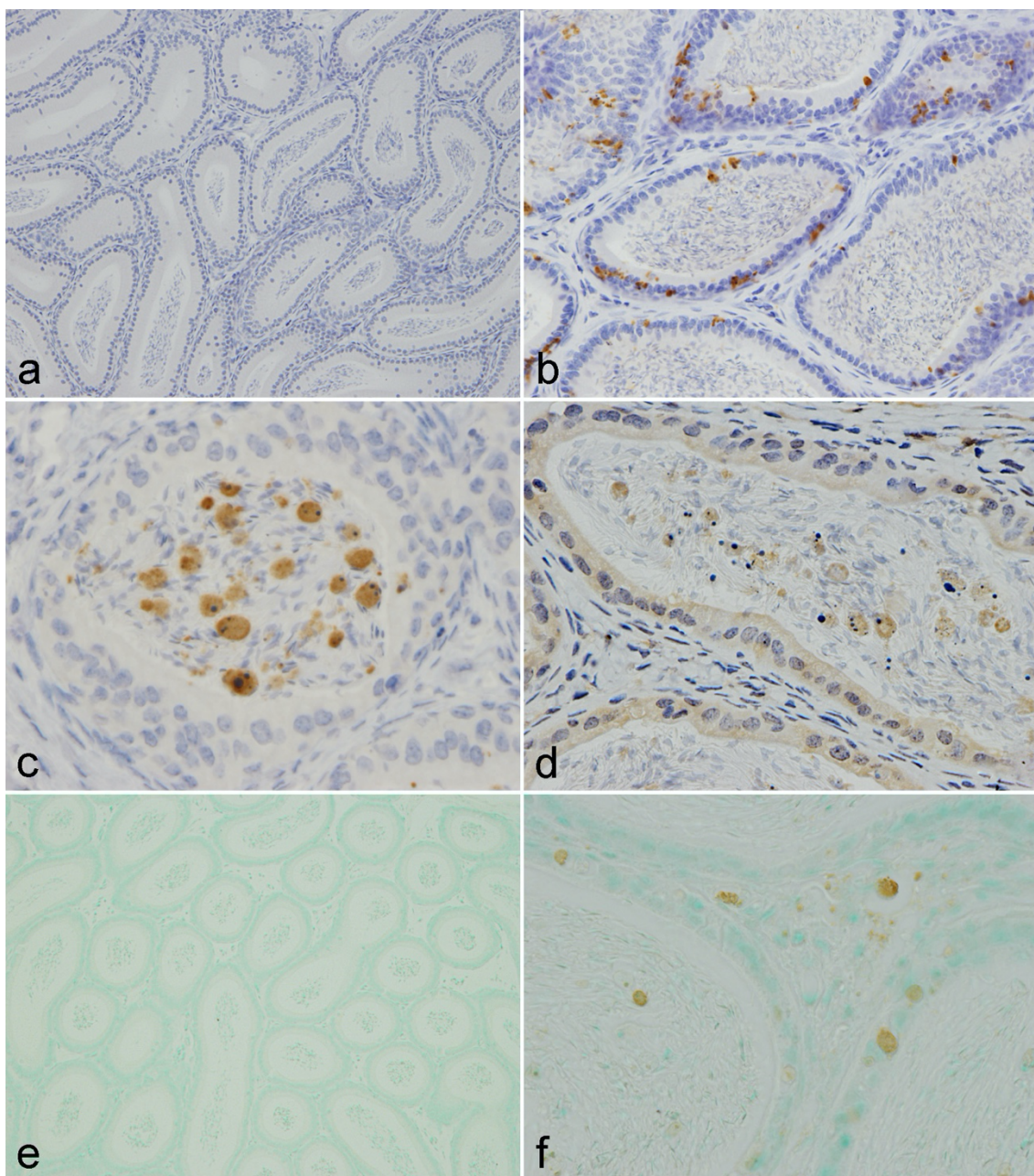


Figure 18. Epididymis of C57BL/6 mice in CG and IG. (a) Caspase-3 positive cells are not detected in the epididymis of a CG mouse. IHC for caspase-3. (b, c) In the epididymis of an IG mouse, caspase-3 positive epithelial cells are detected multifocally (b). Also, caspase-3 positive cells are observed within the lumen of epididymal duct (c). IHC for caspase-3. (d) The round cells positively stained with caspase-3 are also stained with cytokeratin 19. The positive

