

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

デング4価DNAワクチンのドーズ低減とデング蛋白ワクチンの製造法に関する研究

分担研究者 小西英二 神戸大学・准教授

研究要旨

地球規模の病気を予防するためには、それに適したワクチンを開発する必要がある。DNAワクチンは、安全・安価な次世代ワクチンであり、先進国はもとより開発途上国にも導入可能である。昨年度は、ウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスモデルを用いて、蛋白ワクチンの混合投与によりDNAワクチンのドーズを格段に低減できることを証明した。今年度は、デング4価DNAワクチンのドーズをどの程度にまで低減できるかを検討した。この結果、デング2型蛋白ワクチンの150 ngを混合したとき、各型のデングDNAワクチンが5 µgの少量でも、防御に重要な中和抗体を全ての型に対して誘導することが示された。この場合、2型以外の型では交差免疫原性により中和抗体価が上昇したことが示唆される。また、さらに安価な蛋白ワクチンの産生系を目指して、昆虫由来のSf9細胞を用いて発現させたデング2型蛋白ワクチンを評価した。この結果、Sf9細胞由来のワクチン蛋白は、哺乳類由来のCHO細胞から産生された蛋白と同等の生化学的性質及びマウスにおける免疫原性を示した。昆虫細胞は高密度培養が可能であり、より安価に蛋白ワクチンが製造できることが示唆された。

DNAワクチンは種々の利点を持つ次世代ワクチンとして開発が進められているが、問題は遺伝子組換え製剤に対する人々の懸念である。解決策として、ドーズの低減が挙げられる。我々はこれまで蛋白混合投与方法や針無投与方法がDNAワクチンの効果を高めることを報告してきた。今回、ウエストナイルDNAワクチン (pcWNME) と日本脳炎DNAワクチン (pNJEME) を用いて、低ドーズにおける中和抗体誘導能を調べた。その結果、市販のウエストナイル不活化ワクチンの1/10ドーズを混合した時、0.1 µgのpcWNMEは、1回の接種でマウスに中和抗体を誘導した。マウスを用いるDNAワクチンの初期評価には通常100 µgを複数回投与するので、大幅なドーズ低減が可能であることを示す。また、市販の日本脳炎不活化ワクチンの1/100ドーズを混合した時、1 µgのpNJEMEは、1-2回の接種でブタに中和抗体を誘導した。大動物に通常用いられるDNAワクチンのドーズは数百µgから数mgであり、今回の結果は、大動物においても投与方法の工夫によりDNAワクチンのドーズを格段に低減できることを示す。

A. 研究目的

デング熱及びデング出血熱は、熱帯・亜熱帯地域に広く分布する地球規模の蚊媒介性疾患で、年間推定約1億人の患者を生ずる。流行域は拡大しており、患者数は増加している。しかし、特異的な治療法はない。このまま地球温暖化が進めば流行域は北上し、わが国にもデング熱及びデング出血熱が侵

入することが危惧される。

感染症を予防するためにはワクチンは最も普遍的な手段であるが、現在のところデング熱やデング出血熱に対して認可されているワクチンはない。種々の戦略でワクチンが開発されているが、熱帯・亜熱帯地域の開発途上国に導入可能なワクチンでなければならぬ。すなわち安価であり、また人々

に容認されうるワクチンを開発する必要がある。

DNAワクチンは開発途上国に導入可能なタイプのワクチンである。これまで、我々の教室ではデング4価DNAワクチンを試作して、マウスに中和抗体を誘導することを示してきた。しかし、一般的にDNAワクチンは、防御に重要とされる中和抗体を誘導するためには高いドーズを必要とするため、その低減の可能性が検討されてきた。

我々はDNA・蛋白ワクチン混合投与法を開発して、DNAワクチンのドーズが格段に低減できることを示した。昨年度の本分担研究では、ウエストナイルウイルスのマウスモデルにおいては0.1 µgの1回接種で、また日本脳炎ウイルスのブタモデルにおいては1 µgの2回接種で中和抗体を誘導できることを証明した。

今年度は、デング4価DNAワクチンのドーズをどの程度にまで低減できるかを検討した。また、より安価な蛋白ワクチン産生系の確立を目的として、昆虫細胞を用いたデング蛋白ワクチン発現システムを構築した。さらに、産生された蛋白抗原を、哺乳類細胞由来の蛋白抗原と比較評価した。

B. 研究方法

デング1型ウイルス (DENV1) 望月株、デング2型ウイルス (DENV2) ニューギニア C (NGC) 株、デング3型ウイルス (DENV3) H87 株及びデング4型ウイルス (DENV4) H241 株を用いた。中和試験の抗原にはそれぞれのウイルスを Vero 細胞に感染して得られた培養液を用いた。また、免疫マウスの2次免疫応答を調べるためには、DENV2 感染 K562 細胞を腹腔内に接種した。さらに、昆虫細胞由来蛋白ワクチンの評価には、NGC 株感染 C6/36 細胞培養液を対照として用いた。NGC 株の不活化には、パイナリーエチレンイミンを最終濃度 0.06% になるようにウイルス液に混合し、37°C に 6 時間保温した。不活化の確認には単層 Vero 細胞を用いた。

DNA ワクチン：デング1型、2型、3型及び4型に対する DNA ワクチン (それぞれ pcD1ME、pcD2ME、pcD3ME 及び pcD4ME) は、平成16年度厚生科学研究費

補助金、新興・再興感染症研究事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書「デング4価 DNA ワクチンのマウスにおける評価」に記載した。DNA ワクチンに組み込んだ prM/E 遺伝子は、それぞれ望月株 (1型)、NGC 株 (2型)、H87 株 (3型) 及び H241 株 (4型) であった。すべてのプラスミド DNA は、キアゲン DNA 精製キットで精製してマウスに投与した。1型から4型に対する DNA ワクチンの混合液をデング4価 DNA ワクチンとした。デング4価 DNA ワクチンのドーズとして、各 25 µg (計 100 µg/匹)、各 5 µg (計 20 µg/匹)、各 1 µg (計 5 µg/匹) 及び各 0 µg (希釈液に用いた PBS) を投与する4群を設けた。

哺乳類細胞由来蛋白ワクチン：DENV2 の prM-E 遺伝子を CHO 細胞にトランスフェクトして構築した連続抗原発現細胞 (D細胞) の培養液を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法で精製して得た DENV2 細胞外粒子 (D2EP-D) を用いた。なお細胞外粒子は、表面は本来のウイルス粒子と同じであるが、ニュークレオカプシドのない非感染性粒子である。

マウス実験：4週令の雄 ICR マウス (各群5匹) に、DNA ワクチンと蛋白ワクチンを単独で、あるいは混合して大腿部に投与した。投与にはジェット式針無注射器 (島津製作所) を用いて、片脚につき 50 µl (1匹あたり 100 µl) を接種した。投与後3週毎に眼窩静脈叢から採血し、プール血清を用いて中和抗体価を、または個々の血清を用いて ELISA 抗体値を測定した。

中和試験：70%あるいは90%フォーカス減少法で抗体価を求めた。すなわち、2倍階段希釈した血清とウイルスの混合液に補体を最終濃度が5%になるように添加し、4°C に一夜保温後 Vero 細胞に感染した。3-4日目に固定し、フラビウイルス交差性モノクローナル抗体 (D1-4G2) あるいは抗 DENV 過剰免疫マウス腹水で染色し、フォーカスを計数した。

