

200/0925

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13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 相川 正道

平成14(2002)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する基礎研究	1
相川正道	
II 分担研究	
1. ジピリダモールの熱帯熱マラリア原虫発育に対する効果	6
相川正道、伊藤義博	
2. 赤血球膜へのジピリダモール吸着機構の開明	9
金村聖志	
3. 抗 Dipyridamole ウサギ抗体の作成と血清抗体価	13
西野武志、伊藤義博、大友弘志、相川正道	
4. 試験管内における抗マラリア薬の研究	
Dipyridamole のサル赤血球膜に対する親和性	15
伊藤義博、大友弘志、相川正道、川合 覚	
5. サルにおけるジピリダモール動態の検討	17
大友弘志、相川正道、川合 覚	
6. サルにおけるジピリダモールの抗マラリア効果の検討	19
大友弘志、相川正道、川合 覚	
7. 抗マラリア薬複合投与の遺伝薬理学的研究	21
金子 明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
IV. 研究成果の刊行物別刷	27

厚生科学研究補助金（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

熱帯熱マalaria原虫培養系での検討から、バンド3のインヒビターである DP が赤血球表層上に存在するバンド3に結合して赤血球膜構造に変化を起こす結果、赤血球侵入型原虫メロゾイトの侵入が阻止されるのみならず、DPがバンド3に結合した赤血球内では原虫の正常な発育が阻害されたと考えられた。また、DPが細胞膜の脂質に結合する結果、メロゾイトおよび赤血球の膜表層のなんらかの変化が起り、メロゾイトの侵入ないし赤内型原虫の発達に影響を与える可能性が考えられた。実際、DP処理されたメロゾイト侵入部位の荷電に変化が認められた。DPとCQ同時投与による相乗効果の可能性が示された。一方、マウスではDPの抗マalaria効果が再確認されたが、サルでは明確な効果は認められなかった。その原因として、DPは速やかに血中に現れ、速やかに消滅することに起因すると考えられた。現在、サルに対して投与方法を改善してDPとメフロキンの同時投与を検討中である。また、フィールドワークによるワクチン候補ならびにCQ耐性の薬理遺伝学研究からマalaria制圧には、自然環境ならびにマalaria治療政策などの人為的環境を考慮する必要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・財団法人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
研究協力者
川合 覚・独協医科大学・講師

A. 研究目的

近年、マalariaが地球レベルで再燃している。マalaria再燃の原因として、地球規模の環境破壊、地球温暖化、政治的・経済的理由による難民の増加のが考えられる。しかし、クロロキン(CQ)を始めとする抗マalaria薬を治療に加えて予防的に使用した結果、多くの抗マalaria

薬耐性株が出現したことがマalaria再燃の最犬原因と考えられる。従って、抗マalaria薬の投与方法の改善が望まれる。この現状を鑑がみ、本研究は作用点の異なる2種類の薬を組み合わせ、その相乗効果によるマalaria治療効果の改善ならびに副作用等の患者における負担の軽減をめざすものである。

作用点の異なる2種類の薬を組み合わせによるマalaria治療効果の改善に関する研究は従来からいくつかなされてきたが、本研究事業の特色としてマalaria原虫を直接殺傷することを目的とせず、赤血球侵入を阻止することを目的とする薬と従来の抗マalaria薬を組み合わせることである。また、原虫の赤血球侵入過程に荷電が大きな役割を果たすことが判

明したので、侵入阻止薬使用時の赤血球膜ならびに赤血球侵入型細胞メロゾイト表層の荷電変化の検討に原子間力顕微鏡を導入する。また、プログアニル (PG) は体内でシクログアニル (CG) に変換されて、抗マラリア活性が発現される。バヌアツにおける遺伝薬理学研究から民族により遺伝的素因として PG から CG への変換酵素の強弱があることが判明したので、複合投与をより効率的に行うために、マラリア流行地住民の遺伝的素因を考慮した研究をも取り入れた。

昨年度までの研究結果から、ジピリダモール (DP) は熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の培養系で原虫の増殖を抑制することが判明した。その作用機序は主として赤血球膜に結合し、その結果原虫の赤血球侵入を阻害すると考えられた。マウス重症マラリアモデルにおいて DP がマラリア感染マウスの生存率を高める効果があることが認められた。DP 結合赤血球表層の構造変化は AFM により認められ、その理論的検討が生体物質モデル系で明らかになった。

以上の結果を踏まえて、本年度はマウスにおける DP の抗マラリア効果を再確認し、マウスよりヒトに近いニッポンザルに対する DP の抗マラリア効果を獨協大学の川合覚博士の協力を得て各分担研究者が共同で調べる。また、DP の作用機序を明らかにするために、熱帯熱マラリア原虫培養系における赤血球内原虫の各ステージに対する DP の効果を同調培養法を用いて調べる。また、ヒトおよびサル赤血球を用いて DP の抗マラリア効果の作用機構を検討する。

また、PG から CG への変換酵素の強弱があることが判明した。今年度は、複合投与をより効率的に行うために、マラリア流行地における原虫遺伝子の遺伝薬理研究を行った。

B. 研究方法

熱帯熱マラリア原虫培養系：*P. falciparum* Indochina 1 を同調培養し、各ステージの原虫に対する効果を調べた。マウス実験系：BL/6N マウス (7 週齢、メス) に *Plasmodium berghei* ANKA を感染させた。DP は市販品 (ペルサンチン) を用いて静脈注射による投与を行った。

サル実験系：Macaca 属のサル (ニッポンザル) 3 歳齢、メス体重 2.5-3.5kg を用い、ペルサンチンを上腕静脈内に投与した。感染実験では *Plasmodium coatneyi* を感染させた。

抗 DP 抗体作成：ウサギを用いて DP 抗体を作成し、血清から γ -グロブリンの分画を行った。

DP 量測定：血中および赤血球膜をメタノール処理により DP 画分を分離し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した。

