

研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20790325  
研究課題名（和文） 繰り返し感染あるいは再燃患者における脳マラリア抵抗性機序のマウスモデルによる解析  
研究課題名（英文） Experimental rodent model of cerebral malaria in semi-immune and recrudescence animals  
研究代表者 グエン フィ ティエン（ Nguyen Huy-Tien ）  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：20457526

## 研究成果の概要（和文）：

準免疫状態あるいは再燃マラリア患者における脳マラリア（CM）の発症は稀であるものの、流行域ではしばしば問題となる。流行域における成人はマラリアに対して部分的な免疫を獲得しているため、子供に比べて CM に対して抵抗性を持つ。しかし、CM から宿主を守るのに十分な免疫を獲得するために何回の感染が必要なのかは未だに不明である。本研究で 2 系統のマウス（B6、Balb/c）に 0～2 回の事前感染と治療のサイクルを繰り返した後、104 個の Plasmodium berghei ANKA に感染させ、以下を明らかにした。（1）2 回の事前感染により感受性 B6 マウスを CM から保護できる、（2）非感染および 1 サイクル事前感染マウスにおいて CM の病態に違いは見られない、（3）CD8 T 細胞、血液脳関門レギュレーター・アンジオポエチン-1（ANG-1）とアンジオポエチン-2（ANG-2）および遊離ヘムが CM の病態に関係する。

## 研究成果の概要（英文）：

Cerebral malaria (CM) in semi-immune and recrudescence individuals is rare but still a real issue in endemic areas. In endemic areas, adults are less vulnerable to CM than children because of acquired partial immunity, and the question that how many infections are required to get acquired immunity to protect the host against CM is still unsolved. Here, we developed a CM model in semi-immune and recrudescence animals for better understanding of cerebral malaria and provide a tool for treatment of the disease. To assess the CM occurring in semi-immune mice, 2 strains of mice (B6, Balb/c) were taken through several cycles (0-2 cycles) of infection and treatment, then the mice was challenged with with  $10^4$  P. berghei ANKA again without treatment. This study helps to understand the follow: (1) CM can occur in non-immune and semi-immune B6 mice but not in recrudescence mice. (2) Pre-infection did not affect the CM susceptibility of resistant Balb/c mice. (3) Two infections are required for protection of CM in susceptible B6 mice. (4) The pathogenesis of CM is not different between naïve and 1 cycle infection B6 mice. (5) CD8 T-cells, blood-brain-barrier regulators angiopoietin-1 (ANG-1) and angiopoietin-2 (ANG-2), and released heme contributed in the pathogenesis of CM. (6) Antioxidants and heme chelators could be used as complement treatment for CM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア，脳マラリア，準免疫，再燃，マウス

1. 研究開始当初の背景

脳マラリア（CM）は主に若い子供と非免疫成人に発生する。しかし、近年、流行域に住む準免疫成人（多少の免疫を獲得している成人）、薬剤による治療後に再燃したマラリア患者においてCMの発生が報告されている。流行域では、成人はマラリアに対して部分的な免疫を獲得しているため、子供に比べてCMに対して抵抗性を持つ。しかし、CMから宿主を守るのに十分な免疫を獲得するために、何回の感染が必要なのは未だに不明である。さらに、準免疫状態の成人におけるCMは、発熱がない[4]、パラシテミアが上がらない[1]、脳における病巣が見られない[5-7]など、非免疫状態の患者の病態とは異なる。

流行域では、準免疫状態のCM患者においてパラシテミアが上がらないために、マラリアの初期検出がしばしば困難となる。加えて、アフリカではマラリアは頻りに起こる発熱の原因であるため、医療施設が整っていない地方において自己診断および抗マラリア薬による自己治療が一般的であり、マラリアの診断の遅れあるいは誤診につながっている。これらは、準免疫あるいは再燃患者におけるCMは流行域において現実の問題であることを示している。しかし、未だに実験動物モデルでのCMに関する報告は無い。そのため、我々はげっ歯類を用いて準免疫あるいは再燃動物におけるCMを解析することを目指した。

2. 研究目的

(1) 3種のマウス（非免疫、準免疫、再燃）は

CMを発症するか？準免疫マウスでCMから防御するために必要な事前感染回数はいくらか？ 2系統のマウス(B6, Balb/c)を用いて、非免疫、準免疫および再燃マウスを作出し、マラリア原虫に感染させる。CMの発症を組織学的解析および血液脳関門の破壊によって確認する。

(2) 3種のマウス（非免疫、準免疫、再燃）においてCMの病態は異なるか？ プロ炎症性サイトカインによる炎症および脳に浸潤した $\alpha\beta$  CD8リンパ球が非免疫マウスのCMに関与していると考えられている。この仮説を検討するため、3種類のマウスにおける血中サイトカイン量をタンパク質レベルおよびmRNAレベルで解析するとともに、脳内浸潤 $\alpha\beta$  CD8リンパ球を定量する。さらに、CD8ノックアウトB6マウスを用いてCMにおけるCD8の役割を解明する。また、HO-1の発現レベルの測定、4系統のマウスのプロモーター配列解析による多型の分析、ルシフェラーゼアッセイによる機能解析を行う。

