

## 博士論文（要約）

Studies on severe manifestations in experimental rodent malaria

（ネズミマラリアにおける重症症状に関する研究）

山越 祥子

## 論文内容要約

応用動物科学 専攻  
平成 23 年度博士課程 進学  
氏名 山越 祥子  
指導教員 松本 芳嗣

論文題目 : Studies on severe manifestations in experimental rodent malaria.

(ネズミマラリアにおける重症症状に関する研究)

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  
に出版予定である。

*Plasmodium* 属原虫は寄生原虫のひとつであり、哺乳類の中でもヒトを含む霊長類及び齧歯類、哺乳類以外には爬虫類、鳥類での感染が報告されている。例えばヒトに感染する *Plasmodium* 属原虫は 4 種類あり、ヒトマラリアを発症させる。特に 4 種のうちの 1 つである熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)は原虫血症 (parasitemia) やヒトマラリア三大兆候である発熱、貧血、脾腫に加え脳性マラリア、肺浮腫、腎不全、不正出血を起こす事が知られている。ネズミに感染する *Plasmodium* 属原虫には thicket rat より分離された *P. berghei* を筆頭に *P. chabaudi*、*P. vinckei* 及び *P. yoelli* などが知られている。しかしながら *Plasmodium* 属原虫感染によるマラリアの発症機序は不明な点が多い。本研究では宿主の中でも実験的感染法が確立しているマウスを用いて、ネズミマラリアの病態形成機序の一端を明らかにすることを目的とした。

まず第1章ではネズミマラリア原虫 *P. berghei* を実験的に2系統の近交系 (C57BL/6、BALB/c)マウスに感染させ、どのような症状が起きるかを明らかにするため血液検査、行動評価及び剖検を行った。*P. berghei* ANKA 株感染赤血球  $1 \times 10^6$  個を腹腔内接種することにより C57BL/6 及び BALB/c に致死的な感染をおこさせた。感染3日目より両系統共に末梢血中に感染赤血球が認められ、その割合は感染3日目より急激に上昇し、感染6日目には約40%となった。ヘマトクリット値は両系統共に感染が進むにつれ著しく減少した。両系統共に感染5日目より立毛が認められ、感染6日目には踞る姿勢が観察された。C57BL/6 は感染約7日目に、BALB/c は感染約8日目に死亡した。感染6日目に C57BL/6 でのみ顕著な体重減少及び呼吸数の低下が認められた。マウスの運動障害及び意識障害を rapid murine coma and behavior scale (RMCBS)でスコア化した結果、C57BL/6 でスコアが顕著に減少した。感染6日目にマウスを安楽殺して剖検した結果、感染マウス脾臓重量は非感染マウスと比較し約3倍に達した。さらに C57BL/6 において皮膚での点状赤斑が認められた。以上の結果より *P. berghei* 感染 C57BL/6 及び BALB/c においては原虫血症や脾腫といったマラリア原虫感染に典型的な症状が見られた。また、parasitemia の上昇率は同程度であるにも関わらず C57BL/6 でのみ体重減少、意識障害や運動障害、さらに呼吸不全及び皮膚での異常出血が起きていた。以上第1章では *P. berghei* の実験的感染によってマウスに様々な症状が起き、さらに BALB/c に比べ C57BL/6 でより重篤ないくつかの症状がみられる事が明らかになった。

第2章、第3章では第1章において C57BL/6 で認められ、特に顕著な症状であった意識障害、呼吸不全に着目した。これら重症症状の発症機序の一端を血管機能の異常という観点から明らかにする事を目的として解析を行った。

第2章では第1章で認められた意識障害の発症機序の一端を明らかにするため脳の解析を行った。*P. berghei* ANKA 株感染赤血球  $1 \times 10^6$  個を C57BL/6 に腹腔内接種した。まず、感染マウスにおいて血液脳関門(Blood-brain barrier; BBB)の破綻を疑い、感染6日目にマウス尾静脈より Evans blue 溶液を投与し、1時間後マウスを安楽殺して心臓より PBS を投与する事により血管内の血液還流を行った。結果、脳実質への高度な Evans blue の浸出が示された。次に感染6日目にマウスを安楽殺して脳を採取、HE染色を行った。結果、大脳皮質領域の毛細血管内では赤血球が減少し、白血球の集中像が観察された。しかしながら血球成分の脳実質への浸出は認められなかった。そこで血漿成分である IgG に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った結果、大脳皮質の毛細血管だけではなく、その周囲実質も陽性反応を示した。以上の結果より *P. berghei* 感染末期の C57BL/6 の大脳皮質領域では毛細血管の透過性が亢進し、IgG を含む血漿成分が脳実質へ浸出する事が示唆された。ここから血漿成分の脳実質への浸出が脳浮腫をおこし、意識障害の病態形成の一助を担っていると考えられる。