電子顕微鏡：透過型電子顕微鏡 (JOEL TEM-1200EX II) により観察した。

原子間力顕微鏡：デジタルインスツルメント社のタッピング型バイオスコープないしセイコーインスツルメント社製の接触型原子間力顕微鏡を用いた。

PG の遺伝薬理学研究：バヌアツを始めとするマラリア流行地における原虫の遺伝的解析を行った。

(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い、最小限の動物を使用する。

また、バヌアツで行う調査研究はバヌアツ保険省の許可を得ており、さらに調査地域の担当者の協力を得て、調査の主旨、安全性を十二分に説明して理解を得、被験者の同意を得た (被験者が子供の場合は保護者の同意を得た)。

C. 研究結果

1. DP に関する研究

熱帯熱マラリア原虫培養系における DP と CQ 投与の原虫ステージに対する効果 (相川、伊藤): DP は 30nM、CQ は 97nM で原虫の生育を 50% 阻害した。また、0.1nM DP 存在下では 14nM CQ で生育を 50% 阻害した。DP は、赤内型原虫の各ステージ (リング、トロポゾイト、シゾン) の発育を阻害した。電子顕微鏡によりトロポゾイトおよびシゾンステージでは DP 処理により pigment vacuole の増加・肥大化が認められた。同調培養して分離したメロゾイトを DP 処理した赤血球に加えて培養をした結果、感染率ならびに正常な発育ステージの変化を阻害された。また、原子間力顕微鏡によりメロゾイト侵入部位の陽性荷電が消失が認められた。

赤血球膜への DP 吸着機構の解明 (金村): 接触型原子間力顕微鏡により 100 μ M DP 処理赤血球膜では、DP は膜表層の 3-4 割を覆い、ほぼ単分子で吸着していた。

抗 DP ウサギ抗体作成と血清抗体価 (西野、伊藤、相川): 精製する事により、 γ -グロブリンの抗体価は 5000 倍以上上がった。

ニッポンザル赤血球膜結合 DP 濃度 (伊藤、川合、相川): 1、10、100 μ M DP で処理したサル赤血球膜結合 DP 量は、それぞれ 37.5、49.2、90.5ng/mg protein で、DP 処理濃度に依存していた。

ニッポンザルにおける DP 動態 (大友、相川、川合): 投与後 30 分で DP は濃度血清および赤血球結合量とも最高値で、その後時間の経過とともに速やかに減少した。

ニッポンザルにおける DP の抗マラリア効果 (大友、相川、川合): 無投与群の感染率は感染後、11-12 日目に最高値に達し、また投与群での感染率は 14 日後に

最高値に達した。しかし、1-2 日の感染の遅れは無投与群でもしばしば認められ、この差は有意ではなかった。マラリアの症状については両群間に明確な差は認められなかった。

2. 遺伝薬理学的研究 (金子)

MSP-1 多型解析: ヴァヌアツ 4 島嶼における MSP-1 多型解析の結果は、この地域におけるリコンビネーションが極めて限られていることを示した。この結果は MSP-1 多型発生のメカニズムに新たな知見を加えるとともに、ワクチンによるマラリア制圧戦略に密接にかかわるものである。

CQ 耐性: 耐性原虫の増加 (47%) により CQ 投与が 1993 年以降中止されているマラウイで 1998、2000 年 in vitro 薬剤耐性試験を行った熱帯熱マラリア原虫における pfmdr1(N86Y)、pfert(K76T) 変異について検討した。96 例中 CQ 耐性 (CQR) 原虫は 9%、pfmdr1 変異 48%、pfert 変異 7% であった。両変異と CQR との関連は見られなかったが、pfert 変異率は CQ を常用している他のアフリカ諸国より有意に低かった。これよりマラウイにおける CQ 薬剤圧の減少が pfert 変異原虫を減少させ当地における CQ 感受性をもたらしたものと考えられるが、CQR 獲得には他の遺伝子多型が必要であることも推察された。

D. 考察

1. DP の抗マラリア効果

熱帯熱マラリア原虫培養系での検討結果から、バンド 3 のインヒビターである DP が赤血球表層上に存在するバンド 3 に結合して赤血球膜構造に変化が起す結果、メロゾイトの侵入が阻止され、また DP がバンド 3 に結合した赤血球内では原虫の正常な発育が阻害されたと考えられた。一方、DP は細胞膜を構成す

る脂質と結合するので、DPが細胞膜に結合する結果、メロゾイトおよび赤血球の膜表層のなんらかの変化が起り、メロゾイトの侵入ないし赤内型原虫の発達に影響を与える可能性が考えられた。実際、侵入に必要と考えられている侵入部位の陽性荷電がDP処理されたメロゾイトでは消失していた。また、DPの抗酸化作用も抗マラリア効果に関連する可能性がある。一方、当アッセイ系ではDP0.1nMでは30%阻害し、CQ14nMでは5%阻害し、両薬を同時投与することにより50%の阻害効果を示した。この結果は同時投与による相乗効果が期待される。

マウスではDPの抗マラリア効果が再確認されたが、サルを用いた実験では明確なDPの抗マラリア効果は認められなかった。その原因として、サルではDPは速やかに血中に現れ、速やかに消滅することに起因すると考えられた。この点を改善するためには、投与方法を改善する必要があると考えられる。投与回数を増やさないし徐放性カプセルによる経口投与の方法が考えられる。

2. 遺伝薬理学的研究

ヴァヌアツにおけるMSP-1多型解析の結果は、この地域におけるリコンビネーションが極めて限られていることを示す。またMSP-1におけるリコンビネーションの頻度はマラリア流行度のみでなく、その地域に存在するMSP-1遺伝子の頻度にも影響されることを示唆する。MSP-1は有力なワクチン候補であるが、原虫株間で抗原性に著しい違いを示す。またそのハプロタイプの頻度分布には地理的差異がある。今回の研究はMSP-1多型発生のメカニズムに新たな知見を加えるとともに、ワクチンによるマラリア制圧戦略に密接にかかわるものである。

マラウイにおけるCQR分子マーカーの解析は当地におけるCQ薬剤圧の減少が

pfprt変異原虫を減少させ当地におけるCQ感受性をもたらしたものと考えられるが、CQR獲得には他の遺伝子多型が必要であることも推察された。低CQ薬剤圧下においてはPfprt-K76T変異を維持するのはcostlyであるのに対して、Pfmdr1-N86Yはno costで維持されると考えられる。強い薬剤圧下においては、耐性に寄与するcostlyおよびnon-costlyな変異は両方とも選択されると考えられる。薬剤圧減少下において（完全には消えない）、前者が選択されないのに対して後者は残るであろう。

