

厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

# マラリアの病態疫学と対策に 関する基礎的研究

平成10年度研究報告書 (1998)

# 厚生科学研究費補助金研究報告書

平成11年4月10日

厚生大臣 宮下 創平 殿

住所

研究者 氏名 スズ キ マモル  
鈴木 守  
(群馬大学医学部)

平成10年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名：マラリアの病態疫学と対策に関する基礎的研究 (H10-新興-27)

国庫補助金精算所要額：金 27,000,000 円也

## 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称 厚生科学研究費

研究事業名 新興・再興感染症研究事業

研究課題名 マラリアの病態疫学と対策に関する基礎的研究

国庫補助金精算所要額 27,000,000

研究期間 1997-1999

主任研究者名 鈴木 守（群馬大学医学部）

分担研究者名 片貝良一（群馬大学工学部）、宮本 薫（群馬大学生体調節研究所）、  
姫野國祐（徳島大学医学部）、竹内 勤（慶應義塾大学医学部）、相川正道（東海大学総合医学研究所）、秦 順一（慶應義塾大学医学部）、穂積信道（東京理科大学生命科学研究所）

研究目的 再興感染症であるマラリアに対する日本の貢献は、無償資金協力、技術協力などODA資金をもとに行われてきたが、日本で生まれた科学的成果を現地の対策に応用することが最も基本的な貢献であることはいうまでもない。本申請は現在のマラリア対策の基礎として強く望まれている流行地住民の病態疫学解明のための基礎的知見をそろえることを目的に立案された。生体高分子化学、タンパク化学、分子生物学などの先端的基礎研究と、流行地の疫学調査・研究とを整合性をもたせて一体化させて進める点に特徴があり、流行地住民の病態疫学的特性をとらえるためのマラリア原虫の抗原分子を特定し、その分子を合成することを目指している。この研究目的が達成できれば、現地において各流行の特性に応じた選択的な対策方針を計画することが可能となる。現在、薬剤耐性マラリアについての基礎研究は、現在あらゆるアプローチにより進めなければならないことはいうまでもないが、本研究においては、すでにかつて広く使用されたピペラジン誘導体を使って耐性を除去するユニークな試みが検討され、有望な結果がえられている。現在基礎的解析をすすめている新しい動物モデルは、完成すると本研究計画すべてにわたって応用可能なばかりでなく薬剤やワクチン開発研究にも奨用されるはずである。

研究方法および結果 (1) 病態疫学解析に必要な抗原分子の合成 マラリアの病態を反映する熱帯熱マラリア原虫の抗原分子を特定するために、さまざまな病態にあるマラリア感染者の血清を用意しウエスタンブロット法により各病態において特異的に反応する抗原分子48.7kDポリペプチドを特定したのち、Bio Rad Model 491 Prep Cell を使って大量に用意し、さらに高速クロマトグラフ法により純化した。純化させたポリペプチドをLysine部分で切断し得られた材料につきアミノ酸分析器によりアミノ酸の配列をきめた。2カ所の異なる配列をきめ、コンピューター検索をおこなった結果、48.7kD分子は原虫のエノラーゼであることが判明した。すなわち感染をうけて臨床的に発症している患者は特異的にマラリア原虫の持つ解糖系酵素エノラーゼに結合する抗体を産生していることが解明されたわけである。エノラーゼ全体は合成が不可能であるので立体構造モデルを作製しそのモデルから推測される抗原活性部分を合成することにし3部分が合成された。その内の一つであるHelix 7と命名した16アミノ酸を順次結合させてえられた合成分子を用意し、流行地の重症患者、中等度患者、軽症患者および非感染コントロール群から得た血清との反応を試みた。その結果、重症群がHelix 7に対するもっとも高い抗体価が重症群においてみられ、中等度群、軽症群の順に抗体価は低下した。この結果は、Helix 7は流行地患者の中で熱帯熱マラリア感染に対して抵抗力の少ないグループを特定する上に有効な抗原であることを意味している。(2) 病態疫学解明の基礎的研究 マラリア原虫の毒性とヒトの免疫力が相俟ってマラリアの病態を作り出している。マラリア原虫の毒性に関してマウスのモデルにより、ヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼの発現が抑制された原虫が、弱毒化原虫であることを示唆する知見がみいだされた。さらに、マラリア原虫のもつ熱ショック蛋白、HSP90の発現がマラリア原虫の毒性の強さをきめるらしいこと、毒性の高い原虫は、宿主のマクロファージのHPS65の発現をおさえることにより、宿主の攻撃をかわしていることなどを示す実験結果もえられた。ヒトの免疫に関してはタイで集めたマラリア患者の血液を使い、補体リセプター1の発現量を規定する多型性遺伝子型頻度と重症化との関係をしらべたところ、免疫複合体処理能力の低下が重症化につながることを示唆する知見がえられた。また抗体の反応がTh1型からTh2型にきりかえられることも重症化をもたらすことが考えられた。(3) ヒト・マラリアの新しい実験動物に関する研究 NOD-SCIDマウスにはNK細胞がほとんど除去されていることがみいだされたので、ヒトの骨髄をNOD-SCIDマウスに移植し、ヒト造血系の再構築に成功した。ヒトの赤血球を選択的に分化させるために赤血球分化関与遺伝子をヒト骨髄細胞内へ遺伝子導入する研究をすすめ、レトロウイルスベクターにより遺伝子導入を試み、成功をみた。ヒトの骨髄同様にヒトの骨、造血細胞、血管がマウスの中で新生している所見もえられた。今後ヒト赤血球造血を特異

的に高効率化させることを計画している。(4) 薬剤耐性熱帯熱マラリアの耐性除去に関する研究 今年度は13種類のピペラジン誘導体を合成し、耐性除去作用について検討した。その結果ジベンゾスベロイル-ピペラジン誘導体のなかに有望な化合物が見出された。現在特許申請中である。

