

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590491

研究課題名(和文) 低亜鉛飼料給餌マウスにおけるマラリアに対する感染防御能の解析

研究課題名(英文) Immune response in the zinc-deficient mice infected with murine malaria.

研究代表者

渡部 久実 (WATANABE, HISAMI)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：50143756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：低栄養及び微量元素やビタミン欠乏による免疫機能低下は、発展途上国における小児・妊婦の感染症対策における喫緊の課題である。我々のフィールドでの研究からも、血中亜鉛濃度がマラリア感染リスクに関与することが示唆されたことから、ネズミマラリア原虫を亜鉛欠乏飼料給餌マウスに感染させ宿主の感染防御の動態を解析することにより、フィールドでの研究を検証すると共に、そのメカニズムを追求した。その結果、亜鉛欠乏状態下でのマラリア感染では、感染初期にはマクロファージによる貪食機能等の自然免疫機構により防御されるが、感染後期における原虫特異抗体産生の誘導が十分でないために、マラリア原虫の排除が困難であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Malaria is one of the most serious infectious diseases worldwide. Therefore, there were many reports suggested the importance of nutritional status to maintain the immunity against pathogens. In particular, zinc is known to play a critical role in responding to infections including malaria. We have examined the relationship between zinc deficiency and murine malaria infection. The objective of this study is to explore the effect of zinc deficiency to the immunity against malaria. Mice fed with zinc deficient diet were infected with murine malaria parasites and the immunological parameters were sequentially analyzed. The results of this study indicated the zinc deficiency might affect the immune responses to malaria. The following is suggested; in early phase of infection, both innate immunity and phagocytic activities of macrophages can be maintained. However, acquired immune system might fail to induce the production of malaria specific antibodies to eliminate the parasites.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：ネズミマラリア 亜鉛欠乏 自然免疫機構 Th2サイトカイン 原虫特異抗体産性能

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ラオス国のマラリア流行地における血清疫学調査から、マラリアの感染リスクについて、住民の感染抵抗性（感染防御能）の動態から検討してきた。その結果から、感染を繰り返し高いマラリア抗体価を有する住民は、比較的低栄養状態であることによりその感染リスクは高いものの、重症化を免れているのではないかと推察した(Acta Trop. 126: 193-197, 2013)。

感染症における「栄養と免疫」の考え方は、低栄養及び微量元素やビタミン類の欠乏により免疫能が低下し、より症状が重篤化するとの見方が多い。本研究課題で取り上げた亜鉛は、DNA 合成、RNA 転写、細胞分裂や細胞活性等の生物学的機能に必須であり、成長や発達及び免疫機能の維持に重要な役割を担うことが知られている。従って、亜鉛欠乏は成長不良や感染症に対する感受性や致死率に大きな影響を与えることから、発展途上国における小児と妊婦の重要な健康課題とされている。亜鉛欠乏は、好中球や NK 細胞、補体活性などの自然免疫（非特異的）機能を弱めることにより、獲得免疫機構を担う T 細胞や B 細胞の減少や、高度な免疫機能である細胞障害性や抗体産生機能を抑制するとされている。このような知見から、一部の発展途上国では感染症の予防や治療において亜鉛が栄養補助剤として用いられているが、Papua New Guinea と Gambia における研究ではマラリア感染率の低下がみられたが、Burkina Faso ではその効果がみられなかったとの報告も見られることから、動物モデルを用いてこれらを免疫学的視点から追及することは重要な研究課題と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者らのラオス国における血清疫学調査において、マラリアの感染リスクを住民の栄養状態（血清中の微量栄養素含量）より解析した結果を基に、亜鉛欠乏飼料