E. 結論

1. DPの抗マラリア効果

熱帯熱マラリア原虫培養系の実験結果から、DPは赤血球表層およびメロゾイト表層に結合して、メロゾイトの赤血球への侵入を押さえると同時に、赤内型原虫の正常な発育を抑制すると考えられた。また、DPはCQと同時投与することにより相乗効果が認められた。マウスにおいては、DPの抗マラリア（延命）効果が再確認されたが、サルを用いた抗マラリア効果は明確には認められなかった。サルにする際の投与方法を改善する必要がある。

2. 原虫遺伝子の研究

島嶼等の自然環境やマラリア治療政策等の人為的環境がマラリア原虫集団の様々な遺伝子変異分布に影響を及ぼしており、マラリア制圧戦略においてはこれらの要因を考慮する必要があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Akaki M, Nagayasu E, Nakano Y, Aikawa M. Surface charge of *Plasmodium falciparum* merozoites as revealed by atomic force microscopy

with surface potential scopy. Parasitol Res, 2002: 88; 16-20.

Akaki M, Nakano Y, Itoh Y, Nagayasu E, Aikawa M. Effects of dipyrindamole on Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Parasitol Res (投稿中). Hamagami J, Yamaguchi G, Kanamura K, Umegami T. IN SITU OBSERVATION OF APPATITE FORMATION ON BIOGLASS. Key Eng Matel.2002: 218-220; 279-282.

金村聖志, 表面 2002 : 39 : 433-442.

Sakihama N, Mitamura T, Kaneko A, Horii T, Tanabe K. Long PCR amplification of Plasmodium falciparum DNA extracted from filter paper blots. Exp Parasitol 2001; 97: 50-54.

Sakihama N, Kaneko A, Hattori T, Tanabe K. Limited recombination events in merozoite surface protein-1 alleles of *Plasmodium falciparum* on islands. Gene 2001; 279 : 41-48.

Bwijo B, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Lum J K, Kobayakawa T. Findings of decreased chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates of Malawi. Clinical Parasitology 2001; 12: 145-147.

美田敏宏, 金子 明, Bwijo A, 塚原高広, 小早川隆敏, 武地美保. Malawi における熱帯熱マラリア原虫クロロキン耐性遺伝子 *Pfcrt* および *Pfmdr1* 多型の検討. Clinical Parasitology 2001; 12: 148-150.

2.学会発表

相川、伊藤他、「イン・ビトロおよびイン・ビボにおけるジイピリダモールの抗マラリア効果の検討」、第42回日本熱帯医学大会（東京）、平成13年9月26日。

G 知的所有権の取得状況

ナシ

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ジピリダモールの熱帯熱マラリア原虫発育に対する効果

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）

分担研究者 伊藤義博（財団法人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

同調培養を用いた熱帯熱マラリア原虫培養系で、ジピリダモール（DP）の作用機序を検討した。DPは赤血球侵入型細胞メロゾイトの侵入を抑制するのみではなく、赤内型原虫の各ステージ（リング、トロポゾイト、シゾン）の発育を阻害した。DP処理により赤血球侵入に必要なと考えられるメロゾイト侵入部位の陽性荷電が消失し、またトロポゾイトおよびシゾンでは pigment vacuole の増加・肥大化が認められた。同アッセイ系は従来のアッセイ系より感受性が高く、DPは30nM、クロロキン（CQ）は97nMで原虫の生育を50%阻害した。また、0.1nM DP存在下では14nM CQで生育を50%阻害し、相乗効果が生じる可能性が認められた。

A. 研究目的

昨年度までの研究結果から、熱帯熱マラリア原虫培養およびマウス重症マラリアモデルでジピリダモール（DP）に抗マラリア効果が認められた。DPが赤血球膜に結合することから、赤血球膜表層のバンド3や脂質に結合することによる赤血球侵入型細胞メロゾイトの侵入抑制に起因して抗マラリア効果が生じると考えられた。しかし、赤内型原虫の各ステージ（リング、トロポゾイト、シゾン）に対する効果は不明であった。従って、同調培養を用いた系で熱帯熱マラリア原虫の発達のどのステージでDPが作用するかを明らかにする目的で実験を行った。

B. 実験方法

マラリア原虫培養：熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum* Indochina 1）をTrager&Jensenの方法（*Science*, 193, 673-675, 1976）に従って培養した。DP単独の抗マラリア効果ならびにクロロキン（CQ）との相乗効果：5%ソルビトールを添加して同調培養し、リングステージが1.4%に達した時点で、培養を開始し24時間後に感染率を調べた。

赤内型原虫の各ステージに対する効果：マラリア原虫を同調培養し、リング初期、リング後期、トロポゾイト、シゾン直前の各ステージの感染赤血球をDP50 μ M存在下で培養し、1、12、24時間後の発達状態を調べた。

メロゾイトの赤血球侵入に対する効果：同調培養より70%パーコールにより後期トロポゾイトおよびシゾンを分離し、50 μ MDPで37 $^{\circ}$ C、20分処理した赤血球に加えて4、12時間後の発達状態を調べた。

微細構造の検討：感染赤血球に対する影響は透過型電子顕微鏡（JOEL TEM-1200EX II）により観察し、メロゾイト表層荷電に対する影響は同調培養より70%パーコールにより分離したメロゾイトを5 μ MDPで37 $^{\circ}$ C、20分処理後、原子間力顕微鏡システム（Digital Instrument BioScope IIIa）で分析した。

C. 実験結果

DIP単独の抗マラリア効果ならびにCQとの相乗効果：同調培養を導入した本アッセイ系では、DPは30nM、CQは97nMで原虫の生育を50%阻害した。また、0.1nMのDIP存在下では14nM CQで生育を50%阻害した（図-1）。

赤内型原虫の各ステージに対する効果；DIPは、赤内型原虫の各ステージ（リング、トロポゾイト、シゾン）からの発育を阻害した（図—2）。電子顕微鏡によりトロポゾイトおよびシゾンステージでは DP 処理により pigment vacuole の増加・肥大化が認められた。

