

平成30年6月5日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15123

研究課題名（和文）希少糖溶液をハマダラカに吸わせて原虫発育を抑制する、新規マラリア伝播阻止法の開発

研究課題名（英文）Development of a new transmission-blocking method against malaria, using rare sugar-containing sugar solution as food for vector mosquitoes

研究代表者

新井 明治 (ARAI, Meiji)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30294432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：希少糖の一種であるD-アロースを含む糖液をハマダラカに吸わせることで、蚊体内でのマラリア原虫の発育を著しく抑制することを示した。さらに、一般に市販されている希少糖含有シロップでも同様のマラリア伝播阻止効果が認められることを示した。これらの結果は、マラリア流行地における希少糖含有糖液による新たなマラリア伝播阻止法の実用化を加速する大きな成果である。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that D-allose, a kind of rare sugars, has strong transmission-blocking effect against rodent malaria parasite, Plasmodium berghei, in the vector mosquito Anopheles stephensi. Furthermore, rare sugar-containing syrup widely available at stores has been shown to possess transmission-blocking effect which is comparable in efficacy to D-allose. These results will have a striking positive impact for developing a new transmission-blocking method using rare sugars in malaria-endemic countries.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア ハマダラカ 伝播阻止 希少糖 D-アロース ヘキソース・トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

希少糖とは「自然界にその存在量が少ない単糖とその誘導体」と定義され、単糖とその誘導体としての糖アルコールを加えると、60種類ほどになり、自然界に豊富に存在するD-グルコースやD-マンノースなどを除いた単糖の大部分を占める。香川大学では希少糖研究に注力しており、これまでにD-ブシコースの血糖上昇抑制作用・抗肥満作用、D-アロースの抗酸化作用・抗癌作用など、従来想定されていなかった生理活性の存在を明らかにしてきた。我々はD-アロースが、培養トリコモナス原虫に対する抗原虫薬メトロニダゾールの作用を増強する効果があることを明らかにしており (Harada 他, *Parasitol Res*, 2012)、マラリア原虫に対しても抑制効果を示すのではないかと考えて研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自然界に微量しか存在しない希少糖を含む糖液をハマダラカに吸わせることで、蚊体内でマラリア原虫の発育を抑制し、当該蚊の刺咬による新たな感染者・患者の発生を防ぐ、新規マラリア伝播阻止法であるATSB (Attractive Toxic Sugar Bait) 法の理論的・技術的基盤を確立することである。具体的には、(1) 予備実験で伝播阻止効果を確認しているD-アロースの蚊体内で原虫発育阻害機序の解明と、(2) D-アロースよりも強力な伝播阻止活性を示す希少糖の探索である。

3. 研究の方法

(1) 蚊体内のどの発育ステージで効果を阻害効果を示すのか：ローデントマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA 株) に感染させたマウスを吸血させたハマダラカ (*Anopheles stephensi*) にエサとして希少糖含有糖液 (ベースとして 440 mM D-フルクトースを含み、これに 100 mM のD-アロースあるいはD-ブシコースを添加した糖液) を与え続け、吸血1日後に中腸オオキネート数、10日後に中腸オオシスト数、18日後に中腸および唾液腺のスプロゾイト数をそれぞれカウントすることで、蚊体内の原虫発育に及ぼす希少糖の抑制効果を調べた。さらに、吸血20日後の蚊を無処理マウスに吸血させ、経時的に採血してマラリア発症の有無を調べた。

(2) D-アロースによる伝播阻止効果の濃度依存性：100 mM のD-アロースを加えた場合に著しい伝播阻止効果が認められたことから、その効果がD-アロースによるものであることを確認するために、添加するD-アロースの濃度を3段階 (10 mM、30 mM、100 mM) に設定し、上記(1)と同様に蚊体内での原虫数のカウントを行った。さらに、吸血20日後の蚊を無処理マウスに吸血させ、経時的に採血してマラリア発症の有無を調べた。