考察 (1) 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの一部であるHelix-7を使えば、流行地において重症化する住民群を特定する調査を可能にする血清反応が実施できる可能性がでてきた。Helix-7以外に合成した残りの2つのポリペプチドについて検討を加え、最も優れた特異性をもつ物質をえらび実用化を目指す一方、これらのポリペプチドの中に防御免疫を誘発する分子があるかどうかについても*in vitro*の系で調べる予定である。平成9年度の成果を生かし、化学構造修飾をさらに分子量を小さくしても抗原性が保持されるか否かについても検討する。(2) 弱毒化した*Plasmodium berghei* XAT原虫は、ヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼの発現が抑制されていることを示す結果が得られたので、この知見を放射線照射して弱毒化させた熱帯熱マラリア原虫においても確かめる予定である。弱毒化の判定は、原虫の増殖曲線とヨザルを感染させることによって行う。(3) タイのマラリア患者から得た血液により得られた知見については、動物実験を組んで、より詳細に検討する必要がある。少数のヨザルを感染させて経時的に血液をえて検討を加える予定である。(4) 新しい実験モデルであるNOD-SCIDマウスについてはヒト赤血球を高効率に産生するための遺伝子導入実験が成功したなら、ただちに現在までに凍結させてある患者からの分離株を使い熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫とも感染実験を試みる予定である。

結論 本研究班においては、特許申請中の結果が3件あることから示されるように、着実に実用化の方向に向かって成果がでてきている。研究実績の中には論文報告で終了するものと、なお続けて進行させるべき実績とがある。平成11年度の研究においては、少なくとも合成抗原に関しては具体的に実用化できる方向にさらに収斂させることが期待できる。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書（平成10年度）

マラリアの病態疫学と対策に関する基礎的研究

主任研究者 鈴木守 群馬大学医学部教授

研究要旨 マラリアの病態疫学研究を進め、熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼに対する抗体値を測定することにより、熱帯熱マラリアに感受性の高い集団を特定できることが判明した。熱帯流行地の使用にたえる合成抗原としてエノラーゼの全配列の中から16アミノ酸部分を合成し、流行地住民血清と反応させたところ重症グループと有意に高く反応する結果を得た。新しいマラリアの動物モデルとしてNOD-SCID-huマウスにヒトの骨髄を移植したところ、ヒトの血管、赤血球が新生していることが明らかとなった。ヒトのマラリア原虫を感染させる実験準備を進行させている。

A. 研究目的

マラリアの病態疫学調査は、今後マラリア対策を選択的に、各流行地に適した方法で進めていく上に必要とされるが、そのためには新しい血清疫学を可能にする抗原の特定が必要である。特定された抗原の分子構造を決定し、熱帯地で利用しやすい合成抗原を作ること、今後のあらゆるマラリア研究の基礎となる新しい動物モデルを用意しマラリアの病態研究に寄与することが本研究の目的である。

B. 研究方法

重症化した患者から、軽症の患者までさまざまな病状を呈するマラリア感染者の血清を用意しウエスタンブロット法により各病態において特異的に反応する抗原分子を特定し得られた材料につきアミノ酸分析器によりアミノ酸の配列をきめた。その結

果、臨床的に発症している患者は特異的にマラリア原虫の持つ解糖系酵素エノラーゼに結合する抗体を産生していることが判明した。エノラーゼ分子立体構造の解析を進め、アミノ酸全配列の中から抗原活性をもつと予想される3か所を選んで合成をおこなった。helix-7と命名した部分につき流行地で得た患者血清と反応させた。一方新しいマラリア実験に適する動物モデルとして、NOD-SCID-huマウスにヒトの骨髄を移植させ機能状態をみる実験がおこなわれた。感染実験室は間もなく完成するので熱帯熱マラリア原虫感染、三日熱マラリア原虫感染を試みる。

C. 結果と考察

(1)エノラーゼの立体構造モデルがコンピュータにより完成した。合成可能な配列部分3か所が指定され、Helix-7と命名し

た部分につき、非感染者、軽症感染者、中等度感染者、重症感染者から得た血清と反応させたところ、予想どおり重症感染者のグループと最も高い反応が記録された。

(2)NOD-SCID-huマウスにすべての免疫セットと赤血球の幹細胞をふくむヒトの骨髄を移植したところ、ヒトの赤血球、リンパ球、毛細血管上皮などがマウス内に新生していることが分子レベルで確認された。

(3)その他、病態疫学に関与した実験結果として熱帯熱マラリアの重症化に伴い、マラリア原虫に対する特異的IgG産生が抑制され、特異的IgE産生に切り替わること、すなわちTH1の免疫系からTH2の免疫系に変化することが示唆された。また原虫の強毒、弱毒を決める因子として、熱ショック蛋白が関与していることを示す実験結果もえられている。

#### D. 結 論

本研究の中で、もっとも実用化に近い距離にあるのが流行地の病態疫学解析につかう合成抗原の特定と生産である。この目的のために使用される合成抗原は、マラリアワクチン候補となりうる可能性もあるので、平成9年度成果および具体的な方法ともあわせて特許申請中である。動物モデルについては間もなく感染実験がおこなわれる予定であり、すでに多数の患者分離株が用意され、液体窒素タンク内に保存されている。そのほかのマラリア病態疫学に関する基礎的研究も論文として次々に完成しているので熱帯流行地の病態疫学解析に応用

する方法を今後検討していく予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kano, S., Onda, T., Matsumoto, Y., Buchachart, K., Krudsood, S., Looareesuwan, S., Aikawa, M. and Suzuki, M. (1998)

Serological evaluation of malaria patients in Thailand: antibody response against electrophoresed antigenic polypeptides of *Plasmodium falciparum*. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 29:341-343

Kano, S., Onda, T., Matsumoto, Y., Looareesuwan, S., Aikawa, M. and Suzuki, M. (1998)

Serological evaluation of malaria patients in Thailand, with particular reference to the reactivity against a 47 kD antigenic polypeptide of *Plasmodium falciparum*. Tokai J Exp Clin Med 23:97-98

Kawai, S., Aikawa, M., Suzuki, M. and Matsuda, H. (1998)

A nonhuman primate model for severe human malaria: *Plasmodium coatneyi* - infected Japanese macaque (*Macaca fuscata*). Tokai J Exp Clin Med 23:101-102

Matsumoto, Y., Naya, T., Darko, C.A., Katakai, Y., Kano, S., Suzuki, M., Wilairatana, P., Looareesuwan, S., Brittenham, G.M. and Aikawa, M. (1998)

Different plasma levels of circulating cell adhesion molecules in falciparum malaria patients according to disease severity. Tokai J Exp Clin Med 23:79-80

鈴木 守 (1998)

マラリアの感染に伴う腎障害. 腎と透析 44: 384-389

鈴木 守 (1998)

世界におけるマラリア. 化学療法の領域 14: 19-23

## 2. 学会発表

Suzuki, M. and Aoki, Y.