給餌マウスにネズミマラリアを感染させ、その免疫動態を解析することによりフィールドから得られた結果の検証をすると共に、そのメカニズムを追求する。これらの研究より得られた知見は、マラリアをはじめとする熱帯感染症制圧に向けての実験室レベルの基礎的データであり、フィールドからの知見と共に、発展途上国における新興・再興感染症対策に役立てることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) マウスとマラリア原虫：C57BL/6 マウス（8～14 週令）を用いた。給餌飼料は精製亜鉛欠乏飼料 (Zn(-))（亜鉛含有量 0ppm）、精製対照飼料 (Zn(+))（亜鉛含有量 21ppm）および通常飼料 (normal) の 3 種を用いた。亜鉛欠乏飼料並びに対照飼料給餌マウスは 3-4 週間の飼料への順化飼育を行った後、マラリア原虫の感染実験に用いた。亜鉛欠乏並びに対照飼料給餌マウスには、マラリア原虫の生育に必要なパラアミノ安息香酸 (PABA、150 mg/kg) を添加した。飲水は亜鉛欠乏飼料および対照飼料給餌マウスには亜鉛等の微量元素の摂取を防ぐ為に超純水を、通常飼料給餌マウスには水道水を自由摂取させた。ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17XNL（非致死株）はマウスで継代維持した後、実験に用いた。マウスへの感染はマラリア原虫寄生赤血球  $10^4$  個を腹腔内に接種することで行った。赤血球の原虫感染率 (Parasitemia) は血液の塗抹標本を作成し、常法のギムザ染色法により算出した。

(2) 血中亜鉛濃度測定：ヘパリン処理キャピラリーにて尾静脈より血液を採取し、遠心分離により血漿を得た。血漿は -80 °C にて凍結保存し、亜鉛濃度の測定は Zinc Assay Kit による比色定量法で算出した。

(3) 細胞分離：麻酔下で、マウスの心臓より全採血を行った後、肝臓や脾臓等を摘出した。各臓器を細切した後、スチールメッシュ

上ですりつぶし、単核球浮遊液を調整した。肝臓の細胞浮遊液はヘパリン加 35% Percoll 溶液による遠心で単核球を分離・採取した。

(4) リンパ球サブセットの解析：肝臓や脾臓等のリンパ球表面抗原の解析は、各種蛍光標識の抗マウスモノクローナル抗体による多重蛍光免疫染色法にて行った。蛍光免疫染色をした細胞はフローサイトメトリー (FACSCalibur) を用い CellQuest Pro ソフトウェアで解析した。

(5) サイトカインの測定：血漿中のサイトカイン IFN- $\gamma$  及び IL-4 等の測定は Cytometric Bead Array キット及び Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit を用いた。

(6) 原虫特異的 IgG 抗体価の測定：ネズミマラリア原虫に対する抗原特異的 IgG 抗体価の測定は粗抗原を用いた ELISA 法で行った。マラリア原虫の再感染 7 日目のマウス血清を陽性対照とし、IgG 抗体価を index で表した。マクロファージの貪食能の測定：肝臓の単核球に蛍光標識ラテックスビーズを添加培養することにより、ビーズをマクロファージに貪食させ、フローサイトメーターによる多重蛍光免疫染色法を用いて、貪食能を Mean fluorescent Intensity (MFI) で評価した。

(7) 検定：実験群の有意差検定には Student's *t*-test を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

(1) 一般的な動物飼育飼料は植物性タンパク質である大豆粕等を主体にしたペレット状である。本実験では亜鉛含量を極力少なくするために、栄養素の含有量や由来が明確な精製原料により調整された粉末状飼料を用いた。従って、通常飼育飼料、精製亜鉛欠乏飼料 (Zn(-)) と精製対照飼料 (Zn(+)) を用いた場合の体重・血中亜鉛濃度の変化を観察する必要がある。その結果、通常飼料と対照飼料給餌マウスでは体重の有意な変動は認め

られなかったが、亜鉛欠乏飼料給餌マウスではやや体重が低値を示していた。一方、亜鉛欠乏飼料群では明らかな血中亜鉛濃度の低下が認められたが、70 日後でもマウスは死亡することなく、血中亜鉛濃度を 90% 低下させる実験系が確立できた。

(2) 本実験で用いたネズミマラリア原虫は弱毒株であり、感染後約 2 週間で原虫の赤血球内寄生率がピークに達するが、その後宿主の免疫機構により原虫が排除される。通常飼料と対照飼料給餌マウスでは原虫が排除されるが、亜鉛欠乏飼料給餌マウスでは赤血球内寄生率のピーク時に全例が死亡した (図 1)。従って、亜鉛欠乏により免疫機構の不全がもたらされたものと考えられた。

