

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659187

研究課題名(和文)脳性マラリア発症機序の解明と薬物治療の効果判定システムの構築

研究課題名(英文)Exploring the pathogenesis of cerebral malaria and a new approach to detect antimalarials

研究代表者

石井 明 (Ishih, Akira)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50107801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：GFP遺伝子導入ネズミマラリア原虫感染B10マウスは、感染6日目から立毛、運動障害などの脳性マラリア症状を示し、血虫率が低値で死亡し、GFP遺伝子導入による原虫の生物学的性状の変化は認められなかった。マウス脳表の血管内マラリア原虫の観察結果、運動障害を示したマウスでの血流速度は減少した。同一個体における観察では、感染後3日目の原虫感染赤血球の速度に対して、感染後5日目の感染赤血球の速度は有意に減少した。また、感染赤血球の速度とPKH26染色非感染赤血球の速度との間に有意差は認められなかった。本モデルは、脳性マラリア発症後のin vivoでの新規抗マラリア薬の探索に有効なモデルと思われる。

研究成果の概要(英文)：B10 mice were infected with Plasmodium berghei-GFP transgenic clone of ANKA (named as GFP-PbANKA). Six days after infection the infected mice showed cerebral malaria and died with parasitemia around 10%. In vivo asexual infectivity of GFP-PbANKA was not significantly different to wild type P. berghei ANKA ancestral parasites. Through the cranial window, confocal images were obtained using a microscope equipped with a multi-pinhole confocal scanner and a water immersion objective lens. The velocity of parasitized RBCs of mouse showing cerebral malaria was slower than that of mouse with no symptoms. By continuous observation of intra-vessel parasites of the same animal after parasites inoculation, the velocity of parasitized RBCs at 5 days was significantly slower than that at 3 days after infection. Furthermore there was no significance between the parasitized RBCs and PKH26-labeled RBCs at 5 days after infection. This model may be a useful additional tool for detecting antimalarials.

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：脳性マラリア マウスモデル 血流測定 蛍光色素

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトが罹患するマラリアには4種類あるが、感染後短期間のうちに重症化し、死に至る可能性があるのは熱帯熱マラリアである。脳性マラリアは、この熱帯熱マラリア原虫感染後に惹起される重篤な合併症の一つであり(Nickerson et al. 2009 *Am J Neuroradiol*)、その病態は、ヒトあるいは実験動物の感染個体の行動および死亡個体の組織標本観察から推測されたものである。さらに発症要因であるマラリア原虫感染赤血球表面のリガンドと血管内皮レセプター分子は同定され、病態を引き起こす分子の相互作用について徐々に解析されてきているが、血管内皮細胞とマラリア原虫の接着程度の量的解析および発症時期との量的関係は解明されていない。

(2) マラリア原虫感染後の重篤な合併症の一つである脳性マラリアを惹起する熱帯熱マラリア原虫に薬剤耐性が出現し、その原虫の拡散がマラリアの制御を困難としている(Omar et al. 2001, *Ann Trop Med Parasitol*)。未だ有望なワクチンがない現状では、マラリアに対する治療法は薬物治療が第一選択であり、新規抗マラリア薬の開発や既知薬物と抗マラリア薬との併用の検討などが、マラリア制御を考える上で重要である(WHO 2000, *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*)。

(3) *In vivo* 研究方法としてネズミマラリア原虫感染マウスモデルが、新規抗マラリア薬の開発、あるいは防御免疫研究にとって必須の段階として確立されている(Peters 1999, *Ann Trop Med Parasitol*)。しかしながら、脳性マラリアに対する抗マラリア薬の作用を、原虫感染および薬物投与後の動物の生死やマラリア原虫の増減を比較するなどの従来の *in vivo* 方法での効果判定の指標で検討するのは不十分である。

(4) 現在までに、蛍光顕微鏡、CCD カメラ、ビデオ

装置、コンピューターなど周辺機器は素晴らしいものが多く開発されている。さらに、緑色蛍光蛋白(GFP)遺伝子がクローニングされて以来、GFPなどの蛍光タンパク質を応用した研究がマラリア学の分野で急増した(Amino et al. 2005 *Curr Opin Microbiol*)。例えば、遺伝子導入された熱帯熱マラリア原虫では、プロモーター解析や遺伝子産物の局在解析などが行なわれている。また、ネズミマラリア原虫に関しては、蚊から哺乳動物に注入されたスポロゾイトの肝臓組織への感染動態などの解析に用いられている。しかしながら、脳性マラリアの病態の解明や抗マラリア薬の治療効果過程の解明への導入は限られている。

