

博士論文

マラリア動物モデルを用いた 5-アミノレブリン酸および二価鉄
イオンの経口による併用投与の治療と防御効果の評価

鈴木 重雄

目次

要旨	3
略語一覧.....	5
1 序論.....	6
1-1 マラリア	6
1-2 マラリアの予防と治療	7
1-3 マラリア治療実験の動物モデル	10
1-4 5-アミノレブリン酸.....	12
1-5 マラリア原虫のヘム合成.....	13
1-6 目的	16
2 材料および方法.....	17
2-1 実験動物.....	17
2-2 化合物および投与液の調製.....	17
2-3 マラリア原虫と感染方法.....	18
2-4 投与方法.....	19
2-5 感染マウスのモニター	21
2-6 再感染.....	22
2-7 診断 PCR	23
2-8 ライセートおよび血清の調製.....	24
2-10 二次元電気泳動.....	27
2-11 抗原の推定	28
2-12 統計解析	28
2-13 倫理.....	29
3 結果.....	30
3-1 マラリアマウスモデルにおける ALA/SFC の薬効評価の予備検討	30
3-2 致死性マラリア原虫に感染したマウスに対する ALA/SFC の治療効果.....	31
3-3 治癒マウスの再感染に対する抵抗性.....	34
3-4 治癒マウスが獲得した持続性および特異的な抗体の解析.....	35
3-5 <i>P. yoelii</i> 17XL 特異的抗体に対応する抗原の推定.....	38
4 考察.....	41
4-1 抗マラリア薬としての ALA/SFC の可能性.....	41

4-2	げっ歯類とヒトに感染するマラリア原虫の比較.....	44
4-3	鉄と薬効の関係.....	45
4-4	ALA/SFC 投与で治癒したマウスが獲得した再感染防御の重要性	47
4-5	今後の展望	51
5	結論.....	53
	引用文献.....	54
	図表	75
	謝辞	92
	利益相反.....	93

要旨

マラリアの治療に利用されている既存の薬剤全てに対する薬剤耐性株が出現している事から、新規治療薬の開発が急務となっている。マラリア患者が5-アミノレブリン酸とクエン酸第一鉄ナトリウム（ALA/SFC）を含むサプリメントを摂取した結果、マラリア症状が軽減して早期回復を促進した。その後、ALA/SFC が熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の増殖を抑制する事が *in vitro* の実験で実証された。しかし、マラリア患者を対象とした臨床試験の実施するためには、動物モデルによりマラリア原虫に対する ALA/SFC の効果を確認する必要がある。そのため、本研究ではマウスマラリアモデルにおいて ALA/SFC の薬効・防御効果の評価を行った。致死性のマラリア原虫 *P. yoelii* 17XL をメスの C57BL/6J マウスに感染させ、ALA 塩酸塩、SFC、またはその併用で1日1回の経口による反復投与を行った。また、治癒マウスに対しては再感染に対する防御効果を調べた。さらに、二次元電気泳動、イムノブロットおよび nano LC-MS/MS 解析により防御に関与する抗体を推定した。対照群では全てのマウスが死亡したのに対し、ALA/SFC 投与群では半数以上のマウスが治癒した。また、治癒マウスは再感染に対して長期に渡り抵抗性を示し、そのメカニズムの一部は原虫特異的な抗体による事が示された。その中には代表的なマラリアワクチン候補を

抗原とする抗体が複数含有され、これらの抗体が感染防御に重要と考えられた。再感染に対する抵抗性を示した既存の化合物による治療に比べ、ALA/SFC は経口投与で有効である点でこれらを上回る利点を有していた。この様に、ALA/SFC はマラリアの治療だけでなく予防にも効果がある事が *in vivo* 実験で示された。従って、ALA/SFC の新規治療薬としての開発へ大きく前進した。

略語一覽

ALA	5-aminolevulinic acid
BLAST	basic local alignment search tool
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
MEGA-9	<i>n</i> -Nonanoyl- <i>N</i> -methyl- <i>D</i> -glucamine
MSP	merozoite surface protein
nano LC-MS/MS	nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry
PBS	phosphate-buffered saline
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFC	sodium ferrous citrate
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloric acid

1 序論

1-1 マラリア

マラリアは年間約2億人以上が感染して約44万人が死亡すると推定されているが、その被害を受ける人々の多くはサハラ砂漠以南の5歳以下の幼児であり(1)、グローバルヘルスの観点からも重大な問題の1つである。主な症状には周期的な発熱、貧血、脾腫などが挙げられるが、重症化すると悪性貧血、アシドーシス、そして脳性マラリア等を引き起こして死に至る(2)。マラリアは病原体である*Plasmodium*属のマラリア原虫の感染によって起こる疾患であり、ヒトに病原性を示す種にはこれまで熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*) の4種が知られていたが、近年、サルに感染するマラリア原虫である*P. knowlesi*がヒトにも感染する事が報告され、第5のヒトマラリアとして認識されている(3)。これらの中でヒトに対して最も致命的な症状を与える種は熱帯熱マラリア原虫であり、上述の脳性マラリアはこの種の感染によって引き起こされる。

マラリア原虫は*Anopheles*属のハマダラカによって媒介される。ほ乳類宿主への吸血時に唾液とともにスポロゾイトが体内に注入され、これが血流に乗って肝細胞に侵入

して分裂しメロゾイトを形成する(図1)。その後、破壊された肝細胞からこのメロゾイトが血流中に放出されて赤血球に感染する。赤血球内におけるマラリア原虫のステージを赤内期と呼ぶが、感染時に宿主に対して発熱などの症状を示すのはこの段階である。赤内期では、マラリア原虫はリング型(輪状体)、トロフォゾイト(栄養体)、そしてシゾン(分裂体)を経た後に感染赤血球を破壊し、メロゾイトが再び血流中に放出されて非感染赤血球に侵入し、このサイクルを繰り返す。赤血球に感染したマラリア原虫の一部は生殖母体(ガメトサイト)に分化するが、これにはマクロガメトサイト(メス)とミクロガメトサイト(オス)があり、ハマダラカの吸血により蚊体内に取り込まれた後に有性生殖を行い、複数の発育段階を経てスポロゾイトが形成される。スポロゾイトは最終的にハマダラカの唾液腺に侵入し、蚊の吸血時に宿主体内へ注入され新たな感染が成立する(4)(図1)。さらに、三日熱マラリア原虫および卵形マラリア原虫は肝細胞で休眠期の原虫(ヒプノゾイト)を形成して潜伏し、数ヶ月後あるいは1年以上経過してから再発が生じる。

