

## 論文内容の要旨

論文題目; Coinfection with nonlethal malaria parasites suppresses pathogenesis caused by lethal parasites.

和訳; マラリアにおける病態重症化の抑制に関する研究

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成19年4月入学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 新倉 保

### [序論]

マラリアは、熱帯病の中で最大の感染者を有する原虫感染症であり、小児を中心に年間100万人以上がその犠牲となっている。ヒトに感染するマラリア原虫には悪性の熱帯熱マラリア原虫と、比較的良好な経過をたどる三日熱、四日熱、卵形マラリア原虫の4種類が存在する。熱帯熱マラリア原虫は病態の重症化（脳マラリア、急性腎不全、重症貧血及び肝傷害などの発症）を引き起こすことによって宿主に致命的な障害を与える。特に脳マラリアは致死率が高く、マラリアにおける主な死亡原因の一つとなっている。熱帯熱マラリア原虫による病態の重症化は、マラリア原虫に対する免疫を有しない生後5歳以下の小児及び非流行地からの旅行者で起こりやすい。

以前より流行地では熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫との複合感染が報告されており、この複合感染では熱帯熱マラリア原虫が引き起こす病態の重症化が抑制されることがあると報告されている(Maitland *et al. Parasitol. Today* 1997)。しかし、この抑制機構は解明されていない。そこで本研究では、この複合感染による病態重症化の抑制機構を解析するにあたり、異種のマラリア原虫が存在することによって宿主免疫反応が変化し、病態を抑制していると推測した。

脳マラリアの発症には、TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインや CD8T 細胞が関与することが広く知られている (Hunt *et al. Trends Immunol.* 2003)。このことから複合感染では、発症に関わる IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン産生が抑制されることによって、脳マラリアの発症が抑制されているのではないかと推測した。そこで、この宿主免疫反応の変化による抑制機構についてマウスマラリア原虫を用いて解析することを試みた。

### [材料と方法① 供試原虫 *Plasmodium berghei* (Pb) ANKA、Pb NK65、Pb XAT について]

マウスマラリア原虫のうち *Plasmodium berghei* (Pb) ANKA は致死性株であり、宿主であるマウスに感染するとヒト脳マラリアと類似する症状を引き起こすことから、ヒト脳マラリア研究のモデルとして多用されている。これまでに、様々な KO マウスを用いた研究成果から

マウス脳マラリアの発症には IFN- $\gamma$  および CD8 陽性 T 細胞などが関与することが明らかにされている(Grau *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989; Rudin *et al. Am. J. Pathol.* 1997)。

*Pb* NK65 はマウスに感染すると重度の原虫血症、重症貧血、体重減少および肝傷害を引き起こす致死性株である。*Pb* NK65 が引き起こす肝傷害には Toll Like Receptor 9、IL-12、IFN- $\gamma$ 、CD8 陽性 T 細胞が関与することが明らかとなっている (Yoshimoto *et al. J. Immunol.* 1998; Adachi *et al. J. Immunol.* 2001)。*Pb* ANKA が引き起こす脳マラリア同様、*Pb* NK65 感染宿主体内でも過剰炎症が誘導され、病態発症に関与していると推測される。

*Pb* XAT は、*Pb* NK65 に放射線照射して分離された非致死性株で、マウスに感染するとは非常に低レベルの原虫血症を引き起こすが、感染 4 週間には自然治癒する。*Pb* XAT 感染の間、脳マラリアなどの病態は引き起こさない。

## [材料と方法② 原虫接種法]

これらの原虫を、単独感染ではそれぞれ  $1 \times 10^4$  の感染赤血球を感染させた。複合感染では致死性株と非致死性株をそれぞれ  $1 \times 10^4$  ずつ、計  $2 \times 10^4$  の感染赤血球を感染させた。

## [結果 1 : マウスマラリア原虫非致死性株との複合感染は、*Pb* NK65 致死性株感染による肝傷害を抑制する]

*Pb* NK65 単独感染マウスは急激な原虫血症の上昇と体重減少を引き起こし、早期に死亡した。一方、*Pb* NK65 と *Pb* XAT との複合感染マウスでは、*Pb* NK65 単独感染マウスで認められた急激な原虫血症の上昇が抑制され、生存期間が延長した。これらの感染マウスの感染後 9 日目の肝臓を解析した結果、*Pb* NK65 単独感染マウスでは肝細胞の壊死と白血球の浸潤が認められた。血清中では肝傷害の指標である AST および ALT が著しく増加しており、IFN- $\gamma$  の著しい産生増加が認められた。これに対して、複合感染マウスでは肝組織への白血球の浸潤が認められたが、肝細胞の壊死は抑制されていた。また、複合感染マウスでは *Pb* NK65 単独感染マウスと比較して血清中 ALT の増加は抑制され、IFN- $\gamma$  の産生も抑制されていた。さらに、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞について解析した結果、*Pb* NK65 単独感染マウスの脾臓中では CD4 陽性 T 細胞の増加が認められなかった。一方、複合感染マウスの脾臓中では CD4 陽性 T 細胞の増加が認められ、*Pb* XAT 単独感染マウスとほぼ同程度の CD4 陽性 T 細胞の増加を示した。