Environmental impact on the parasitic diseases in the 21st century. (ワークショップ) 第67回日本寄生虫学会大会, 神戸, 1998年4月

Kano, S., Onda, T., Matsumaru, T., Hirai, R., Suzuki, M., Matsumoto, Y., Looareesuwan, S., and Aikawa, M.

Association between serum nitric oxide concentration and clinical severity of *Plasmodium falciparum* infected patients in Thailand. 第67回日本寄生虫学会大会, 神戸, 1998年4月

Kano, S., Katakai, R., Sato, K., Kakegawa, W., Karasawa, M., Onda, T., Looareesuwan, S., Aikawa, M. and Suzuki, M.

Characterization of synthetic peptides of a of *Plasmodium falciparum* specific enzyme of the

glycolytic pathway. 第9回国際寄生虫学会大会, 千葉. 1998年8月. Parasitol Inter 47 (Suppl.): 255, 1998

佐藤久美子, 狩野繁之, Looareesuwan, S., 相川正道, 鈴木 守

マラリア患者血清の種々エノラーゼに対する反応性. 第58回日本寄生虫学会東日本大会, 宇都宮, 1998年10月

狩野繁之, 竹田美文, 大上美穂, 鈴木 守  
政府開発援助に伴う派遣前マラリア健康教育の必要性—ギニアビサウよりのマラリア疑い2例を経験して—. 第58回日本寄生虫学会東日本大会, 宇都宮, 1998年10月



## 分担研究者報告書

### マラリアの病態疫学と対策に関する基礎的研究

分担研究者 片貝 良一 群馬大学工学部教授

熱帯熱マラリア原虫の分裂期に発現する48.5kD分子解糖酵素エノラーゼのエピトープを特定するために、ペプチドを人工合成した。このペプチドは末端の $\alpha$ -ヘリックス構造により構造全体が安定化されたターン構造をもち、強い免疫反応を呈して、人工合成抗原となる可能性が示唆された。

#### A 研究目的

熱帯熱マラリアの人工合成抗原を開発すべく、メロゾイトの急性期に産生されるエノラーゼの抗原決定部位を推定し、人工合成して、免疫反応を測定する。

り予想通り、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していることが分かった。この16ペプチドはELISA法による免疫反応測定で熱帯熱マラリア患者血清に特異的に強い免疫活性を持つことが明らかとなった。

#### B 研究方法

メロゾイトの産生するエノラーゼのアミノ酸配列が決定されているので、その配列といくつかのエノラーゼのアミノ酸配列を比較し、マラリアエノラーゼに特異的なアミノ酸配列部分で、立体構造的に酵素の表面に存在するであろう部分を推定する。この部分をペプチド合成法により、人工的に合成する。このペプチドの立体構造を決定する。この人工ペプチドが免疫活性を持つかどうかを酵素標識免疫吸着測定(ELISA)法により判定する。

#### D 考察

エノラーゼの抗原決定部位の一つであるペプチド配列が判明した。しかし、このペプチドそのものがワクチン開発に応用できるかは定かではない。今後は、このペプチド配列を大きな分子に担持させて、抗原活性を増強させ、人工抗原としたい。

#### E 結論

エノラーゼの抗原決定部位の一つを特定することができた。今後の研究の展開によりワクチン開発の可能性が期待される。

#### C 研究結果

エノラーゼの中で、アスパラギンを含み、折れ曲がり構造を形成し、更にカルボキシル末端で $\alpha$ -ヘリックス構造を持つ16ペプチドを化学合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製した。このペプチドは円二色性スペクトル解析によ

#### F 研究発表

R. Katakai et al., Hydrophobic Site-Specific Control of the Volume Phase Transition of Hydrogels, *Macromolecules*, 31, 3383-3384 (1998)

# マラリア弱毒性因子の同定

研究者 宮本 薫 群馬大学生体調節研究所

**研究要旨** Plasmodium berghei XATは、強毒性であるP.berghei NK65株を放射線照射することにより得られた弱毒性株である。本研究では、P.berghei XATの弱毒性の原因となっている因子を明らかにするため、P.berghei XAT株で強く発現抑制されている蛋白質のクローニングを行い、ヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼであることを明らかにした。

## A. 研究目的

P.berghei XAT株は、強毒性のネズミマラリア株P.berghei NK65をX線照射する事により得られた弱毒性株である。昨年度の研究成果により、P.berghei XAT株の弱毒性の原因のひとつと考えられる因子の、単離精製およびそのN末端アミノ酸配列を決定に成功した。本研究の目的は、このアミノ酸配列を基にして、P.berghei XAT株の弱毒性の原因となっている因子のcDNAクローニングを行いP.berghei XAT株の弱毒性獲得のメカニズムを明らかにする事である。