1-2 マラリアの予防と治療

マラリア原虫の持つ複雑な生活環や鍵となる抗原分子に多型が存在する等の特徴に起因し、マラリアに対するワクチンの開発は非常に困難である(5)。そのため、これ

までのところ有効なワクチンは未だ実用化には至っていなかったが、GlaxoSmithKline社がビル&メリンダ・ゲイツ財団からの資金援助を受け、PATH Malaria Vaccine Initiative等の機関と共同開発した世界初のマラリアワクチン、RTS,S/AS01が2015年7月に欧州医薬品庁から承認勧告を受領した(6)。これに続いて、日本の大阪大学微生物病研究所の堀井俊宏教授のグループが開発中のマラリアワクチン、BK-SE36は第I相臨床試験で安全性だけでなく免疫原性においても良好な結果を示し(7)、第II相臨床試験に進む事が予定されている。しかし、これらのワクチンは実用化前の段階であるため、マラリア流行地域では殺虫剤浸漬蚊帳（オリセット®ネット等）の使用や殺虫剤の室内残留性噴霧が現在も有効な予防策として実行されており(1, 8)、海外渡航者はメフロキンやマラロン（アトバコン・プログアニルの合剤）等の抗マラリア薬の予防内服により発症を未然に防いでいる(9)。しかし、予防内服に使用される薬剤は以前に比べれば軽減されたとはいえ(10)、未だにその副作用が問題となっている。

マラリアに対する治療薬としては、キニーネ、クロロキン、ファンシダール（サルファドキシシン・ピリメサミンの合剤）、メフロキン、マラロン等が臨床で使用されている。現在主力の化学療法となっているのがアルテミシニン併用療法であるが、これはヨモギ科の*Artemisia annua*から発見されたアルテミシニンまたはその誘導体と既存の抗マラリア薬との併用で、非常に高い治療効果を持ちWHOにより使用が推奨され

ている(11, 12)。そして、肝臓内に潜伏するヒプノゾイトに対してはプリマキンが唯一有効な治療薬である。さらに最近では、ガメトサイトを標的とした阻害剤探索も進められており、伝搬阻止薬としての利用が期待されている(13)。

マラリアの化学療法において大きな問題となっているのが薬剤耐性マラリア原虫の存在である。かつてはクロロキンがマラリア治療薬として広く用いられてきたが、1960年代後半にタイでクロロキン耐性のマラリア原虫が出現して以来東南アジア諸国へ拡散し、またその後もアフリカや南米でも報告され、マラリアによる死者が再び増加する原因となった(14)。クロロキンに続いて開発されたファンシダールやメフロキン等に対する耐性原虫もその後出現し(15)、さらに、最も効果的な治療法であるアルテミシニン併用療法による治療遅延（治療開始72時間後においても末梢血中に原虫が存在する事）が確認され(16)、アルテミシニン耐性株として認識されるに至る。そして、このアルテミシニン薬剤耐性株はタイ-カンボジア国境付近で出現し東南アジアに拡散しつつある(17-19) (図2)。耐性株の出現と拡散の背景の中、マラリアを予防または治療するために重要な点は、既存の治療薬とは異なる作用機序や構造を持つ化合物や、安全性が高く予防効果を併せ持つ化合物(20, 21)を新規抗マラリア薬として開発する事である。そのためには既存の薬剤に対する耐性獲得のメカニズムを解明し(15, 22-27)、病原体としてのマラリア原虫を基礎研究により分子レベルで明確に理解

する事が必須であり、そしてその知見を臨床へ応用するための橋渡し研究等のアプローチが極めて重要である。

1-3 マラリア治療実験の動物モデル

臨床応用への橋渡し研究として、動物実験系で抗マラリア薬やワクチン候補を評価する事は非常に重要なプロセスである。しかし、マラリア原虫は宿主特異性が極めて高いため、動物種間の壁を越えて感染が成立する事は稀である。言い換えると、ヒトマラリア原虫の*P. falciparum*や*P. vivax*等はヒトまたは一部の非ヒト霊長類にのみ感染が可能であり、また*P. berghei*、*P. yoelii*または*P. chabaudi*等げっ歯類マラリア原虫はヒトに感染することができない。リスザルなどの非ヒト霊長類には*P. falciparum*は感染可能で、かつヒトと同様に発熱などの症状を呈するなど、ヒトの臨床例に近い病態を再現できるため非常に有益なモデルであるが(28)、サルを実験に用いる倫理的なハードル、高いコストや限定された実験施設等、サルモデルを使用するためには多くの条件が要求されるため、その実施は容易ではない。この問題を解決するため、免疫抑制マウスにヒトの赤血球や肝臓を移植したヒト化マウスが開発され、ヒトマラリア原虫の感染が可能になったマウスモデルが利用されている(29)。血液培養系がほとんど確立されておらず、また肝臓におけるヒプノゾイトの研究が重要視されている*P. vivax*

では特に有用なモデルではあるが、定期的なヒト赤血球の移植が必要なため維持は煩雑であり、またマラリア原虫をこのモデルに適応させる必要もあり、これが正しい表現型を示さないケースもある(29)。この様な背景から、抗マラリア薬の評価にはげっ歯類マラリア原虫を用いたマウスモデルが一般的であるが、マウスの系統とマラリア原虫の種の組合せが症状や感染率の推移といった表現型に大きく影響を及ぼすため、適切なモデルを検討する必要がある。尚、マウスモデルの中には*P. berghei* ANKAを使用して実験的に脳マラリアを引き起こす重症マラリアモデルがあるが、マラリア流行地域の通常治療に要求される経口薬(30)の開発を目的とした抗マラリア薬の治療実験では、次の2つの理由から重症マラリアモデルは適切ではないと考えられる。(i) 脳マラリアモデルでは感染率が上昇する前に脳マラリア症により治療中のマウスが死亡する事もあり、治療効果の評価には不適當な点があるため、また (ii) 実際の重症マラリア治療では注射剤や座剤が利用されている事から、経口投与薬の開発とは目的が合致しないためである。