抗体測定 of ELISA：DENV2 に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原 (DENV2 感染 Vero 細胞の培養液)、検体 (100倍希釈マウス血清)、

アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。各プレートには一定の陽性対照を置き、この対照で得られた吸光度で換算した値を ELISA 抗体値とした。

昆虫細胞由来蛋白ワクチン：昆虫細胞用発現プラスミド pIB/V5-His に DENV2 の prM-E 遺伝子を組み込み、pIBD2ME を作製した。pIBD2ME を蛾細胞由来の Sf9 細胞にトランスフェクトし、24-72 時間後の培養液から、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法で精製して、昆虫細胞由来蛋白ワクチン (D2EP-Sf9) を得た。対照として、哺乳類由来 CHO 細胞に pcD2ME をトランスフェクトし、24-72 時間後の培養液から、上記と同様の方法で精製して、哺乳類細胞由来蛋白ワクチン (D2EP-CHO) を得た。

免疫染色：固定した細胞を、E に対するモノクローナル抗体 (D1-4G2) あるいは M に対するモノクローナル抗体 (D3-2H2) で免疫染色した。D1-4G2 はフラビウイルス交差性抗体、2H2 は Dengue ウイルス交差性抗体である。

免疫沈降法、ウエスタンブロット法：Dengue ウイルスに対するモノクローナル抗体である D1-4G2 を表面に結合させたプロテイン A アガロースビーズを、発現細胞の培養液と混合し、4°C で一夜保温した。ビーズを洗浄後、電気泳動用サンプルバッファに溶解する蛋白を 10% ポリアクリルアミドで展開し、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写した。転写された蛋白を D2-3H5 で染色した。

PNGase F 処理：糖タンパクから糖鎖を除くために、PNGase F (ロシュ社) を加え、37°C で 20 時間反応させた。

密度勾配遠心：10-40% の蔗糖密度勾配液上に重層して超遠心後、20 分画を得た。

抗原測定のスンドイッチ ELISA：DENV2 に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、DENV2 特異的マウスモノクローナル抗体 (D2-3H5)、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。各プレートには抗原スタンダードを設け、未知資料の抗原量をカリブレーションした。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された後に実施した。

C. 研究結果

Dengue 4 価 DNA ワクチンのドーズ低減： Dengue ウイルスのすべての型に対する中和抗体を誘導する Dengue 4 価 DNA ワクチンのドーズを検討するために、1 つの型について 25 μ g、5 μ g あるいは 1 μ g の DNA を 150 ng の D2EP-D と混合してマウスに投与した (図 1)。対照として PBS 投与群 (0 μ g) を設けた。初回の投与から 7 週目に初回と同じ免疫原で追加免疫した。25 μ g 投与群及び 5 μ g 投与群では、すべての型の Dengue ウイルスに対して中和抗体が誘導された。3 週目では多くの場合中和抗体は検知レベル未満であったが、追加免疫の後 (初回免疫から 9 週目) には高い中和抗体価を示した。一方、1 μ g 投与群及び PBS 投与群では、検知レベルの中和抗体価はほとんど認められなかった。

次に初回免疫から 9 週目に、これらの免疫マウスを DENV2 により攻撃し、4、8 及び 14 日目の DENV2 に対する中和抗体価を調べた (図 2)。25 μ g 投与群及び 5 μ g 投与群では攻撃時の抗体価が既に高かったが、4 日目には 4-8 倍の上昇を示した。一方 PBS 投与群では、4 日目には上昇が認められず、8 日目に 1:10、14 日目に 1:40 の低値を示したのみであった。前者の中和抗体価の経時変化は 2 次免疫応答、また後者のそれは 1 次免疫応答と考えられ、これらの結果は、25 μ g 投与群及び 5 μ g 投与群のマウスには中和抗体の誘導と一致して記憶 B 細胞が誘導されたことを示す。興味あることに、1 μ g 投与群でも 4 日目に急激な上昇が見られた。攻撃前においては中和抗体の誘導は検知できなかったが、この群のマウスにも記憶 B 細胞が誘導されたことを示す。

昆虫細胞由来 Dengue 蛋白ワクチンの評価：pIBD2ME をトランスフェクトした Sf9 細胞を免疫染色した結果、E 及び prM 抗原が細胞内で発現していることが示された (図 3)。次に、トランスフェクト後、24-72 時間目の培養液を、D1-4G2 抗体で免疫沈降し、

さらにD2-3H5抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した結果を図4に示す。染色されたバンドは分子量が約60kDaに認められ、pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞培養液から得られたバンドは、pcD2MEをトランスフェクトしたCHO細胞培養液から得られたバンド及びNGC株感染C6/36細胞培養液から得られたバンドと同じ位置であった。また、糖鎖切断酵素であるPNGase Fで処理した後の蛋白も、同等の移動度であった。この結果は、pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞から、本来の抗原と同等のE抗原が放出されていることを示す。

蔗糖密度勾配遠心による解析では、pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞培養液中のE抗原は、NGC株感染C6/36細胞培養液で示されたSHAのピーク及びpcD2MEをトランスフェクトしたCHO細胞培養液中のE抗原と同等の密度であった(図5)。この結果は、pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞から放出されたE抗原は粒子状であることを示唆する。

マウスにおける免疫原性を検討した結果を図6に示す。アジュバントとして、pcDNA3プラスミドを用いた。このプラスミドには、遺伝子アジュバントであるCpGモチーフが含まれる。Sf9またはCHO細胞由来の精製抗原(それぞれD2EP-Sf9またはD2EP-CHO)あるいはNGC株感染C6/36細胞培養液から精製したウイルス抗原(DENV-C6/36)の100 ngをpcDNA3の36.5 µgと混合して、マウスに2週間隔で3回投与した。ELISA抗体及び中和抗体共に、D2EP-Sf9はD2EP-CHOと同等の抗体誘導能を示した。なお、対照として用いたDENV-C6/36の免疫原性が低かったのは、BEIによる不活化の際、37°Cで6時間保温する過程があり、抗原性が低下したためと考えられた。

DNAワクチンと混合投与した場合の増強効果を、D2EP-Sf9とD2EP-CHOまたはD2EP-Dと比較した(図7)。50 µgのpcD2MEを、それぞれの蛋白ワクチンの100 ngと混合してマウスに6週間隔で2回投与した。初回の投与から7-9週目には、pcD2ME単独投与により誘導された中和抗体価(1:20)の8-16倍の中和抗体価

(1:160-1:320)が蛋白混合投与により誘導された。これは蛋白混合投与による増強効果であり、この増強効果は3種の蛋白ワクチン間で差は認められなかった。これらの結果から、昆虫細胞由来蛋白ワクチンは哺乳類細胞由来蛋白ワクチンと同等の免疫原性、またDNAワクチン増強効果を持つことが示された。

培養液中に放出されるE抗原量を、pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞とpcD2MEをトランスフェクトしたCHO細胞で比較した(表1)。トランスフェクト後、48時間目にはSf9細胞とCHO細胞の間に差は認められなかった。この結果は、昆虫細胞のE抗原産生量は哺乳類細胞のそれとほぼ同じであることを示す。

