

厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

抗マラリア薬の複合投与による 相乗効果に関する基礎的研究

平成 11 年度研究報告書 (1999)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 12 年 4 月 10 日

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

住所

研究者 氏名 アイカワ マサ ミチ
相川 正道
(学校法人東海大学総合科学技術研究所)

平成 11 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：抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究
(H11-新興-3)

国庫補助金精算所要額：金 20,000,000 円也

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

抗マalaria薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究
主任研究者・相川 正道・学校法人東海大学総合科学技術研究所教授

研究要旨

赤血球膜に結合することにより、マalaria原虫の侵入を抑えるディラゼップおよびディピリダモールが熱帯熱のマalaria重症化因子の一つであるロゼット形成過程を阻害した。また、結合により生じる表層電位をも含めた膜変化を液中で検出する原子間力顕微鏡システムのモデル系を確立した。また、これら薬剤による原虫増殖の阻害効果ならびに治療効果のアクセイ系、さらに血中ディピリダモール濃度の測定方法を改良した。一方、プログアニル (PG)の薬理遺伝学的研究から PG 自体に、その代謝産物であるシクログアニルとは別の抗マalaria作用があることが示唆された。

分担研究者

大友弘士・東京慈恵会医科大学・教授
金村聖志・東京都立大学・助教授
西野武志・京都薬科大学・教授
伊藤義博・(財)生産開発科学研究所・主任
研究員
金子 明・東京女子医科大学・助教授

アニル (PG) は、副作用が少なく他薬との合剤として用いられるが、耐性が起りやすい欠点がある。このような欠点を補うためにもマalaria原虫を直接のターゲットとする薬剤としない薬剤との適切な組み合わせが必要である。

本年度は、上記研究の推進に必要な各種アクセイ系の確立ならびに PG の遺伝薬理学的研究を行った。

A.研究目的

現在、マalariaが地球レベルで再燃し、WHOはマalariaを人類が撲滅すべき感染症の第一にあげている。マalaria再燃の原因の一つは、クロロキンを始めとする抗マalaria薬が治療に加えて予防的に使用されたため、耐性株が出現したことである。従って、抗マalaria薬の投与方法の改善が緊急に求められる。

この現状を鑑み、本研究の目的は作用点の異なる2種類の薬を組み合わせることにより、その相乗効果によるマalaria治療の改善ならびに副作用等の患者における負担の軽減を目指すものである。

我々は、抗血小板凝集薬であるディラゼップ (DZ)およびディピリダモール (DP)が赤血球膜に結合して赤血球侵入型細胞のメロゾイトの侵入を抑制することによりマalaria原虫の増殖を抑えることを見い出した。この結果を基に、DZ および DP などの原虫の赤血球侵入阻止薬と原虫を殺傷する従来の抗マalaria薬を同時投与することにより耐性株出現の確率を減少させ、抗マalaria薬の使用量を減少させることを発案した。

また、原虫酵素を特異的に阻害するプログ

B.研究方法

1. DZ および DP などの膜親和性薬剤が結合しておこる赤血球膜の表層構造変化の検出に熱帯熱マalaria原虫 (*Plasmodium falciparum*) 感染赤血球によるロゼット形成系を用いた。また、走査電子顕微鏡ならびに透過電子顕微鏡を用いて、DZ ないし DP 処理赤血球膜構造の微細構造を調べた (相川)。
2. DZ ないし DP などが結合しておこる赤血球膜の表層構造および表層荷電の変化を“生きたままに近いかたち”で検出するために原子間力顕微鏡システム (AFM)を導入し、その液中測定条件をイオン交換樹脂膜ならびにアパタイト膜を用いたモデルシステムで検討した (金村)。
3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)による、少量の血漿サンプルを用いた DP 濃度測定条件の検討を行った (大友)。
4. 複合投与の動物実験系の確立のため、ICRマウスを用いて、マウス・マalaria原虫 (*Plasmodium yoelli*)感染系を確立し、メフロキン、キノロン薬、マクロライド系薬、テ

トラサイクリン系薬および複合投与による治療効果を検討した(西野)。

5. ICR マウス赤血球を用いた培養系で DP による *P. yoelli* の侵入抑制効果を調べ、またマウスに投与された DP の赤血球膜親和性を HPLC により調べた(伊藤)。

6. バヌアツにおいて PG 治療を受けたマラリア患者のサンプルを採取し、肝チトクローム P450 のアイソザイムである CYP2C19 の遺伝子をターゲットとして PG 代謝と抗マラリア効果を検討した(金子)。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、「動物実験に関する指針」に従って、最少限度の動物を使用した。

バヌアツで行う調査研究計画がバヌアツ保健省により許可された。さらに、調査地区での協力を得て、研究の主旨、検査、危険性について説明して、患者(子供の場合は保護者)の同意を得た。

C. 研究結果

1. DZ および DZ のロゼットに対する影響(相川)。

DZ および DP は 5 および 50 μ M でロゼットを壊さなかった。しかし、ヘパリンを用いて一旦ロゼットを壊し、ヘパリンを除いてロゼットが再構成される過程を DZ は、5 および 50 μ M で、DP は 50 μ M で有意に ($P < 0.05$) 阻害した。また、透過電子顕微鏡ならびに走査電子顕微鏡観察の結果では、これらの薬剤処理した赤血球表層に明確な微細構造変化は認められなかった(相川)。

2. AFM を用いた液中表面電位分布測定に関する研究(金村)

赤血球表層を模擬したイオン交換膜ナフィオンやアパタイト膜をモデル物質として用い、市販の探針により大気中湿潤条件下の表層微細構造と表層電位分布を同時に測定できることが確認できた。しかし、液中での測定では、探針表層における電解反応による気泡の発生などの問題点があることが判明した。

3. DP の抗マラリア効果の検討: DP 測定法の開発(大友)。

マウス血漿 100 μ l を用いて従来の DP 濃度測定法(Pederson AK, 1979)を改善した結果、検出限界 0.1 μ g/ml、0.1-10 μ g/ml の範囲で良好な ($r^2 = 1.0$) 相関関係が得られ

た。

4. マウス・マラリア感染モデルの確立(西野)。

P. yoelli の感染量を種々に変えて、ICR マウスの腹腔内および静脈内に接種した。感染後の死亡率および染色標本による感染赤血球の顕微鏡観察により、*P. yoelli* の感染量に対応した死亡率および感染赤血球が認められ、ICR マウスにおけるマラリア原虫感染モデルを確立でき、この感染モデルを用いて治療効果を検討した。メフロキンでは投与量に対応した優れた治療効果がえられたが、キノロン薬(sparfloxacin, sitafloxacin) マクロライド系(clarithromycin) テトラサイクリン系(doxycycline)では治療効果が認められなかった。また、メフロキンと clarithromycin を用いて予備実験をおこなったが、相乗作用効果は認められなかった。

5. 試験管内における抗マラリア薬の赤血球膜親和性とマラリア原虫侵入抑制効果(伊藤)。

試験管内アッセイ系で、DP は *P. yoelli* の増殖に対して 10mM 以上で顕著な抑制効果を示した。また、マウスに投与後の DP の赤血球膜への親和性を調べた。その結果、経口投与、腹腔接種のいずれにおいても DP が赤血球膜に親和性があることが、HPLC 分析により証明された。

6. 薬剤耐性マラリアに対する PG 治療の薬理遺伝学的研究(金子)。

1) PG で治療した 100 人のマラリア患者における CYP2C19 遺伝子型を調べた。活発な PG 代謝(EM)に関連する野生型の CYP2C19*1 および不活発な PG 代謝(PM)に関連する CYP2C19*2 および CYP2C19*3 の頻度は、それぞれ 0.18、0.57、0.25 であり、CYP2C19 遺伝子型に関して 68 名が PM、32 名が EM であった。PM 群は EM 群に比べて PG 血中濃度は高く、代謝産物であるシクログアニル(CG)および 4-クロロフェニルビグアニドは低かった。