感染方法に関しては、ハマダラカの吸血による感染方法の方が現実の感染に即しているのが理想的ではあるが、マラリア原虫が感染したハマダラカを飼育する施設も必要でありその維持も煩雑である。これに対し、感染赤血球の腹腔内接種は必要とする設備も少なく手技もより簡便であり、実際にマラリア症状を起こす赤内期原虫への影

響を見ることが可能であることから、マラリアマウスモデルで薬効評価を行う場合は感染赤血球の接種が一般的である。以上の理由を十分に考慮し、研究目的に合った適切な動物モデルや感染ルートを選定することが非常に重要である。

1-4 5-アミノレブリン酸

5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid, ALA) は、植物、細菌、カビから動物に至るまで普遍的に存在する天然アミノ酸であり、クロロフィル、ビタミンB₁₂、およびヘムなどのテトラピロール化合物の前駆体である(31)。一般的に、光合成能を持たない真核生物では、ALAはグリシンとサクシニルCoAを出発物質としてALA synthaseにより生成するShemin経路を介して合成される(32)。がん細胞が大量のALAを取り込むとこれを材料にヘムの合成が開始されるが、がん細胞では鉄を挿入する最後の反応ステップを触媒するferrochelataseの発現量が低く、このステップが律速となるため(33, 34)、鉄を含まないプロトポルフィリンIXがミトコンドリアに蓄積する。プロトポルフィリンIXは光感受性物質であり紫色光(405-415 nm)を照射すると赤色蛍光(617-673 nm)を発する事から(35)、プロトポルフィリンIXを蓄積したがん細胞を容易に検出できる(36, 37)。さらに可視光を照射すると活性酸素種を生成してがん細胞を死滅させる事が可能である(34, 38)。これらの特徴から、ALAはがんの光線力学的診断および光線

力学療法として医療分野で利用されている(37, 39-41)。さらに、糖尿病前症のボランティアに対してALAおよびクエン酸第一鉄ナトリウム (sodium ferrous citrate, SFC) の併用投与を行った大規模臨床試験では、II型糖尿病の発生リスクを減少させる事が示されている(42, 43)。医療分野以外においても、ALAはクロロフィルに変換されるため園芸肥料として、またヘムに変換されるため化粧品や栄養補助食品として中東やアジア諸国で承認され販売されている。

1-5 マラリア原虫のヘム生合成

マラリア原虫のヘム生合成酵素群は3つの細胞区画、即ちミトコンドリア、細胞質、そしてアピコプラスト（植物の葉緑体に由来するが光合成を行わないオルガネラ）に分かれて局在している（図3）。ミトコンドリアのALA synthaseによりALAが生成してアピコプラストに輸送され、3つの酵素、ALA dehydratase、*porphobilinogen decarboxylase* および *uroporphyrinogen III decarboxylase* によりコプロポルフィリノーゲン III まで変換される。コプロポルフィリノーゲン III は細胞質に排出され、*coproporphyrinogen III oxidase* によるプロトポルフィリノーゲン IX への変換後、ミトコンドリア内に運搬されて *protoporphyrinogen IX oxidase* によってプロトポルフィリン IX に変換され、最後に *ferrochelatase* がプロトポルフィリ

ン IX に鉄を挿入してヘムが合成される(35, 44-46) (図 3)。一方、ほ乳類細胞では ALA dehydratase、porphobilinogen decarboxylase および uroporphyrinogen III decarboxylase は細胞質に、そして coproporphyrinogen III oxidase はミトコンドリアに存在し、マラリア原虫とは対応する酵素の局在が異なっている(47, 48)。ALA dehydratase は有望な薬物標的として考えられており(49, 50)、またアピコプラストはマラリア原虫の生存にとって非常に重要である事から(51)、ヘム生合成経路を標的とする事で新規治療薬の開発に繋がる事が期待される。興味深い事に、ソロモン諸島において小児のマラリア患者がサプリメントとして ALA リン酸塩と SFC のカプセル（それぞれ 50 mg および 57.36 mg）を 1 日 1 個摂取したところ、発熱、頭痛、吐き気などの典型的な症状が改善され早期回復を促進した事が報告されており、ヒトのマラリア症例のために有効である事が示されている(52)。しかし、ALA と SFC がどのようなメカニズムでマラリア症状を改善したのかはこの報告では明らかにされていない。このソロモン諸島における事例を考えるうえで、関連する研究としては次の様なことが報告されている。すなわち、ヘム生合成はヘムによるネガティブフィードバック機構により ALA synthase による ALA 生合成を抑制するため律速段階となっているが、細菌、植物、マウスやヒトといった幅広い生物種が外因性の ALA を取り込むと ALA synthase による律速を迂回し、ferrochelatase が次の律速酵素になり特定の細胞や組織に過剰の

プロトポルフィリン IX が蓄積されると考えられている(53)。マラリア原虫においても同様の事が起こり、過剰の ALA を添加するとプロトポルフィリン IX が蓄積し、光を照射すればがん細胞と同様に増殖抑制を引き起こすという仮説を Smith と Kein は立てた(54)。これを検証するために ALA による光線力学療法をマラリア原虫に適用したところ、0.2 mM の ALA と白色光への曝露を組み合わせる事によって熱帯熱マラリア原虫の増殖をほぼ完全に抑制する事が *in vitro* (血液培養) の実験で証明された(54)。