メロゾイトの赤血球侵入に対する効果：4、12時間後ともに感染率ならびに正常なステージの変化を阻害した。また、原子間力顕微鏡によりメロゾイト侵入部位の陽性荷電が消失が認められた（図—3）。

D.考察

心筋保護、冠動脈副血行促進、冠循環改善等を目的として使用されている DP の薬理作用はヌクレオシドトランスポーター(ENT)ならびに cGMP 阻害に起因と考えられる。DP はヒトの ENT を阻害するが、原虫の ENT は阻害しない。一方、バンド 3 (anion exchanger 1)は、102KDa で、一赤血球細胞当たり 1.2×10^6 分子存在し、赤血球表層タンパク質の 25% を占める。DP はバンド 3 ダイマー当たり一分子の DP が結合してその活性を阻害すると報告されている。また、バンド 3 はメロゾイトの赤血球侵入過程に関与するという報告がある。従って、DP が赤血球膜上のバンド 3 に結合して赤血球膜構造にの変化が起る結果、メロゾイトの侵入が阻止され、また DP がバンド 3 に結合した赤血球内では原虫の正常な発育が阻害されたと考えられる。一方、細胞膜を構成する脂質と結合することが報告されている。従って、DP が細胞膜に結合する結果、メロゾイトおよび赤血球の膜表層に変化が起り、メロゾイトの侵入ないし赤内型原虫の発達に影響を与える可能性が考えられる。実際、DP 処理されたメロゾイト侵入部位の荷電に変化が認められた。

DP は、抗酸化作用を有する。赤内型マラリア

原虫はタンパク質合成のため、ヘモグロビンを代謝する。その過程で、原虫 food vacuole ではオキシヘモグロビンからメトヘモグロビンへの酸化が起る。DP はこの酸化過程を阻害して原虫の生育が抑制される可能性がある。同調培養を導入した 24 時間アッセイ系では、従来の 72 時間非同調アッセイ系よりも DP に対する感度が高かった。DP0.1nM では 30% 阻害し、CQ14nM では 5% 阻害したが、両薬の同時投与することにより 50% の阻害効果を示した。この結果から、同時投与することにより相乗作用が生まれた可能性があると考えられた。

E.結論

DP は赤血球表層およびメロゾイト表層に結合して抗マラリア効果を発現する。メロゾイトの赤血球への侵入を押さえると同時に、赤内型原虫の正常な発育を抑制すると考えられる。抗マラリア薬である CQ と同時投与することにより相乗効果が認められた。

1.発表論文

Akaki M, Nagayasu E, Nakano Y, Aikawa M. Surface charge of Plasmodium falciparum merozoites as revealed by atomic force microscopy. Parasitol Res 2002, 88: 16-20.

Akaki M, Nakano Y, Itoh Y, Nagayasu E, Aikawa M. Effects of dipyridamole on Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Parasitol Res (投稿中).

2.学会発表

相川他、「イン・ビトロおよびイン・ビボにおけるチピリダモールの抗マラリア効果の検討」、第42回日本熱帯医学大会（東京）、平成13年9月26日。

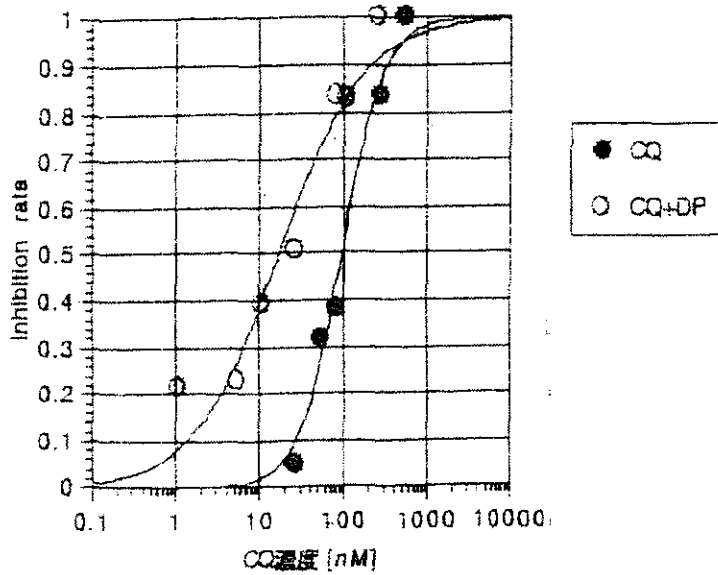


Fig. 1 Effects of chloroquine with or without dipyridamole (0.1 μ M) against the chloroquine-resistant Indochina 1 strain of *P. falciparum*. The effect of chloroquine with dipyridamole is indicated by open circles, and the effect of chloroquine alone by solid circles.

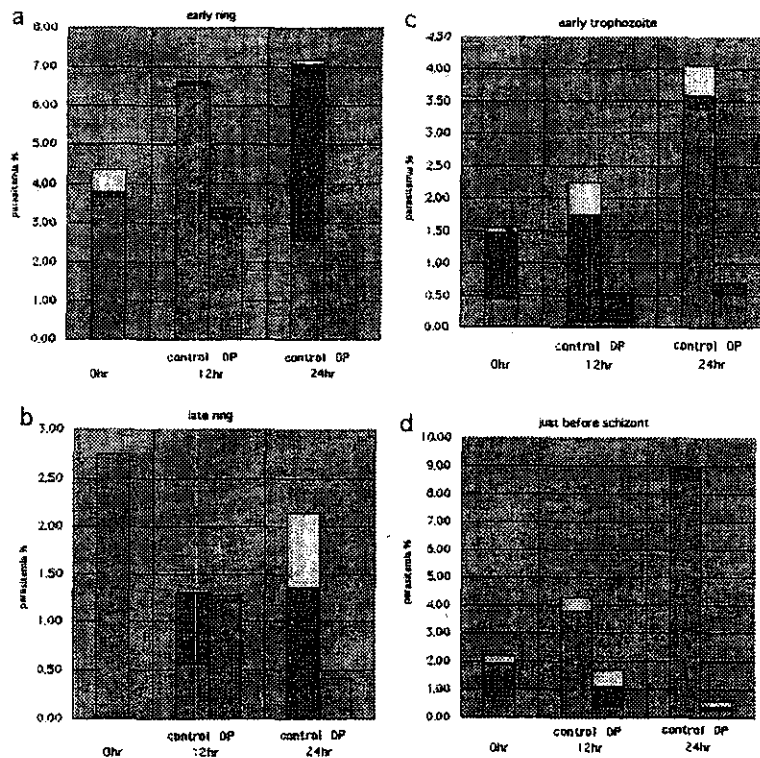


Fig. 2 Parasitemia after 12 and 24hr-exposure to dipyridamole (DP) during (a) the early ring stage (b) the late ring stage (c) the early trophozoite stage (d) the stage just before schizogony. Gray indicates rings, black trophozoites, and white schizonts.