## B. 研究方法

P.berghei XAT株で強く発現抑制されている蛋白質を、二次元ゲル電気泳動上で切り出し、緩衝液で抽出したのち、ペプチドシーケンサにかけてそのN末端アミノ酸配列を決定した。決定されたアミノ酸配列を基に、縮重オリゴヌクレオチドを合成し、それらをプライマーとして用いたPCRによって、このP.berghei XAT株で強く発現抑制されている蛋白質のcDNAクローニングをおこなった。さらにクローニングしたcDNA断片をもちいて、P.berghei NK65およびXAT cDNAライブラリーから全長をコードするcDNAをそれぞれ単離し、それらの塩基配列を、DNAシーケンサーを用い、デオキシダイターミネーター法によって決定した。またそれらの塩基配列に基づき、この原因蛋白質の全アミノ酸配列を推定した。推定したアミノ酸配列を蛋白質データベースに送り、現在までに蛋白質データベースに登録されている全ての蛋白質とのホモロジーを検索することで、その因子の同定を行った。さらにこの因子の遺伝子発現を検討するため、P.berghei NK65およびXAT株からmRNAを抽出し、ノーザンブロット法を行った。プローブは放射性ラベルしたcDNAを用い、ノーザンブロットの定量はBAS2000を用いて行った。

## C. 研究結果

強毒性株であるP.berghei NK65で強く発現しているスポットを発見し、二次元ゲル電気泳動上で切り出し、緩衝液で抽出したのち、ペプチドシーケンサにかけてそのN末端アミノ酸配列を決定した。ペプチドシーケンサにより決定された45残基のN末端アミノ酸配列をもとに、縮重オリゴヌクレオチドを合成し、それらをプライマーとして用いたPCRによって、このP.berghei XAT株で強く発現抑制されている蛋白質のcDNAクローニングをおこなった。その結果65bpをもつインサートcDNAが得られ、その塩基配列から推定されたアミノ酸配列は、完全にそのN末端アミノ酸配列と一致した。このことから、このcDNAは目的とする蛋白質をコードする遺伝子の一部であることが確認された。さらにこの65bpのcDNAをプローブとして全長cDNAの単離に成功した。全長cDNAは1.3kbpの長さをもち、231アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。このアミノ酸配列を、BLAST法に基づく検索法を用いて、蛋白質データベースに送り、現在までに蛋白質データベースに登録されている全ての蛋白質とのホモロジーを検索した。その結果、この蛋白質は、これまで蛋白質データベースに登録されていない新規の蛋白質である事が明らかとなった。またこの蛋白質は、ヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼと有意のアミノ酸配列相同性を示すことが明らかとなり、本因子はP.bergheiのヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼであると考えられる。またP.berghei NK65およびXAT株のヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼは、全く同一の構造であるため、強毒性株と弱毒性株の違いはその発現量の違いに由来するものと推定される。これは、両者のノーザンブロットの結果とも一致している。

## D. 考察

P.berghei XATの弱毒性の原因となってい

る因子を明らかにするため、P.berghei XATに特異的に強く発現抑制されている蛋白質の一つを単離した。この蛋白質は、データベースに登録されていない新規の蛋白質であったが、ヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼと有意のアミノ酸配列相同性を示したことから、P.bergheiのヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼであると考えられる。P.berghei NK65およびXAT株のヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼは、全く同一の構造であったため、強毒株と弱毒株の違いはその発現量の違いに由来するものと推定された。XAT株ではヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼ活性が著しく低いため、増殖のために必須の核酸合成が阻害されている可能性が高く、それがXAT株の弱毒性の原因となっている可能性が示唆される。

#### E. 結論

P.berghei XATの弱毒性の原因となっている因子を明らかにするため、P.berghei XATに特異的に強く発現する蛋白質の一つを単離し、それがヒポキサンチンアミノトランスフェラーゼであることを明らかにした。

# 分担研究報告書

## マラリアの病態疫学と対策に関する基礎的研究

分担研究者 姫野國祐 徳島大学医学部教授

**研究要旨** マラリア原虫の病原性に原虫のHSP90が関わっているか否かを *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) および *P. yoelii* の強毒株と弱毒株を用いた感染実験によって検討し、またその遺伝子のクローニングを行った。

### A. 研究目的

複雑な生活史を持ち、多様な抗原変異により宿主免疫系からエスケープするとされているマラリア原虫においては、肝細胞内型の schizont や merozoite では、原虫自体にHSP70が発現されることが知られている。しかし、このHSPがマラリア原虫のエスケープの手段として貢献しているか否かについては明らかではない。本研究では、マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei*, *P. yoelii* の強毒、弱毒株を用いて原虫HSP90の病原性への関与を検討する。まずマラリアHSP90をクローニングすることを目標とした。

### B. 研究方法

原虫のHSPの局在を知る目的で、感染マウス血液より各ステージの原虫を分離して、イムノプロットを行った。また、免疫電顕による解析も行った。さらにHSP90遺伝子のクローニングを行った。原虫のHSP90が結合している蛋白質を、抗HSP90モノクローナル抗体を用いて、免疫沈降法により同定することで、その役割を検討している。

### C. 研究結果

マラリア原虫が宿主内でサーバイブし宿主防御機構からエスケープする上で虫体へのHSP90の発現が essentialであることを既に解明してきた。しかもこの発現は日和見的であり、宿主にマラリア感染に対して防御能が全くないSCIDマウスやCD4欠如マウスではこの発現なしにエスケープすることである。原虫症を含めた多くの感染症において、HSPは病原体、宿主細胞あるいはそれらの双方に発現する。しかし、HSPが病原寄生体の宿主防御からのエスケープの手段として機能するのか、あるいは宿主側の防御機構に有利に働くものであるのかについては、未だに明確にされていない。HSP90のクローニングの結果、強毒株と弱毒株間には遺伝子の差は殆どないことが判明した。

### D. 考察

原虫を含めた多くの感染症において、HSPが病原体自身、宿主細胞あるいはそれらの双方に発現することが知られている。しかし、HSPが病原寄生体の宿主防御からのエスケープの手段として機能するのか、あるいは宿主側の防御機構に有利に働くもので

あるのかについては、未だに明確にされていない。本研究により、HSPを絡めた原虫感染におけるエスケープ機構、生体防御機構の特異性を体系づけることができ、ワクチン開発を含めた抜本的な感染対応策を練る上で大きな示唆が得られると思われる。また、HSP90遺伝子のクローニングが完成したことから、HSP90のエスケープにおける機能を今後さらに精密に解明できる。