2) PG による治療効果は *P. falciparum* 患者では 71%、三日熱マラリア(*P. vivax*) 患者では 90%に有効であったが、PM 群と EM 群で治療効果に差が認められなかった。

3) PG 治療後認められた嘔吐、腹痛など上部消化管に対する副作用は血中 PG 濃度と相関した。

D. 考察

1. 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球はその表層の特異的突起構造物を介して複数の非感染赤血球に接着してロゼットを形成することから、ロゼット形成には非感染赤血球および感染赤血球表層の構造が重要と考えられる。従って、表層の構造に何らかの変化が起ればロゼットが壊れる（ないし壊れやすくなる）か、またはロゼット再構成が抑制されることが予測される。DZ および DP は、50 μ M でロゼットを壊さず、ロゼット形成を阻害したことから、ロゼット形成過程に必要な構造が変化したと推測された。この系では、試験管内でのマラリア原虫増殖阻止実験に比べて 1/100 の濃度で赤血球に対する影響を検出できたことから他の赤血球親和性薬剤のアッセイに有効と考えられる。

また、マラリアの中でも、熱帯熱マラリアは重症化しやすく、ロゼット形成は熱帯熱マラリアの重症化因子の一つと考えられている。従って、DZ および DP はロゼット形成を阻害することにより、熱帯熱マラリア重症化を阻止しうることを示された。

DZ および DP が結合した結果、生じるであろう赤血球膜の微細変化は電子顕微鏡では検出できなかった。現在、液中の AFM により構造変化の検出を試みている。

2. モデル物質を用い、市販の探針により大気中湿潤条件下の表層微細構造と表層電位分布を同時に測定できることが明かになった。しかし、市販の探針で液中での電位測定を行うと AFM の探針表層のコーティングが、電解反応ため剥がれ、一瞬しか表層電位を測定できないので、探針のコーティングの検討を行い、液中での電位測定を試みる。

3. 限られた検体量で検出感度を上昇させた H PLC による血中 DP 濃度測定法が確立でき、今後他の分担者が確立した動物を用いた薬理実験に導入する。

4. ICR マウスでのマラリア原虫感染モデルを確立することができたが、治療効果があると報告されている doxycycline で効果を確認することができなかったため、マラリア原虫の接種量や薬物の投与量および回数、また投与時期などについても今後検討する必要がある。

5. 予備的実験で、抗赤血球膜抗体が DP の膜親和性を阻害する結果を得たので、この結果

を基に膜親和性薬物と増殖阻害との関係について DP および DZ に限定せず、膜親和性を持つ多くの薬物を対象として検討する。

6. PG は、ヒトの体内で CG に代謝されることにより原虫のデイヒドロフォレート・レダクターゼ (DHFR) 活性を抑制して、抗マラリア作用を発揮する。従って、PM のマラリア患者では、PG 代謝が不活発なので CG に変換されにくく、抗マラリア効果が少ないと予想された。しかし、今回の結果では、CYP2C19 の変異と PG 代謝とが相関していたが、PG 治療効果に関して PM と EM とで差が認められなかった。従って、PG 自体に CG とは別の抗マラリア作用があることが示唆された。

E. 結論

薬剤が、赤血球膜に結合して起る膜表層の微細な変化を検出するスクリーニング系ができ、結合の結果生じる表層電位をも含めた膜変化を検出する AFM の測定条件検討に進展が認められた。また、これらの薬剤による原虫増殖の阻害効果を検定する試験管内アッセイ系および治療効果を検定するマウス動物実験系が確立できた。さらに、微量な血中 DP を測定する方法が確立した。上記の実験系および分析方法により、作用点の異なる 2 種類の薬剤の治療効果の研究が効率良く進展すると考えられる。また、PG の薬理遺伝学的研究から PG 自体に抗マラリア効果があることが推定され、PG と他薬剤との複合投与に新たな可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hamagami J, Kanamura K, Umegaki T, Nakano Y, Aikawa M and Yamashita K (1999). Surface potential measurement of electrically poled HAP ceramics. *Bioceramics* 12: 169-172.

Bhisutthibhan J, Philbert MA, Fujioka, H, Aikawa M. and Meshnick S R (1999). The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein : subcellular localization and binding. *Euro J Cell Biol*, 78: 665-670.

Kaneko A, Lum JK, Yaviong J, Takahashi N, Ishizaki T, Bertilson L, Kobabayakawa

T, Björkman A (1999). High and variable frequencies of *CYP2C19* mutations: medical consequences of poor drug metabolism in Vanuatu and other Pacific islands. *Pharmacogenetics*, 9: 581-590.

Kaneko A, Bergqvist Y, Taleo G, Kobayakawa T, Ishizaki T, Björkman A (1999). Proguanil disposition and toxicity in malaria patient from Vanuatu with high frequencies of *CYP2C19* mutations. *Pharmacogenetics*, 9: 317-326.

Kaneko A, Bergqvist Y, Takechi M, Kalkoa M, Kaneko O, Kobayakawa T, Ishizaki T, Björkman A (1999). Intrinsic efficacy of proguanil against falciparum and vivax malaria independent of the metabolite cycloguanil. *J Infect Dis*, 179:974-979.

2.学会発表

Hamagami J, Kanamura K, Umegaki T, Nakano Y, Aikawa M and Yamashita K. Surface potential measurement of electrically poled HAP ceramics. 12th Surface potential measurement of electrically poled HAP ceramics at Nara, Japan (1999, October).

Akaki M, Nakagawa T, Takeuchi T, Asai T, Kobayashi S, Nagakura K, Katakura K, Matsumoto Y, Horii T, Aikawa M. Invasive form of protozoan parasites have a positive electric charge at their contact site with host cells. The Annual Meeting of the Japanese Society of Parasitology at Tochigi, *Parasitology International* (1999, April), 48 (Suppl):112
Aikawa, M. Atomic force microscopic study on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. The 2nd International Meeting on Tropical Disease, Sanya, China (1999, December).

Kaneko A. A practical exercise in malaria control in a low endemic setting. Agenda for meeting on Strategic considerations for the Development of Vaccines against Malaria Transmission; (1999 Dec 3-5; Bethesda, USA).

Kaneko A, Bergqvist Y, Takechi M, Kalkoa M, Kaneko O, Kobayakawa T,

Ishizaki T, Björkman A. *CYP2C19* polymorphism and proguanil efficacy in malaria patients from Vanuatu. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 48th Annual Meeting Program Update (1999 Nov 28 - Dec 2; Washington, USA). Kaneko A, Lum JK, Yaviong J, Ishizaki T, Bertilsson L, Kobayakawa T, Björkman A. High frequencies of *CYP2C19* mutations and poor drug metabolism in Vanuatu. 1999 Gordon Research Conference on Molecular Evolution (1999, Oct 24-29, Hayama, Japan).

Kaneko A, Taleo G, Yamar S, Ichimori K, Rieckmann KH, Kobayakawa T, Perlmann H, Perlmann P, Björkman A. Persistence of immune responses 7 years after the eradication of malaria on an island of Vanuatu. Programme and abstracts of the 11th British Society for Parasitology Malaria Meeting 1999), *Sepp* 20-22; London, UK. p. 71.

Kaneko A, Taleo G, Perlmann H, Perlmann P, Ichimori K, Mita T, Kobayakawa T, Björkman A. Eradication of malaria on an island of Vanuatu. Joint Conference of the 40th Annual Meeting of Japanese Society of Tropical Medicine and the 14th Annual Meeting of Japanese Association for International Health (1999 Sep 3-5; Tokyo, Japan). *Jp J Trop Med Hyg* 1999; 27 (Suppl.): 79 (291).

金子明, Taleo G, Björkman A. プログアニール治療の ethnopharmacology. 科学研究費補助金「特定領域研究 (A)」マラリア制圧の分子論的展開, 第2回全体班会議講演要旨集; 1999年1月8-9日, 東京. 1999. p.60-1.

