

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659193

研究課題名(和文)人工酸素運搬体による重症マラリア合併症の補助療法の開発研究

研究課題名(英文)Development of an adjuvant therapy for severe malaria with the hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier.

研究代表者

狩野 繁之(KANO, Shigeyuki)

独立行政法人国立国際医療研究センター・熱帯医学・マラリア研究部・部長

研究者番号：60233912

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

研究成果の概要(和文)：ヘモグロビン小胞体(HbV)の応用による重症マラリア合併症の補助療法の開発を目標とし、マウスのマラリア感染実験系を用いてその可能性を評価した。P.berghei原虫をマウスに感染させ、感染後6日目よりHbVを毎日に投与したが、原虫寄生率等の病態の指標の改善は観察されなかった。一方、HbV投与直後のマウスは、対照群と比較して行動が活発になったので、ロータロッド試験で評価解析を行ったところ、投与前と比較してHbV投与後に有意な滞在時間の延長が観察された。HbV投与は、貧血の改善など、重症マラリア合併症の補助療法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potential of HbV as an adjuvant therapy for severe malaria using rodent malaria models. Balb/c mice were inoculated with Plasmodium berghei. The HbV or saline infection was started in tail vein from 6-day after inoculation. No significant difference in parasitemia and body weight of the mice was observed between the HbV and saline treated groups after daily treatment until they died. However, we observed that, immediately after its administration, the HbV treated mice became more active comparing the saline treated mice. To evaluate the effects of the HbV treatment, the rotarod performance test was carried out. The riding time on the rotarod compared between the 2 groups revealed significant extension of the time in mice treated with the HbV. The HbV transfusion may have improved the anemia and mitigated the complication of severe malaria in mice. The HbV has high potential as adjuvant therapy for human as well to save the lives of patients in the endemic areas.

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：原虫 マラリア ヘモグロビン小胞体 補助療法

## 1. 研究開始当初の背景

現在、マラリアの治療方法は抗マラリア薬の投与が中心であるが、合併症を伴う重症マラリア患者に対しては、輸血や透析の補助療法が必要になる場合もある。特にマラリアの3大徴候の1つである貧血に対しては、輸血は極めて重要な治療方法である。しかしマラリアの流行地域は、近代的な医療制度が十分に行き渡っていない地域が中心である。このような地域は、医療環境の問題だけでなく電気、上下水道、交通、通信など様々なインフラが整っていない場合も多く、安全な輸血や透析を行うことは非常に困難であり、安全かつ効果的な新たな輸血治療方法を確立することは、マラリアの対策上、喫緊の課題である。

この問題に対する斬新なブレイクスルーとして、酒井ら（シンガポール早稲田バイオサイエンス研究所：現在奈良県立医科大学）が研究開発してきた人工酸素輸液が上げられる（Sakai et al: J Intern Med, 2007）。人工酸素輸液の一つであるヘモグロビン小胞体（HbV）は、①ヒトの赤血球と同じ酸素運搬能を持ち、②溶液のまま常温で長期間（2年間以上）保存可能であり、③60℃の加熱処理とウイルス除去膜処理の組合せで、感染に対する安全性を確保し、④血液型を問わないという特徴がある。そして安全性に関しては、⑤マウスを用いた実験で、全赤血球の40%をこのHbVに置換することが可能であることがすでに証明されている（Sakai et al: Transfusion, 2006）。しかもHbVは、⑥マラリア原虫がヒト赤血球に接着・侵入する際に必要となる赤血球膜表面のレセプター分子を持たない。そのため、重度の貧血を呈したマラリア患者にHbVを投与した場合、通常の輸血とは異なり、マラリア原虫がHbVに接着・侵入することが物理的に出来ないため、貧血の改善に寄与するだけでなく、原虫の寄生率を下げるという積極的な治療効果が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、人工酸素輸液運搬体の一つであるHbVの重症マラリア治療への適用可能性を評価するための基盤となるデータを収集・分析することにある。輸血を必要とするマラリア患者へのHbV投与は、これまでに例を見ない非常に有効なマラリアの補助療法となる可能性が期待される。そこで本研究では、マラリア患者へのHbV投与の実用化に向けての第一段階として、すでに確立されているローデントマラリア原虫とマウスの感染実験の系を用いて、HbV投与がローデントマラリアの病態改善にどのような影響を及ぼすのかについて、詳細なデータの収集とその分析を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) 原虫感染後の血液データ解析

原虫感染によるマウスの貧血の進行度の解析を行った。Balb/cマウスに*Plasmodium berghei* ANKA株（P.b. ANKA）を $1 \times 10^6$ 原虫を腹腔内投与で感染させた。感染後は24時間毎に寄生率、体重を測定、感染後5日、6日、7日に3匹ずつ全採血を行い赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量を測定した。

### 2) HbV投与試験

実験区はHbV 100  $\mu$ lを尾静注投与の区、生理食塩水を100  $\mu$ l尾静注の区、HbV 500  $\mu$ lを腹腔内の投与区の3つ設け、P.b. ANKAを $1 \times 10^6$ 原虫を腹腔投与後6日目よりマウスが死亡するまでHbV及び生食の投与を行った。また感染後は24時間毎に寄生率、体重を測定した。