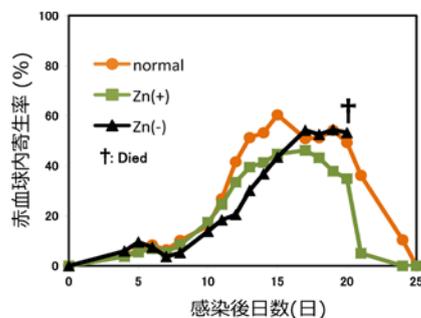


図 1 赤血球内原虫寄生率の経時的変化

(3) マラリアに対する宿主の感染防御機構についてはすでに多くの報告がある。病原体の侵入に伴い、感染初期にはマクロファージ、好中球、NK細胞、NKT細胞、 $\gamma$ TMT細胞などの自然免疫担当細胞が動員され、非特異的な免疫応答 (自然免疫機構) が誘導される。感染中期から後期にかけてはT細胞やB細胞が免疫応答の制御を担い、抗原特異抗体の産生や細胞障害性T細胞の誘導などの獲得免疫機構が感染防御の主体となる。我々は自然免疫担当細胞の機能解析を行い、特に原虫の排除を担うマクロファージについて注目した。肝臓と脾臓のマクロファージの動態を解析した結果、亜鉛欠乏飼料給餌感染 (亜鉛欠乏感染) マウスでは肝臓・脾臓においてマクロファージが増加するが、蛍光標識ビーズの取り込みで検

討したその食能については対照飼料給餌感染（対照感染）マウスとの差は見られなかった。従って、感染初期のマクロファージによる原虫排除機能は正常であることが明らかとなり、亜鉛欠乏感染マウスの死亡原因とはならないことが明らかとなった。

(4) 感染初期のマラリア感染防御を担う自然免疫機構は正常に機能していると考えられることから、その後に稼働する獲得免疫機構について解析を進めた。亜鉛欠乏飼料給餌感染マウスでは、免疫応答の制御をするCD4<sup>+</sup>T細胞の総数が肝臓及び脾臓で優位に減少していたが、エフェクター機能を発揮するCD8<sup>+</sup>Tにその差は見られなかった（図2）。

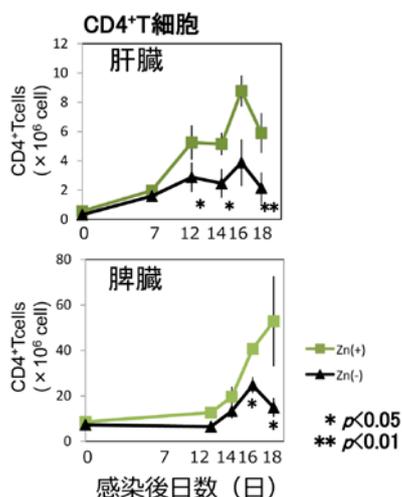


図2 肝臓と脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞数の変動

(5) 獲得免疫機構ではCD4<sup>+</sup>T細胞が産生するサイトカインがこれらの機能を制御することから、血中のサイトカインレベルを測定した。対照感染マウスと亜鉛欠乏感染マウスでは、細胞障害性T細胞の誘導などのTh1免疫応答を担うIFN- $\gamma$ の産生の有意な低下は認められなかったが、亜鉛欠乏感染マウスでは抗原特異抗体産生に関わるTh2応答を担うIL-4産生が感染中期から有意に低下していた。これらの結果から、亜鉛欠乏感染マウスにおける感染後期におけるマラリア原虫の排除に重要な原虫特異抗体の血中レベルを測定したところ、感染に伴う抗体価の上昇は

見られなかった。従って、Th2型CD4T細胞のIL-4産生が低下することにより、B細胞からの原虫特異抗体の産生が低下し、マウスが死に至ることが強く示唆された（図3）。