金子明. バヌアツにおけるマラリア対策に関わる遺伝的多様性 日本オセアニア学会 第16回研究大会 プログラム・研究発表要旨; 1999年3月14-15日, 大仁. 1999. p.6.

金子明. 南太平洋における島しょマラリア対策 第23回日本熱帯医学会九州支部大会, 熱帯医学シンポジウム, プログラム及び抄録; 1999年2月20-21日, 長崎.

Kaneko A, Bergqvist Y, Taleo G, Kobayakawa T, Ishizaki T, Björkman A. Proguanil disposition and toxicity in relation

to CYP2C19 polymorphism. Program and abstracts of the 68th annual meeting of the Japanese society of Japan. Parasitology International parasitology; 1999 April 5-7; Tochigi, (Supl.):117.

金子明. マラリアの諸問題ーバヌアツの経験から 第73回日本感染症学会総会, 教育講演, 学術講演抄録 1999年3月30-31日, 東京, 感染症学雑誌 1999;73 増刊号. 1999;48

G. 知的所有権の取得状況

ナシ

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ディピリダモールの抗マラリア効果の検討：ディピリダモール測定法の開発
分担研究者 大友弘士 東京慈恵会医科大学教授

研究要旨

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による血漿ディピリダモール（DP）測定法を改良した結果、DPの検出限界は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、検量線は $0.1\text{-}10 \mu\text{g/ml}$ で良好な相関関係が得られた（相関関数 $r^2=1.0$ ）。

A. 研究目的

ディピリダモール（DP）などのマラリア原虫の赤血球侵入を阻止する薬と原虫を殺傷する抗マラリア薬の適切な組み合わせを選定することを目的とする。そのためには、投与された DP の体内濃度を正確に測定し、抗マラリア効果および治療効果との関係を明確にする必要がある。従来の Pederson の方法による HPLC では限られた検体量での測定ができないので、測定法の改善を試みた。

B. 研究方法

ラット血漿（ $100 \mu\text{l}$ ）に内部標準物質としてインドメタシン溶液（ $1.0 \mu\text{g/ml}$ ） $100 \mu\text{l}$ 、メタノール $200 \mu\text{l}$ を加え 15 分間振盪後、 $10,000\text{g}$ で 5 分間遠心してタンパク質を除いた上清 $100 \mu\text{l}$ を HPLC で分析した。以下に測定条件を示す。

カラム；Sensyu Pack ODS C18

移動層； 20mM 酢酸ナトリウム（ $\text{pH}4.0$ ）とメタノールとの混合液（ $25 : 75$ ）

流速； 2ml/min （常温）

倫理面への配慮

「動物実験に関する指針」に従い、最少限度の動物を使用する。

C. 研究結果および考察

DP の検出限界は、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ であった。検量線は $0.1\text{-}10 \mu\text{g/ml}$ で良好な相関関係が得られた（図 1：相関関数 $r^2=1.0$ ）。

D. 結論

HPLC 法の改善により限られた検体量で検出限界が向上できたので、この方法を用いて、

他の分担者と協力して DP 投与動物の血漿濃度を測定し、抗マラリア効果との関係を明らかにする。

E. 参考論文

Pederson, AK (1979). Specific determination of dipyridamole in serum by high performance liquid chromatography. *J Chromatography* 103:98-103

大友弘士、狩野繁之（1999）抗マラリア薬 医学のあゆみ 191：109-113

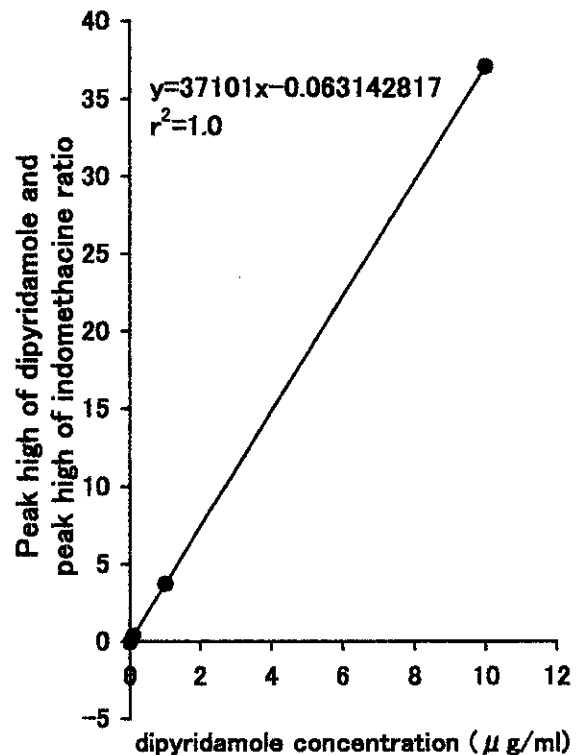


図 1. ラット血漿中の DP 検量線

原子間力顕微鏡を用いた液中表面電位分布測定に関する研究

分担研究者 金村 聖志 東京都立大学工学研究科助教授

マラリアに感染した赤血球表面の形状変化と表面電位の変化はマラリアが引き起こす諸症状と関連している。このような現象を、血液あるいは体液などの液中で直接観測できれば、マラリア感染の形状および電位変化について多くの知見を得ることができる。また、抗マラリア薬剤のスクリーニングにも摘要できる。これらの観点から、液中における赤血球表面の形状測定系および表面電位測定系の確立を目指して研究を行った。本年度は、特に測定用探針の製作に重点をおき赤血球膜を模擬したイオン交換膜やアパタイト膜を用いて研究を行った。大気中湿潤状態における測定は、市販の探針を用いて容易に行うことができるようになったが、液中での測定には多くの問題が存在することが明らかとなった。そこで、液中用の探針を独自に開発することを試みた。その結果、原子間力顕微鏡による形状観察は十分に可能となったが、電位の測定にはいくつかの問題点があることが分かった。今後、測定条件の最適化が必要と考えられる。

A. 研究目的

生体内の細胞の多くは、細胞膜表面の電荷と関連して諸現象が生じる場合が多い。例えば視覚細胞では光に応答して H^+ 移動が生じるが、そのような H^+ 移動は親水性領域において生じる。そして、その周囲には疎水的な環境が存在する。このような反応場の分析を行い、親水的な部分や疎水的な部分、さらには表面の電位を測定することは、諸現象を解明する上で重要である。これまでの多くの研究は表面の形状変化を中心に研究が行われてきたが、表面の形状だけではなく、その微小領域における電位分布を測定することが望まれる。そこで、本研究課題においても、赤血球表面の状態変化を、その形状だけでなく物理化学的な性質である表面電位分布を測定することにより明確に捉え、マラリア感染による赤血球表面の状態変化を特定しようとするもので

ある。また、本手法は、抗マラリア薬のスクリーニングを行う場合においても重要な手法となることが期待される。

既に、大気下での測定においてはいくつかの成果をあげてきた。例えば、マラリアに感染した赤血球に対して測定を行い、いくつかの興味ある結果を得てきた。しかし、これまでの測定は大気中湿潤状態の赤血球を観察したもので、より実体に近い状態の赤血球を観測することが今後望まれる。特に抗マラリア薬のスクリーニングには、液中での観測が必要不可欠である。

本研究分担者の課題はこのような測定を実現可能とするためのバックアップ的研究である。ちなみにこのような測定を高い信頼性と簡便性を持って行った例はなく、測定方法の基礎的な研究が重要な課題となっている。

赤血球そのものの観察も無論可能である

が本年度はより明確に定義された表面を有するサンプルについて測定を行うことで、本測定方法の問題点を明らかにし、液中での測定を可能にすることを目的として研究を行った。

B. 測定方法

B-1 走査型プローブ顕微鏡

目的とする赤血球表面のノブと呼ばれる部位の大きさは数十 nm 程度の大きさである。したがって、形状にしても表面電位にしてもこのオーダーの領域において測定ができなければ意味がない。このようなオー