### E. 結論

(1)強毒株は宿主M $\phi$ へのHSP65の発現阻止によりエスケープすること、(2)強毒株はさらに原虫自体にHSP90を発現することにより、宿主からの攻撃に耐える機能を持つこと、(3)強毒株におけるHSP90の発現は免疫系の欠損したSCIDマウス等では発現しないこと、換言すると宿主から攻撃を受けるときのみ強毒株はHSP90を発現すること等を明らかにした。なお、HSP90のクローニング実験から弱毒株においてもDNAレベルでは、正常な遺伝子を保有しているが、その転写レベルで欠陥があることが判明した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Switch of CD4<sup>+</sup> T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. Maekawa, Y., Himeno, K., Ishikawa, H., Hisaeda, H., Sakai, T., Dainichi T., Asao, T., Good, R.A., and Katunuma, N. (1998) J. Immunol., 161:2120-2127

2) Stage specific expression of heat shock protein 90 in murine malaria parasite *Plasmodium yoelii*. Zhang, M., Hisaeda, H., Tsuboi, H., Torii, M., Sakai, T., Nakano, Y., Ishikawa, H., Maekawa, Y., and Himeno, K. (1999) Exp. Parasitol., in press.

3) Macrophages expressing HSP65 play an essential role in protection of mice infected with *Plasmodium yoelii*. Zhang, M., Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Hao, Y., Nakano, Y., Ito, Y., and Himeno, K. (1999) Immunology, in press.

#### 2. 学会発表

The expression of host derived 65kd heat shock protein closely correlates with protective immunity to *Plasmodium Yoelii* infection in mice. Zhang, M., Hisaeda, H., Sakai, T., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Nakano, Y., and Himeno, K. 第9回国際寄生虫学会大会、1998年8月

## クロロキン耐性除去薬剤の開発

分担研究者 竹内 勤 慶応義塾大学医学部教授

本年度もマラリア原虫のクロロキン耐性の抑圧する薬剤の開発を目的としてピペラジン誘導体を種々合成して、クロロキン耐性 *Plasmodium chabaudi* 感染マウスモデルを用いて検討を試み、13種類の薬剤を検討した。その結果アリアル化したジベンズスベロイルピペラジン誘導体の中に2種の有効な化合物を得た。またNOD-SCIDマウスに *Plasmodium falciparum* 感染ヒトB型赤血球を移入し parasitemia の推移をみた。

### A. 研究目的

現在マラリアはサハラ砂漠以南の地域を中心に猖獗を極め、年間の死亡者数は同地域の小児を中心に年間200万人以上に達する状況となっている。この原因としてWHOを中心とした従来のマラリア制圧計画の失敗が挙げられる事は間違いない所であるが、基礎研究の不十分さに起因するワクチン、薬剤の開発の遅れも大きな影響を与えている。特にクロロキン耐性はじめ、各種の薬剤に対する耐性を有する熱帯熱マラリア原虫の分布拡大はマラリアの現況に多大な影響を有している。本研究は以上のような状況に鑑み、クロロキン耐性を抑圧できる薬剤の開発を行なう事をまず第1の目的とする。更にヒトマラリアの実験の制約に鑑み、ヒトマラリアのマウスを使用したモデルを作

成することを目的とする。

### B. 研究方法

(1)ピペラジン誘導体の合成と作用の検定：ピペラジン誘導体の合成は基本的には従来のとおり、ジベンズスベロイルピペラジンにエピクロルヒドリンと水素化ナトリウムを反応させ、ジベンズスベロイルエポキシプロピルピペラジンを中間体として合成する方法をとった。この方法に使用する試薬を高度に脱水する事で中間体の収率を上昇させた。一部はまずフェノール類、チオフェノール類などをエピクロルヒドリンと反応させ、クロロヒドロキシプロピル付加体を合成し、これをジベンズスベロイルピペラジンと反応させる方法をも採用した。作用の検定はICRオスマウス(5週令)を使用し、クロロキン

耐性の Plasmodium chabaudi, 3CQ strain、 $5 \times 10^6$ 個/0.1mlを尾静脈内に注射し、同日よりクロロキン2mg/kg、または3mg/kg(水溶液)腹腔内投与を4日間連続して行なった。ピペラジン(10%DMSOに溶解した)投与はクロロキン投与と同様のスケジュールでクロロキン投与30分前に行なった。投与量は以前の実験と同様50mg/kgに設定した。Parasitemiaの推移は尾静脈から採血して、ギムザ染色標本を作成し、10,000個の赤血球を観察して行なった。

(2)NOD-SCIDマウスへの Plasmodium falciparum感染実験：NOD-SCIDマウスは慶大病理、秦教授より分与を受けた。使用した P. falciparumはFCR-3 strainで、ヒトB型血球(1%の parasitemiaのものを1.0ml)を腹腔内投与して経時的に末梢血を検索した。

#### C. 研究結果

今年度は13種類のピペラジン誘導体を合成した。このうち4種類は置換基として芳香環を有し、その他のものは基本的にアリール化したジベンズペロイルピペラジンという化学構造をとっている。現在なお追試を慎重に行なっているが、後者のうちの2種類の化合物に優れた耐性消去作用を有すものが見いだされている(構造その他の詳細は特許申請終了後に報告したい)。置換基として芳香環を有している4種類は有意な耐性消去作

用を示さなかった。現在さらに *in vitro*での P. falciparum感染系での実験をも予定しており、その後急性毒性、慢性毒性の評価を行ないたい。

NOD-SCIDマウスに P. falciparumを感染せしめた実験系では、原虫は3日間で消失することが判明した。今後更にヒト造血系を備えたNOD-SCIDの導入も予定されており、ヒトマラリアのマウスモデルの作成を継続して行なう予定である。