(3) CMを誘導する炎症性インデューサーはどこから供給されるのか？抗酸化剤およびヘムキレーターはCMの治療薬として有効か？ 感染血に遊離される遊離ヘムは炎症を誘導する最も重要な因子であると考えられている。感染Balb/cマウス（CM耐性として知られている）にヘムを注射し、Balb/cをCM感受性に変換する（我々の予備的データに基づく）。Ex vivoおよびin vivoチャレンジによって脳マラリアの治療薬となりえる物質をスクリーニングする。

### 3. 研究方法

#### (1) 3種のマウス (非免疫、準免疫、再燃) を用いた脳マラリアモデルの開発

①マラリア感染とCMの評価: 全ての実験において  $10^4$  個のマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA をマウスに感染させる。CMの神経学的徴候 (興奮、半側まひ、運動失調、頭偏位、痙攣) を1日2回観察する。原虫および網状赤血球はギムザ染色によって計数する。ヘモグロビン量はDrabkin試薬 (シグマ社製) を用いて解析する。

②再燃マウスにおける実験的CM: 7~8週齢の各マウス系統 (Balb/c, B6, CBA, NZW) 10匹ずつに  $10^4$  個のマラリア原虫を感染させ、6日後から5日間クロロキン (10 mg/kg) を投与する。ギムザ染色およびPCR法によって原虫が検出されたマウスを再燃マウスとし、さらに30日間観察し、CMを評価する。

③非免疫および準免疫マウスにおける実験的CM: 各系統のマウス (Balb/c, B6, CBA) に感染6日目から5日間、クロロキン (10 mg/kg) およびピリメチン (10 mg/kg) を投与して準免疫マウスを作成する。2週間投与を中断し、再燃の徴候が無いことを確認する。感染と薬剤投与 (1回~3回) を繰り返し行って作成した準免疫マウスおよび非免疫マウスに  $10^4$  個のマラリア原虫を感染させ、30日間観察し、CMを評価する。

④血液脳関門の透過性: CMの病態を確認するため、感染マウスにおける血液脳関門の透過性を検討する。すなわち、CMの医学的徴候が検出された時に、エバンスブルー (シグマ社製) を静脈より注入する。1時間後にマウスを殺し、脳を摘出する。脳をホルマリン溶液に浸してエバンスブルーを抽出し、620 nmの吸収を測定してエバンスブルーの濃度を測定する。

⑤感染脳の組織学的解析: マウスCMにおいて脳毛細血管における活性化白血球および赤血球の凝集、脳実質における出血が報告されている。脳マラリアの病態をさらに解析するため、CM感受性マウスの組織学的解析を行う。

#### (2) 3種のマウス (非免疫、準免疫、再燃) およびCD8ノックアウトB6マウス (Jackson Laboratoriesより購入) のマラリアにおける炎症性サイトカインの比較

①サイトカインの産生量: プロ炎症性サイトカイン (腫瘍壊死因子 (TNF)  $-\alpha$ 、インターフェロン  $\gamma$ 、インターロイキン (IL)  $-2$ 、IL-12a、IL-12b) および抗炎症性サイトカイン

(IL-4、IL-10) の血中タンパク質レベルをELISA法によって測定する。種々の組織および全血におけるこれらサイトカインのmRNA量を半定量RT-PCR法およびリアルタイムPCR法によって測定する。

②脳内浸潤  $\alpha\beta$  CD8リンパ球の定量: CMマウスをと殺し、生理食塩水を灌流して脳内の赤血球および白血球を除去する。脳を摘出し、ホモジェナイズしてリンパ球を単離する。脳内の浸潤  $\alpha\beta$  CD8リンパ球をフローサイトメトリーで定量する。

### 4. 研究成果

#### (1) 事前感染のCMに対する効果

準免疫マウスのCMを評価するため、2系統のマウス (B6, Balb/c) に0~2回の感染と治療のサイクルを繰り返した後、 $10^4$  個の *Plasmodium berghei* ANKAに感染させた。結果を表1に示す。

表 1. 非免疫、準免疫、再燃マウスにおけるCMによる死亡数

	B6 <i>n</i> (%)	Balb/c <i>n</i> (%)
非免疫 (事前感染なし)	10/10 (100%)	0/6 (0%)
準免疫 1 回事前感染 - 治療	8/8 (100%) 0/6 (0%)	0/6 (0%) 0/4 (0%)
2 回事前感染 - 治療		
再燃	0/6 (0%)	0/6 (0%)