### 3) ロータロッド試験

重症化マウスへのHbV投与効果を数値化するため、ロータロッド試験（図1）を行った。

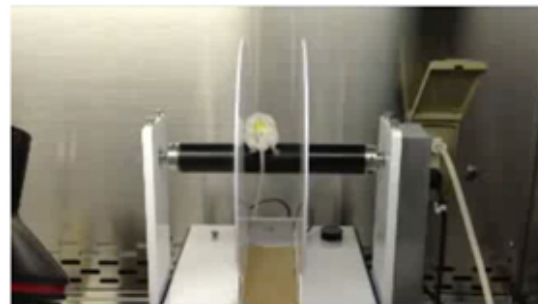


図1 ロータロッド試験機

ロータロッド試験は協調運動、運動学習のテストで、回転するロッドにマウスを乗せると落ちないようにロッド上を歩き始める。ロッドの回転数は、5分で4 RPMから40 RPMへと次第に早くなり、やがてそのスピードに調和できなくなり、マウスは落下する。落下するまでのロッド上の滞在時間を3回測定し、平均で評価した。

本研究では、P.b. ANKAを $1 \times 10^6$ 個を腹腔投与した後、7日目にHbVを100  $\mu$ l尾静注で投与し、投与後のロータ上滞在時間の改善を評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 原虫感染後の血液データ解析結果

赤血球数は、感染後5日目では、健常コントロールマウスと比べて10%、6日目では20%、7日目では29%と10%ずつ減少が観察された。同様にヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度の減少も観察された。（図2）

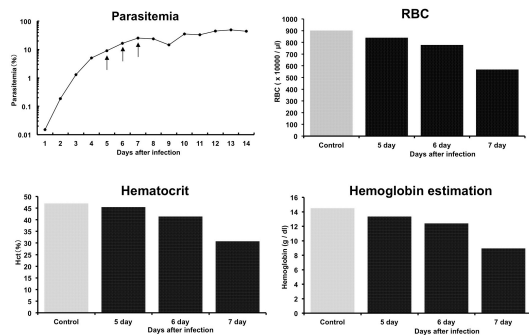


図2 原虫感染後の血液データ

Balb/c マウスに P. b. ANKA を  $1 \times 10^6$  個を腹腔投与した場合、感染8日後より死亡するマウスが観察され始めることから、感染マウスに対する HbV の投与時期は、感染後6日目あるいは7日目に行うことにした。

## 2) HbV 投与試験結果

P. b ANKA を  $1 \times 10^6$  個を腹腔投与した後、6日目よりマウスが死亡するまで HbV 及び生食の投与を行ったが、寄生率の変動に両群の間に優位な差は見られなかった。

HbV 腹腔投与の実験区では体重の増加が見られるが、これは毎日 HbV を 0.5 ml 投与しているために増加したものと考えられた。(図3)

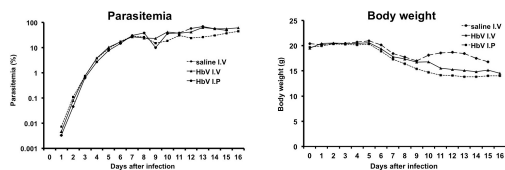


図3 感染6日後から HbV、生食を24時間毎に投与したときの寄生率及び体重変化

尾静注で HbV、生食を投与した区で両者の間でこれら数値的な差は観察されなかったが、HbV 投与直後のマウスは生食投与のマウスと比べ行動が活発になることを見出した。

## 3) ロータロッド試験結果

P. b. ANKA を  $1 \times 10^6$  原虫を腹腔投与後7日目に、投与前にロータ上滞在時間を3回測定後 HbV 100 μl を尾静注で投与し、その3分後より同様にロータ上滞在時間を3回測定、投与前後の滞在時間の平均値の比較を行った。

その結果実験群の各マウス個別の平均値(図4左)を比較すると、それぞれのマウスで HbV 投与後でロッド滞在時間の延長が観察された。さらにこのデータ実験群各回それぞれの測定値の平均値から集計したところ(図4右)、HbV 投与後に比べ有意なロッド滞在時間の延長が観察された。

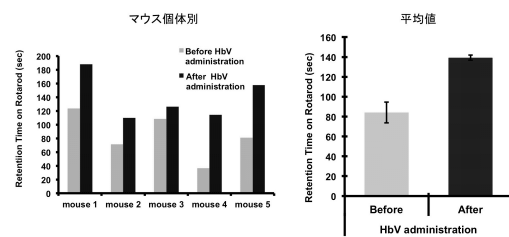


図4 HbV 投与前後のロータ滞在時間

これらの結果からヘモグロビン小胞体(HbV)は、重症マラリア合併症の補助療法用製剤として極めて高いポテンシャルを持つことが示された。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 狩野繁之、重症マラリアの合併症とその治療、第20回日本血液代替物学会年次大会(招待講演)、2013年12月6日~7日、奈良県新公会堂
- ② 矢野和彦、岩上盛敏、酒井宏水、狩野繁之、第83回日本寄生虫学会大会、人工酸素運搬体による重症マラリア合併症の補助療法の開発、2014年3月27日~28日、愛媛大学
- ③ Yano Kazuhiko, Iwagami Moritoshi, Sakai Hiromi, Kano Shigeyuki, Development of an adjuvant therapy for severe malaria with the hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology, 2014, 08, 10~15, Hotel Camino Real Mexico City.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

狩野 繁之 (KANO Shigeyuki)  
独立行政法人 国立国際医療研究センター  
研究所熱帯医学・マラリア研究部・部長  
研究者番号：60233912

### (2) 研究分担者

酒井 宏水 (SAKAI Hiromi)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70318830

### (3) 連携研究者

矢野 和彦 (YANO Kazuhiko)  
独立行政法人 国立国際医療研究センター  
研究所熱帯医学・マラリア研究部・上級  
研究員  
研究者番号：30392393

### (3) 連携研究者

石上 盛敏 (IWAGAMI Moritoshi)  
独立行政法人 国立国際医療研究センター  
研究所熱帯医学・マラリア研究部・上級  
研究員  
研究者番号：20392392