#### D. 考察

今回合成したピペラジン誘導体は一部昨年までテストした誘導体に構造が類似しているもの(特に置換基として芳香環を有しているもの)があるが、それらよりも優れたクロロキン耐性消去作用を有するものが本年度の実験でアリール化誘導体のなかに見いだされた。これらの消去作用は極めて強力で、血液中の原虫数はクロロキン感受性のマラリア原虫(P. chabaudi, AS strain)がクロロキン投与に対して示す parasitemia とほぼ同様の推移を示している。今後更に類縁の化合物の合成を進めると同時に、毒性の検索、ABCトランスポーター等との相互作用の検討なども行ないたい。

NOD-SCIDマウスの実験はヒトマラリアのマウスモデルの開発を目指したものであるが、今年度はSPF状態を維持できる動物室の完成が遅れ、NOD

-SCIDに*P. falciparum*感染ヒトB型赤血球を移入した実験のみしか行なえなかった。しかし共同研究を行なっている慶大病理学教室ではすでにヒト型の造血能を一部再現したNOD-SCIDを開発しており、慶大微生物学教室との共同研究でのrag-2マウスを含み、本格的な実験を開始するべく準備を整えつつある段階である。

#### E. 結論

ジベンゾスベロイルピペラジン誘導体の中にこれまで開発した中で最も強力なクロロキン耐性除去作用を有する化合物を見いだした。特許申請後、報告したい。ヒトマラリアのマウスモデル開発はNOD-SCIDで行なっているが、rag-2も導入し近々本格的な検討を開始する予定である。

マラリア病態疫学と対策に関する基礎的研究  
分担研究者 相川正道 東海大学総合医学研究所 教授

研究概要

タイ国のマラリア患者 DNA を検査した結果、補体リセプター 1 型発現量を規定する 3 種類の遺伝子型のうち正常人では H/L が、重症患者では L/L が高いことが判明した。熱帯熱マラリア原虫感染赤血球が複数の非感染赤血球に接着する過程（ロゼット形成）を N-アセチルノイラミック酸が阻害し、ロゼット形成にシアル酸の関与することが示唆された。

A. 研究目的

近年のマラリア再燃の現状を鑑み、WHO はマラリアを人類が撲滅すべき感染症の第一に挙げている。この認識の基に、1998 年のパーミンガム宣言においてマラリア撲滅のため日本を初めとする先進主要国が積極的施策をとることが宣言された。この方針に沿って、我々は熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) によって引き起こされる重症マラリアの病態疫学と対策に関する基礎研究を行った。

B. 研究方法

1. タイ国マヒドン大学でおよそ 100 人の熱帯熱マラリア患者および正常人の血液を採取し、補体リセプター 1 (CR1) の発現量を規定する多型性遺伝子型 (H/H, H/L, L/L) 頻度と重症度との関係を明らかにする目的で、血液から得られた DNA を分析した。DNA の *Hind*III 切断部位を含むおよそ 1800bp を PCR 法により増幅し *Hind*III 処理後、アガロースゲル電気泳動法により分離し、約 1,800bp の単一バンドは H/H、1,300bp と 500bp の 2 バンドは L/L、1,800, 1,300 および 500bp のバンドが混成するものを H/L とした。

2. *P. falciparum* を培養し、感染率が約 7%、ロゼット形成率が約 20% に達した時点で、ヘパリン 5U/ml を加えてロゼットを破壊後、培地で洗浄してヘパリンを除きその後起るロゼット再形成過程に対する N-アセチルノイラミック酸 (NANA) の効果を調べた。

C. 研究結果

1. CR1 遺伝子型 (H/H, H/L, L/L) 頻度 (%) はタイ正常人ではそれぞれ、20.0, 56.7, 23.3、軽症

患者ではそれぞれ 31.5, 52.2, 16.3、重傷マラリア患者ではそれぞれ 28.0, 36.0, 36.0 であった。

2. NANA は 0.1-0.5mM でロゼット再形成過程を 50% 以上阻害したが、ロゼットそのものは破壊しなかった。

D. 考察

1. タイ国正常人では H/L 頻度が高いにもかかわらず、マラリア重症患者では L/L 頻度が有意に高かった。従って、L/L における免疫複合体の処理能力の低下が重症化の原因の一つとして考えられた。

2. NANA がロゼット形成を阻害するがロゼット自身を破壊しないことから、感染赤血球はその陽性荷電の突起構造物と非感染赤血球表層の陰性荷電のシアル酸の間の静電引力により接近・接触し、その後より強固な結合で非感染赤血球に接着してロゼットを形成すると考えられた。

E. 結論

1. 免疫複合体処理能力がマラリア重症化の遺伝的素因であることが示唆された。IgE, IgG およびプロスタグランジン等他の免疫因子の動態ともども検討さらに加え、マラリア診断の指標を目指す。

2. ロゼット形成には NANA により阻害される過程がある。

F. 研究発表

1. Nagayasu, E. et al. CR1 density polymorphism on erythrocytes of falciparum malaria patients. *Lancet* (submitted for publication).

2. Nakano, Y. et al. N-acetyl neuraminic acid inhibits rosette formation induced by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology International* (in preparation).

3. Gorduek, V.R. et al. Influence of hemoglobin E trait on the severity of falciparum malaria. *J. Infect. Dis.*, 179, 283-286, 1999.