第 3 章では第 1 章で特に顕著な症状を示した呼吸不全の病態形成機序の一端を明らかにするため肺の解析を行った。*P. berghei* ANKA 株感染赤血球  $1 \times 10^6$  個を C57BL/6 に腹腔内接種し、感染 6 日目にマウスを安楽殺して肺を採取、HE 染色を行った。非感染マウス肺では毛細血管や II 型肺胞上皮細胞が明瞭に観察されたのに対して、感染マウス肺では毛細血管内に鬱血像が観察され、肺胞壁の肥厚が認められた。さらに、一部の肺胞腔内が薄赤色に染色された事から液体成分が肺胞腔内に貯留していたと考えられる。次に感染マウスでの肺毛細血管の透過性の変化を Evans blue 投与方法により検討した。感染 6 日目にマウス尾静脈より Evans blue 溶液を投与し、1 時間後マウスを安楽殺して心臓より PBS を投与する事により血管内の血液還流を行った。結果、感染マウスの肺全体が濃く青く染色された。ここから毛細血管からの Evans blue の顕著な浸出が示され、肺胞の毛細血管の透過性が顕著に亢進している事が示唆された。以上の結果より *P. berghei* 感染末期の C57BL/6 の肺では毛細血管の透過性が著しく亢進する事で一部の肺胞腔内へ血漿成分が浸出すると考えられる。ここから肺浮腫がおき、呼吸不全発症の一助を担っていると考えられる。以上、第 2 章、第 3 章では C57BL/6 で認められた意識障害及び呼吸不全の発症機序に血管透過性の変化が関与する事が明らかになった。

第 4 章では妊娠中に特異的に形成され、胎子の発育に重要な役割を担う血管集合体である胎盤に着目して *P. berghei* が母体に感染した際の胎盤の病理学的変化を詳細に解析した。まず、*P. berghei* が母体に感染する事が胎子に与える影響について検討した。C57BL/6 を交配し、交配翌日に膈栓を確認した日を gestation day 1(G1)とした。G13 に *P. berghei* ANKA 株感染赤血球  $1 \times 10^7$ 、 $10^6$  及び  $10^5$  個をそれぞれ腹腔内接種して出産時の仔の死亡率及び重量を検討した。結果、仔の死亡率は非感染では 15%であったのに対して、順に 100%、64.71%、21.05%であった。また仔の重量は非感染では 1.26 g であったのに対して順に 0.76 g、0.98 g、1.18 g であった。よって母体が *P. berghei* 感染する事で胎子の生存率の低下及び重量の減少を起し、死産や低体重症を起す事が分かった。次に新生仔の死亡率が顕著であった  $1 \times 10^7$  感染母体での胎盤の病理学的変化を検討した。G13 に *P. berghei* ANKA 株感染赤血球を  $1 \times 10^7$  個を腹腔内接種し、G18 に母体を安楽殺して胎子の生存数を検討すると共に胎盤を採取し HE 染色を行った。結果胎子は全て死亡していた。マウスの胎盤は母体側より decidua、junctional zone 及び labyrinth zone の 3 層の細胞層より構成されているが感染母体の胎盤では junctional zone が labyrinth zone に異常に貫入し、また junctional zone に赤血球の集中像が認められた。Labyrinth zone では大型の核を持つ cytotrophoblast cell 及び syncytiotrophoblast cell が母体血液と胎子血液を隔てる胎盤関門を構成しているが、感染母体胎盤では cytotrophoblast cell の数が減少した。さらに syncytiotrophoblast cell に特異的に発現する syncytin に対する抗体を用

いて免疫組織化学的解析を行った結果、感染母体胎盤では染色部位の減少が認められた。ここから syncytiotrophoblast cell が破壊され、maternal blood space の拡張が示唆された。以上の結果より  $1 \times 10^7$  *P. berghei* 感染母体では出産前に母体胎内で胎仔が死亡し、この時胎盤構造の著しい変化が起きている事が初めて明らかになった。特に胎盤関門を構成している cytotrophoblast cell 及び syncytiotrophoblast cell の消失及び破壊は母体マウスの血流の異常を起し、胎仔の症状に深く関わると考えられる。

本研究により、ネズミマラリア原虫感染によっておこるいくつかの重症症状が明らかとなり、さらに血管透過性の変化がこれらの病態形成の一助を担っている事が示唆された。本研究によりネズミマラリアにおける重症症状の病態形成機序の一端が明らかとなり、これらの病態形成機序論に新たな一説を提供すると共に *Plasmodium* 属原虫感染によって起こるマラリアの発症機序解明に大きく貢献すると考えられる。