ダーの解像度を有する測定手法として原子間力顕微鏡や走査型トンネル電子顕微鏡が挙げられる。もちろん、透過型電子顕微鏡を用いても同じような測定を行うことができるが、真空下での測定であり、表面の物理化学的な性質を知ることは不可能である。また、プローブ分子を用いて擬似的にそのような性質の測定も可能とは思われるが、やはりその議論には常にプローブとなる分子の性質も含まれる。すなわち、ありのままの状態で測定することが最も確実であり真の姿を捉えていることになる。この点において原子間力顕微鏡や走査型トンネル電子顕微鏡が優れていることは間違いのないことである。これらの測定を総称し走査型プローブ顕微鏡と呼ぶ。

走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope; SPM) は、微小な探針を試料表面で走査することにより、試料表面の種々の物理状態を観察する顕微鏡である。特に試料と探針との間に働く引力ならびに斥力を検出する走査力顕微鏡 (Scanning Force Microscope; SFM) は、原子間斥力、静電気力、磁気力、摩擦力などを対象としている

Table 1 Characteristics of cantilever

	MESP	NP-S
Material	Si single crystal	Si ₃ N ₄ (oxide sharpened)
Cantilever length	225 μm	120 μm 200 μm
Resonance frequency	100 ~ 150 kHz	5 ~ 50 kHz
Elastic constant	20 ~ 70 N m ⁻¹	1. 0.58 N m ⁻¹ 2. 0.38 N m ⁻¹ 3. 0.12 N m ⁻¹ 4. 0.06 N m ⁻¹
Height of tip	10 ~ 15 μm	3 μm
Curvature radius	5 ~ 10 nm	5 ~ 40 μm

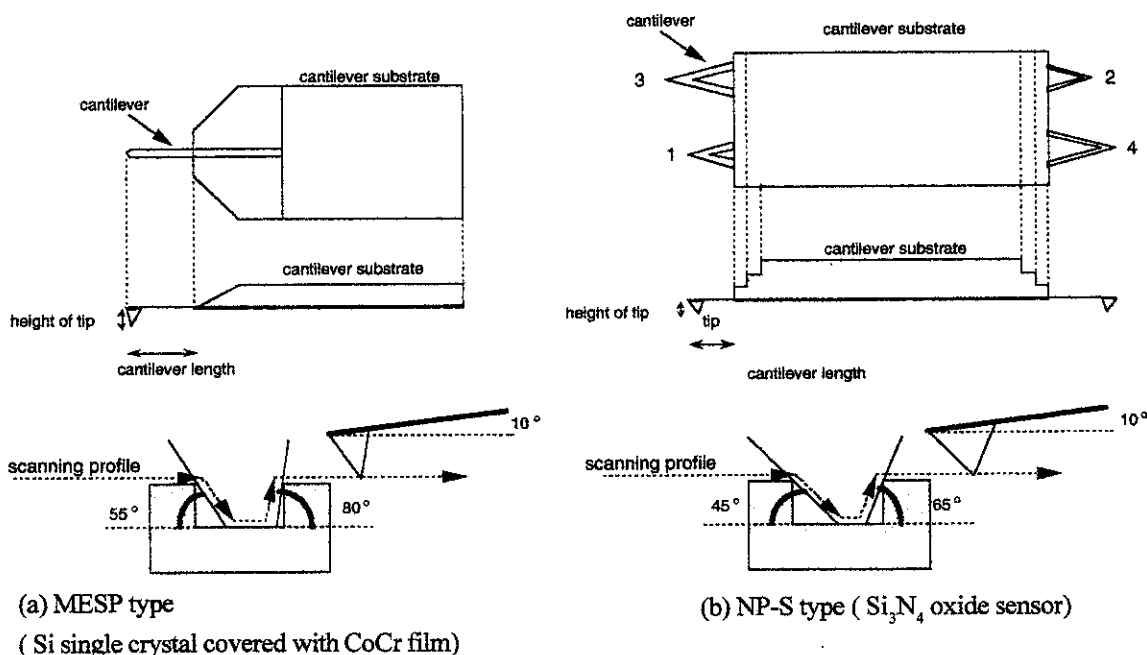


Figure 1 Schematic illustration for (a) MESP type and (b) NP-S type cantilevers.

ので、試料表面の種々の物理状態を調べることができる。その中でも、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope; AFM) は、試料表面原子と探針原子との間に働く斥力およびファンデルワールス力を利用するものであり、試料表面の凹凸に関する情報が得られる[1-3]。AFMは、試料の電子導電性を必要としない手法なので、いかなる試料でも特に前処理を必要としない。従って、AFMは、既に各種材料の表面の形状を観察する手段として普及しつつある。また、数年前に試料と探針との間に働く静電気力を利用して、試料表面の帯電状態の分布を測定する新規な走査力顕微鏡が開発された。これは、Kelvin Probe Force Microscope [4, 5]、走査型マクスウェル応力顕微鏡 (Scanning Maxwell-Stress Microscope; SMM) [6, 7]、または走査型表面電位顕微鏡 (Scanning Surface Potential Microscope; SSPM) [8]などと命名されている (本研究では、以下表面電位顕微鏡; Surface Potential Microscope; SPoMと呼ぶ)。試料表面の帯電は、試料の仕事関数、吸着分子の双極子モーメント、ならびに表面被膜の誘電率などに影響を受けるので、試料表面の帯電状態の分布は、試料表面の化学組成の分布を反映している。従って、

この走査型表面電位顕微鏡を用いれば、表面の化学組成が特に重要な材料にとって、極めて有益な情報が得られるものと考えられる。

本研究では、原子間力顕微鏡を用いた測定を採用し赤血球表面の形状変化のその場測定および表面に存在する電荷分布の測定を行う。

B-2 原子間力顕微鏡(AFM)および表面電位顕微鏡(SPOM)装置

AFMならびにSPoMによる表面分析には、Digital Instruments社製SPMコントロールステーションNanoscopeIIIa、マルチモードSPMユニット、ならびに位相検出エクステンダー・モジュールPhase-01を用いた。防振台には、ヘルツ工業株式会社製TDI-107LAを用いた。探針(プローブ)には、Digital Instruments社製のCoCr合金被覆シリコン単結晶プローブMESPを用いた。MESPの特性ならびに形状をそれぞれTable 1、Figure 1に示した。

AFMによる表面形状の観察とSPoMによる表面電位の観察は、AFMで観察した部分を続けてSPoMで測定するというインターリーブ・スキャン方式を用いた。この方法を用いれば、表面形状と表面電位の同時観察が可能である。

AFMの測定方法として、探針を試料表面上を断続的に軽く触れることで表面形状を観察する手法を用いた。これは、DI社によってタッピングモード(TM-Mode)と命名されている。探針の加振周波数は、50-100 kHz間にある探針の共振周波数に設定した。探針の加振用のピエゾ素子に印加する交流電圧の振幅は500 mVに設定した。走査速度は、1 Hz/lineに設定した。

SPoMの測定時に探針に直接印加する交流電圧の振幅は、1 Vに設定した。試料-探針間距離は20 nmに設定した。印加交流電

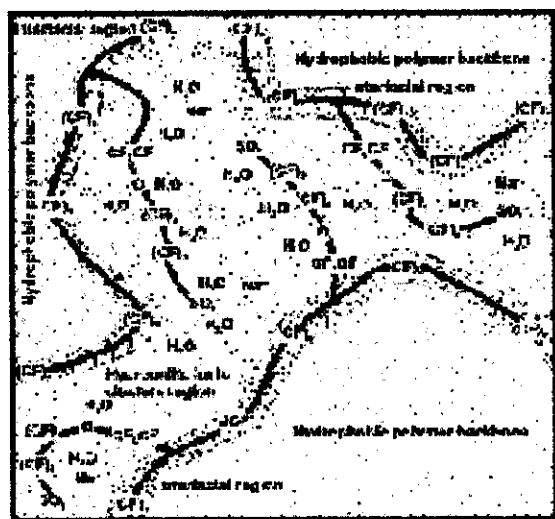


Figure 2 Schematic illustration of Nafion® polymer.