NOD/SCID マウスを用いたマラリア感染モデルの開発  
ーヒト造血・血管・肝組織の再構築を通じてー

分担研究者 秦 順一 慶応義塾大学医学部病理学教室 教授

研究要旨：NOD/SCID マウスを用いたマラリア慢性感染モデル確立のためヒト骨・造血・血管・肝の再構築を試みた。本系ではヒト Erythropoietin, Stem cell factor 導入ストローマ細胞の移植により赤血球造血の高効率化が可能であった。

A. 研究目的

マラリアは生体内での感染機構やその慢性化のメカニズムについていまだ不明な点が多い。マラリア制圧においては生体感染モデルの開発が重要と考えられる。しかしマラリアの長期感染モデルには、長期間に及ぶヒト赤血球造血とヒト血管内皮や肝細胞が必要であり、これまでの SCID マウスを用いた系では限界があった。そこでわれわれは SCID マウスよりも NK 活性と補体価が低く、ヒト正常組織移植に適している NOD/SCID マウスを用いて、マラリア感染モデルの開発を試みた。

B. 研究方法

1. NOD/SCID マウス：Jackson 研究所 Shultz 博士より供与され安定したコロニーとして確立している。
2. ヒト骨を NOD/SCID マウス皮下へ移植し、造血をコロニー形成法で、血管内皮を抗 CD31, CD34 抗体にて観察した。またヒト G-CSF および IL-3 発現ベクターを導入したストローマ細胞 GSL へヒト erythropoietin (Epo), Stem cell factor (SCF), Flt-3 ligand 遺伝子導入を行った後、ヒト骨内へ移植し、ヒト赤血球造血能を観察する。
3. ヒト肝組織を NOD/SCID マウス腎被膜下へ移植し、その定着について観察する。

C. 研究結果

ヒト骨を NOD-SCID マウス皮下へ移植することで長期間、ヒト骨・造血が維持された。ヒト赤芽球系の前駆細胞 BFU-E, CFU-E は 4 ヶ月以上にわたり、移植骨内に多数存在した。また移植骨内外にヒト血管が存在することが抗 CD31, 34 抗体を用いた免疫染色にて明らかになった。一方、ヒト IL-3, G-CSF 発現ベクターを導入したマウス・ストローマ細胞 GSL を  $\beta$ -galactosidase 発現ベクター導入により標識し、ヒト骨内へ移植した。その結果、12 週以上 GSL 細胞の定着が認められ、さらに移植骨におけるヒト CFU-GM, BFU-E はそれぞれ 3.5, 2.5 倍増加した。さらに SR $\alpha$  をプロモーターとしてヒト Epo, SCF の発現ベクターを構築し、GSL 細胞への遺伝子導入を行ったところ、上清中にそれぞれ 80, 120 IU/ml のヒト Epo, SCF の産生が見られた。現在、このヒト Epo, SCF 導入 GSL 細胞を Hu-Bone SCID マウスへ移植し、生体内におけるヒト赤血球およびその前駆細胞について検討している。また NOD/SCID マウス腎被膜下へ移植したヒト正常肝は 4-6 週まで定着し、肝細胞、胆管とともに CD31, 34 陽性の血管内皮細胞が認められた。

D. 考察

Hu-Bone SCID マウスにおいてヒト血管新生が見られたことは、ヒト骨髓同様にヒト骨・造血・血管がマウスで再構築されていることを示す。また Hu-Bone SCID マウスだけでなく肝移植マウスでも、血管新生が見られ、さらにこのヒト内皮細胞が CD31 (PECAM) を発現していたことは、PECAM がマラリアの受容体の一つと考えられていることからマラリアの感染モデルとして期待されるものである。またこの Hu-Bone SCID マウスへのヒト Epo, SCF 導入ストローマ細胞の移植が完了しており、さらにヒト Flt-3 ligand 導入により、ヒト赤血球造血をさらに高効率することが可能と思われる。

E. 結論

NOD/SCID マウスへのヒト骨、肝移植とヒト Epo, SCF, Flt-3 ligand 遺伝子導入ストローマ細胞移植を組み合わせることで、マラリア慢性感染モデルに必要なヒト赤血球、内皮細胞、肝細胞が構築可能と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Regulation of human leukemic cell infiltration by Rho and Rho-GDI. Yamada T, Nakata S, Fukushima S, Nishimura Y, Kuwabara Y, Hata J Cytoskeleton and G-proteins in the regulation of cancer, Hakkaido University Medical Library Series Vol.37, pp116-117, 1998

Trichomonas foetus meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Okamoto S, Wakui M, Kobayashi H, Sato N, Ishida A, Tanabe M, Takeuchi T, Fukushima S, Yamada T, Ikeda Y Bone Marrow Transplant 21 (1):89-91, 1998

2. 学会発表

NOD-SCID マウスを用いたヒト造血・血管・骨の再構築 山田健人、穂積信道、中田勇二、橋口明典、南雲春菜、秦 順一 第 60 回日本血液学会総会（大阪）pp43, 1998

NOD-SCID マウスを用いたヒト癌の血行性転移モデルの確立ーヒト骨・血管の再構築を通じてー 山田健人、穂積信道、Jasbir S. Sandhu、秦 順一 第 87 回日本病理学会総会（広島）pp463, 1998

NOD/SCID マウスを用いたヒトがんの浸潤・転移モデルの確立ーヒト骨・血管の再構築を通じてー 山田健人、穂積信道、Jasbir S. Sandhu、浮山越史、秦 順一 第 57 回日本癌学会総会（横浜）pp175, 1998

マラリア感染のための動物モデルの確立

分担研究者 穂積 信道 東京理科大学生命科学研究所 生命工学技術部門 教授

研究要旨 ヒト骨髄細胞からストローマ培養細胞を作製し、ヒトIL-6を持つレトロウイルスベクターを感染させた。IL-6を発現するストローマ細胞を予めSCIDマウスの皮下に移植しておいたヒト骨髄内に注入した。ヒト骨髄内では破骨細胞の分化亢進による広範囲に渡る骨吸収像が観察された。

A. 研究目的

マラリアはヒト赤血球に感染するためマラリア感染のヒト化動物モデルの開発には、ヒト赤血球が恒常的に分化する実験系の確立が必須である。我々はすでにヒト骨をSCIDマウスの皮下に移植し、ヒト造血系の再構築に成功している。さらにヒト赤血球を選択的に分化させるため、赤血球の分化に関与する遺伝子をヒト骨髄細胞に遺伝子導入する必要がある。そのための基礎実験として骨髄細胞内への遺伝子導入実験系の確立を目的として研究を行った。