2. 研究の目的

(1) GFP 遺伝子導入ネズミマラリア原虫(以下 GFP 原虫)が作製され、マラリア原虫の感染動態の解明が進んでいる(Amino et al. 2005, *Curr Opin Microbiol*)。脳性マラリアの病態は、感染個体の行動および死亡個体の組織標本観察から推測されたものである。そこで、感染動物の脳血管内でのマラリア原虫の感染動態をイメージングによりリアルタイムに評価するためのモデルを作成する。

(2) ネズミマラリア原虫とマウス系統の組合せにより、ヒトマラリアの熱帯熱マラリアの重篤な合併症の一つである脳性マラリアに類似した病態が認められる(Bagot et al. 2002 *Infect Immun*)。マラリア原虫の脳血管内での感染動態をイメージングによりリアルタイムに評価するためのモデルを用いて、マウスで見られる脳性マラリアの病態を解明する。病態が解明されれば、脳性マラリアに対する薬物治療の効果判定および病態回復過程を評価する有効な *in vivo* 方法として導入できると思われる。

3. 研究の方法

(1) 脳性マラリア発症モデルの作成

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA とマウス系統の組合せにより、ヒトマラリアの熱帯熱マラリアの重篤な合併症の一つである脳性マラリアに類似した病態が認められることが知られている (Bagot et al. 2002 *Infec Immun*)。発症機序の解明および薬効評価を行う上で、より好適な原虫感染マウスモデルを構築するために、C57BL/6(B6) および H-2 タイプの異なる C57BL/10 マウス (B10, B10.BR, B10.D2) を宿主として GFP 遺伝子導入原虫 (GFP-PbANKA) を感染させ、脳性マラリア発症の症状の有無や程度を明らかにする。

これらの実験では、原虫感染赤血球 10^5 個を腹腔内に注入後、毎日マウスの行動を観察し、尾部から血液塗抹標本作製し、原虫感染赤血球を数えて血虫率を算出する。これらを基に、脳性マラリア発症までの日数、発症と末梢血内の原虫数の相関関係などを検討し、血液塗抹標本での脳性マラリア発症開始時期の評価法を確立する。

(2) マウス脳表の血管内マラリア原虫の観察モデルの確立

GFP-PbANKA 原虫感染赤血球 10^5 個を C57BL/10 マウス腹腔内に注入後、流血中の赤血球内部の原虫が、マウスの脳表の血管で観察されるかを検証する。ラットで確立された方法 (Wang et al. 2010 *Neurosurgery*) を用い、全身麻酔下にてマウスの頭蓋骨に小さい骨窓を設け蛍光顕微鏡での観察により生体内蛍光イメージングを行う。同一視野に単位時間当たり観察された感染赤血球 (蛍光を発する原虫に感染した血球) を算定することにより定量的な評価が可能である。

(3) 感染経過に伴う脳血管内の原虫動態変化

感染後明らかな運動障害は認められないマウス脳表の血管内の GFP-PbANKA 原虫感染赤血球の速度と感染後明らかな運動障害が認められるマウス脳表の血管内の原虫感染赤血球の速度を比較することで、感染後の血流の変化を検討する。イメージングで観察を試みるのと同時にマウス尾部から血液塗抹標本作製し、脳性マラリア発生時前後における末梢血中原虫感染赤血球率を算出することにより、脳性マラリア発症と末梢血内の原虫数の相関関係が明らかとなる。