圧の周波数ならびに走査速度はAFMの測定時に用いた値と同じに設定した。

B-3 赤血球膜模擬材料としてのNafion®の作製

イオン交換膜の一種であるNafion®はFigure 2に示したようにミクロに相分離をした構造を有し、その表面には電位状態の異なる部位が存在する。すなわち、マラリアに感染した赤血球表面の状態と類似した表面構造を基本的に有している物質である。そこで、この材料を標準的なサンプルとして用い本研究の目的である液中でのAFMおよびSPoMの測定法の開発を行った。Nafion®膜はそのNafion®溶液をPt上に滴下した後乾燥させるsolution casting法により容易に形成することができる。また、非常に平坦な表面を得ることができるので、本研究の目的に対応した材料である。

B-4 赤血球膜模擬材料としてのアパタイト膜の作製

水酸アパタイトは生体親和性に優れたセラミックスである。そのため、赤血球をAFMならびにSPoMにて実験を行う場合、赤血球を破壊することなく観察するための赤血球固定用基板として使用することができる。また、水酸アパタイトは誘電性を示すことから電氣的に分極するとその表面電位を人為的に制御することのできる材料でもある[9]。そこで、本研究においては、赤血球のその場測定法の開発のためとその基板としての有用性を示すために、分極処理により表面電位を変化させた水酸アパタイトの液中での観察を行うことを試みた。試料はその表面が平坦である必要があるため、薄膜化して使用した。薄膜化にはスパッタリング法を用いて行った。以下に薄膜作製の手順を示す。

水酸アパタイト薄膜はトッキ社製高周波マグネトロンスパッタリング装置を用いて

作製した。水酸アパタイト粉末をスパッタターゲットとし、薄膜を形成する基板にはチタン金属板を用いた。水酸アパタイト薄膜表面の平滑性を制御するため、表面粗さの異なる三種類のチタン金属基板と、スパッタ導入ガスとしてアルゴンと酸素の混合ガスを用いて検討を行った。得られた薄膜試料はX線回折測定法および赤外吸収スペクトル法により水酸アパタイト単相であることを確認した。水酸アパタイトの表面形態は使用するチタン金属の表面粗さとスパッタ雰囲気により変化した。本研究の目的に適した平坦な表面を持つ水酸アパタイトは、平滑なチタン基板を用い、なおかつ酸素ガス雰囲気によるスパッタ蒸着にて得られた。Figure 3に表面粗さの異なるチタン基板上に酸素スパッタにて形成された水酸アパタイト膜のAFMイメージを示す。最も平滑な表面が得られた作製条件にて水酸アパタイトを調製し、次のような分極処理を施した。水酸アパタイトの分極処理はFigure 4に示すような方法にて行った。薄膜試料を金属板で挟み込み、300°Cにて行った。水

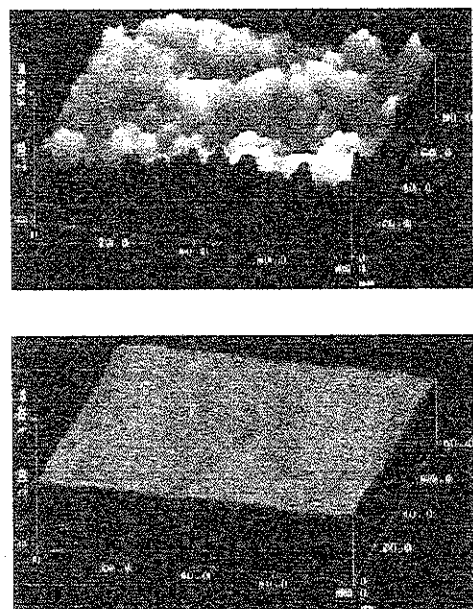


Figure 3 AFM images of hydroxyapatite films onto titanium plates with rough and smooth surfaces.

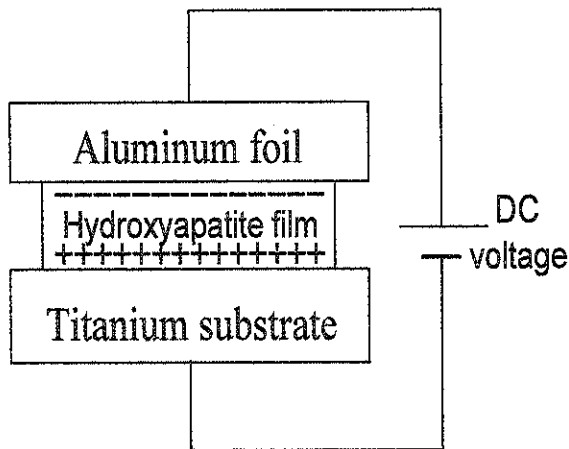


Figure 4 Schematic illustration of electrically poling treatment of hydroxyapatite film.

酸アパタイトに直流電界 5 kV cm^{-1} を1時間印加した後、分極緩和を防ぐため電界を印加した状態で室温まで降温させた。分極処理前後における水酸アパタイト薄膜に対し、大気中ならびに液中でのAFMおよびSPoM測定を実施した。

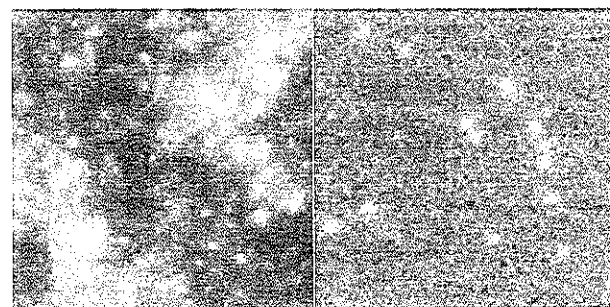
C. 研究結果

C-1 大気下での観察

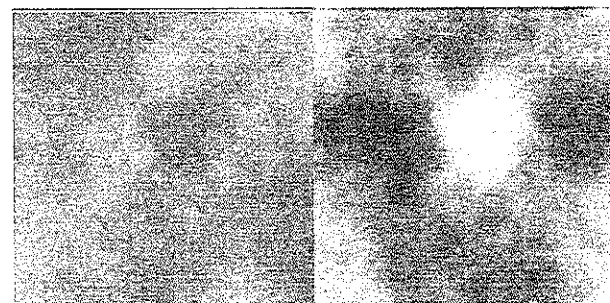
C-1-1 Nafion®表面の観察

Figure 5にPt板上にキャスト法により作製したNafion®のAFMイメージと表面電位分布のイメージを示す。AFMイメージにおいてはポリマー表面の凹凸が観測されている。このイメージだけでは形態に関する情報はあるものの何を観察しているのか判然としない。これに対応して右に示した表面電位図では非常に白い部分と暗い部分に大きく分かれて観察される。左右の図を比較すると形状で高くなっている箇所とそうでない箇所では電位の差を観察することはできない。すなわち、電位の高低と形状の高低は一致していないことが分かる。したがって、電位の測定が形状を反映せず、その電位を反映した結果を与えていることが

As-prepared Nafion® Membrane



5 μm 100 nm 0.05 V



0.3 μm 100 nm 0.05 V

Figure 5 AFM and SPoM images for Nafion® (H^+ form).