(3) 鞭毛放出に対するD-アロースの効果：*P. berghei* の生殖母体をアルカリ培地で活性化して鞭毛放出を誘導する実験系を用いて、蚊体内発育ステージの最初の段階である生殖体形成に対するD-アロースの効果を検討した。*P. berghei* 感染マウスの尾から微量の血液を採取し、鞭毛放出誘導培地 (RPMI-1640 with 10% FBS, pH 8) で希釈して鞭毛放出をカウントする実験を行い、D-アロースの鞭毛放出に対する影響を調べた。

(4) 希少糖を感染蚊体腔に直接注入してマラリア原虫の発育阻害能を評価する実験：希少糖を感染蚊体腔に直接注入してマラリア原虫の発育阻害能を評価するために、マイクロインジェクション装置 (ドラモンド社 NANOJECT II) による注入実験を行ったが、インジェクション実験の各種条件 (蚊の麻酔・保定方法、刺入部位、刺入角度、注入量、注入後の維持) の最適化に予想外の困難をきたし、インジェクション後の蚊体内での原虫数のカウントに至っていない。

(5) ローデントマラリア原虫のヘキソース・トランスポーター組換えタンパクの発現とプロテオリポソームによるトランスポーター活性評価実験系構築：当初計画ではD-アロースを与えた感染蚊からRNA抽出を行い、マイクロアレイ解析によってD-アロース存在下で影響を受ける遺伝子群を同定する予定であったが、D-アロースの作用標的がマラリア原虫のヘキソース・トランスポーターである可能性が浮上したため、その検証のために実験計画を変更することとなった。*P. berghei* のヘキソース・トランスポーター (PbHT1) 遺伝子をクローニングし、pET大腸菌発現系での発現実験を試みたところ、タンパク発現が認められなかった。次にコムギ胚芽発現系を用いて発現実験を行った結果、ウェスタンブロットでPbHT1の発現を確認することができた。この組換えタンパクをリポソーム上に配置したプロテオリポソームを用いることで、マラリア原虫のトランスポーター活性に対する希少糖の阻害能を *in vitro* で評価する実験系の構築に取り組んだ。しかし作成したプロテオリポソームのトランスポーター活性が安定せず、リポソームの作成方法を別法に変更しての再実験が必要となった。

(6) 希少糖含有シロップによる伝播阻止効果：市販されている希少糖含有シロップにもマラリア伝播阻止効果があるのではないかと考え、伝播阻止実験を行った。使用した「レアシュガースウィート」はグルコース、フルクトース、各種希少糖を含む甘味料であり、体脂肪低減作用や血糖上昇抑制作用などの生理機能が報告されている。*P. berghei* 感染マウスを吸血させたハマダラカに、糖分含量

を約30%になるように希釈したRSSを与え続けたところ、100 mM の D-アロースと同等の著明な伝播阻止効果が認められた。

4. 研究成果

(1) *P. berghei* 蚊体内ステージに対する D-アロースの阻害効果：これまでに実施した実験結果から、D-アロースによる伝播阻止活性は、生殖体形成期以降のステージで作用しており、オオキネート形成、オオシスト形成、スポロゾイト形成と、ステージ進行に伴って徐々に効果が現れてくることが明らかとなった。100mM の D-アロース含有糖液を吸わせた蚊では唾液腺スポロゾイトがほぼ消失し、ナイーブマウスに吸血させても発症がみられなかった。D-アロースの抗原虫作用には濃度依存性が認められたが、別の希少糖である D-プシコースでは 100mM でも抗原虫効果は認められなかった。D-アロースは原虫の特定の発育ステージで特異的に阻害効果を発揮するのではなく、蚊体内で原虫発育に継続的に阻害作用を与え続けると示唆される。また、D-アロースによる伝播阻止効果には顕著な濃度依存性が認められたことから、原虫の糖代謝が作用標的であるとする仮説が支持される。この実験では、単に原虫数が減っただけでなく、マウスへの伝播実験で発症阻止が認められたことは特筆に値する成果であり、希少糖による新たな伝播阻止法の開発という目標に向けての大きなアピールポイントである。