IL-10 は IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている (Mosmann *et al. Immunol. Today* 1991, Xu *et al. J. Immunol.* 2001)。そこで、感染後 9 日目の脾臓における IL-10 mRNA の解析を行った。解析の結果、*Pb* NK65 単独感染マウスと比較して、複合感染マウスで炎症抑制性サイトカインである IL-10 が有意に増加していたことから、IL-10 が肝傷害の抑制に関与していると推測された。この推測を IL-10KO マウスで検証した結果、WT で認められた複合感染による生存期間の延長効果は IL-10 KO マウスでは認められなかった。また、WT マウスでの複合感染では肝組織の傷害が抑制されていたのに対して、IL-10 KO マウスでの複合感染では広範囲な肝組織の壊死を伴う肝傷害を引き起こした。これらの結果から、マウスマラリア原虫複合感染による肝傷害抑制効果には IL-10 が関与することが示唆された (Niikura *et al. J. Immunol.*, 2008.)。

**[結果 2 : *Pb* ANKA が引き起こす脳マラリアは、非致死性株マラリア原虫との複合感染によって抑制される]**

*Pb* ANKA 単独感染マウスでは感染初期に原虫血症が増悪し、マウスは早期に死亡した。一方で、*Pb* ANKA と *Pb* XAT との複合感染マウスでは感染初期の原虫血症の増悪が抑制され、生存期間が大幅に延長した。これらのマウスについて脳の病理解析を行った結果、*Pb* ANKA 単独感染マウスでは典型的な脳マラリアの症状である脳出血が認められ、血管内には感染赤血球が観察されたが、複合感染マウスでは脳マラリアの症状は全く認められず、発症することはなかった。脳マラリアの発症に関わるサイトカインである TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  について解析したところ、*Pb* ANKA 単独感染後 6 日目の血清中で高レベルの TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の産生が認められた。一方、複合感染後 6 日目の血清中ではこれらのサイトカイン産生が抑制されており、弱毒株である *Pb* XAT と同様のレベルを示した。

マウスマラリア原虫複合感染による肝傷害抑制効果には IL-10 が関与することから (Niikura *et al. J. Immunol.*, 2008.)、複合感染による脳マラリアの抑制にも同様に IL-10 が関与している可能性があるとして推測し、IL-10KO マウスを用いて解析した。その結果、複合感染させた WT マウスで認められる生存期間延長効果は、IL-10KO マウスで消失し、マウスは早期に死亡した。これらの複合感染させたマウスについて脳の病理解析を行ったところ、複合感染させた IL-10KO マウスで、典型的な脳マラリアの症状である脳出血が認められ、血管内には感染赤血球が観察された。また、感染後 6 日目の血清中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の産生は WT マウスと比較して高レベルであることが示された。これらのことからマラリア原虫複合感染による脳マラリアの抑制にも IL-10 が非常に重要な役割を果たしていることが示唆された (Niikura *et al. I. J. P.*, 2009.)。

### [考察]

致死性株単独感染では炎症性サイトカインが過剰に誘導されることによって脳マラリアや肝傷害を引き起こし、マウスは死亡する。一方で、致死性株と非致死性株との複合感染マウスでは、炎症性サイトカインの産生が抑制され、その結果、脳マラリアや肝傷害の発症は抑制された。しかし、IL-10KO マウスでは炎症性サイトカインの産生を抑制できず、脳マラリアや肝傷害を発症した。以上の結果から、マウスマラリア原虫複合感染による病態抑制効果は、非致死性株が宿主免疫応答を修飾させることによって誘導されることが示唆された。

世界各地で報告されている多剤耐性熱帯熱マラリア原虫の存在と拡散は、致命的な経過をたどる熱帯熱マラリア原虫感染に対して治療を行う際に非常に深刻な問題となってきた。一方で、最も致死性の高い脳マラリアの発症には免疫学的機構が関わることから、宿主免疫応答を修飾させることによって脳マラリアの発症を抑制できる可能性がある。申請者のこれまでの実験により、マウスマラリア原虫複合感染モデルは、熱帯熱マラリア原虫が引き起こす脳マラリアを抑制する機構の解析に適した実験モデルであると考えられる。