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 金村 聖志 東京都立大学大学院工学研究科助教授

研究要旨

Dipyridamole 投与による赤血球表面の変化を原子間力顕微鏡により表面形状を測定し、Dipyridamole の抗マラリア薬としての特性を評価する。 $100 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $50 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の濃度の Dipyridamole で実験を行った結果、いずれも赤血球表面に Dipyridamole がほぼ単分子で吸着した。吸着面積は Dipyridamole の濃度に依存し $100 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ では赤血球表面の 3 割から 4 割を覆っていた。感染赤血球においても、このように赤血球表面に Dipyridamole が吸着し、そしてマラリア原虫の移動を抑制したり赤血球の凝集を防ぎ血液の流れを円滑にする働きがあることが考えられる。これらのことより Dipyridamole の抗マラリア特性が示唆された。

A. 研究目的

マラリアに感染した赤血球表面の状態について、原子間力顕微鏡および表面電位顕微鏡を用いて研究を行ない、その表面電荷の変化について検討を行ってきた。薬剤の効果を調べることを目的として研究を行ない、ジピリダモールを添加することにより感染赤血球の電荷が反転し正常赤血球と同じ状態に変化することを見出した。そのことはジピリダモールの効果の一つであると考えられた。しかし、その時点ではジピリダモールの赤血球表面に対する親和性については全く知見を持っていなかったため、本年度は、赤血球とジピリダモール分子間の相互作用について、特に吸着状態に関する分子オーダーの研究を行なうことを目的とした。ジピリダモールの吸着形態、たとえば単分子吸着なのか多分子吸着なのかといった点は、この試薬の有効性を評価する上で非常に重要であり、その点を原子間力

顕微鏡観察により評価した。以下に、その結果を記す。

B. 実験方法

感染していない正常な赤血球に Dipyridamole の濃度を変えて処理しその表面の原子間力顕微鏡観察を行った。実験に使用した赤血球は人から血液を 1 滴採取し、生理食塩水によって $2 \times 10^3 \text{ L}$ に薄め、それを更に遠心分離することによって得た。得られた赤血球は生理食塩水で分散、そして遠心分離することにより洗浄した。この洗浄は 3 度行った。この洗浄した赤血球を生理食塩水で $1 \times 10^3 \text{ L}$ に薄めた(この溶液を赤血球溶液とする)。薬剤の調整は次のように行った。Dimethyl sulfoxide に Dipyridamole を 0.2 mol dm^{-3} , または 0.1 mol dm^{-3} になるように加え、十分に溶解させた。調整した薬剤を赤血球溶液 $1 \times 10^3 \text{ L}$ に $5 \times 10^{-7} \text{ L}$ 加えた。調整した薬剤は紫外可視吸収スペクト

ル測定により、温度、そして光に対して不安定なことが確認されたので、調整後迅速に使用するようにした。この結果、赤血球溶液中の Dipyridamole の濃度は $100 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $50 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ であり、Dimethyl sulfoxide の濃度は 0.05 vol% 含むことになる。この薬剤処理を室温(約 22°C)で 30 分間行った後、遠心分離により赤血球を濃縮した。そしてその赤血球濃縮溶液を ITO ガラス上にピペットにより滴下し、乾燥後、原子間力顕微鏡により測定を行った。比較として薬剤処理を行っていない試料に対しても同様の測定を行った。測定は湿潤状態を保つためにできるかぎり短時間で行った。原子間力顕微鏡には、セイコーインスツルメンツ社製の SPI3800N シリーズの DFM モードを使用した。なお、カンチレバーには Si 製のマイクロカンチレバー SI-DF20(バネ定数: 15 N/m , 共振周波数: 132 KHz)を用いた。測定は室温、大気雰囲気下で行った。

C. 結果と考察

Fig.1 に標準試料として薬剤処理を行っていない赤血球の表面形状図を示す。Fig.1(a)により円盤状の赤血球が確認された。赤血球周辺に確認される数 μm の物質が血液中の不純物、もしくは生理食塩水に含まれるイオンが塩として析出したものと考えられる。Fig.1(b)より、(a)で観察された赤血球は 1.6 nm 以下という極めて平坦な表面構造をもっていることがわかった。

次に Fig.2 に $100 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の Dipyridamole にて処理を行った赤血球の表面形状図を示す。Fig.2(a)に示すような巨視的な観察では標準試料である薬剤未処理の赤血球と比較して大きな変化は見られな

かった。しかし、Fig.2(b)に示すように $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$ の拡大図においては平坦な赤血球表面上にまだら状に物体が析出しているのが確認された。薬剤処理を行っていない赤血球ではこのような物質が観察されないもので、この物質は赤血球表面に吸着析出した Dipyridamole と考えられる。

Fig.3 に $50 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の Dipyridamole にて処理を行った赤血球の表面形状図を示す。Fig.3(a)において標準試料である薬剤未処理の赤血球とほぼ同様の円盤状の赤血球が確認された。Fig.3(b)から、Fig.2(b)で観察された Dipyridamole の赤血球に対する被覆面積が小さくなっているのが観察された。赤血球表面膜が荒くなっているのは測定時に赤血球表面が若干乾燥したためと思われる。