D. 考察

デング4価DNAワクチン単独の中和抗体誘導能については、平成16年度の本研究事業の研究報告書(上記と同)に記載した。すなわち、各型について25 µgのDNA(全量では100 µg)を2回投与したBALB/cマウスは、70%フォーカス減少法で1:20-1:80の中和抗体価を示した。この中和抗体価は、今回用いた90%フォーカス減少法では<1:10-1:20に相当する。マウスの系統や接種スケジュールが異なるため正確な比較ではないが、今回各型について25 µgのDNAを150 ngのD2EP-Dと混合してICRマウスに投与した結果、初回投与から9週目にDENV1を除いて1:80-1:160の値を示したことは、D2EP-D混合投与の増強効果と考えられる。なお、D2EP-D単独の免疫原性は、1 µgのDNAワクチンと混合投与したマウスには中和抗体の誘導がほとんどの型について認められなかったことから、低いと考えられる。また、DENV1に対する中和抗体価については25 µg投与群では低値(1:10)であったが、5 µg投与群では1:40を示した。

D2EP-D混合投与の効果は、各型について25あるいは5 µgのDNAワクチンを投与したマウスに認められたが、1 µgのDNAワクチン投与群には認められなかった。この結果は、150 ngのD2EP-Dと混合投与する条件下では、DNAワクチンのドーズを各型5 µgにまで低減できることを示す。昨年度

の本研究で示されたように、WNVのマウスモデルでは0.1 µg、またJEVのブタモデルでは1 µgまでドーズを低減できる。今回、デングウイルスの系で低減できるドーズは、WNVやJEVの系で達成できるほど低くはなかった。混合する蛋白の質や量における差異に起因することも考えられるが、一般的にデングウイルス感染細胞から産生される感染性ウイルス量は、WNVやJEVより 10^1 - 10^3 倍低いので、ウイルス蛋白の安定性が関与しているのかもしれない。

本研究で、デング4価DNAワクチンに混合した蛋白ワクチンはDENV2由来の細胞外粒子(D2EP-D)であった。したがって、デング4価DNAワクチンの中で、pcD2MEと同型の蛋白ワクチンを使用したことになる。しかし、特異性が高いと言われる中和試験においても同等の抗体価が4型共に示され、蛋白ワクチンによるDNAワクチンの増強効果が他の型にも認められた。フラビウイルス属の中で、4種のデングウイルス(1型から4型)はデンググループに属し、血清学的に交差反応性があるため、この抗原交差性が免疫誘導に影響したのかもしれない。この交差免疫原性は、DNA・蛋白ワクチン混合投与方法の特徴と考えられる。

昆虫細胞は、高密度培養ができるため、蛋白生産の道具として最近注目されてきた。担体を使用した浮遊細胞培養系で1グラム当たり最大 5×10^7 個の細胞培養を可能にし、さらにバイオリクターの使用によりミリグラムからグラム単位の蛋白製造が可能とされる。今回のSf9細胞を用いた発現系では100 ng/mlのオーダーのデング蛋白産生量であったが、10リットルのバイオリクターを使用した高密度培養では計算上10mgの収量となる。DNA・蛋白ワクチン混合投与方法によりデング4価DNAワクチンの免疫原性を上昇させる蛋白量は少量(150 ng)であったため、かなりのドーズ数が安価に製造できると思われる。

E. 結論

DNA・蛋白ワクチン混合投与方法によりデング4価DNAワクチンのドーズを低減できた。また、昆虫細胞を使用してもデング蛋白ワクチンが生産できることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiro Ishikawa, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Souichi Nukuzuma, Takashi Kondo, and Eiji Konishi: Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice. *Microbes and Infection* 9, 1089-1095, 2007

Yoko Kitai, Mizue Shoda, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus Infections in Equine Sera. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1024-1031, 2007.

Atsushi Yamanaka, Saori Kosugi, and Eiji Konishi: Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *Journal of Virology* 82, 927-937, 2008.

Eiji Konishi, Yoko Kitai, and Takashi Kondo: Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity to Measure Low Levels of Antibodies: Evaluation in a Model of Japanese Encephalitis Nonstructural Protein 1. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 88-94, 2008.

2. 学会発表

Tomohiro Ishikawa, Yoko Kitai, Takashi Kondo, Peter W. Mason, Eiji Konishi: Current status of Japanese encephalitis virus circulation in Japan: surveys of antibodies to NS1 and implications of deletions in the 3'-untranslated region. Forty-First Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Baltimore, 2007年7月

糸田川優、小西英二: 中和活性または感染増強活性を示す抗デング1型マウスモノクローナル抗体。第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007年5月

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二：ブタ流産予防を目的とした日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月

北井陽子、近藤高志、小西英二：新しい日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法：補体媒介性細胞傷害の利用。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月

山中 敦史、小西 英二：ウイルス血症に対する防御を評価するマウスモデルの確立：デング 2 型ウイルスを用いた予備的検討。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、小西英二：ブタにおける日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合針無投与方法の有用性評価。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月

桑原三和、小西英二：昆虫細胞を用いたデ

ング蛋白ワクチン大量生産系確立の基礎的検討。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用した日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法の開発。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月

山中敦史、小西英二：デングワクチンの防御効力を評価するマウスモデル。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月

酒井陽平、小西英二：インドネシアにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の調査。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月

糸田川優、小西英二：抗デング 1 型マウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び感染増強活性の解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

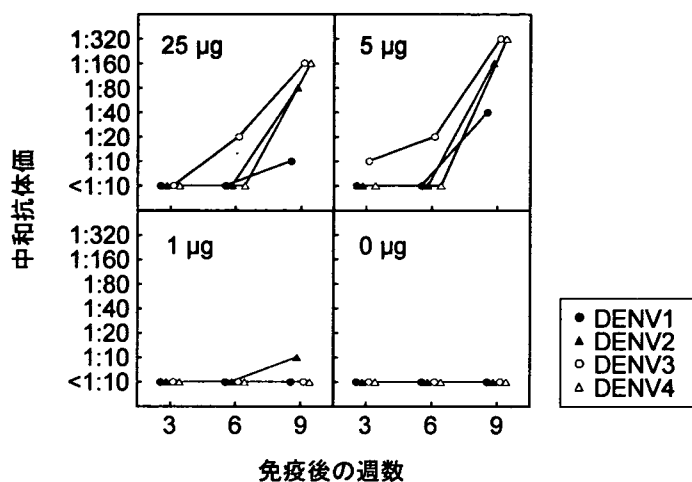


図1. 蛋白ワクチン (D2EP-D) と混合した種々のドーズの Dengue 4 価 DNA ワクチンの中和抗体誘導能。1 群 5 匹の 4 週齢の ICR マウスに、DNA・蛋白混合ワクチンを 7 週間隔で 2 回投与した。Dengue 4 価 DNA ワクチンのドーズは、1 つの型について 25 μg 、5 μg あるいは 1 μg (全量としては 100 μg 、20 μg あるいは 4 μg) であり、D2EP-D のドーズは 150 ng であった。“0 μg ” は、対照として設けた PBS 投与群である。免疫後 3、6 及び 9 週後に採血し、プール血清の中和抗体価を 90% フォーカス減少法で、DENV1 (黒丸)、DENV2 (黒三角)、DENV3 (白丸) 及び DENV4 (白三角) に対して求めた。