非免疫 B6 マウス 10 匹中 10 匹、事前感染 1 回の B6 マウスは 8 匹中 8 匹が感染後 7 日から 10 日目で死亡した。その際、パラシテミアは低く、貧血も無かったことからマウスはCMのために死亡したと考えられる。死後解剖の結果、これらのマウスは脳内出血が見られ、CMを確認することができた。一方、事前感染 2 回の B6 マウスは 6 匹中全てがCMにならなかった。これは、2 回のマラリア事前感染によりCMが防げることを示している。コントロールとして用いた非免疫および準免疫 Balb/c マウスはCMに非感受性であった。さらに、再燃マウスでは B6、Balb/c いずれの系統もCMを示さなかった。

#### (2) 準免疫マウスにおけるCMの病態

脳内における  $\alpha\beta$  CD8 リンパ球の sequestration (遮蔽) と数種類のサイトカインによる炎症は非免疫マウスにおけるCMの進展に重要な役割を果たしている。本研究では、非免疫および 1 回事前感染 B6 マウ

スのCMにおいてサイトカインレベル、血漿中のmRNAの発現および脳内CD8リンパ球数に有意差は認められなかった。さらに、血液脳関門レギュレーターであるアンジオポエチン-1 (ANG-1) およびアンジオポエチン-2 (ANG-2) の血漿中のレベルにも差は認められなかった。これらは、1回の事前感染はマウスの免疫システムに大きな影響を及ぼさないことを示している。

しかし、2回事前感染B6マウスの脳内CD8リンパ球の数は1回事前感染マウスと比較して減少していた。2回事前感染B6マウスにおいてANG-1レベルは有意に減少していたが、ANG-2レベルおよびANG-2/ANG-1比は有意に増加した。これは、CD8リンパ球数およびANG-2/ANG-1比がCMの病態に重要であることを示している。

### (3)CMに対する補完療法としてのヘムキレターの効果

マラリア感染血中に放出される遊離ヘムは炎症反応を惹起する重要な因子であることが報告されている。本研究において、感染Balb/cマウス (CM耐性として知られている。) にヘムを注入すると、10匹中全部が死亡することを見出した。組織学的解析の結果、この死亡原因はCMによることを確認した。さらに、抗酸化剤およびヘム分解剤でもある還元型グルタチオンGSHの合成を阻害するブチオニンスルフォキシミン (4 mmol/kg) を感染Balb/cマウスに投与すると、100% (8匹中8匹) が2週間以内にCMのために死亡した。抗酸化剤および抗炎症剤でもあるブチルヒドロキシアニソールを感染B6マウスに投与すると、10匹中7匹がCMによる死亡を免れた。これらの結果は、抗酸化剤および抗炎症剤がCMに対するアジュバント療法に有効であることを示している。今後、その効率と安全性を明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Nhien NT, Huy NT, Naito M, Oida T, Uyen DT, Huang M, Kikuchi M, Harada S, Nakayama K, Hirayama K, Kamei K. (2010). Neutralization of Toxic Heme by *Porphyromonas gingivalis* Hemoglobin Receptor. *J Biochem.* **147**(3):317-25 (査読有)
- ② Hoa PT, Huy NT, Thu LT, Nga CN, Nakao

K, Eguchi K, Chi NH, Hoang BH, Hirayama K. (2009). A Randomized-Controlled Study investigating Viral Suppression and Serological Response following PreS1/PreS2/S Vaccine Therapy Combined with Lamivudine in HBeAg-positive Chronic Hepatitis B Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**. 5134-40. (査読有)

- ③ Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K (2009). Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malar J.* **5**. 91 (査読有)

[学会発表] (計 3件)

- ① Gideon kofi helegbe, Tetsuo Yanagi, Masachika Senba, Nguyen Tien Huy, Mohammed Nasir Shuaibu, Akiko Yamazaki, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, and Kenji Hirayama. Histopathologic studies in different strains of semi-immune mice infected with *P. berghei* ANKA after chronic exposure. Conference presentation (poster) at the 58<sup>th</sup> ASTMH (America Society of Tropical Medicine and Hygiene), Marriot Wardman Park, Washington, DC, USA. November 18<sup>th</sup>-22<sup>nd</sup> 2009 (査読有)
- ② Nguyen Tien Huy, Nguyen Thanh Hong Thao, Truong Huu Khanh, Nguyen Anh Tuan<sup>2</sup>, Doan Thi Ngoc Diep and Kenji Hirayama. Diagnostic rule to identify bacterial from viral meningitis. Conference presentation (poster) at the 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Tropical Medicine, Okinawa, Japan. October 22<sup>nd</sup>-23<sup>rd</sup> 2009 (査読有)
- ③ Tran Thi Ngoc Ha, Nguyen Tien Huy, Vu Thi Que Huong, Tran Thi Thuy, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kenji Hirayama. **Role of circulating plasma DNA in severe dengue disease.** Conference presentation (poster) at the 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Tropical Medicine, Okinawa, Japan. October 22<sup>nd</sup>-23<sup>rd</sup> 2009 (査読有)

〔図書〕（計 1 件）

最新医学63巻6月増刊号 特集 新興・再興感  
染症(後篇) マラリア (1171-1189) 平山 謙  
二、グエン ティエン フィ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

グエン フィ ティエン

(**Nguyen Huy-Tien** )

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：20457526