B. 研究方法

ヒト骨髄細胞からストローマ培養細胞を作製した。次にヒトIL-6とneo遺伝子を持つレトロウイルスベクターを感染させ、ネオマイシン耐性細胞を選択培養し、予めSCIDマウスの皮下に移植しておいたヒト骨に注入した。

C. 研究結果

SCIDマウスの血清中には、4ヶ月間に渡ってヒトIL-6の発現(250pg/mL)が確認された。ヒト骨髄内ではIL-6発現によるヒト破骨細胞の分化亢進と活発な骨吸収像が確認された。しかしマウス骨髄内では破骨細胞の分化亢進は観察されなかった。

D. 考察

ヒト赤血球のNOD-SCIDマウスにおける半減期は75時間と短いため、継続的にヒト赤血球をマウスに移植することにより、マラリア感染実験系の維持がはかられている。この方法では実験系のプロトコール、解析が複雑になる。この問題解決のためには、恒常的にヒト赤血球分化が誘導される系の開発が望まれる。ヒト骨髄細胞にエリスロポエチン、SCF、Flt3L等の遺伝子導入を行えば、理想に近い実験系が開発できるものと期待される。しかしヒト骨髄細胞への遺伝子導入は容易ではない。そのための基礎実験としてストローマ細胞にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する方法を確立した。遺伝子導入されたストローマ細胞をヒト骨髄に移植することにより、導入された遺伝子がin vivoで発現し機能することが確認された。この方法はヒト骨髄細胞の分化の解析や遺伝子治療の前臨床モデルとしても発展が可能である。

E. 結論

ヒト骨髄細胞を遺伝子操作する実験系を確立した。レトロウイルスベクターにより遺伝子導入されたストローマ細胞は、ヒト骨髄への移植後、機能を発現することが確かめられた。この方法を用いればヒト造血機能に関与した遺伝子を導入することにより造血系細胞の分化を制御することも可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hozumi, N., Cole, J., Lucien, J., Terzioglu, M., Gorczyński, R. and Sandhu, J. A human model of xenogeneic graft-versus-host disease.(1998) The Proceedings of the 10th Int. Congress of Immunol. (New Dehli, 1-6 November, 1998) 255-260.

Teng, A-T., Nguyen, H., Hassanloo, A., Ellen, R.P., Hozumi, N. and Gorczyński, R. (1999) Periodontal immune responses of human lymphocytes in Actinobacillus actinomycetemcomitans-inoculated NOD/SCID mice engrafted with peripheral blood leukocytes of periodontitis patients. J.Periodontal. Res. 33: 1-8,1999.

Sandhu, J. Gorczyński, R., Waddell, J., Nguyen, H. Squires, J., Waddell, J., Boynton, E. and Hozumi, N, Effect of interleukin-6 secreted by engineered human stromal cells on osteoclasts in human bone. Bone ( in press)

2. 学会発表

Hozumi, N. The 10th International Congress of Immunology, Delhi, 1-7 Nov. Symposium-XXV: Transplantation and autoimmune disorders. A human model of xenogeneic graft versus host disease.

## 研究成果の刊行に関する一覧表

- 鈴木 守 (1998) 世界におけるマラリア. 化学療法の領域 14: 783-787.
- 鈴木 守、相川正道 (1998) マラリアの感染に伴う腎障害. 腎と透析 44: 384-389.
- 相川正道 (1998) 現在話題のマラリア研究. 化学療法の領域 14: 815-820.
- Aikawa, M. (1998) The pathology of cerebral malaria. Host Response to International Parasitic zoonoses (Ishikura, H., Aikawa, M., Itakura, H. and Kikuchi, K. eds.) pp. 53-68. Springer-Verlag, Tokyo.
- 中野 山路、相川 正道 (1998) 脳性マラリア感染赤血球の微細構造. 電子顕微鏡 33: 93-98.
- Torii, M. and Aikawa, M. (1998) Ultrastructure of asexual stages. Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection (Sherman, I. W. ed.) pp. 123-134, ASM Press, Washington, D. C.
- Sein, K. K. and Aikawa, M. (1998) The pivotal role of carbonic anhydrase in malaria infection. Med Hypotheses 50: 19-23.
- Kano, S., Onda, T., Matsumoto, Y., Looareesuwan, S., Aikawa, M. and Suzuki, M. (1998) Serological evaluation of malaria patients in Thailand, with particular reference to the reactivity against a 47KD antigenic polypeptide of *Plasmodium falciparum*. Tokai J Exp Clin Med 23: 97-98.
- Matsumoto, Y., Naya, T., Darko, C. A., Katakai, Y., Kano, S., Suzuki, M., Wilairatana, P., Looareesuwan, S., Brittenham, G. M. and Aikawa, M. (1998) Different plasma levels of circulating cell adhesion molecules in falciparum malaria patients according to disease severity. Tokai J Exp Clin Med 23: 79-80.
- Katakai, R., Saito, K., Sorimachi, M., Hiroki, A., Kinuno, T., Nakajima, T., Shimizu, M., Kubota, H. and Yoshida, M. (1998) Hydrophobic site-specific control of the volume phase transition of hydrogels. Macromolecules 31: 3383-3384.
- Hiroki, A., Yoshida, M., Yamashita, J., Asano, M., Reber, N., Spohr, R., Kumakura, M. and Katakai, R. (1998) *p*-Nitrophenol permeability and temperature characteristics of an acryloyl-L-proline methyl ester-based porous gel membrane. J Polym Sci Pol Chem 36: 1495-1500.
- Maekawa, Y., Himeno, K., Ishikawa, H., Hisaeda, H., Sakai, T., Dainichi, T., Asao, T., Good, R.A. and Katunuma, N. (1998) Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. J Immunol 161: 2120-2127.
- Yamada, T., Nakata, Y., Fukushima, S., Nishimura, T., Kuwabara, Y. and Hata, J. (1998) Regulation of human leukemic cell infiltration by Rho and Rho -GDI. Hokkaido Univ Med Lib Ser 37: 116-117.

19980479

報告書続きページは「研究成果の刊行に関する一覧」の雑誌論文のコピーが掲載されている