4. 研究成果

(1) マウス系統の脳性マラリア発症頻度

ヒトにおいて MHC ハプロタイプが脳性マラリアに関係していると示唆されている。より好適な原虫感染マウスモデルを構築するために、C57BL/6 および数種類の H-2 タイプの異なる C57BL/10 マウス (B10, B10.BR, B10.D2) を宿主として GFP 原虫を感染させ、脳性マラリア発症の症状の有無や程度を検討した。保存 GFP-PbANKA を 2 匹の ICR (8 週令、雌) の腹腔内に注入し、新鮮な原虫を得た。B6、B10、B10.BR および B10.D2 の各種マウス (7 週令、雌) の腹腔内に原虫感染赤血球 10^5 個を注入後、マウスの状態を観察し、マウス尾部から血液塗抹標本作製した。メタノールで固定後、ギムザ染色を施し、原虫感染赤血球を数えて血虫率を算出した。B10 および B10.D2 が感染 6 日目から立毛、運動障害などの脳性マラリア症状を示し、さらに血虫率が低値 (10% 前後) で死亡した (図 1 および図 2)。このことから、B10 および B10.D2 が今回

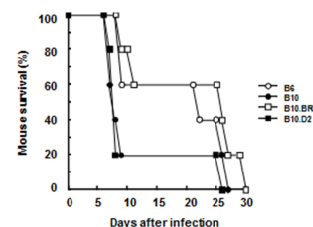


図 1 原虫感染後のマウス生存率の変化

使用する原虫との組み合わせに優れた系統と思われた。さらに、病態に関して他の H-2 タイプが異なる他のマウスとの更なる比較研究により、H-2 タイプの関与を検討することが可能と思われる。

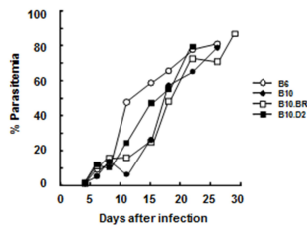


図2 原虫感染後の原虫感染赤血球率の変化

また、GFP 遺伝子導入により原虫の病原性に変化が生じたか否かを検討するため、野生型原虫(WT-PbANKA)および GFP 遺伝子導入原虫(GFP-PbANKA)をそれぞれ B10 マウスに感染させ、脳性マラリア発症の症状の有無や程度を検討した。結果、両原虫感染マウスは感染後6日から運動障害などの脳性マラリア症状を惹起し、血虫率が低値で死亡した。このことから、GFP 遺伝子導入による原虫の生物学的性状に変化は生じていないことが示唆された(図3)。

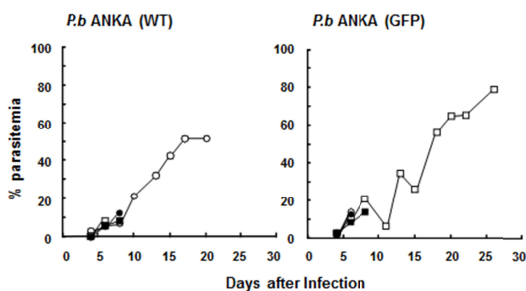


図3 野生型原虫とGFP原虫のB10マウスでの感染動態

(2) マウス脳表の血管内マラリア原虫の観察

保存 GFP-PbANKA を2匹の ICR (8週令、雌)の腹腔内に注入し、新鮮な原虫を得た。得られた原虫感染赤血球を実験用の B10 マウス(7週令、雌)

5頭の腹腔内に注入した。感染後運動障害が認められない時期のマウスと運動障害が認められたマウスの脳表の血管内での原虫を観察した。全身麻酔下にてマウスの頭蓋骨に小さい骨窓を設け、B共焦点スキャノユニットおよびイメージンテンシファイア(増幅器)付 CCD カメラを装着した顕微鏡で生体内蛍光イメージングを行った(図4)。同時