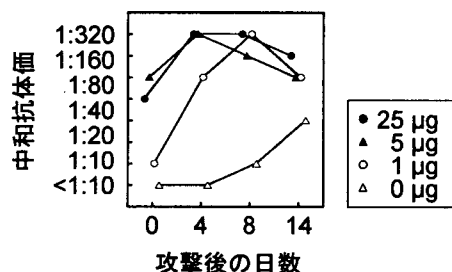


図2. 攻撃後の中和抗体の 2 次免疫応答。図 1 の実験で用いたマウスの初回免疫 9 週後に、DENV2 により攻撃した。4、8 及び 14 日目に採血し、DENV2 に対する中和抗体価の経時変化を、25 μg 投与群 (黒丸)、5 μg 投与群 (黒三角)、1 μg 投与群 (白丸) 及び PBS 投与群 (白三角) について調べた。

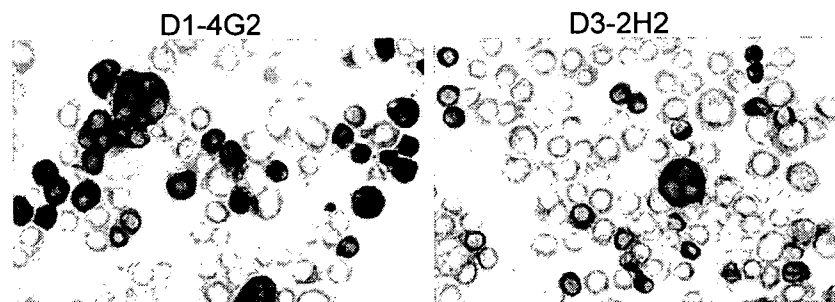


図3. pIBD2ME をトランスフェクトした Sf9 細胞の免疫染色像。DENV2 の E に対する抗体 (D1-4G2) あるいは M に対する抗体 (D3-2H2) で染色した。

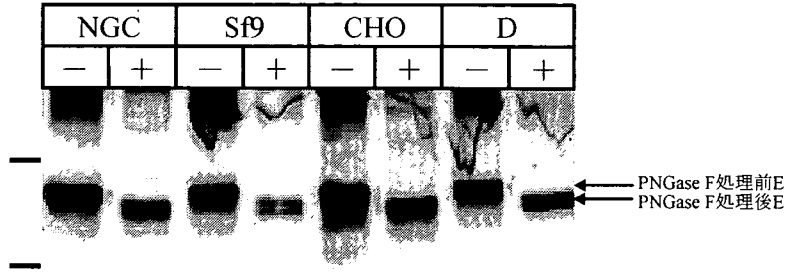


図4. pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞の培養液に含まれるE抗原のウェスタンブロット解析。対照として、NGC株感染C6/36細胞培養液 (NGC)、pcD2MEをトランスフェクトした一過性発現のCHO細胞培養液 (CHO) 及びpcD2MEを安定的にトランスフェクトしたD細胞の培養液 (D) を用いて、pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞培養液 (Sf9) を評価した。培養液は、D1-4G2抗体で免疫沈降した後に、PNGase F処理無しに (-) または処理して (+) 電気泳動した。そして、転写の後にD2-3H5抗体で染色した。

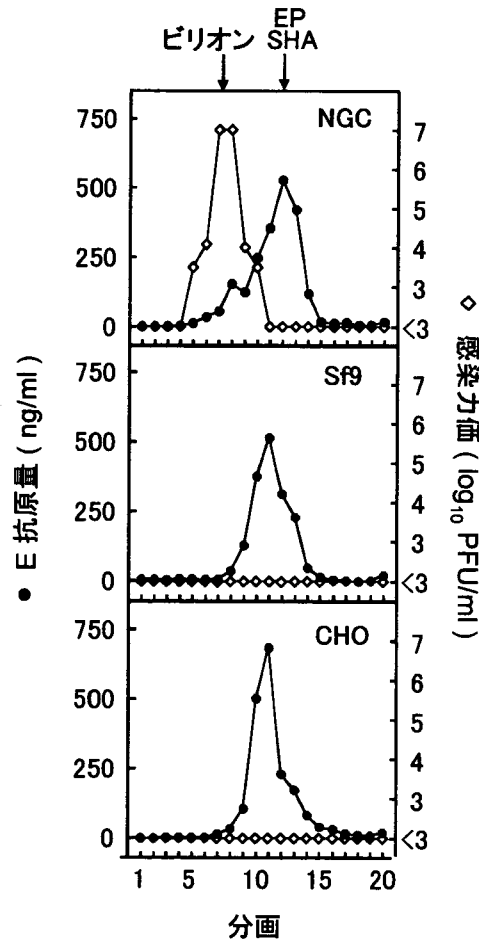


図5. pIBD2MEをトランスフェクトしたSf9細胞の培養液に含まれるE抗原の蔗糖密度勾配遠心による解析。対照として、NGC株感染C6/36細胞培養液 (NGC) 及びpcD2MEをトランスフェクトしたCHO細胞培養液 (CHO) を用いた。

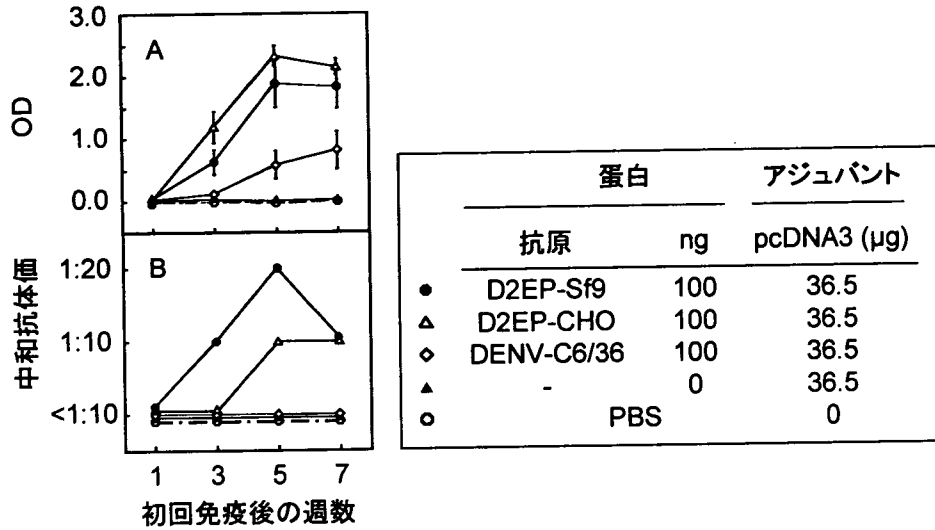


図6. D2EP-Sf9の免疫原性。1群5匹の4週齢のICRマウスに、100 ngのD2EP-Sf9を2週間隔で3回投与した。アジュバントとして、36.5 μgのpcDNA3プラスミドを用いた。対照として、D2EP-CHO及びDENV-C6/36を用いた。免疫後1、3、5及び7週目に採血し、個々の血清をELISA (A) に、プール血清を中和試験 (B ; 70%フォーカス減少法) に供した。上のパネルのデータは個別に得られたELISA値の平均値と標準誤差 (誤差棒) である。