これらの結果より、赤血球表面に吸着する Dipyridamole は溶媒中の濃度に依存することがわかった。吸着の仕方としては、測定された高さの情報から Dipyridamole が単分子から数分子の層によって赤血球の表面に吸着していることが分かった。この吸着は感染赤血球でもほぼ同様なことが言えると考えられる。この吸着によりマラリア原虫の赤血球内外への移動を抑制し、また血管中での凝集を防ぎ、血液の流れを円滑にする働きがあると考えられる。また被覆量は $100 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の Dipyridamole で赤血球表面の 3 割から 4 割に及んでおり、おおよそこの濃度があれば、表面構造的な観点からは十分であると考えられる。現段階では測定することはできていないが、Dipyridamole の吸着点が、赤血球表面膜の分子構造の位置と関連していることを見出せるならば、より低濃度の Dipyridamole で

もマラリア原虫の赤血球内外への移動を抑制することが可能であると考えられる。

E. 結論

原子間力顕微鏡によって Dipyridamole が赤血球に対してほぼ単分子的に吸着してい

ることがわかった。このときの吸着量は溶媒中の Dipyridamole の濃度に依存していた。この吸着がマラリア原虫の活動を抑制すると思われるため、Dipyridamole は抗マラリア薬として効果があることが示唆された。

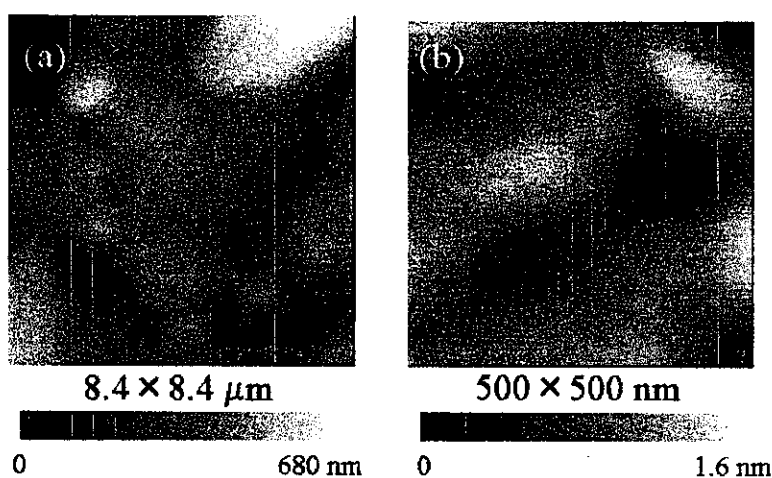


Fig.1 薬剤処理を行っていない正常赤血球。(a)円盤状赤血球が確認された。(b)500×500 nmの拡大図。起伏が1.6 nm以内で表面膜の平坦さが確認された。

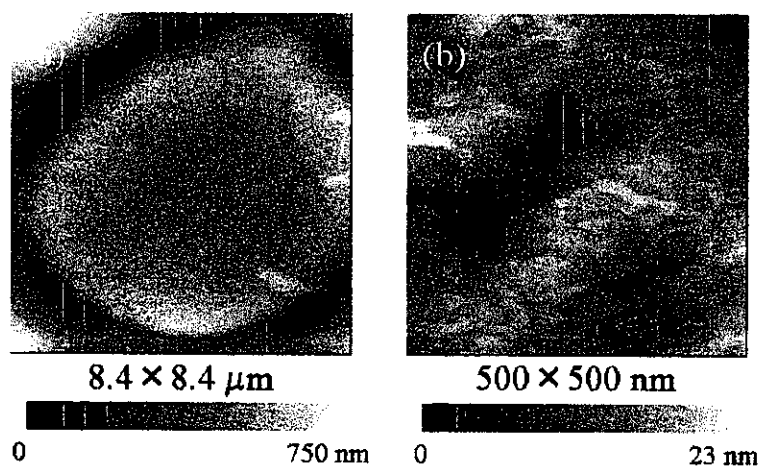


Fig.2 Dipyridamole 100 μm にて処理を行った正常赤血球。(a)円盤状赤血球が確認された。(b)500×500 nmの拡大図。赤血球表面膜上にまだら状にDipyridamoleが析出しているのが確認された。

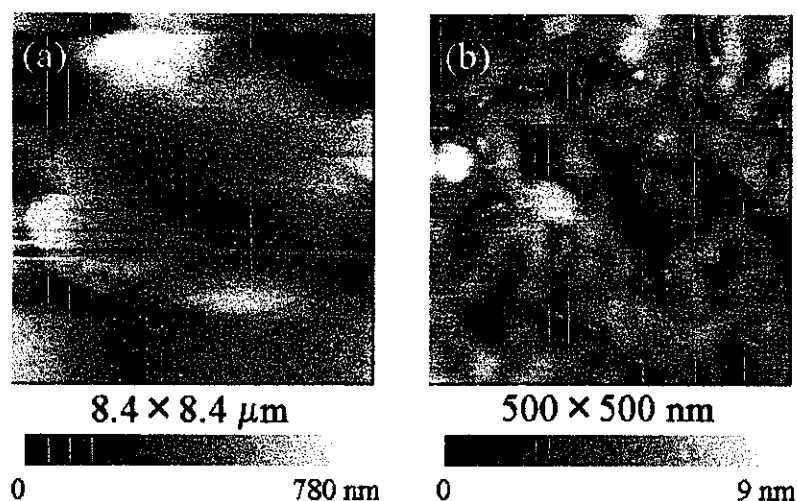


Fig.3 Dipyridamole 50 μm にて処理を行った正常赤血球。(a)円盤状赤血球が確認された。(b)500 \times 500 nmの拡大図。表面膜が乾燥により変形していた。 Fig.2で観察されたただら状のDipyridamole析出物の赤血球表面に対する被覆量が減少しているのが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) In Situ AFM Observation of Apatite Formation on Bioglass

Jun-ichi Hamagami, Gou Yamaguchi, Kiyoshi Kanamura, and Takao Umegaki

Key Engineering Materials, Vol. 218-220, pp.279-282 (2002).

(2) 原子の針を用いた実材料表面のその場観察(その場電気化学原子間力顕微鏡による実材料の観察)

金村聖志

表面, Vol. 39, No. 10, pp.433-442 (2001).