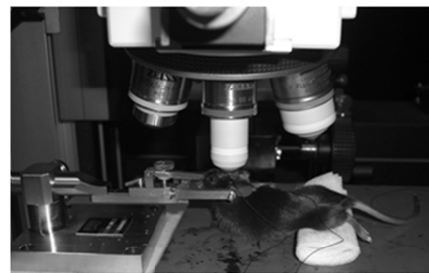


図4 マウス脳表血管内のマラリア原虫の観察システム

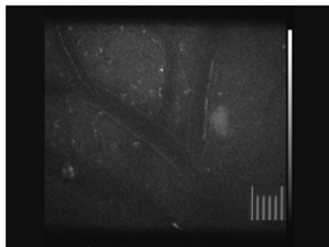
にマウス尾部から血液塗抹標本を作製し、原虫感染赤血球を数えて血虫率を算出した。血流速度を推定するために、録画データより、単位時間当たりの原虫の移動距離を求めた。結果、明らかな運動障害は認められない感染後3日目のマウス(血液塗抹標本での血虫率 0.03%)の血管内の原虫の移動距離($2.03 \pm 0.36 \mu\text{m}/\text{ms}$)と明らかな運動障害が認められる感染後5日目のマウス(5.5%)および6日目のマウス(8.3%)の原虫の移動距離($1.70 \pm 0.07 \mu\text{m}/\text{ms}$ および $1.65 \pm 0.16 \mu\text{m}/\text{ms}$)の間に違いが認められ、運動障害を示したマウスでの血流速度は減少したことが示唆された。しかしながら、熱帯熱マラリアで報告されている感染赤血球の血管内皮細胞への接着は認められなかった。

(3) 同一個体における原虫感染後のマウス脳表血管内の原虫感染赤血球速度の経時的変化を検討した。保存 GFP-PbANKA を2匹の ICR (8週令、雌)の腹腔内に注入し、新鮮な原虫を得た。得られた原虫感染赤血球を実験用の B10 マウス(7週令、雌)2頭の腹腔内に注入した。感染3日目にマ

ウスの脳表の血管で観察するために、全身麻酔下にてマウスの頭蓋骨に小さい骨窓を設け、顕微鏡で生体内蛍光イメージングを行った。観察後、癒着を防ぐためサランラップで窓を塞ぎ、カナマイシンを噴霧し頭皮を縫合した。縫合後、エアゾール式殺菌性プラスチック包帯剤を噴霧し、ケージに戻した。感染5日目に他個体の B10 マウスから赤血球を採取し PKH26 で染色後、感染マウスの尾静脈から注入し、30 分後に全身麻酔下にて縫合部を切開し、骨窓から蛍光イメージングを行った。

頭皮を縫合した2個体 (No.1 と No.2) には、2 日間の経過では癒着は見られず、同一個体での経時的変化を観察できた。No.1 の感染後3日目の GFP 原虫感染赤血球の血虫率と速度および感染後5日目の感染赤血球の血虫率と速度はそれぞれ、0.03%、 $3.64 \pm 0.21 \mu\text{m}/\text{ms}$ および 6.6%、 $3.39 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{ms}$ であった (図5および図6)。No.2 の値は、それぞれ 0.02%、 $4.47 \pm 0.54 \mu\text{m}/\text{ms}$ および 6.0%、 $3.83 \pm 0.20 \mu\text{m}/\text{ms}$ であり、両マウスとも感染後5日目の感染赤血球の速度は有意に減少した (Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$)。また、PKH26 で染色した赤血球の速度を求めたところ、No.1 は $3.30 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{ms}$ で、No.2 は $3.84 \pm 0.16 \mu\text{m}/\text{ms}$ であり、感染赤血球の速度との間に違いは認められず、感染赤血球の速度が減少するのではないことが示唆された。この実験でも、熱帯熱マラリアで報告されている感染赤血球の血管内皮細胞への接着は認められなかった。

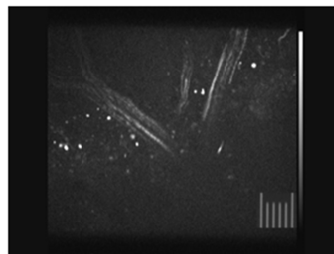
GFP-*Plasmodium berghei* ANKA-infected B10 mouse (No.1)



3DPI (0.03%)

図5 マウス脳表血管内のマラリア原虫の観察

GFP-*Plasmodium berghei* ANKA-infected B10 mouse (No.1)



5DPI (6.6%)

図6 マウス脳表血管内のマラリア原虫の観察

5. 主な発表論文等

(学会発表) (計1件)

石井 明、油田 正夫、山本 清二、マウス脳表の血管内マラリア原虫の感染動態の観察、第 82 回日本寄生虫学会大会、平成 25 年 3 月 29 日 - 31 日、東京医科歯科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 明 (ISHIH, Akira)
 浜松医科大学・医学部・准教授
 研究者番号: 50107801

(2) 研究分担者

加藤 秀樹 (KATO, Hideki)
 浜松医科大学・動物実験施設・准教授
 研究者番号: 30142053

山本 清二 (YAMAMOTO, Seiji)
 浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授
 研究者番号: 60144094

永田 年 (NAGATA, Toshi)
 浜松医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 90275024