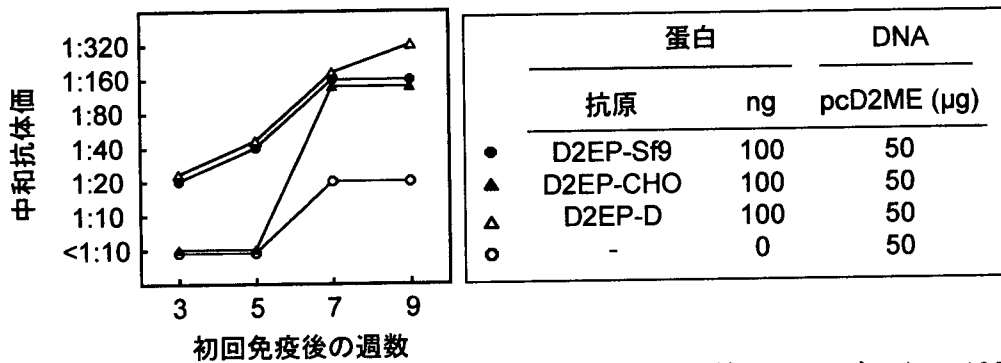


図7. D2EP-Sf9によるDNAワクチン増強効果。1群5匹の4週齢のICRマウスに、100 ngのD2EP-Sf9を50 μgのpcD2MEと混合して6週間隔で2回投与した。対照として、D2EP-CHOまたはD2EP-Dを混合したpcD2ME、またはpcD2ME単独を投与した。免疫後3、5、7及び9週目に採血し、プール血清の中和抗体価 (70%フォーカス減少法) を求めた。

表1. 昆虫細胞と哺乳類細胞におけるE抗原産生量の比較*

細胞種	E産生量 (ng/ml)	
	24**	48
Sf9	129±31	238±28
CHO	197±35	241±35

*直径35mmのディッシュにSf9あるいはCHO細胞を約80%コンフルエントに生育させ、それぞれ2 μgのpIBD2MEあるいはpcD2MEをトランスフェクトした。

**トランスフェクト後の時間。

生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

日本脳炎ウイルスの吸着と侵入に関する研究

分担研究者 名和 優 （埼玉医科大学・講師）

研究協力者 町田早苗 （埼玉医科大学・助教）
高崎智彦 （国立感染症研究所・室長）
倉根一郎 （国立感染症研究所・部長）

研究要旨 日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus, JEV) の吸着と侵入に関する解析を JEV 感受性細胞株である、ヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞を用いて行った。

pH7.4 から pH6.4 までの弱酸性条件では JEV 感染価を示すプラーク数は減少したが、pH6.2 から pH5.8 までの酸性になると逆にプラーク数が増えた。酸性条件ではウイルスと細胞との融合が増強されることが示唆された。エンドサイトーシス抑制剤を用いた実験においても pH の変動によるプラーク数の変動パターンは変わらなかったが、プラーク数は 63%から 69%に減少したので JEV の C6/36 細胞の感染はエンドサイトーシスを介していることも考えられた。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus, JEV) は、ブタとヒトとの脊椎動物宿主間を節足動物 vector で媒介され、蚊の細胞、マウス、サルなどの細胞で良く増殖する。JEV 感受性細胞株である、ヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞、アフリカミドリサル腎由来の Vero 細胞を用いて日本脳炎ウイルスの吸着と侵入に関して解析することは、治療薬や防除等の開発に重要である。今までの報告によると JEV の感染機構は、レセプターの介在するクラスリン依存エンドサイトーシスであると証明されているが、そのレセプターは同定されていない。レセプター同定の前段階とし

て蚊の細胞である C6/36 細胞を用いて pH 変動による JEV 吸着、侵入について解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 細胞

Aedes albopictus 由来 C6/36 細胞を使用した。

2. ウイルス

日本脳炎ウイルス (JEV) JaGAr01 株は、C6/36 細胞で増殖させ、その培養上清を 10% (w/v) のポリエチレングリコール 6000 および 0.5M 塩化ナトリウムで濃縮し、10~40% ショ糖密度勾配にて精製し使用した。

3. pH 変動によるプラーク検出法

C6/36 細胞は、poly-L-lysine をコーティングした 6 ウェルプレートで培養した。細胞に吸着させる 100-150 pfu / 0.2ml のウイルス (ビリオン) 液は、氷上で冷却した C6/36 細胞に接種し、氷上で 1 時間吸着させ、未吸着なウイルス液は冷ハanks 緩衝液で取り除いた。この冷ウイルス吸着細胞に Charke と Casals の方法による 0.2M Na_2HPO_4 緩衝液と 0.2M NaH_2PO_4 緩衝液の混合比と 0.05M ホウ酸緩衝液によって pH5.8 から 7.4 に pH を調整した溶液 (VAD) を加え、31°C で 5 分間インキュベートした。JEV エンvelope (E) 蛋白に対するモノクローナル抗体 (MoAb 503) を 150 μg 含む溶液を加えてブロッキングし、氷上で 30 分間おいた。溶液を除去後、MoAb 503 を 150 μg 含むオーバーレイ培養液を加えて 28°C で 5-6 日間インキュベート後、出現したプラークをカウントした。

4. バフィロマイシン A1 (BFM-A1) 前処理によるエンドサイトーシスの影響

BFM-A1 は、エンドサイトーシスを抑制する薬剤である。1.0-1.2 μM 濃度の BFM-A1 を 2%DMEM に加えて、プレートに培養した C6/36 細胞に添加し、28°C、1 時間反応させた後、pH 変動によるプラーク検出法を施行した。

酸性条件での E 蛋白構造変化に関わる MoAb 503 の影響: ELISA プレートに JEV 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ をコーティングし、2.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ または、5.0 $\mu\text{g}/\text{well}$ の MoAb 503 を 4°C、1 晩反応させた。コントロールとして正常マウス IgG を 5.0 $\mu\text{g}/\text{well}$ 反応させた。次に pH5.8 から 7.4 に pH を調整した VAD 溶液を加えて 37°C、10 分間反応させ、PBS を加えて平衡化した。酵素標識した E 蛋白に

対する MoAb 301 を反応させ、発色による吸光度を測定した。

C. 研究結果

1. pH 変動によるプラーク数の変化

C6/36 細胞において pH7.4 では平均 134 個のプラークが形成されたが、pH7.0 になるとプラーク数が平均 100 個に減少した。pH6.8 から pH6.4 までの弱酸性になるにつれてプラーク数が減少したが、pH6.2 から pH5.8 までの酸性になると逆にプラーク数が増えた (図 1A)。また、MoAb 503 とウイルス液をはじめに反応させて同様にプラーク検出実験を行ったものは、pH 変動に関わらずほとんどプラークは形成されなかった (図 1A)。

2. BFM-A1 処理後の pH 変動によるプラーク数の変化

細胞のエンドサイトーシスを防ぐために V-ATPase 抑制剤である BFM-A1 をあらかじめ C6/36 細胞に処理してから pH 変動によるプラーク形成法を行うと pH7.4 から pH6.2 の間では、pH が酸性になるにつれてプラーク数も減少したが、pH6.0 以下になるとプラーク数が増えた。BFM-A1 処理により、未処理に比較してプラーク数は約 63% から 69% に減少した。プラーク数の差はあるが pH 変動によるプラーク数の影響はコントロールでも同様に認められた (図 1B)。

3. 酸性化による MoAb 503 と JEV の結合の影響

JEV と 2.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ または、5.0 $\mu\text{g}/\text{well}$ の濃度で反応させた MoAb 503 の結合は、pH7.2 から酸性下の pH5.8 でも酵素標識した MoAb 301 の認識は変わらなかったが、JEV と正常マウス IgG の結合は酸性下にな

ると低下した(図2)。

D. 考察

蚊の細胞である C6/36 細胞では、pH7.4 から pH6.4 までの弱酸性条件では JEV 感染価を示すプラーク数は減少したが、pH6.2 から pH5.8 までの酸性になると逆にプラーク数が増えた。酸性条件ではウイルスと細胞との融合が増強されると考えられた。