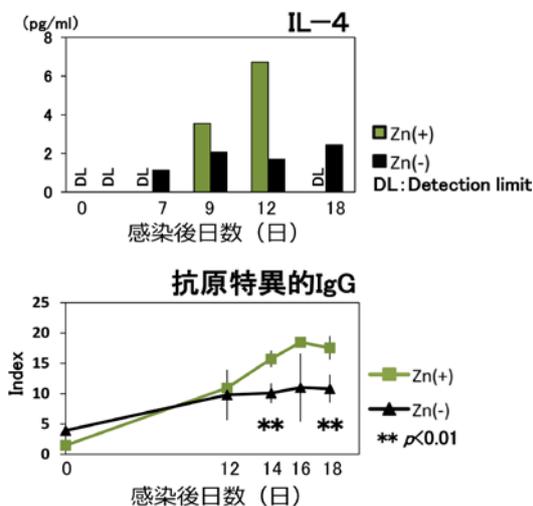


図3 血中サイトカインとマラリア原虫特異抗体価の経時的変化

(6) 本研究では、ネズミマラリア感染マウスモデルにおいても、宿主の亜鉛欠乏は感染防御機能の低下、特に感染後期の原虫排除の主体をなす特異抗体産生能の低下をもたらし、マウスが死亡することが強く示唆された。本研究で得られた成果がマラリアをはじめとする熱帯感染症制圧に向けての基礎的データとなり、発展途上国における新興・再興感染症対策やわが国の輸入感染症対策に役立てることが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

1. Akiyama, T., Taniguchi, T., Vanisaveth, V., Inamine, Y., Toma, N, Li C., Toma, H., Takeuchi R., Kobayashi, J., Kano, S., Hongvanthong, B., Watanabe, H. Association between serum zinc concentration and Plasmodium falciparum antibody titer among rural villagers of Attapeu Province, Lao People's Democratic Republic. Acta Trop. 126: 193-197, 2013. (査読有)

2. Mannoor, K., Li, C., Inafuku, M., Taniguchi, T., Sato, Y., Watanabe, H. Induction of ssDNA-binding autoantibody secreting B cell immunity during murine malaria infection is a critical part of the protective immune responses. *Immunobiology*, 218: 10-20, 2013. (査読有)
3. Tomiyama, C., Watanabe, H., Watanabe, M., Abo, T. Immunosuppressive function of dendritic cells existed in the liver. *Curr. Res. Immunol.*, 6: 1-7, 2012. (査読有)
4. Abo, T., Tomiyama, C., Watanabe, H. Biology of autoreactive extrathymic T cells and B-1 cells of the innate immune system. *Immunol. Res.*, 52: 224-230, 2012. (査読有)
5. Li, C., Mannoor, K., Inafuku, M., Taniguchi, T., Inamine, Y., Miyazaki, T., Watanabe, H. Protective function of an unconventional  $\gamma\delta$ T cell subset against malaria infection in apoptosis inhibitor deficient mice. *Cell. Immunol.* 279: 151-159, 2012. (査読有)
6. Toma, H., Hatabu, T., Vanisaveth V., Mannoor, K., Watanabe, H., Li, C., Kobayashi, J., Phompida, S., Kano, S., Sato, Y. Efficacy of mefloquine treatment and genetic profiles in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Lao PDR. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 42: 759-763, 2011. (査読有)
7. Tomiyama, C., Watanabe, H., Izutsu, Y., Watanabe, M., Abo, T. Suppressive role of hepatic dendritic cells in concanavalin A-induced hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 166: 258-268, 2011. (査読有)
- [学会発表] (計 17 件)
1. 李長春、稲嶺由羽、渡部久実 Analysis of the mechanism of anemia and the importance of extra-medullary erythropoiesis in murine malaria 第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 27-28 日、愛媛。
2. Watanabe, H. Sero-epidemiological survey of malaria in the border area of Quang Tri Province, Vietnam. The 4<sup>th</sup> International Symposium on Human Monkey Malaria in Vietnam (Nagasaki, Japan), 26-27 Nov., 2013.
3. Phongmany, P., Watanabe, T., Araki, M., Sourinphomy, K., Watanabe, H., Sopraseuth V., Moji, K., Southalack P., Nhativong K., Kobayashi, J. Genetic analysis of HIV-1 subtypes and drug resistance mutations in Savannakhet Province, Lao PDR. The 11<sup>th</sup> International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. (Bangkok, Thailand), 18-22 Nov., 2013.
4. 9. Li, C., Inamine, Y., Watanabe, H. Multifactorial anemia and induction of extra-medullary erythropoiesis in murine malaria. 第 81 回日本寄生虫学会大会 2012 年 3 月 23-24 日、西宮。
5. 10. 稲嶺由羽、李長春、稲福征志、渡部久実 マウスモデルにおける低亜鉛状態下のマラリア感染時の免疫動態について 第 81 回日本寄生虫学会大会 2012 年 3 月 23-24 日、西宮
6. 11. Akiyama, T., Taniguchi, T., Inamine, Y., Takeuchi, R., Moji, K., Kano, S., Pongvongsa, T., Watanabe, H. Asymptomatic malaria and anemia among children in Savannakhet Province, Lao PDR. 5<sup>th</sup> ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology (Manila, Philippines), 15-16 May, 2012.
7. 12. Akiyama, T., Taniguchi, T., Toma, H., Inamine, Y., Takeuchi, R., Kobayashi, J., Kano, S., Pongvongsa, T., Vanisaveth, V., Hongvanthog, B., Watanabe, H. Field research: Micronutrient status and malaria infection among rural villages of Lao PDR.