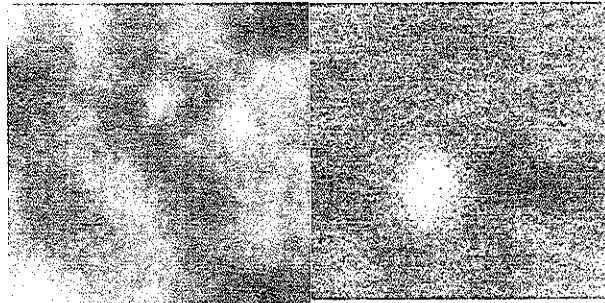
分かる。電位の高い所はより親水的な組成を有する場所であり、イオン交換膜のイオンチャンネルに相当するものと思われる。また、電位の低い場所は疎水的な箇所であり、主にフルオロカーボンから構成されているものと思われる。比較的イオンチャンネルの分布が面内において少ないことがわかる。実際の組成をよく考えてみると、本研究で得られたFigure 5の結果は妥当なものと思われる。

Figure 6はFigure 5のNafion®膜をCsCl溶液に浸漬した後のAFM / SPoMイメージである。電位の高低および形状の高低ともに、 H^+ formのNafion®の結果とよく似ているが、若干ではあるが疎水性部分の大きさや分布の仕方が変化しているように見受けられる。 Cs^+ で H^+ を置換することによりNafion®中のイオンチャンネルが変化した結果と思われる。したがって、電位の高低は明らかにNafion®表面のマイクロ相分離構造を可視化したイメージと考えられる。

Nafion® Membrane Exchanged From H⁺ form to Cs⁺ form



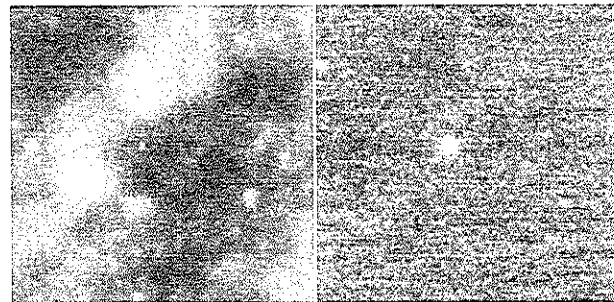
10 μm 100 nm 0.05 V



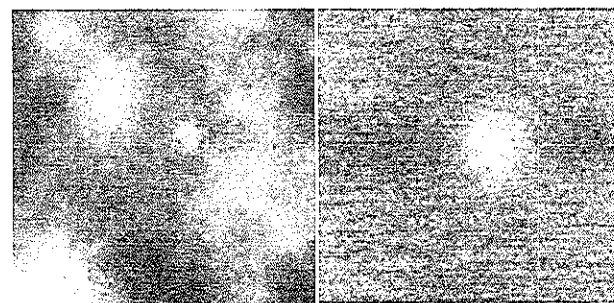
1 μm 50 nm 0.05 V

Figure 6 AFM and SPoM images for Nafion® (Cs⁺ form).

Nafion® Membrane After Vacuum Dry Process



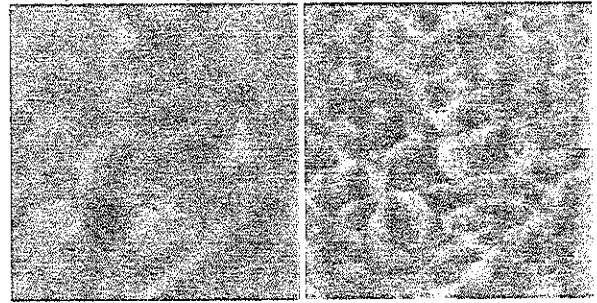
5 μm 200 nm 0.05 V



1 μm 50 nm 0.05 V

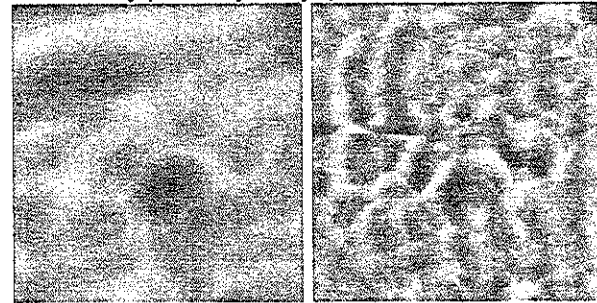
Figure 7 AFM and SPoM images for Nafion® casted under vaccum.

As-sputtered hydroxyapatite film



10 μm, 800 nm, 0.2 V

Electrically poled hydroxyapatite film



10 μm, 800 nm, 0.2 V

Figure 8 AFM and SPoM images of hydroxyapatite films before and after poling treatment.

Figure 7はNafion®をキャストして乾燥する際に減圧乾燥したものである。形状の高低と一致した形で電位の高いところが観察されている。減圧乾燥を行うことにより、親水性部分であるイオン交換部が全体的に突出してきたものと考えられ、その結果として形状と電位の高低とが一致した形で観測されたものと考えられる。

C-1-2 アパタイト表面の観察

Figure 8にチタン板上に高周波マグネトロンスパッタリング法により作製した水酸アパタイト薄膜の分極処理前後における大気中でのAFMイメージと表面電位分布のイメージを示す。分極処理前後での水酸アパタイトのAFMイメージにおいて、その表面形態に大きな違いは見られない。両者ともに粒子と粒界に対応するような形態を有していることが分かる。これは、使用したチタン基板の表面形態を反映したものと考えられる。未分極の水酸アパタイト膜にお

るAFMとSPoMイメージを比べると、表面形態を反映するような電位分布が観察されている。すなわち、粒界部分(凸な部分)において表面電位が他の部分に比べて明るいことが分かる。これに対し、分極処理を施した水酸アパタイト膜の表面電位分布においては、未分極試料に比べ全体的に明るい部分が多くなっていることが観察される。これは、粒界を含めた表面形態の違いによる明暗の差に加えて、粒子の内部においても表面電位に顕著な差が現れている。また、試料の表面電位の分布は膜の形状のみならず、膜の組成の不均一性によっても生じる可能性がある。今回、実験に用いた試料をエネルギー分散型X線アナライザーによる元素マッピングを水酸アパタイトの主成分であるカルシウムとリンについて行った。その結果、それらの元素分布が不均一な箇所は見あたらなかった。以上の結果より、分極処理を施した水酸アパタイトの表面電位分布のイメージは試料表面の電位を反映した結果と考えられる。

C-2 液中での観察

Nafion[®]および水酸アパタイトの両者のサンプルを用いて液中での測定を行ったが、表面電位分布の明瞭な結果を得ることができなかった。そこで、液中でのカンチレバー表面を光学顕微鏡にて観察した結果、カンチレバー表面に気泡の発生が観測された。これより、表面電位を測定する際カンチレバー表面にて電解反応による気泡が生じ、表面電位の測定を妨げることが判明した。また、この実験では大気中で使用される探針を用いて液中での測定を行うために、測定が非常に困難なものとなった。これらの欠点を克服し本研究の最大の目的としている液中での電位分布の観察を行うためには、液中表面形状測定用の探針を使用することが望まれる。しかし、そのような探針

は市販されておらず自作する必要がある。そこで、本研究においては大気中用の探針に金をコーティングすることにより液中にて測定可能な探針を開発することとした。金は他の金属と比較して電気化学的な反応が生じにくい材質であり、これにより液中での気泡の発生を抑制することを試みた。金のコーティングには簡易型DCスパッタリング装置を用いて行った。Figure 9に実際に作製した探針の電子顕微鏡写真を示す。この探針を用いて液中での測定を行ったが、測定中にコーティングした金が剥がれる現象が観測された。これは、カンチレバーの材質とコーティングした金との密着性が低いために生じた現象である。密着性を高めるには、基材となるカンチレバーを加熱した状態で金蒸着を行う必要がある。そこで、予備実験として金を蒸着する前にカンチレバーをあらかじめヒーターで加熱しておき、その直後に金蒸着を実施した。その結果、金コーティングの剥離をある程度防げることができた。密着性をさらに向上させるためには、現在所有しているDCスパッタリング装置のチャンバー内に基板加熱用の装置を自作する必要がある、現在その設計を行っている。金コーティングを施した液中

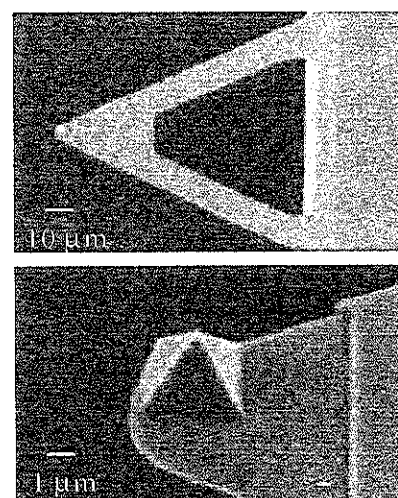


Figure 9 Scanning electron micrograph of the NP-S type cantilever covered with gold.