エンドサイトーシス抑制剤を用いた実験においても pH の変動によるプラーク数の影響パターンは変わらなかったが、プラーク数は 63%から 69%に減少したので JEV と C6/36 細胞の感染はエンドサイトーシスを介していることも示唆された。

JEV を MoAb 503 と反応した後、同様のプラーク検出を試みたが、pH による影響はなく、プラークもほとんど検出されなかった。また、MoAb 503 と JEV と反応させ、その後 E 蛋白を認識する MoAb301 で検出する実験においては、pH 酸性化による影響は認められず、この JEV E 蛋白の I と II ドメインを認識する MoAb 503 モノクローナル抗体は、pH 酸性条件で細胞に JEV が結合するエpitepを認識している可能性も示唆された。

E. 結論

C6/36 細胞では、pH7.4 から pH6.4 までの弱酸性条件では JEV 感染価を示すプラーク数は減少したが、pH6.2 から pH5.8 までの酸性になると逆にプラーク数が増えた。酸

性条件ではウイルスと細胞との融合が増強されると考えられた。

エンドサイトーシス抑制剤を用いた実験において JEV の C6/36 細胞の感染はエンドサイトーシスを介していることも証明された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nawa M, Machida S, Takasaki T, Kurane I. Plaque formation by Japanese encephalitis virus bound to mosquito C6/36 cells after low pH exposure on the cell surface. J. J. I.D., 60: 118-120, 2007.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

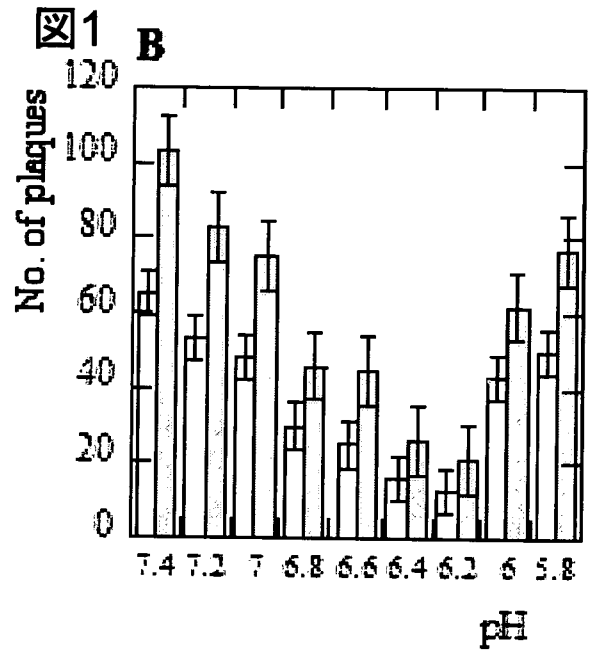
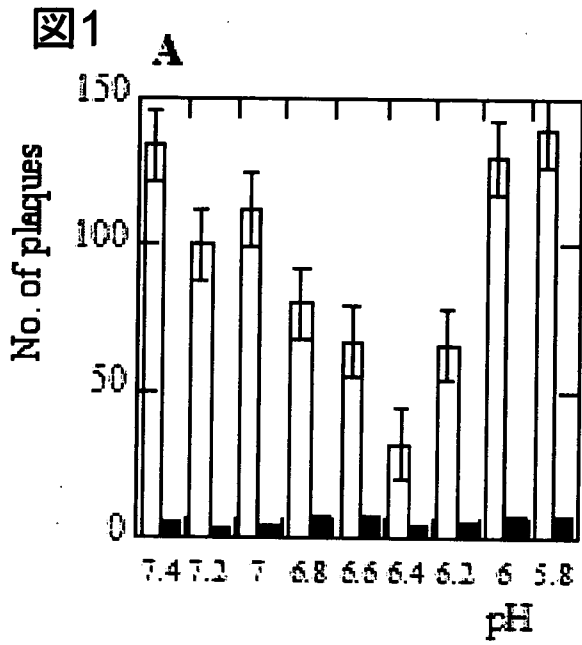
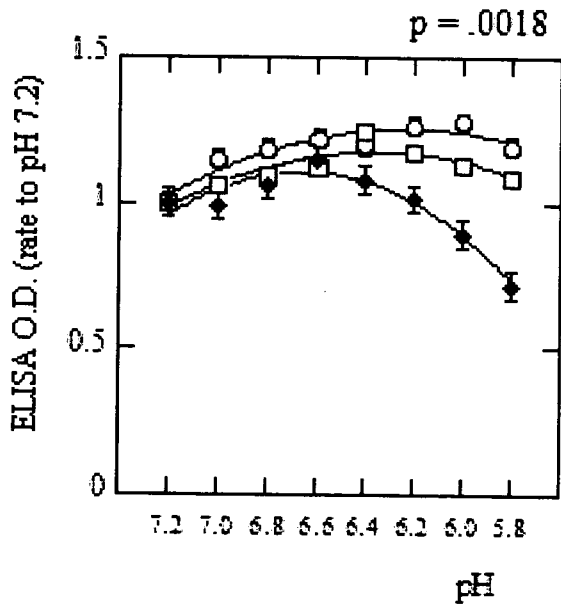


Figure 2



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

フィリピンの自然災害被災地におけるマラリア媒介蚊の分布

分担研究者 高木正洋（長崎大学熱帯医学研究所・教授）
研究協力者 前川芳秀（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・博士課程）

研究要旨 過去に地震、洪水、地滑りなどの自然災害を被ったフィリピン数州のマラリア流行地で採集されたハマダラカ成虫の外部形態による種同定を行い、被災地におけるマラリア感染リスクを媒介蚊の種類構成から評価した。11種のハマダラカが同定された。この中にフィリピンでの媒介蚊としてよく知られる *An. flavirostris* と *An. litoraris*、東南アジアからインド、スリランカにかけた広い地域で媒介に与っている *An. subpictus* が含まれていた。3種の主な生息環境は、丘陵地 (*An. flavirostris*)、臨海地 (*An. litoraris*)、その両方 (*An. subpictus*) で、自然災害の観点からみれば地震、津波、地滑り、洪水等、特に地震と大雨に起因する災害の影響を大きく被る自然環境といえる。よって地震や大雨に起因する災害がマラリア感染リスクを増大させる可能性が示唆された。日本も山が海に迫った平野部の少ない地震国、多雨国である。我が国における地震や大雨関連災害の評価には、疾病媒介蚊への影響を読み込んでおくべき必要性も併せて示唆された。勿論、上記のマラリア媒介蚊は何れも我が国には生息するものではない。しかし沖縄の南西諸島には、*An. flavirostris* と近縁で、生息環境も発生水域を含めて類似している上、東南アジアの最重要マラリア媒介蚊の一種であるコガタハマダラカ (*An. minimus*) が普通に生息しており、一部では気候温暖化に伴う同種の北上も懸念されている。それ故、今回の結果は、少なくともコガタハマダラカ生息地でのモデルを提示したことになる。

A. 研究目的

一定の水域に発生し、生涯飛翔範囲内の一定空間にて休息し、その範囲に生息する吸血可能な動物から吸血しているマラリア媒介蚊の生存は、当然のことながら生息環境の変化に大きな影響を受ける。そこで我が国と同じような地形を持ち、台風による大雨や地震災害の多い点でも共通点を有する、フィリピンの被災地におけるマラリア媒介蚊の生息実態を調べることにより、被災地のマラリア感染リスクを媒介蚊の側か