しかし、この研究は輸血用血液からマラリア原虫を除去する事を目的に実施されたものである。一方、実際に宿主体内のマラリア原虫に光を効果的に照射する事は非常に困難であり、マラリア患者の治療としては現実的ではない。私の所属する研究グループではこの方法を臨床治療に適応させるために光照射の代わりとなる条件を探索し、またソロモン諸島での事例のメカニズムを明らかにするため、*in vitro* (血液培養系) の実験により検証を行った。がん細胞において金属化合物と ALA を組み合わせる事でヘム中間体の蓄積量が変動する報告(38)に着目し、マラリア原虫でも同様の事が生じて増殖を阻害すると予想して金属化合物のスクリーニングを行った(35)。この結果、ALA に SFC などの二価鉄イオンを組み合わせると熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害する事を見出し、マラリア患者への投与薬として応用できる可能性が示された(35)。

この結果はソロモン諸島でのマラリア症状緩和の原因を示唆している。これらの知見から、ALA と SFC の併用はマラリアに対する有望な新規化学療法として期待される。

1-6 目的

これまでに *in vitro* の実験系とソロモン諸島でのサプリメント摂取例で ALA と二価鉄イオンの効果が示されている事から、マラリア患者に対する大規模臨床試験へ進む事を検討している。そのためには、体内動態（吸収・分散・代謝・排泄・毒性）や免疫応答といった条件を含む動物実験で宿主体内における薬物のマラリア原虫への影響をより詳細に観察する事が重要であり、マラリアの動物モデルで ALA と SFC による併用療法の有効性を実証する必要がある。本研究では、げっ歯類に感染するマラリア原虫で致死株である *P. yoelii* 17XL を C57BL/6J マウスに感染させ、ALA と SFC を経口投与して治療効果の評価を行った。さらに、ALA と SFC の投与により治癒したマウスの免疫能を調べるために、治癒マウスの再感染に対する抵抗性について検討した。

2 材料および方法

2-1 実験動物

近交系のBALB/cマウスおよびC57BL/6Jマウスは日本チャールス・リバー株式会社から購入した。マラリア原虫の継代や初感染のためには4から5週齢のメスの未感染マウス（BALB/c: $21 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ 、C57BL/6J: $17 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ 、平均 \pm 標準偏差）を、再感染時のコントロールのためには17週齢のメスの未感染C57BL/6Jマウス（ $23 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ 、平均 \pm 標準偏差）を使用した。マウスは東京大学医学部の動物施設において維持され、市販の標準的なペレット飼料であるCE-2（日本クレア株式会社）および水道水を自由に摂取できるようにして与えた。

2-2 化合物および投与液の調製

5-アミノレブリン酸塩酸塩（ALA塩酸塩）はコスモ石油株式会社から入手し、SFC（日本では食品添加物としても認可されている）は小松屋株式会社から提供されたものを用いた。滅菌済みの0.5%のメチルセルロース及び濃塩酸は和光純薬工業株式会社から購入した。ALA塩酸塩は滅菌0.5%メチルセルロースに溶解して治療群マウスへの投与に用いた。ALA塩酸塩とSFCの併用（ALA/SFC）投与を行うグループに対して

は、上述のALA溶液とSFCを混合する事により溶解して投与液とした。SFC単独の治療群のためには、0.3 M塩酸（最終濃度）を含む滅菌0.5%メチルセルロースを調製してこれにSFCを溶解し投与に供した。これはSFCが酸性溶液へは容易に溶解するが、中性付近ではほとんど溶解しない特徴のためである。また、水溶液中のSFCは徐々に二価鉄から三価鉄に酸化されるため、SFCの溶解は投与する直前に行った。

2-3 マラリア原虫と感染方法

致死株であるげっ歯類のマラリア原虫*P. yoelii* 17XLおよび*P. berghei* NK65は杏林大学医学部感染症学講座寄生虫学部門の小林富美恵教授および新倉保博士より分与された。致死株とは、一度マラリア原虫による感染がマウスに成立すると、適切な治療処置を行わない場合、感染マウスが死亡する程度の病原性を持つ株の事である。ヒトのマラリア原虫*P. falciparum* 3D7は東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室で保管・維持されている株を使用した。尚、*P. falciparum* 3D7は患者から単離されたNF54株を親株としてクローニングされた株であり(55)、実験室で一般的に用いられている薬剤感受性株である。マウスに対するマラリア原虫の感染方法としては感染赤血球の腹腔内接種を採用し、先行研究で報告されている方法(56)を参考に次の様に感染を実施した。-80 °Cで凍結保存されたげっ歯類マラリア原虫を解凍してPhosphate-buffered

saline (PBS) で希釈し、これを継代用の未感染マウスの腹腔内に接種して感染させ、さらにこの感染マウスから別の未感染マウスに継代してマラリア原虫の感染能を確実なものとした。継代後の感染マウスから採血した感染赤血球を 1×10^5 個/mLの濃度になるようにPBSで希釈し、100 μ Lを治療実験で用いるマウスの腹腔内に接種して感染を開始した（1匹当たりの感染赤血球 1×10^4 個）。マウスからの採血はヘパリン処理をしたシリンジおよびニードルを用いて心臓穿刺により行った。*P. falciparum* 3D7の培養は先行研究と同様の方法で実施した(35)。尚、*P. falciparum* 3D7の培養は共同研究者の東京大学大学院医学系研究科生物化学教室の小松谷啓介博士が行った。

2-4 投与方法

あらかじめ体重を測定したマウスを、予備検討では1群あたり5匹（BALB/c- *P. berghei* NK65感染系）または3匹（C57BL/6J- *P. berghei* NK65およびC57BL/6J- *P. yoelii* 17XL感染系）、そして本実験では1群あたり5匹の6つの投与群（グループAからF）に無作為に振り分けた。治療は感染後1日目から開始して1日1回の反復投与を行い、感染マウスが治癒するまで（約5週間）継続した（マウス治癒の判定基準は方法2-5を参照）。ゾンデを用いた経口投与で行い、100 μ Lの投与液を各投与群の感染マウスに与えた。投与液の組成および用量は次の通りである。予備検討では、これまでにインフ

