

## 博士論文 (要約)

### **Studies on experimental visceral leishmaniasis**

(実験的内臓型リーシュマニア症に関する研究)

長田 康孝

## 論文の内容の要旨

応用動物科学

平成 23 年度博士課程進学

氏名 長田 康孝

指導教員名 松本 芳嗣

論文題目 Studies on experimental visceral leishmaniasis  
(実験的内臓型リーシュマニア症に関する研究)

本博士論文の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

内臓型リーシュマニア症(Visceral leishmaniasis, VL)は *Leishmania donovani complex* に属する原虫によって引き起こされる原虫感染症で、世界で毎年 50 万人もの新規患者が発生し、WHO によれば早急にコントロールが必要な 6 大疾患の一つである。本症は脾臓、肝臓で原虫が増殖し、肝脾腫、発熱、貧血、消瘦などを引き起こし、適切な治療が施されなければ死に至る重篤な感染症である。しかしながら、VL の病態解析において有用な病態マウスモデルが確立されていないこともあり、*L. donovani* がもたらす VL の病態機序に関する研究は立ち遅れている。本研究は重篤な病態を再現出来る VL マウスモデルを確立し、病態解析、免疫学的生体防御機構の一端を明らかにし、さらに治療薬評価への有用性を示すことを目的としている。

第一章では持続的に病態が進行し、重篤な病態を示す VL マウスモデルの確立を目的とし、世界各地の *L. donovani complex* 分離株のマウスへの感染実験を試みた。そのうちネパール人 VL 患者より分離した *L. donovani* D10 (MHOM/NP/03/D10, 長崎大学熱帯医学研究所より分与)が BALB/c マウスに対して最も強い病原性を示すことを明らかにした。脾臓、肝臓における感染原虫数を各臓器の押捺標本を用いて LDU(Leishman Donovan units; 宿主有核細胞あたりの原虫数×臓器重量 mg)を指標に評価した結果、両臓器の LDU は経時的に増加しており、感染 12 週では脾臓で  $805 \pm 121$ 、肝臓で  $3,139 \pm 489$  であった。また両臓器重量を測定した結果、両臓器とも経時的に増加し、臓器重量は感染 12 週では未感染マウスと比較し、脾臓が約 8 倍、肝臓が約 1.4 倍に腫大し顕著な肝脾腫を呈し、病理組織学的解析の結果、両臓器で原虫感染宿主細胞の著しい浸潤

及び増加が観察された。*L. donovani* D10 株感染 BALB/c マウスが脾臓、肝臓における持続的な原虫の増殖、進行性の肝脾腫を示し、重篤な VL の病態を再現するマウスモデルになると考えられた。更に、*L. donovani* D10 株感染 BALB/c マウス末梢血からの PCR 法による原虫遺伝子の検出及び培養法による原虫の分離を試みたところ、感染 4 週目には原虫遺伝子が検出され、8 週目には生きた原虫が分離された。これらの結果は PCR 法の末梢血を試料とした早期診断法の可能性を示すとともに、感染時の原虫血症の実験的証明といえる。