ら評価しようとした。またその結果から我が国の被災に係る疾病媒介蚊対策に有益な情報も得ようとした。

B. 研究方法

フィリピン・ミンダナオ島の被災地10地点にて、水牛囲により夜間採集され、長崎大学熱帯医学研究所に提供されたハマダラカ成虫342個体のうち、比較的保存状態が良く、外部形態に拠る種同定に耐え得る196個体を供試した。種の同定は、"Illustrated

keys to the Anopheles mosquitoes of the Philippine Islands” (Cagampang-Ramos, A. and Darsie, R.F. 1970.)と”Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo” (Reid J.A. 1968.)に拠った。

(倫理面への配慮)

提供を受けた感染リスクの全くない乾燥標本を検鏡したのみであり倫理面での問題はない。

C. 研究結果

(Table 1)

標本の保存状態が悪く(42.7%が同定不可能)外部形態に拠る同定は困難を極めたが、合計196個体については種同定までこぎつけた。10地点から11種が同定された。最も多かったのは *An. subpictus* で全体の40%を占め、Malayal Sibuco Zamboanga del NorteとPhase 4, Brgy. Batungan Tugawan Zamboanga del Surの2採集地点を除く全ての採集地点で見つかった。フィリピンでの重要マラリアとされる *An. flavirostris* は4地点から、*An. litoralis* は、5個体のみであるが3地点から採集されていた。

D. 考察

一定の水域に発生し、生涯飛翔範囲内の一定空間にて休息し、その範囲に生息する吸血可能な動物から吸血しているマラリア媒介蚊の生存は、当然のことながら環境変化の影響を受ける。本年度は、地震、地滑り、洪水などの自然災害が発生したフィリピンの数州において採集されたマラリア媒介蚊成虫標本の提供を受け、その種類構成を明らかにすることから、被災地のマラリア感染リスクを媒介蚊の側から評価しようとした。またその結果から我が国の被災に係る疾病媒介蚊対策に有益な情報も得よう

とした。

3州に亘る被災地のサンプルから3種の有力なマラリア媒介蚊が見つかった。このうち最も採集個体数が多く、またほとんどの採集地点で見つかった *An. subpictus* は、東南アジアからインド、スリランカにかけて広い地域で媒介に与っている種で、丘陵地から臨海地まで広い範囲に分布している。一方、*An. flavirostris* は丘陵地、*An. litoralis* は臨海地に発生するマラリア媒介蚊であるが、Tongol-Rivera, Kano (2007)によれば提供を受けたこれらの蚊の採集地は、何れも丘陵地が海岸に迫った平野部の無い地形を成しているという。このような地形は、自然災害の観点からみれば地震、津波、地滑り、洪水等、特に地震と大雨に起因する災害の影響を大きく被る自然環境といえる。よって地震や大雨に起因する災害がマラリア感染リスクを増大させる可能性が示唆された。日本も山が海に迫った平野部の少ない地震国、多雨国である。我が国における地震や大雨関連災害の評価には、疾病媒介蚊への影響を読み込んでおくべき必要性も併せて示唆された。勿論、上記のマラリア媒介蚊は何れも我が国には生息するものではない。しかし沖縄の南西諸島には、*An. flavirostris* と近縁で、生息環境も発生水域を含めて類似している上、東南アジアの最重要マラリア媒介蚊の一種であるコガタハマダラカ (*An. minimus*) が普通に生息しており、一部では気候温暖化に伴う同種の北上も懸念されている。それ故、今回の結果は、少なくともコガタハマダラカ生息地でのモデルを提示したことになる。

E. 結論

フィリピンでは、地震と大雨に起因する災害の影響を大きく被る丘陵と臨海部の被災地から3種の有力なマラリア媒介蚊が採集された。このことから地震や大雨に起因

する災害がマラリア感染リスクを増大させる可能性が示唆された。我が国にも類似した環境と蚊の生息がある。地震や大雨関連災害の評価には、疾病媒介蚊への影響も読み込んでおくべき必要性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行 年等も記入）

Pilarita T. Rivera, Bobby A. Crisostomo, Elena A. Villacorte, Aleyla D. Escueta, Yoshihide Maekawa, Masahiro Takagi, Jocelyn Samaniego, Antonietta Ebol, Shigeyuki Kano: GIS and Malaria Surveillance, A study in disaster-prone malarious provinces in the Philippines. Pilarita Tongol-Rivera and Shigeyuki Kano eds., Free Press Co, Tokyo, 2007 (ISBN: 978-4-902358-04-9)

2. 学会発表

Rivera Pilarita T., Crisostomo Bobby A., Villacorte Elena A., Escueta Aleyla D., 前川芳秀、高木正洋、Samaniego Jocelyn., Ebol Antonietta, 狩野繁之： フィリピンの被災地域における地理情報システムによるマラリアサーベイランス. 第48回日本熱帯医学会大会（2007/10/12-13、大分）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

動物モデルを用いたマラリア重症化機構に関する研究- 特に脳性マラリア等重症マラリアの発症機序の解明および重症化の指標となるバイオマーカーの探索

分担研究者 松本芳嗣（東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授）

研究要旨 マラリア重症化の予知および重症マラリアの治療技術の開発のためにバイオマーカーの探索は必須である。さらに、これらのバイオマーカーに関する研究は不明な点が多く残されているマラリア病態形成機序の解明のため有用な情報を提供できるものとする。今年度はマラリア重症化のバイオマーカーとして尿中肝臓型脂肪酸結合タンパク (L-FABP) に注目して検討を行った。ヒト L-FABP (hL-FABP) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、マラリア感染の進行に伴い尿中 hL-FABP 排出量が増加することを示した。マラリア感染時における尿中 L-FABP の挙動は熱帯熱マラリアにおける様々な合併症の発症機序の解明にも有用な情報を提供すると考えられる。

A. 研究目的

マラリアはマラリア三大徴候と呼ばれる発熱、貧血、脾腫を主徴とする。ヒトの4種のマラリアの中で熱帯熱マラリアは悪性マラリアとも呼ばれ、三大徴候に加え、しばしば重篤な貧血、肺浮腫、腎不全、低血糖症等の合併症を伴い重症化し、また脳症状を伴う場合は適切な処置を施さなければ致死性である。マラリア重症化の予知、予防、診断および治療技術の開発のために重症化の指標となるバイオマーカーの探索は必須である。一方、熱帯熱マラリアにおいてみられる合併症の病態形成機序については未だ不明な点が多く残されている。マラリアの重症化に伴って変動するバイオマーカーの研究は、マラリア病態形成機序の解明のためにも有用な情報を提供できるものとする。

本分担研究者らは *P. berghei* 等ネズミマラリア赤内型原虫接種マウスおよび *P.*

falciparum 赤内型原虫接種リスザルにおいて原虫血症の亢進に伴い、感染動物が脾腫を呈すること、またこれらの脾腫が何れも赤脾髄における MRP8 および MRP14 陽性マクロファージの増加によることを明らかにした。MRP8 および MRP14 は炎症性サイトカインとしても知られている。そこで上述の感染動物の MRP8 および MRP14 の血中濃度を測定したところ、原虫血症の亢進に伴い MRP8 および MRP14 の血中濃度が増加することを明らかにした。マウス、およびリスザルを用いた実験系において、血中 MRP 濃度の上昇は脾臓における MRP8 および MRP14 産生マクロファージの増加に起因することが考えられた。これら動物実験により得られた成果をもとに、急性期のマラリア患者における重症度を判定するバイオマーカーとしての有用性を明らかにするため測定を行ったところ、MRP8 および MRP14 の血中濃度がマラリア重症度に相関して上昇すること