ルエンザや糖尿病のマウスモデルにおけるALA/SFC投与実験によって毒性を示さず治療効果を示す投与量を経験的に得ていることから、BALB/c-*P. berghei* NK65の感染系ではALA/SFC 300/100 mg/kgに、C57BL/6J-*P. berghei* NK65およびC57BL/6J-*P. yoelii* 17XLの感染系ではALA/SFC 300/300 mg/kgに設定した。この予備検討の結果を受け、本実験では次に示す投与量に設定した。グループA（コントロール）は、Vehicleである滅菌済み0.5%メチルセルロースを投与した。グループBとCはそれぞれ600 mg/kg ALA塩酸塩単独、または300 mg/kg SFC単独を投与した。グループD、EおよびFは、それぞれALA/SFCを100/300、300/300および600/300 mg/kgの用量で投与した。本実験の全体的なスケジュールは図5に示した。グループAおよびEは独立した実験を2回行い、n=10となっている（図6および表1）。

尚、本研究で用いたマウス飼料は100 g当たり30 mgの元素鉄を含有している（URL: http://www.clea-japan.com/en/diets/diet_a/a_03.html）。また、C57BL/6Jマウスは1日当たり約3 gの飼料を摂取する（飼料販売元の日本クレア株式会社による）。従って、本研究で用いたマウスは1日あたり約1 mgの元素鉄を飼料から摂取する事が予想され、この量は約60 mg/kgに相当する。

2-5 感染マウスのモニター

感染マウスの尾の先端を切断して採血を行い、スライドグラス上に薄く塗抹してメタノールで固定した後、ギムザ染色液（メルク株式会社）で染色した。500から10,000個の総赤血球を顕微鏡下で観察し、その中に含まれる感染赤血球の割合として感染率（%）を算出した。投与開始から1ヶ月間は2日から4日に1回、その後は1週間に1回感染率を算出した。また、生存率は生存するマウスの数を毎日計数する事によって評価した。さらに、各マウスの体温および体重を感染前に測定し、感染後は1週間に1回測定した。体温は動物用微小温度計BAT-12R（Physitemp Instruments Inc.）を使用して直腸温を測定した。生存したマウスからマラリア原虫のDNAが診断PCR（方法2-7を参照）により検出されなかった時点で感染マウスが治癒したと判断した。

本研究での初感染におけるフォローアップ期間は次の様に決定した。非常に少ない数のマラリア原虫（例えばマウス1匹当たり3匹の原虫）を静脈内接種してマウスに感染させた場合でさえ、感染後8日目の時点で、通常10匹中3から5匹のマウスで感染率が顕微鏡で観察できる程度（0.05から0.1%）まで上昇する(57)。従って、感染マウスが治癒したと判定された時点から1週間後の診断PCRが陰性であった場合に、マラリアの再発が起きなかったと判断した。PCRの感度を考慮するとこの判断は妥当であると考えられるため、この時点を超えて初感染のエンドポイントと定義した。

2-6 再感染

ALA/SFCによって治癒したマウスの再感染に対する抵抗性を調べるために、10匹の治癒マウスについて初感染から治癒して6週間後（17週齢、n=4）および33週間後（44週齢、n=6）に、初感染と同様の方法で同じ株のマラリア原虫を用いて再感染を実施した。感染間隔は先行研究を参考に次の様に決定した。Monerizらは薬剤により感染マウスを完治させて40日後に再感染を実施しており(56)、これと比較するために完治6週間後に再感染を行った。また、Azcarateらは完治75日後にブースト免疫のために再感染を行い、340日後に3回目の感染を実施して長期の防御効果を観察している(58)。

本研究ではALA/SFCの投与などで治癒したマウスがブースト免疫を施すことなく長期の防御効果を発揮できるかを調べるため、Azcarateらの実験の2回目と3回目の感染間隔（265日）と同程度の完治33週間（231日）後に再感染を実施した。17週齢の治癒マウスに対する再感染でのコントロールとして、未感染マウス（17週齢、n=5）を感染させた。また、44週齢の治癒マウスへの再感染実験については、同じ週齢のマウスを用意する事が非常に困難であり、また5週齢と17週齢の未感染マウスの間で*P. yoelii* 17XLに対する感染性に差は見られなかった事から、5週齢の未感染マウス（n=5）を

コントロールとして用いた。再感染およびコントロールマウスは、感染率、生存率、そして診断PCRにより1ヶ月間モニターして再感染に対する防御効果を評価した。

2-7 診断 PCR

感染マウスおよび治癒マウスの尻尾の先端を切断して得られた約20 μ Lの血液をヘパリン処理した後、DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (株式会社キアゲン) を用いて全DNAを抽出した。*P. yoelii*のミトコンドリアゲノムは核ゲノムと比べて約150倍のコピー数がある事から(59)、これにコードされる遺伝子の増幅により診断PCRにおいて高い感度を得られることが期待される。そのため、抽出した全DNAを鋳型に*P. yoelii* 17XLのミトコンドリアゲノムにコードされているシトクロム*b*遺伝子(*cob*)の部分配列426塩基対を、MightyAmp[®] DNA Polymerase Ver.2 (タカラバイオ株式会社) を用いてホットスタートPCRにより増幅した。プライマーペアの塩基配列は、5'-CTA ATC CTT TAG GGT ATG ATA CAG CA-3'および5'-CTT GTG GTA ATT GAC ATC CTA TCC A-3'である。反応サイクルは次の通りである。最初に95 °Cで2分間変性した後に、95 °Cで20秒間の変性、60 °Cで20秒間のアニーリング、そして72 °Cで15秒間の伸長のサイクルを30回行い、最後に72 °Cで3分間の伸長反応を行った。PCR産物は1.2%アガロースゲル上での電気泳動後、SYBR[®] safe (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用い

てバンドを検出し、LAS-4000 mini (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を使用して泳動画像を取り込んだ。*P. yoelii* 17XLに感染後治療を施していないマウスの感染血液から抽出した全DNAをPCRのポジティブコントロールとし、増幅反応時には毎回このサンプルを用いた。

