

論文内容の要旨

応用動物科学専攻

平成9年度博士課程入学

氏名：片貝祐子

指導教官名：松本芳嗣

論文題目：Squirrel monkey model for severe human malaria

(リスザルを用いた重症熱帯熱マラリア モデルの開発)

マラリアはマラリア原虫の感染によって起こる疾患である。現在、世界人口の 2/3 がマラリア汚染地域に居住し、感染者数は年間約 3 億人、死者数は約 200 万人に上ると推定されている。マラリア原虫は感染ハマダラカの吸血時にヒトに感染し、まず肝細胞に侵入して分裂する(肝内発育期)。次に赤血球に侵入し、ヘモグロビンを代謝して発育・増殖する(赤内発育期)。赤血球に侵入した原虫は、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の場合、約 48 時間を要して輪状体・栄養体・分裂体と発育する。栄養体及び分裂体の感染赤血球表面には、原虫の遺伝子にコードされる様々な蛋白(knob など)が発現する。細胞分裂の結果形成された十数個の娘虫体は赤血球を破壊し、各々新たな赤血球に侵入することにより赤内発育期を繰り返す。マラリアの症状は赤内発育期に現れ、貧血・発熱・脾腫を三主徴とする。ヒトのマラリアには四種あるが、なかでも熱帯熱マラリアは脳性マラリア等重篤な合併症を併発することが知られており、脳症状を現した場合は適切な処置がなされなければ致死的である。しかし、熱帯熱マラリア原虫は宿主特異性が強く、チンパンジーなど高等類人猿を除くとリスザル *Saimiri*

sciureus 及びヨザル *Aotus trivirgatus* の2種の新世界ザルで実験感染が成立するにすぎず、適切な重症マラリア病態モデルは知られていない。このため、熱帯熱マラリアの病態形成機構については未だ不明な点が多く残されており、病態発現機序の解明及び治療法の開発には熱帯熱マラリア感染病態モデルが必要不可欠である。本研究では、リスザルを用いて熱帯熱マラリア原虫感染による重症マラリアの病態の再現に初めて成功し、さらにそれを用いた薬剤・ワクチン評価系を確立した。

第一章：熱帯熱マラリア原虫感染リスザルにおけるマラリア病態

ボリビアリスザルに熱帯熱マラリア原虫を感染させて重症マラリアの病態発現について検討し、病理組織学的変化と脳症との関わりを解析した。感染赤血球のドナーとして摘脾したリスザルに原虫を感染させ、新鮮な感染血液を採取した。遠心分離にて血漿を除去、さらに白血球除去フィルターを通して白血球を除去し、得られた感染赤血球 1×10^9 個を別のリスザルに静脈内接種した。接種されたリスザルでは、接種翌日から末梢血中に感染赤血球が認められ、その後赤血球感染率は急激に上昇し、接種8～9日目には22～51%に達した。感染期間を通じて、熱帯熱マラリアに典型的な48時間周期の体温変動が認められた。また血色素尿の排出がみられ、沈鬱・痙攣・意識障害・嗜眠などの神経症状等重篤な症状が引き起こされ、同様の方法で感染させた6頭のうち3頭が死亡した（他の3頭は瀕死と判定し麻酔死させ剖検に供した）。何れのサルにおいても著明な貧血、脾腫、及び肺の混濁化等が認められ、脳の断面には点状出血が観察された。これらのリスザルの各種臓器組織について組織学的検索を行ったところ、全頭の脳組織において、脳性マラリア患者の脳に見られる病理組織像と大変類似した、輪状あるいは楕円形をした出血巣（ring hemorrhage）が多数確認された。出血巣は皮質に近い髄質の部分に多く見られ、出血巣の中心部組織が疎になっている像がしばしば観察された。透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ、血管内皮細胞の細胞質が薄くなり、基底膜が一～四層になり波状を呈した像がしばしば認められ、脳実質における血管内皮細胞の異状が示唆された。なお、このような出血像は他の臓器組織では認められなかった。一方、観察した全ての組織において感染赤血球の血管内皮細胞への接着像（sequestration）が確認された。超微形態的には、感染赤血球表面に多数の knob が見られ、それらを介して血管内皮細胞に接着している像が認