カンチレバーを用いてAFMおよびSPoMの測定を行ったが、これまでに十分に納得できる結果が得られるまでには至っていない。この原因として金のコーティングを行った場合にも多少の気泡の発生が生じるためと考えられる。この点についてはSPoMの測定条件を詳細に検討することにより解決できるものと考えられる。次年度の研究テーマとして引き続き精力的に検討を行うことが必要である。

D. 結論

原子間力顕微鏡と表面電位測定装置を組み合わせることでイオン交換膜およびアパタイト表面のマイクロ相分離構造や帯電状況を観察することができた。しかし、これらの測定は大気中のものである。もちろんこの方法を用いて湿潤状態の赤血球膜表面の構造を調べることができ、有益な多くの結果が得られている。しかし、本研究課題の最大のポイントは液中での測定である。この点については、液中用カンチレバーへのAuコーティングにより基本的な測定系の構築を行ってきた。現時点では十分な結果が得られていないが、今後測定条件を精密化することで液中での測定を行うことが可能と思われる。

E. 文献

- [1] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930 (1986).
- [2] D. Sarid, *Scanning Force Microscopy*, Oxford Univ. Press (1991).
- [3] R. Wiesendanger, *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy*, Cambridge Univ. Press (1994).
- [4] M. Nonnenmacher, M. O'Boyle, and H. K. Wickramasinghe, *Appl. Phys. Lett.*, **58**, 2921 (1991).
- [5] M. Nonnenmacher, M. O'Boyle, and H. K. Wickramasinghe, *Ultramicroscopy*, **42-44**, 268 (1992).

[6] H. Yokoyama and T. Inoue, *Thin Solid Films*, **242**, 33 (1994).

[7] H. Yokoyama and M.J. Jeffery, *Collids and Surfaes A*, **93**, 359 (1994).

[8] M. Fujihira and H. Kawate, *Thin Solid Films*, **242**, 163 (1994).

[9] K. Yamashita, N. Oikawa, T. Umegaki, *Chem. Mater.*, **8**, 2697-2700 (1996).

F. 研究発表

1. 論文発表

Surface Potential Measurement of Electrically Poled HAp Ceramics

J. Hamagami, K. Kanamura, T. Umegaki, T. Nakagawa, Y. Nakano, M. Aikawa, K. Yamashita *Bioceramics*, **12**, 169-172 (1999).

2. 学会発表

分極誘起アパタイト薄膜の表面キャラクターゼーション

山口剛、濱上寿一、金村聖志、梅垣高士、中野山路、相川正道、山下仁大

日本セラミックス協会第12回秋季シンポジウム (1999年10月).

Surface Potential Measurement of Electrically Poled HAp Ceramics

J. Hamagami, K. Kanamura, T. Umegaki, T. Nakagawa, Y. Nakano, M. Aikawa, K. Yamashita 12th International Symposium on Ceramics in Medicine (1999年10月).

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究

分担研究者 西野武志

京都薬科大学 微生物学教室教授

研究要旨

まずマウスにおけるマラリア感染モデルを作製するために、マラリア原虫 *Plasmodium yoelli* の種々の感染量を、ICR マウスの腹腔内および静脈内に接種し検討した。感染後の死亡率および染色標本による感染赤血球の顕微鏡観察により、*P. yoelli* の感染量に対応した死亡率および感染赤血球が観察され、ICR マウスにおけるマラリア原虫感染モデルを確立することができた。この感染モデルを用いて新規抗マラリア薬の探索研究を行ったが、抗マラリア薬の mefloquine では優れた治療効果が得られたものの、今回検討した新規物質では効果が見られなかった。

A. 研究目的

クロロキン耐性マラリアの出現に伴い、抗マラリア薬単剤の使用では治療に困難を来すことが将来的に予想される。従って、作用機序の異なる新規な抗マラリア薬の必要性および結核の場合と同様、マラリアの治療の場合も2つあるいは3つの薬剤を併用することが必要になってくる可能性が予想されるので、今からその基礎的な研究を行っておく必要がある。

B. 研究方法

多くの新規物質をスクリーニングするためには、手軽に扱うことができるマウスでの感染モデルを作製する必要性があったので、ICR マウスでのマラリア原虫 *P. yoelli* 感染モデルを作製した。本モデルを用いて死亡率および感染赤血球の顕微鏡観察により、作用機序の異なる新規物質のスクリーニングを行った。

（倫理面への配慮）

「動物実験に関する指針」に従い、最少限度の動物を使用した。

C. 研究結果

マラリア原虫 *P. yoelli* を ICR マウスの静脈内および腹腔内に接種し、感染 21 日後までの死亡率および感染赤血球の顕微鏡観察により、マウスにおける感染系を確立でき、また接種量に対応した死亡率が得られることが分かった。本モデルを用いた治療効果の実験では、抗マラリア薬として使用

されている mefloquine では投与量に対応した優れた治療効果がえられたが、キノロン薬の sparfloxacacin, sitafloxacin, マクロライド系の clarithromycin そしてテトラサイクリン系の doxycycline では全く治療効果が観察されなかった。さらに、mefloquine と clarithromycin との協力作用について検討したが、今回の投与量では相乗効果を観察することができなかった。

D. 考察

ICR マウスでのマラリア原虫感染モデルを確立することができたが、治療効果があると報告されている doxycycline で効果を確認することができなかったため、マラリア原虫の接種量や薬物の投与量および回数、また投与時期などについても今後検討する必要がある。

E. 結論

ICR マウスにおけるマラリア原虫 *P. yoelli* 感染モデルを確立することができた。また、本モデルを用いた治療効果で抗マラリア薬の mefloquine は優れた治療効果を示した。

F. 研究発表

論文発表および学会発表は、ともにこの内容のものはナシ

G. 知的所有権の取得状況

ナシ

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

抗マalaria薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究
試験管内における抗マalaria薬の赤血球膜親和性とマalaria原虫侵入抑制効果
分担研究者 伊藤義博
(財) 生産開発科学研究所・細胞活性研究室 主任研究員

研究要旨

試験管内において、dipyridamole のマウス・マalaria原虫増殖抑制効果が示された。また、マウスの赤血球膜に対する dipyridamole の親和性を経口投与、腹腔接種で試験した結果、いずれにおいても dipyridamole の膜親和性が認められた。従って、dipyridamole のマalaria原虫増殖阻止効果が赤血球膜親和性に起因することが示唆された。

A. 研究目的

研究課題“抗マalaria薬の複合投与による相乗効果”判定の為に、試験管内実験を行う。

本研究の目的は、抗マalaria薬の赤血球膜親和性が、マalaria原虫の増殖にどのように関わるかを、試験管内で検討することにある。マウス・マalaria原虫の侵入抑制効果に集約した理由は、実験系の再現性を高めるためであり、均一・単純化しやすいマウス血球とマウス血清による実験系を採用した。更に、動物実験及び原子間力顕微鏡分析との相補性を得るため、試験管内実験系で、両者に有意な関連を築くことは、研究課題の目的達成に不可欠と考えた。この観点から、本研究は、主体をマウス・マalaria原虫とマウス赤血球の試験管内実験系で実施した。

B. 研究方法

1. 材料

マalaria原虫：*Plasmodium yoelii yoellii* 17X株、実験には、感染蚊の sporozoite (孢子虫) を接種した感染マウスの赤血球を常に使用し、この感染マウス赤血球は、常に液体窒素に保存し、凍結融解後、健康マウスに接種、高感染率の血