2-8 ライセートおよび血清の調製

各種ライセート調製用の感染赤血球は次の様にして得た。未感染マウス、*P. yoelii* 17XLおよび*P. berghei* NK65感染マウスからヘパリン処理をしたシリンジおよびニードルを用いて心臓穿刺により約500 μ Lを採血して非感染赤血球および感染赤血球を得た。また、*P. falciparum* 3D7の感染赤血球は血液培養から直接得た。尚、*P. falciparum* 3D7ライセートの調製は共同研究者の東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室の小松谷啓介博士が行った。これらを用いて先行研究で報告されている方法(56)の一部を改変して次の様にライセートを調製し、抗原として使用した。採取した非感染赤血球および感染赤血球は0.075%のサポニン処理により赤血球を破壊し、5,800 \times g、4 $^{\circ}$ Cで10分間遠沈した。その後、膜タンパク質の抽出に一般的によく用いられる、両性界面活性剤である3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS) および非イオン性界面活性剤である*n*-Nonanoyl-*N*-methyl-*D*-glucamine (MEGA-9) を含む

細胞溶解液 [20 mM Tris-HCl pH 8.0、50 mM NaCl、3% (w/v) CHAPS、1% (w/v) MEGA-9]

でペレットを懸濁し、4 °Cで15分間攪拌した後に凍結融解を3回繰り返してタンパク質を抽出し、12,000 × g、4 °Cで10分間遠心して上清を回収してライセートを得た。

本研究で用いた赤血球破壊方法ではゴースト赤血球（赤血球の形状を保っているが中身が空になったもの）にはならず赤血球を破壊することが出来るが、赤血球膜の断片が残存している可能性もあるため、非感染赤血球のライセートをネガティブコントロールとして調製した。

血清の調製のために、未感染マウス、初感染30日後の感染マウス、そして再感染1日前、5日後、および14日後の治癒マウス（44週齢）からヘパリン処理を行わずに眼窩静脈囊または尾静脈から血液を約50 μLを採取した。尚、眼窩静脈囊からの採血は共同研究者の千葉大学大学院医学研究院感染生体防御教室に現在在籍する彦坂健児博士が行った。これらヘパリン未処理血液を37 °Cで30分間インキュベートした後、4 °Cで一晩放置し血球成分を凝集させた。この後、6,000 × g、20 °Cで20分間遠心し、上清を回収して血清を得た。得られた血清は1匹あたり10-20 μL程度と非常に少量であったため、複数回の実験を行うには十分ではない。そのため、それぞれのマウスから調製した血清の一部を同じタイムポイントごとにプールし、マウス個体ごとではな

く再感染グループ全体の傾向を確認するために、転写膜上のマラリア原虫の抗原を検出するための一次抗体として使用した。

2-9 イムノブロット

各種マラリア原虫のライセート3 μg をSuperSepTM Ace (5-20%グラジエントゲル、和光純薬工業株式会社) を用いて30 mAの定電流で約1時間の条件でsodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った後にGelCodeTM Blue stain reagent (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社) によるクマシー染色を行い、または製造業者のプロトコルに従ってセミドライ法 (0.8 mA/cm²の定電流で1時間) によりImmobilon[®]-P PVDF膜 (メルク株式会社) 上に転写した。抗原に結合した一次抗体に対し、二次抗体としてanti-mouse IgG-horseradish peroxidase (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を結合させ、ECLPrime Western Blotting Detection System (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を使用して添付されたプロトコルに従って検出した。抗原タンパク質はLAS-4000 mini (GEヘルスケア・ジャパン) を用いて可視化した。

2-10 二次元電気泳動

P. yoelii 17XLのライセート (20または60 μg) をトリクロロ酢酸/アセトン沈殿により脱塩した。減圧乾燥によりTCAおよびアセトンを除去した後、沈殿物を膨潤液 [8 M 尿素、2% (w/v) CHAPS、40 mM DL-ジチオスレイトール、0.002% ブロモフェノールブルー、およびPharmalyte IEF, pH 3-10 (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) またはIPGバッファーpH 4-7 (GEヘルスケア・ジャパン株式会社)] 125 μL で膨潤させた。膨潤液に混和したサンプルは、等電点電気泳動用のストリップ (7 cm Immobiline DryStrip pH 3-10または4-7、GEヘルスケア・ジャパン株式会社) にロードし、Ettan IPGphorTM II Isoelectric Focusing System (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を使用して等電点電気泳動を行った。泳動条件は、20 $^{\circ}\text{C}$ で10時間以上膨潤させた後、300Vの等電圧で30分間、300から1,000Vまでのグラジエントで30分間、そして1,000から5,000Vまでのグラジエントで80分間、最後に5,000Vの等電圧で25分間である。泳動後のストリップを平衡化バッファーA [50mM Tris-HCl pH 8.8、6 M尿素、30% (v/v) グリセロール、1% (w/v) SDS、0.25% DL-ジチオスレイトール、0.5%ブロモフェノールブルー] で10分間平衡化し、続いて平衡化バッファーB [4.5%ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファーA] で10分間平衡化を行った。ストリップは二次元目の分離のため、7.5%または10%ゲル上にロードしてSDS-PAGEを行った。その後、2D-Silver stain-IIキット (コ

スモバイオ株式会社) または銀染色MSキット (和光純薬工業株式会社) による銀染色、あるいは方法2-8で調製した血清 (再感染14日目) を用いたイムノブロットによってゲル上のスポットを検出した。

2-11 抗原の推定

マラリア原虫のライセートをSDS-PAGEまたは二次元電気泳動により分離し、銀染色またはイムノブロットにより検出した。そして銀染色およびイムノブロットの結果を比較し、原虫特異的抗体と反応するスポットを選択してタンパク質同定用のサンプルとした。これらのサンプルをnano liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS) 解析およびMASCOT検索を日本バイオサービス株式会社に依頼した。得られた分析結果をBasic local alignment search tool (BLAST) 検索およびPlasmoDB (URL: <http://plasmodb.org/plasmo/>) を用いて関連遺伝子を見出し、ClustalWによりアミノ酸配列を比較して遺伝子ID等を確認した上で抗原を推定した。

2-12 統計解析

感染率は平均 + 標準偏差として表現し、そして各タイムポイントでの値はStudent's *t* 検定を用いて統計解析を行った。また、マウスの生存曲線はKaplan-Meier法

によって示し、Log-rank検定を用いて統計解析を行った。いずれの解析においても、 p 値が0.05未満であった場合にのみ統計的有意差があると判断した。すべての検定はGraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc.) を用いて実施した。