2. 学会発表

(1) 液中 AFM を用いたバイオガラス表面へのアパタイト結晶成長の直接観察

山口剛・濱上寿一・金村聖志・梅垣高士

日本セラミックス協会第 14 回秋季シンポジウム(2001 年 9 月)

(2)アパタイト生成表面のナノキャラクター

ゼーション

山口剛・濱上寿一・金村聖志・梅垣高士

第 5 回生体関連セラミックス討論会(2001 年 11 月)

(3)In Vitro アパタイト形成のナノ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

第 17 回日本アパタイト研究討論会(2001 年 12 月)

(4) Direct Observation of Apatite Formation on Bioglass in Simulated Body Fluid by Atomic Force Microscopy

Jun-ichi Hamagami, Gou Yamaguchi, Kiyoshi Kanamura, and Takao Umegaki

XVth International Conference on Phosphorous Chemistry (July, 2001).

G.知的所有権の取得状況

ナシ

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

抗 Dipyridamole ウサギ抗体作成と血清抗体価

分担研究者 西野武志（京都薬科大学・教授）

伊藤義博（財団法人生産開発科学研究所・細胞活性研究室・主任研究員）

大友弘志（慈恵医科大学・教授）、相川正道（東海大学総合科学技術研究所・教授）

研究要旨

ウサギを用いて Dipyridamole に対する抗体を作成した。精製 γ -globulin の抗体価は 5000 倍以上であった。

A. 実験目的

Dipyridamole の赤血球膜親和性がマラリア原虫侵入抑制に関わるのは、「原虫の膜認識がリガンド・リセプターの特異性に依存する」との仮説のもとに、平成 12 年から平成 13 年度にかけて免疫実験を行った。その結果、図に示す平成 12 年 7 月 10 日に採血した免疫群の抗体が最も高かった。そこで、ウサギ-1 (SE1-1) ウサギ-2 (SE1-2) の血清を用いて γ -globulin の分画を行った。

B. 実験方法

分離精製法：①飽和硫酸アンモニウム法により γ -globulin を分離した（粗 γ -globulin）。

②アフィニティークロマト法で精製し、5 倍抗体が上昇した（精製 γ -globulin）。

抗体値測定の手順：精製 γ -globulin を抗体とし、酵素抗体法で抗体値の測定を行った。

マイクロプレート（8 x 16 wells）に 10 倍希釈した Dipyridamol を抗原とし 500 倍希釈した γ -globulin を抗体として所定の方法に従い反応させた。

C. 実験結果考察および結論

図に示す抗体価を得た。

D. 結論

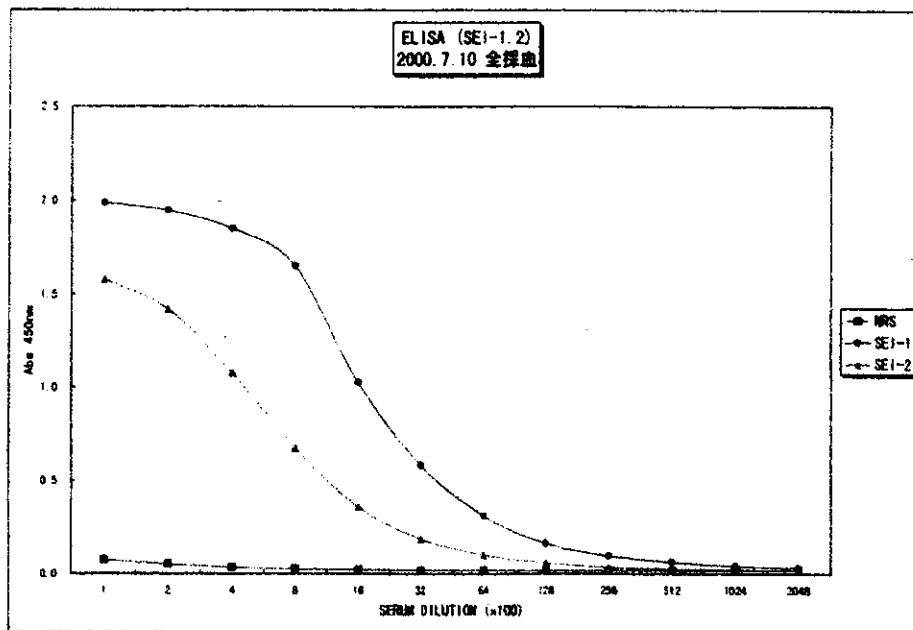
精製 γ -globulin の抗体価は 5000 倍以上であったので、リガンド・リセプターの特異性を明らかにする実験に供する事が可能と思われる。

E. 研究発表

ナシ

G. 知的所有権の取得状況

ナシ



抗Dipyridamoleウサギ抗体作成と血清抗体価

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

試験管内における抗マラリア薬の研究
Dipyridamole のサル赤血球膜に対する親和性

分担研究者 伊藤義博（財団法人生産開発科学研究所・細胞活性研究室・主任研究員）
大友弘志（慈恵医科大学・教授）、 相川正道（東海大学総合科学技術研究所・教授）
研究協力者 川合 覚（独協医科大学・講師）

研究要旨

サルに対する Dipyridamole の抗マラリア効果を検討するに当たり、サル赤血球膜に対する Dipyridamole の親和性を調べた結果、処理濃度に比例して赤血球膜に結合していた。

A. 実験目的

ヒト赤血球を用いた熱帯熱マラリア培養系ならびにマウス感染実験で Dipyridamole の抗マラリア効果がみとめられた。今年度は、サルを用いて抗マラリア効果を検討するので、サル赤血球を DP 処理してサル赤血球膜への親和性を調べた。

B. 実験方法

赤血球処理：赤血球培養液に 1、10 及び 100 μ M の Dipyridamole を含む 10%サル赤血球（脱繊維）を浮遊し、2 時間振盪培養した。終了後直ちに次の操作で赤血球膜を採取した。①低温下で遠心洗浄。②赤血球を低浸透圧で破壊。③膜成分を分離し HPLC 分析を行った。

HPLC 分析条件：

Column; Lichrosorb (Hibar) RP18 (5 μ m)
250x ϕ 4mm ID

Fluent; 4:1 methanol-0.1M acetate buffer
(pH4.0)