1834 reactions of cytokeratin 19 are also detected in normal epithelial cell cytoplasm. IHC for
1835 cytokeratin 19. (e-f) Positive reactions are not observed in the epididymis of a CG mouse (e), on
1836 the other hand, those are multifocally detected in epithelial cells, round cells within the lumen,
1837 and stromal inflammatory cells in an IG mouse (f). Apoptosis in situ Detection Kit Wako.

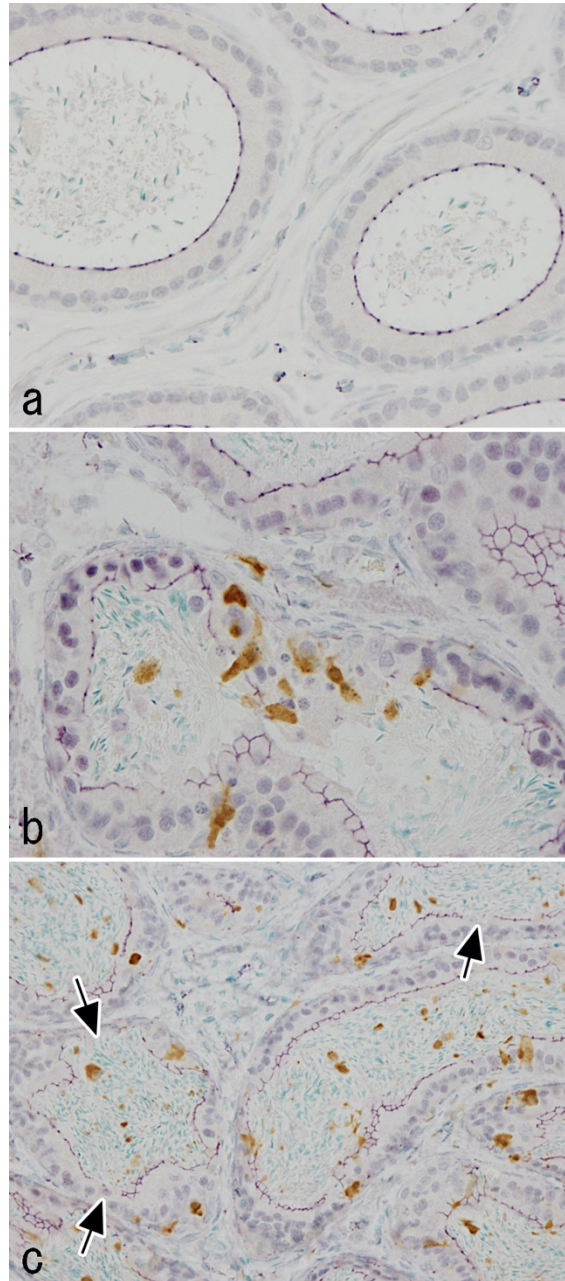


Figure 19. Epididymis of C57BL/6 mice in CG (a) and IG (b, c). (a) Positive reactions for ZO-1 (purple) are detected at the cell membrane on the luminal side of epididymal epithelial cells, which cover the luminal surface of the ducts like a single membrane. IHC for ZO-1. (b) ZO-1 positive reactions (purple) frequently disappear in the areas of aggregation of caspase-3 positive cells (brown). Double IHC for ZO-1 and caspase-3. (c) Focally, positive reactions for ZO-1 are