2-13 倫理

本研究の動物実験のプロトコルは、東京大学大学院医学系研究科の動物倫理委員会によって承認され（承認番号: 医-P11-053）、東京大学動物実験実施規則に従って実施した。ヒトに感染する熱帯熱マラリア原虫を取り扱う実験は東京大学大学院医学研究科の研究倫理委員会によって承認された（承認番号: 10050）。

3 結果

3-1 マラリアマウスモデルにおける ALA/SFC の薬効評価の予備検討

ALA/SFCによる熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害が*in vitro*の実験系で証明された事(35)を踏まえて、本研究では*in vivo*の実験系においてALA/SFCの抗マラリア効果を実証するため、BALB/cマウスとC57BL/6Jマウスおよびげっ歯類のマラリア原虫の*P. berghei* NK65（致死株）と*P. yoelii* 17XL（致死株）を用いた動物実験を実施した。そして、将来的にマラリア流行地域においてALA/SFCを実際の臨床治療に使用する事を視野に入れているため、経口投与を採用した。実際、ALA塩酸塩およびSFCはそれぞれ悪性神経膠腫の光線力学療法(60, 61)および貧血治療(62)のための経口薬として既に承認されている。投与は感染マウスが完全に治癒するまで、約5週間継続した。最初に、薬効評価に用いるマウスの系統とマラリア原虫の種の組合せを選定した。まず、メスのBALB/cマウスに強毒株の*P. berghei* NK65を感染させ、その後コントロール群にはPBSを、治療群にはALA/SFC 300/100 mg/kgを投与して、その治療効果を比較した。その結果、コントロール群に比べて治療群は僅かな増殖抑制を示したが、最終的には両群の感染マウス全てが死亡した（図4A）。次に感染に用いるマウスの系統をC57BL/6Jに変更し、これに対して*P. berghei* NK65および強毒株の*P. yoelii* 17XLを感染

させ、コントロール群にはPBSを、治療群にはALA/SFC 300/300 mg/kgを投与した。

C57BL/6Jマウスに*P. berghei* NK65を感染させたマウスは1匹のマウスを除き、全てのマウスが感染率20%に上昇する前に死亡した (図4B)。この組合せは上述の重症マラリアモデルが適切ではない事と同様の理由からALA/SFCの薬効評価に適してないと判断した。続いてC57BL/6Jマウスに*P. yoelii* 17XLを感染させた実験では、コントロール群は3通りの組合せの中では最も早く感染率が上昇してマウスが死亡したが、一方、治療群では3匹中2匹のマウスで穏和な増殖抑制を示して生存した (図4C)。先のソロモン諸島におけるALA/SFCサプリメント摂取例においてもマラリア原虫に対する穏和な増殖抑制効果が示唆されているため(52)、C57BL/6Jマウスと*P. yoelii* 17XLの組合せがALA/SFCの薬効評価に適切なモデルであると判断してその後の実験に用いた。

3-2 致死性マラリア原虫に感染したマウスに対する ALA/SFC の治療効果

続いて、予備検討で選択したマウスモデルによりALA/SFCの治療効果の本実験を行った。各投与群の感染後30日目の生存率を表1に示す。コントロールとして滅菌済み0.5%メチルセルロース (グループA)、300 mg/kgのSFC単独 (グループB)、またはALA/SFC 100/300 mg/kgの併用投与 (グループD) をした感染マウスはすべてが死亡した。死亡原因については、新生児や乳児においてマラリアと腸閉塞が併発する報告も

あるが(63, 64)その報告例はまれであり、マウスでは同様の症例の報告はない。本研究で死亡したマウスは毛並みの悪化、貧血や脾臓肥大といった典型的なマラリアの兆候を示した事から、貧血や臓器不全といった複数の症状が重なって死亡したものと考えられる。これらのグループに対し、ALA塩酸塩600 mg/kg単独を投与した感染マウス(グループC)は、致死性のマラリア原虫に感染したにもかかわらず2/5のマウスが生存した。さらに、ALA/SFCを300/300 mg/kg(グループE)または300/600 mg/kg(グループF)を併用投与した感染マウスは、それぞれ5/10および3/5が生存した。治療効果をより詳細に比較するための代表例として、グループA(コントロール)およびE(ALA/SFC 300/300 mg/kg)の生存曲線および感染率の推移を図7に示す。グループEのマウスの10匹中5匹が生存し、グループAと比べて生存率に統計的有意差が認められた($p < 0.05$ 、図7A)。感染率の推移に関しては、グループAの感染マウスでは感染率が80%まで上昇したが(図8A)、この傾向はげっ歯類に感染するマラリア原虫で特徴的な事である。ヒトに感染するマラリア原虫*P. falciparum*ではトロフォゾイトおよびシizont期の感染赤血球は血管内皮に付着し(sequestration)、脾臓による除去から逃れると考えられている。これは*P. falciparum*が感染赤血球表面に形成する、ノブと呼ばれる構造体が血管上皮細胞への結合に関与するためである。その為、ヒトのマラリア症例では末梢血にはリング期の感染赤血球のみ観察され、見かけ上の感染率は低く

なる傾向にある。げっ歯類に感染するマラリア原虫の場合はsequestrationが起こらないため、この様な高い感染率が観察される。感染率では2群間を比較して統計的有意差が見られたのは感染後11日目のみで ($p < 0.05$ 、**図7B**)、その他のタイムポイントでは統計的有意差がみられなかったものの、ALA/SFCの投与はげっ歯類のマラリア原虫の増殖を穏やかに抑制する事が示された (**図7B**)。In vitroの実験ではALA/SFCによる活性酸素種の産生と増殖抑制に関連がある事が示唆されているため (文献(35)、supplemental data)、マウスにおいても増殖抑制は同様の理由であると推測されるが、詳細については考察の章で言及する。生存マウスの感染率は感染後20日目から徐々に減少し、感染後1ヶ月以降は生存マウスの末梢血からは顕微鏡観察ではマラリア原虫は検出されなかった (**図7B**)。マウスが生存したグループCおよびFにおいても、グループEと同様の傾向を示した (**図8**)。コントロール群マウスにおいても慢性期 (感染10日後以降) に感染率の低下が観察されたが (**図7B**、**図8A**)、これは慢性期では獲得した抗体によって原虫の増殖が抑制されるためと考えられる(65)。また、この時期には新しい赤血球の産生と貧血が顕微鏡観察により認められた事から、感染赤血球が新たな赤血球により一時的に希釈される事により低い感染率が観察されたと考えられる。さらに、感染マウスの体温および体重は感染後2週間間に減少したが、その後これらの値は生存マウスでは徐々に回復した (**図9**)。