を明らかにした。

FABP (Fatty Acid-Binding Protein) family に属する肝臓型脂肪酸結合タンパク (L-FABP) は 14.4 KD の分子である。血中の遊離脂肪酸は血清アルブミンと結合し、糸球体で濾過された後、近位尿細管でアルブミンとともに再吸収される。遊離脂肪酸の取り込みは尿細管上皮細胞の L-FABP の発現を up-regulate することが知られている。細胞質内で L-FABP は遊離脂肪酸のミトコンドリアあるいはペルオキシソームへの移送に関与すると考えられている。また近年多臓器不全により尿中に L-FABP 排泄されることが知られ、微小循環障害のバイオマーカーとして注目され始めている (Yamamoto, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2007)。特に腎移植後の血流回復を示すバイオマーカーとしての有用性が示されている。一方、悪性マラリアである熱帯熱マラリアに特異的な病理学的所見として微小血管におけるマラリア原虫感染赤血球の内皮細胞への接着像 (sequestration) が知られており、脳性マラリアの発症に深く関わると考えられている。すなわち sequestration は全身の微小血管で起こるが脳実質の微小血管で sequestration が起こることにより血流障害と下流域の無酸素状態により昏睡等が引き起こされるものと考えられている。重症マラリアにおける hL-FABP の挙動に関してはこれまで全く報告がない。そこで今年度はマラリア重症化のバイオマーカーとして尿中 L-FABP に注目して検討を行った。マラリア感染時における尿中 L-FABP の挙動は熱帯熱マラリアにおける様々な合併症の発症機序の解明にも有用な情報を提供すると考えられる。

B. 研究方法

ネズミマラリア原虫の一種である *Plasmodium berghei* ANKA 株は Balb/cA マウ

スに対して 致死的な感染を惹起する。そこで感染実験では *P. berghei* ANKA 株赤内型原虫、動物は Balb/cA を遺伝的背景とするヒト L-FABP 遺伝子導入マウス (hL-FABP Tg マウス) を用いた (Kamijo, A. et al., J. Lab. Clin. Med., 2004)。受け身免疫の影響を避けるため *Plasmodium berghei* ANKA 株原虫を Balb/cA RAG-2 ノックアウトマウスに感染させ、実験に用いる感染赤血球のドナーとして用いた。感染 RAG-2 ノックアウトマウスより得られた新鮮な感染赤血球 1×10^6 個を hL-FABP Tg マウスおよびコントロールとして Balb/cA マウスに腹腔内接種した。マラリア原虫接種後、これらマウスにおける末梢血感染赤血球率をギムザ染色血液塗抹標本により測定した。また、連日、自然排尿によりスポット尿を採取した。尿中 hL-FABP 濃度は Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) (ヒト型 L-FABP 測定キット、IBL) により測定した。マラリア原虫感染 7 日目の感染 hL-FABP Tg マウスおよび Balb/cA マウスを剖検し、腎臓の病理組織学的解析を行った。コントロールとして非感染 hL-FABP Tg マウスの腎臓についても同様に病理組織学的解析を行った。

なお本研究における動物実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会および同遺伝子組換え生物等委員会の承認を受けて行った。ヒト試料は用いていない。

C. 研究成果

マラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種後の末梢血感染赤血球率は、接種 2 日目には hL-FABP Tg マウスにおいて 0.37%、Balb/cA マウスにおいて 0.43%であった。その後両マウスにおいて感染赤血球率は急激に上昇し、接種 7 日目には hL-FABP Tg マウスにおいて 49.43%、Balb/cA マウスにおいて 48.30%に達

し、感染率の差は認められなかった(図1A、B)。同様の方法、接種量で感染させた Balb/cA マウスは感染9日目までに全て死亡することがこれまでの実験から明らかとなっている。

hL-FABP Tg マウスにおける尿中 hL-FABP 量は、マラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種前で 17ng/ml、であったものが、感染の進行に伴い増加し、接種5日目で 187ng/ml、接種7日目では 631ng/ml に達した(図2A)。スポット尿を試料として用いたためクレアチニン補正 (hL-FABP (ng) /クレアチニン (mg)) を行った結果を図2B に示す。これらの結果は感染の進行に伴い尿中への hL-FABP の排出が著しく亢進したことを示している。

HE 染色における腎臓の病理組織学的検索では、hL-FABP Tg マウスにおいて(図3A) マラリア原虫感染 Balb/cA マウス(図3B) に比べ、近位尿細管の拡大、および近位尿細管細胞核の位置の異常が顕著であった。糸球体に顕著な差は認められなかったものの、hL-FABP Tg マウスにおいて軽度の萎縮像が観察された。

D. 考 察

ヒトでは L-FABP は腎臓において近位尿細管上皮細胞において産生され、一部は尿中に排出されるとされている(Kamijo, A. et al., J. Lab. Clin. Med., 2004)。さらに、腎毒性薬剤や虚血などのストレスによって近位尿細管細胞の L-FABP 発現が増加することが報告されている(Nakamura, T. et al., Am. J. Med. Sci., 2007)。一方マウスの L-FABP は腎臓においては産生されず、尿中に排出されることもない。hL-FABP Tg マウスにおける尿中 hL-FABP 排出量の増加、および病理組織像における近位尿細管の異常は、マラリア原虫感染によってマウス腎臓で hL-FABP の産生が亢進していることを示している。本研究によりマウスで得られた結果から尿中 hL-FABP がマ

ラリア重症化を示すバイオマーカーとして有用であることが示唆された。また、尿を検体として用いることができることから重症マラリアの診断のための新たな非侵襲的検査法としての有用性も期待できる。次年度はヒトマラリア特に熱帯熱マラリア患者における尿中 hL-FABP の測定を計画している。具体的にはバングラデッシュ ICDDR, B の協力のもと同国マラリア浸淫地域であるチッタゴン地域においてマラリア患者の血中および尿中 hL-FABP を測定し、マラリア患者における重症度との関連を検索する計画を立て準備を進めている。

マラリア感染によって何故、どのように腎臓で hL-FABP の産生が亢進するのかは今後の研究によって明らかにする予定である。マラリア原虫を接種した hL-FABP Tg マウスおよび Balb/cA マウスにおいて、感染後のマウスの挙動および末梢血感染赤血球率において差が認められなかったことから、hL-FABP Tg マウスは L-FABP のマラリア感染の病態に及ぼす影響を研究する上で有用なモデルマウスであることが示された。次年度はさらに経時的に血中および尿中 hL-FABP、MRP8 および MRP14 を測定するとともに、免疫組織化学的にマウス各組織における hL-FABP、MRP8 および MRP14 の発現を検索し、マラリア重症化との関連を明らかにし、重症マラリア発症機序の一端を明らかにする。

これらマラリアの重症化に伴って変動するバイオマーカーを探索することにより、重症マラリアの早期診断に貢献できるのみならず、発症メカニズムを分子レベルで解明する一助となる。さらに、重症マラリアの発症機序が明らかとなることで、新たな重症マラリアの治療法の開発および患者管理に関する医療の向上に貢献することが期待できるものと考えられる。