1845 disappeared without the cluster of caspase-3 positive cells (arrows). Double IHC for ZO-1 and
1846 caspase-3.
1847

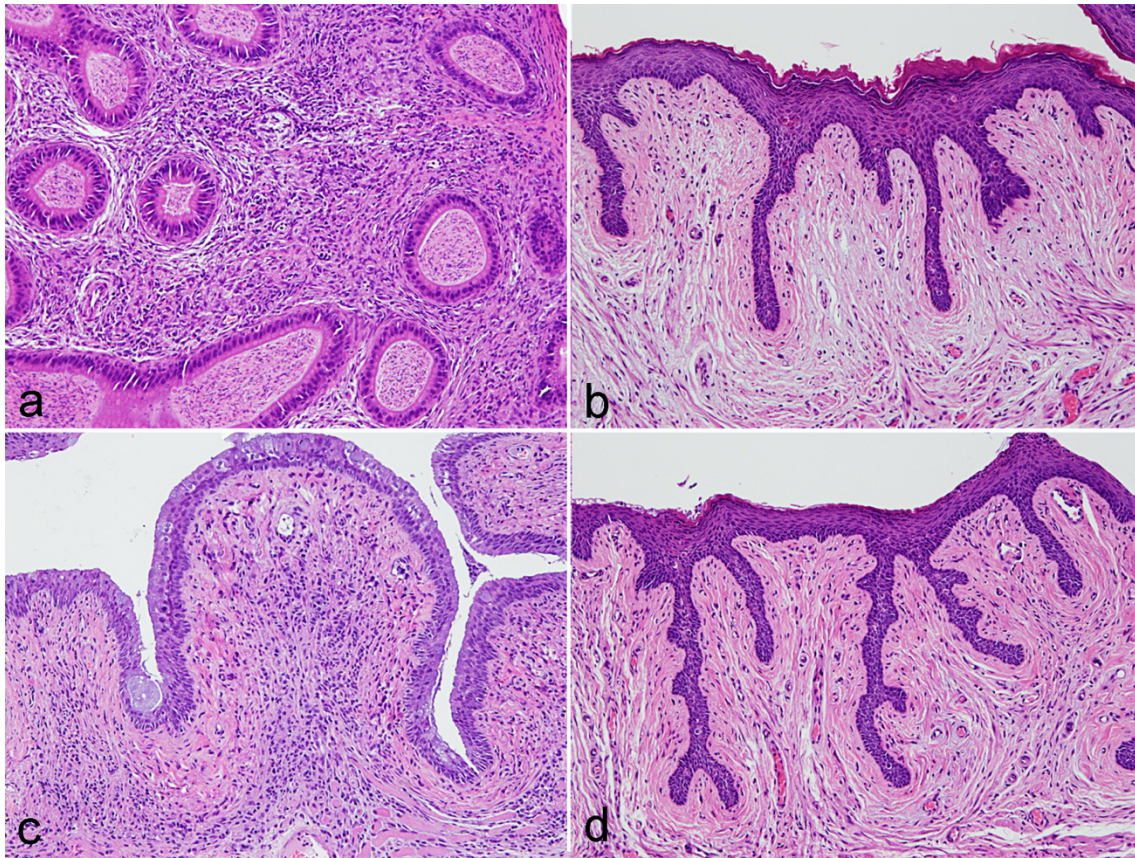


Figure 20. (a) Epididymis of a male BALB/c mouse infected with *T. equiperdum* by intraperitoneal administration. Inflammatory cells diffusely infiltrate into the epididymal interstitium. HE stain. (b) Vagina of a female BALB/c mouse kept in the same cage with an infected male mouse. No significant changes are observed. HE stain. (c) Vagina of a female BALB/c mouse infected with *T. equiperdum* by intraperitoneal administration. Diffuse inflammation is observed in lamina propria and tunica muscularis. HE stain. (d) Vagina of a female BALB/c mouse kept in the same cage with an infected female mouse. There are no histological lesions. HE stain.