- 18<sup>th</sup> International Congress for Tropical medicine and Malaria (Rio de Janeiro, Brazil), 23-27 Sep., 2012.
8. 13. Watanabe, H. Quang Tri Report: Molecular and Sero-epidemiology of malaria in the border area of Quang Tri Province, Vietnam. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Human Monkey Malaria in Vietnam (Inuyama, Japan), 18-19 Dec., 2012.
  9. 14. Inamine, Y., Li, C., Watanabe, H. Immune responses to malaria in a mouse model of zinc deficiency. 第41回日本免疫学会総会、2012年12月5-7日、神戸.
  10. 1. Akiyama, T., Taniguchi, T., Inamine, Y., Takeuchi, R., Moji, K., Kano, S., Watanabe, H. Asymptomatic malaria, growth status and anemia among children in Savannakhet Province, Lao PDR. The 5<sup>th</sup> National Health Research Forum to Promote the Health Research System Strengthening in Lao PDR. (Vientiane, Lao PDR), 29-30 Sep, 2011.
  11. 稲嶺由羽、李長春、稲福征志、渡部久実. 低亜鉛飼料給餌マウスにおけるマラリアに対する感染防御能の解析、第22回日本生体防御学会学術総会、2011年6月29日-7月1日、那覇.
  12. Li, C., Mannoor, K., Watanabe, H. Induction of ssDNA-binding autoantibody secreting B cell immunity during murine malaria infection is a critical part of the protective immune responses. 第22回日本生体防御学会学術総会、2011年6月29日-7月1日、那覇.
  13. 李長春、Mannoor, K., 稲福征志、渡部久実. The important role of ssDNA-binding autoantibody secreting B cells in malaria infection. 第80回日本寄生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大会、2011年7月17-18日、東京.
  14. 秋山剛、谷口委代、稲嶺由羽、竹内理恵、門司和彦、狩野繁之、渡部久実. ラオス国サワナケート県における児童の成長状態と、不顕性マラリア感染及び貧血について、第52回日本熱帯医学会大会・第26回日本国際保健医療学会学術大会、2011年11月4-6日、東京.
  15. 稲嶺由羽、李長春、稲福征志、渡部久実. 低亜鉛飼料給餌マウスにおけるマラリア感染時の免疫動態について、第52回日本熱帯医学会大会・第26回日本国際保健医療学会学術大会、2011年11月4-6日、東京.
  16. Li, C., Mannoor, K., Inafuku, M., Inamine, Y., Watanabe, H. Protective function of autoantibody secreting B cells in murine malaria infection. 第40回日本免疫学会総会、2011年11月27-29日、千葉.
  17. Inamine, Y., Li, C., Inafuku, M., Watanabe, H. Immune response in the zinc-deficient mice infected with murine malaria. 第40回日本免疫学会総会、2011年11月27-29日、千葉.
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- ホームページ等  
<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/immunobiology/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 渡部 久実 (WATANABE HISAMI)  
 琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授  
 研究者番号：50143756
  - (2) 研究分担者  
 李 長春 (Li Changchun)  
 琉球大学・亜熱帯島嶼科学超域研究推進機構・助教  
 研究者番号：20457691