められた。Sequestration は心筋、骨格筋、腎の傍皮質、皮下織等の微少血管において高率に観察された。脳の毛細血管でも sequestration が見られたが、その程度は心筋などに比べ低頻度であった。脳性マラリア患者の脳における主要な病理組織学的変化として sequestration 及び ring hemorrhage がしばしば認められることが報告されている。本研究成果は、リスザルを用いることによって動物に重症マラリアを発症させることができ、ヒトと同様の病理組織学的変化を再現できることを示している。また、神経症状を現わしたリスザルの脳組織の解析から、sequestration よりもむしろ ring hemorrhage が脳性マラリアの発症に深く関わることを示唆された。以上、熱帯熱マラリア原虫感染リスザルモデルが重症ヒト熱帯熱マラリアの実験動物モデルとなることが初めて示された。

第二章：薬剤の抗熱帯熱マラリア原虫効果 *in vivo* 評価系の確立

重症マラリアを発症する熱帯熱マラリア原虫感染リスザルを用いてデキサメタゾンの *in vivo* における抗マラリア効果を検討した。まず、熱帯熱マラリア原虫の *in vitro* 培養にデキサメタゾンを添加することにより、濃度依存的な原虫増殖抑制効果が確認された。次に、3頭のリスザルに各々異なる量のデキサメタゾンを1週間に3回の頻度で計16回経口投与し、投与開始後7日目に、ドナーザルより採取された熱帯熱マラリア原虫感染赤血球を静脈内接種した。これらのリスザルでは、デキサメタゾン投与期間中末梢血コルチゾール濃度が低下し、投与終了時には末梢血中の活性化 T 細胞比が減少していた。感染経過において、投与されたデキサメタゾンが高用量の個体ほど赤血球感染率は低値を示し、感染の進行に伴う赤血球減少及び白血球増加等の血液学的変化も小さくなる傾向が示された。また脳症など重篤な症状を現わすことなく治癒した。In vitro で得られた結果を併せると、デキサメタゾンは *in vivo* においても原虫に直接的に作用するものと考えられた。以上の結果から、デキサメタゾンが抗マラリア薬として有用であることが示された。さらに、熱帯熱マラリア原虫感染リスザルを用いることにより薬剤の原虫増殖抑制効果のみならず病態発現に対する効果を評価することが可能であることが示された。

第三章：抗熱帯熱マラリア原虫ワクチン効果の *in vivo* 評価系の確立

重症マラリアを発症する熱帯熱マラリア原虫感染リスザルを用いて、熱帯熱マラリア原虫赤内型抗原である serine repeat antigen (SERA) のワクチン効果の検定を行った（大阪大学・堀井俊宏博士との共同研究）。免疫原として、SERA 蛋白の 365 アミノ酸から成る 47kDa のフラグメントについて大腸菌発現系を用いてリコンビナント蛋白（SE47'）を作製した。リスザルは、SE47'単独免疫群・SE47'を Freund の complete 及び incomplete アジュバントに懸濁して免疫した群・及び対照群の 3 群に分け、2 週間間隔で 4 回免疫を行い、最終免疫の 2 週間後にドナーザルより採取された感染赤血球を静脈内接種した。SE47'を免疫した全てのリスザルにおいて SE47'特異抗体価の上昇が認められた。アジュバントに懸濁して免疫した群では、アジュバント投与による局所的組織壊死が引き起こされ、3 頭中 2 頭が免疫 3 及び 5 週目に各々死亡した。SE47'単独免疫群では、感染後抗体価は速やかに上昇し、対照群に比較して赤血球感染率は低値を示し、感染率が最高値に達するまでの日数が遅延した。さらに臨床症状も軽度のまま治癒した。以上の結果から、今後用いるアジュバントの更なる検討が必要なものの SE47' のワクチン効果が示され、また熱帯熱マラリア原虫感染リスザルを用いることによりワクチン候補物質の免疫原性、アジュバント等免疫方法及び病態抑制効果についての評価が可能であることが示された。

本研究により、リスザルに熱帯熱マラリア原虫を感染させることによってヒトの重症マラリアと同様の病態が再現されることが明らかとなり、sequestration や ring hemorrhage 等、脳性マラリアで重要な病理組織学的変化について解析が可能であることが初めて示された。特に、熱帯熱マラリア原虫感染による ring hemorrhage を高頻度に発現する in vivo 実験系はこれまで知られておらず、脳性マラリア発症機序の解明に役立つことが期待される。また、熱帯熱マラリア原虫感染リスザルを用いた抗マラリア薬及びワクチンの熱帯熱マラリア病態に対する効果評価系が確立された。これは、殺原虫効果のみならず病態発現を抑制する新規薬剤の開発に役立つと考えられる。以上、熱帯熱マラリア原虫感染リスザルは重症マラリアの病態モデルとして病態発現機構の解明及び治療法の開発に有用であると考えられた。