Flow rate; 0.5ml/min

Detector; HITACHI F-1150 Fluorescence
spectrophotometer (Ex 293nm, Em
468nm)

C. 実験結果

図に示すごとく、赤血球結合 Dipyridamole 量 (ng/mg protein) は、処理濃度に依存した。

D. 考察

サル赤血球膜結合 Dipyridamole 量は、処理濃度 (1-100 μ M) に比例していた。

E. 結論

Dipyridamole はサル赤血球膜に親和性を有することを示した。

F. 研究発表

1. 発表論文

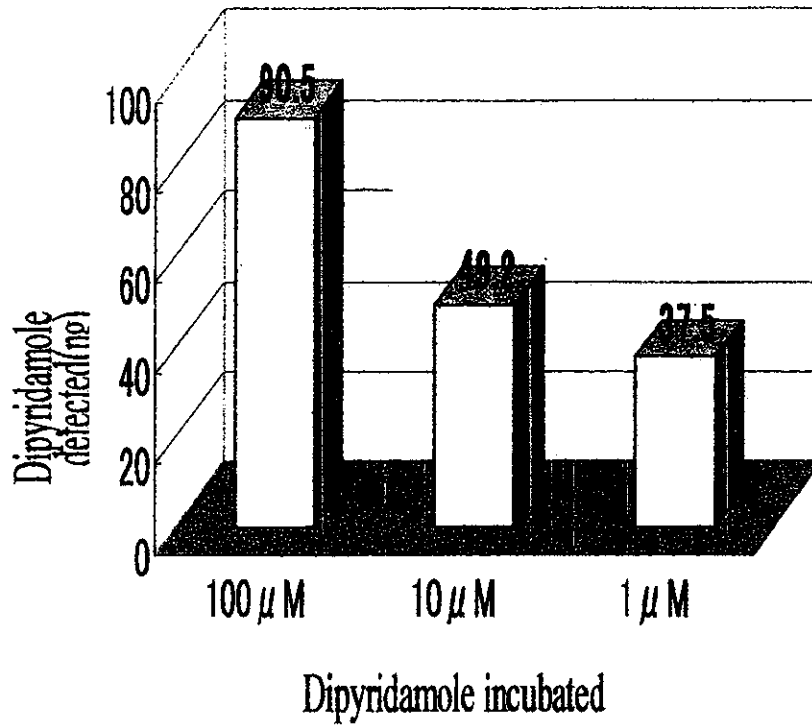
Akaki M, Nakano Y, Ito Y, Nagayasu E, Aikawa M. Effects of Dipyridamole on Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Parasitol Res. (投稿中) .

相川、伊藤他、「イン・ビトロおよびイン・ビボにおけるジピリダモールの抗マラリア効果の検討」。第 4 2 回日本熱帯医学大会（東京）、平成 13 年 9 月 26 日。

G. 知的所有権の取得状況

ナシ

**Detected dipyridamole per 1mg-protein
from monkey RBCs membrane**



厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

サルにおけるジピリダモール動態の検討

分担研究者 大友弘志（慈恵医科大学・教授）相川正道（東海大学総合科学技術研究所・教授）

研究協力者 川合 寛（独協医科大学・講師）

研究要旨

サルを用いてジピリダモール（DP）の抗マalaria効果を検討するに当たり、サルにおける DP 動態を調べた。静脈投与された DP は速やかに血中に現れ、速やかに消滅した。

A.研究目的

熱帯熱マalaria培養系ならびにマウス重傷マalariaモデルで DP の抗マalaria効果がみとめられたので、ヒトへの応用の可能性を検討するため、独協医科大学の川合寛博士の協力を得て、よりヒトに近いサルを用いて抗マalaria効果を検討する。そのため、ニッポンザルに DP を投与し、血中の DP 濃度の推移を検討した。

B.研究方法

サル：Macaca 属のサル（ニッポンザル）3 歳齢、メス 2 匹、体重およそ 2.5kg

ジピリダモール投与：ジピリダモール市販品（ペルサンチン）・ 10mg/匹投与する。

投与は上腕静脈内に行なった。

採血方法：感染日および感染日から 30 分、1、2、4、8、12、24、48 時間後に約 2ml を上腕静脈ないし股静脈から EDTA 処理採血管により採血し、PBS により洗浄した赤血球および血清は採取後ただちに凍結保存した。

DP 測定：0.5ml の試料に 500 μ M を含むメタノール 10 μ l を加えてタンパク質を除き、その上清を蒸発乾固後、200 μ l の移動層で溶解し、100 μ l を HPLC カラムに注入した。HPLC 条件：Sennshyu Pak PEGASIL ODS カラム（250x4.6mm, 5 μ m）を用い、移動層として 3:1 メタノール：0.02M 酢酸ナトリ

ウム緩衝液（pH4.0）を用い、検出波長は 280nm、流速は 1.5ml/min、室温にて測定した。リテンションタイムは DP は 5.8 分インドメタシン 7.1 分であった。

（倫理面への配慮）

サルを用いた実験を行うに当たり、獨協大学の実験動物に関する指針に従い、実験許可を得て必要最小限の動物を使用した。

C.研究結果

投与後 30 分で DP は濃度血清および赤血球結合量とも最高値で、その後時間の経過とともに速やかに減少した。UV 測定に加えて蛍光分析においても同様な結果が得られた DP は、ヒトの場合に比べてより速やかに血液に現れ、速やかに減少した。

D.考察

本実験では明確な DP の抗マalaria効果は認められなかった。その原因として、DP は速やかに血中に現れ、速やかに消滅することに起因すると考えられた。この点を改善するためには、投与方法を改善する必要があると考えられる。投与回数を増やすないし徐放性カプセルによる経口投与の方法が考えられる。

E.結論

DP は速やかに血中に現れ、速やかに消滅した。従って、静脈経由一回投与で効果が認められない時は、血液中の存在時間を長くするために、複数回投与ないし残留時間を長くするた

めの徐放性カプセルによる経口投与が考えられた。

F.研究発表

ナシ

G.知的所有権取得状況

ナシ