(2) D-アロースの伝播阻止効果の作用標的について：マラリア原虫のヘキサース・トランスポーターが D-アロースの作用標的であるとする仮説は、同トランスポーターの特異的阻害剤 (C3361) を作用させることで、蚊体内ステージの発育が著しく抑制されたとする報告に基づく (Blume ら, FASEB J, 2010)。そこで我々は組換えトランスポータータンパク (PbHT) による単糖 (グルコースおよびフルクトース) の取り込み活性を D-アロースが阻害することを示すことができれば作用機序の解明につながると考えて、リポソーム膜上に組換えタンパクを配置するプロテオリポソーム (PbHT-Lipo) を用いる実験系の構築を試みた。CellFree Science 社の ProteoLiposome PLUS Expression Kit を用いて、組換え PbHT タンパクを脂質膜に配置したプロテオリポソームを作成し、SDS-PAGE にて PbHT-Lipo ができていることを確認したが、放射性同位元素で標識した D-グルコースを用いた PbHT-Lipo への D-グルコース取り込み量の評価実験では、取り込みに相当するカウントが安定せず、現在キットを使用せずにリポソームを作成する方法でのやり直しを行っている。

PbHT-Lipo 用いるトランスポーター活性評価系が確立すれば、少量の候補物質でトランスポーター阻害能を調べることが可能とな

り、D-アロースよりも強力な伝播阻止活性を有する希少糖の探索に活用することができると期待される。また、スクリーニング実験を行うことで、希少糖以外のトランスポーター阻害物質を見出す可能性がある。

(3) 希少糖含有シロップによる伝播阻止効果：本研究では、希少糖含有シロップであるレアシュガースウィートにも D-アロースに匹敵する伝播阻止効果があることが確認された。これは一般の小売店で売られている食品が、マラリア伝播阻止に有効であるという非常にインパクトの大きい成果である。希少糖含有糖液による伝播阻止戦略の実用化を考える際に、最も大きな課題となるのが希少糖試薬のコストである。香川大学では D-アロースの大量生産技術を開発し、すでに民間企業への技術移転を行っているところではあるが、試薬のコストは低いほど実用化へのハードルが下がる。その意味において、希少糖含有シロップが伝播阻止に使える可能性を示したことの意義は極めて大きい。今後流行地で伝播阻止実験を担当できるカウンターパートを見出し、希少糖含有シロップでの実証実験を行う予定である。

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)

[学会発表](計7件)

新井明治 他, 希少糖によるマラリア伝播阻止効果の検討. 第 70 回日本衛生動物学会大会, 帯広市, 2018 年 5 月

新井明治 他, 希少糖含有シロップによるマラリア伝播阻止効果の検討. 第 87 回日本寄生虫学会大会, 東京, 2018 年 3 月

新井明治 他, 希少糖 D-アロースによるハマダラカ体内でのマラリア原虫発育阻止効果の検討. グローバルヘルス合同大会 2017, 東京, 2017 年 11 月

新井明治 他, 希少糖 D-アロースはハマダラカ体内でマラリア原虫の発育分化を阻害する. 第 73 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 大阪市, 2017 年 10 月

Arai M, Rare sugars as potential antimalarial transmission-blocking bait which inhibit growth and differentiation of the malaria parasite in the vector mosquito. Symposium for International Collaborative Research on Intractable Infectious Diseases Control. Okayama, Japan. 2017 年 8 月

新井明治 他, 希少糖 D-アロースはハマダラカ体内でマラリア原虫の発育分化を抑制する. 第 86 回日本寄生虫学会大会, 札幌市, 2017 年 5 月

Arai M 他, D-Allose inhibits growth and differentiation of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei* in the vector

mosquito. The 6th Symposium of International Society of Rare Sugars. Takamatsu, Kagawa, Japan. 2016年11月

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：希少糖を有効成分とするマラリア伝播
阻止剤およびマラリア原虫の発育阻止剤
発明者：徳田雅明，新井明治，大隈一裕
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2015/058563
出願年月日：平成27年3月20日
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 明治 (ARAI, Meiji)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：30294432

(2)研究分担者

平井 誠 (HIRAI, Makoto)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：50326849

(3)連携研究者

徳田 雅明 (TOKUDA, Masaaki)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10163974

(4)研究協力者

寺中 正人 (TERANAKA, Masato)
香川大学・医学部・教務職員
研究者番号：20294770