球を実験に供した。

非感染赤血球：マウス (ICR:Crlj, 約 22g, ♀) の新鮮血液から分離した赤血球を使用した。

In vitro 実験系：培地は、ISCOVE の血球用培養液 (0.01% hypoxanthine: Sigma Co.) に、10% マウス血清 (ICR マウス由来) を添加した。赤血球の培養は *Plasmodium falciparum* の方法に準じた¹⁾。抗マalaria薬の膜親和性、及び感染実験は、CO₂ 恒温槽 (気相条件、N₂:O₂:CO₂=90%:5%:5%) で行った。

2. 方法

1) 赤血球膜親和性薬物の分析

赤血球の分離：薬物処理赤血球を Alsver 氏液で 1 回遠心 (700xg, 15min, 10℃) 洗浄、生理的リン酸緩衝で同様に 1 回遠心洗浄後、CF11 (Whatman Co.) を通して白血球を除去した。次いで、分離赤血球を低浸透圧で破壊し、上清にヘモグロビンが検出しなくなるまで、遠心 (1,840xg, 15min, 4℃) 洗浄し、湿潤重量及び湿潤重量当たりのタンパク質量を測定した。

2) 膜親和性薬物の分析：高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、次の条件で分析した。

HPLC 分析の条件： Column : Lichrosorb RP-18 (5 μ g), Eluting solvent; MeOH : 0.1M sodium acetate (pH 4) = 75 : 25, Flow rate : 0.3 ml/min, Detection : UV 280 nm

C. 研究結果

ヒト赤血球とヒト熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の *in vitro* 系ですでに安定した結果の得られた dipyrindamole を膜親和性抗マラリア薬候補として、マウス・マラリアの試験管内実験を行った。

1. 試験管内における dipyrindamole の増殖抑制効果は、図-1 に示すごとく、10mM 以上で顕著に、1mM 以下では傾向のみ示した。《図-1》
2. 投与薬物が体内の送達システム(DDS)の影響を受ける。これは、動物実験と試験管内実験の間にある関門と考えられた。そこで、膜親和性と増殖阻止の関係を明確にするために、投与マウスの赤血球膜に対する dipyrindamole の親和性を試験した。その結果、図-2 に示すように経口投与、腹腔接種のいずれもが HPLC 分析で証明された。《図-2》

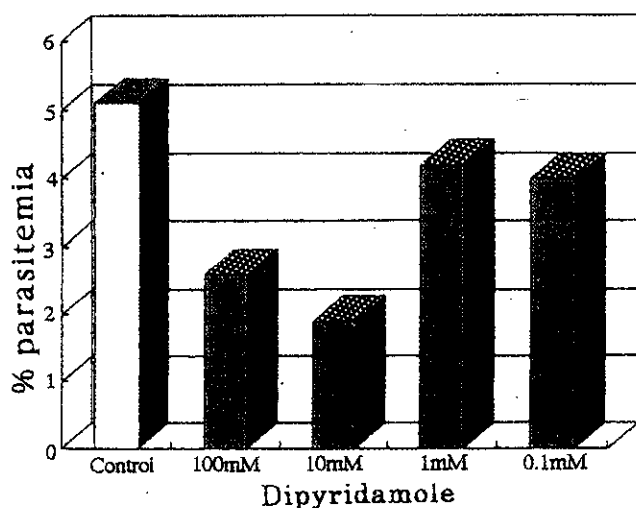
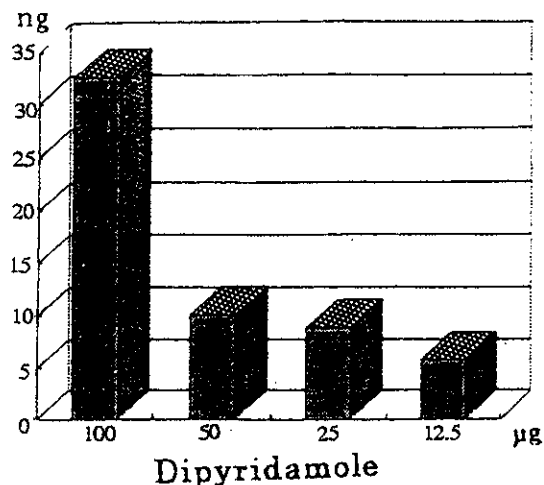
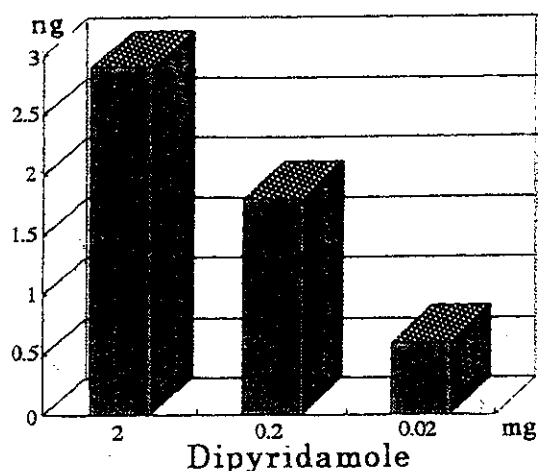


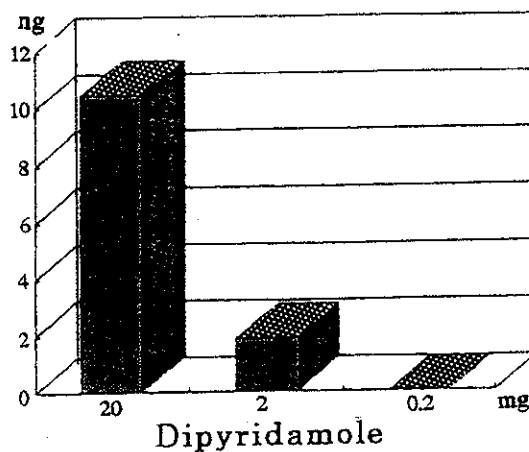
図-1. *in vitro* における dipyrindamole の赤血球内増殖抑制効果



A. 12 hr. incubation (*in vitro*)



B. per os administration (*in vivo*)



C. i. p. injection (*in vivo*)

図-2. 赤血球膜に対する dipyrindamole の親和性 (膜分画の dipyrindamole 量 : HPLC 分析)

D. 考察および結論

Dipyridamole および dilazep は、虚血性心疾患の治療薬として既に市販されており、副作用の少ない薬物として知られている。別に両薬物は、マラリア原虫に対して nucleoside transform system に働いて弱いながらも抗マラリア作用を持つことも報告^{2, 3)} されている。われわれの先の報告で、dipyridamole および dilazep が試験管内で増殖抑制を示し、この作用点が赤血球膜親和性により原虫の赤血球内侵入を抑制する成績^{4, 5)} を示した。即ち、dipyridamole および dilazep と直接的殺原虫作用の従来の薬物とを複合投与する事により、副作用の少ない長期に安定して投与できる薬物の候補の一つであると考えられた。

また、抗赤血球膜抗体は dipyridamole の膜親和性を阻害する成績を得ているので（未発表）、膜親和性薬物と増殖阻害との相関・相補性については dipyridamole と dilazep に限定されることなく、膜親和性を持つ多くの薬物が対象となる。従って作用点を異にする薬物の複合投与の「コンセプト」はマラリア治療法の新しい展開になると考えている。

E. 参考文献

- 1) Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) : Human malaria parasites in continuous culture, *Science*, 103: 673-675.
- 2) Gero, A.M. et al. (1988) : Stage specific alternation of nucleoside membrane permeability and nitrobenzylethioinosine insensitivity in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 27: 159-170.
- 3) Gero, A.M. et al. (1990) : Purines and pyrimidines in malaria parasites. *Blood Cell*, 16: 476-484.
- 4) 伊藤義博, 相川正道 (1992) : 熱帯熱マラリア

原虫の赤血球侵入に対する dilazep および dipyridamole の *in vitro* 抑制効果、*Clinical Parasitology*, 3: 41-44.

- 5) 伊藤義博, 他 (1996) : Dipyridamole の赤血球膜親和性と熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 赤血球侵入阻止効果関係, *寄生虫誌*, 45. Supl: 106.