本症の病態に関わるファクターの探索など免疫学的解析を行うためには、*L. donovani* 感染において病態の違いを示すマウスモデルの確立が必要である。第二章では近交系マウス 3 系統 (BALB/c、C57BL/6、C3H) における感染動態を検討した。重篤な VL 病態を示す BALB/c マウスに比べ、C57BL/6 マウスでは LDU が感染 12 週後では脾臓で  $96 \pm 67$ 、肝臓で  $329 \pm 122$ 、感染 24 週後では脾臓で  $82 \pm 66$ 、肝臓で 0 と、両臓器において BALB/c マウスに比べ明らかに原虫数が低く、また臓器重量を測定した結果、感染 12 週において脾臓重量は約 4 倍に増加したものの、感染 24 週後においても約 4 倍と変化はなく、BALB/c マウスのような明らかな進行性の脾腫は観察されなかった。すなわち感染はするが、進行性の病態悪化は見られず自然治癒すると考えられた。一方、C3H マウスでは両臓器において原虫の感染が確認されなかったうえ、臓器重量も重篤な肝脾腫を呈した BALB/c マウス及び一過性の脾腫を呈した C57BL/6 マウスとは異なり、肝脾腫は認められず抵抗性であると考えられた。*L. donovani* 感染において、明瞭な病態の違いを示す BALB/c、C57BL/6、C3H マウスにおける原虫抗原特異的 Th1 反応及び Th2 反応について、感染 12 週マウス由来脾細胞を原虫粗抗原で刺激した際の IFN- $\gamma$  及び IL-4 産生量を測定して評価したところ、培養上清中の IFN- $\gamma$  は BALB/c で  $1.93 \pm 0.26$  ng/ml、C57BL/6 で  $3.93 \pm 2.18$  ng/ml、C3H で  $5.34 \pm 1.18$  ng/ml であったのに対して、IL-4 は BALB/c で  $47.31 \pm 18.84$  pg/ml、C57BL/6 で  $3.06 \pm 2.46$  pg/ml、C3H で  $11.55 \pm 5.65$  pg/ml であり、*L. donovani* 感染に対して感受性を示した BALB/c マウスでは最も低い IFN- $\gamma$  産生、最も高い IL-4 産生を示し、Th2 型の免疫反応が誘導されたと考えられ、また自然治癒を示した C57BL/6 及び抵抗性を示した C3H は Th1 型の免疫反応が誘導されたことが考えられた。以上のことから、*L. donovani* 感染に対する感受性に Th2 反応、抵抗性に Th1 反応が関与していることが明らかになった。

現在本症の治療薬として 5 価のアンチモン製剤である sodium antimony gluconate が広く用いられているが、副作用が強く、薬剤耐性原虫の出現が問題となっており、新規治療薬の探索が緊急の課題である。本症の新規治療薬の探索には実験動物を用いた薬剤の in vivo 評価系が必要である。第三章では本病態マウスモデルを用いた治療薬 in vivo 評価系の有用性を示すことを目的とした。まず始めに褐藻類ヒバマタ目ホンダワラ科アズマネジモク (*Sargassum yamadae*) より

単離したキノテルペノイド 10 種について *in vitro* における原虫増殖抑制効果を評価した結果、10 種のうち 6 種が 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で 50%以上の増殖抑制効果を示した。100%の増殖抑制効果を示したキノテルペノイドについて、*in vivo* における原虫増殖抑制効果を検討した。対照として既知の治療薬である AmBisome (200  $\mu\text{g/head}$ )を用いた。感染 49 日後に剖検し重篤な VL を発症していることを確認後、30 日間の腹腔内投与(始めの 14 日間:1 mg/head、残りの 16 日間:2 mg/head)を行ったところ、治療終了翌日には双方の治療群の脾臓、肝臓において押捺標本を用いた LDU 及びより検出感度の高い培養法のいずれの方法でも感染原虫は観察されなかった。また、治療群及び未治療群の脾臓、肝臓重量を測定した結果、双方の治療群の臓器重量は、治療開始時より減少し、肝脾腫が改善されていた。尚、このキノテルペノイドを *sargaquinoidatic acid* と命名し、抗リーシュマニア症治療薬として特許を取得した。また、本マウスモデルが VL 治療薬の *in vivo* 評価に有用であることが示された。

本論文は、世界中の広い地域に蔓延し、猛威を振るう原虫感染症である内臓型リーシュマニア症に関して 1) *L. donovani* 感染において脾臓、肝臓で持続的な原虫の増殖、病態の悪化を伴い、重篤な VL 病態を再現出来るマウスモデルを作出し、その病態を解析し、2) 本症の重症化に Th2 型の免疫反応が、抵抗性に Th1 型の免疫反応が強く関わることを明らかにした。3) 本マウスモデルが VL 治療薬の評価に有用であることを示し、更に新規キノテルペノイド *sargaquinoidatic acid* が VL の新規治療薬候補化合物として有望であるところを示した。本論文で示した VL マウスモデルは本症の病態解析、免疫学的解析など基礎研究から、診断法、新規治療薬及びワクチンの開発など応用研究まで多岐に渡る VL の研究に有用であると考えられる。