続いて、末梢血からのマラリア原虫の完全な排除を確認するために診断PCRを行った。マラリア原虫のミトコンドリアゲノム上の*cob*遺伝子の部分配列をPCRにより増幅し、マラリア原虫存在の指標とした。顕微鏡観察では感染後28日目の時点では生存マウスの10匹中3匹のみマラリア原虫が検出されたが（**図8**）、診断PCRの結果では生存マウスの10匹中9匹でマラリア原虫特異的遺伝子が検出された（**図10A**）。この結果は、顕微鏡観察に比べて診断PCRがより高い感度を持つ事を示している。感染後38日目では、生存マウスからマラリア原虫およびそのDNAのいずれも検出されず、マウスの治癒が確認された（**図8**および**10A**）。

3-3 治癒マウスの再感染に対する抵抗性

治癒マウスの再感染に対する抵抗性を調べるため、初感染の回復から6週間経過した17週齢の治癒マウス4匹に対して、初感染と同様に*P. yoelii* 17XL感染赤血球を腹腔内接種して再感染を試みた。コントロール群の未感染マウスは感染後に感染率が上昇して5匹すべてが死亡したが、一方再感染マウスは4匹すべてが生存し（**図11A**）、末梢血からマラリア原虫が全く検出されなかった（**図11B**）。これらの結果は、再感染後に複数のタイムポイント（再感染後3日目から27日目）で診断PCRを実施したがす

べて陰性であった事と一致した（**図10B**）。この様に、ALA/SFC投与によって治癒したマウスは再感染に抵抗性を示す事が分かった。

次に、この防御効果の持続期間を調べる目的で、残りの治癒マウス6匹に対して初感染の回復から33週間経過した時点（44週齢）で再感染を試みた。その結果、再感染7日目に感染率がわずかに上昇したが（1%以下）、その後すぐに抑制された（**図11B**）。また、これらの治癒マウス6匹すべてが再感染から生存した（**図11A**）。そして診断PCRの結果では、再感染後5日目に6匹すべての治癒マウスからマラリア原虫特異的DNAが検出されたが、その後は感染後28日目までDNAは検出されず（**図10C**）、マラリア原虫がマウスから排除された事が確認された。これらのデータは、ALA/SFC投与によって治癒したマウスに長期的な抵抗性が確立された事を示している。上記の再感染防御とその持続性については、この後の考察の章で詳しく言及する。

3-4 治癒マウスが獲得した持続性および特異的な抗体の解析

本研究と同様に薬剤による感染マウスの治療後に再感染を実施した先行研究において、液性免疫により再感染を防御する事が示唆されている(56, 58)。そのため、今回の実験で示された抵抗性のメカニズムも、液性免疫によるものであると推定された。この仮説を検証するために、マラリア原虫のライセート、未感染マウスおよび初感染

マウスから調製した血清、そして様々なタイムポイントの再感染マウスから調製した血清を用いてイムノブロットにより抗体について分析した。尚、マラリア原虫のライセートは赤血球由来のタンパク質も含まれる事が考えられるため、ネガティブコントロールとして未感染赤血球ライセートも泳動して抗血清による検出を行った。まず、未感染赤血球および*P. yoelii* 17XLライセート3 μg ずつをロードしてSDS-PAGEにより分離し、クマシー染色によって泳動像を確認した (図12A)。次にSDS-PAGE後のゲルをPVDF膜上に転写し、調製した血清により抗体を検出した。正常血清は未感染マウスの赤血球および*P. yoelii* 17XLのライセートのいずれとも特異的な反応を示さなかった (図12B)。この結果から、自己免疫性の抗体もマラリア原虫と特異的に反応する抗体のどちらも未感染マウスの血清中には含まれていない事が確認できた。一方、感染マウスおよび再感染マウスの血清は*P. yoelii* 17XLのライセート中の複数のタンパク質と特異的に反応してバンドとして検出された (図12CおよびD)。今回の実験では一次応答 (初感染) の期間に複数のタイムポイントで血清を採取していないため、二次応答 (再感染) における抗体産生の速度や量を一次応答と比較する事は出来ない。しかしここで重要な事は、初感染後30日目 (図12C) と44週齢の治癒マウスで再感染の1日前 (図12Dのパネル左) に調製した血清の間で、抗体の反応性にほとんど差が見られなかった事である。初感染の完治から再感染までには230日以上の間隔があり、

この期間に追加免疫は一切行っていないが、それでもマラリア原虫特異的抗体が長期間保持されていた事が示された。

これらの検討に加え、*P. yoelii* 17XL、*P. berghei* NK65および*P. falciparum* 3D7のマラリア原虫から得られたライセートに対してイムノブロットを行い、治癒マウスが獲得した抗体の種特異性を比較した（**図13B**）。各ライセートはタンパク質重量でノーマライズしており、それを示すためにSDS-PAGE後のタンパク質をクマシー染色で検出した（**図13A**）。*P. yoelii* 17XLのライセートと比べ、げっ歯類を宿主とするが別の種である*P. berghei* NK65のライセートに対しては4本のバンドが、ヒトを宿主とする*P. falciparum* 3D7のライセートに対しては3本のバンドのみが検出され、その交差反応はどれも低かった。げっ歯類マラリア原虫の種間では交差反応性が高いという可能性もあるが、これは抗原により異なると考えられる。例えば、*P. yoelii*、*P. berghei*および*P. chabaudi*のmerozoite surface protein (MSP) 4/5の組換えタンパク質を発現し、マウスに接種して抗体を作成して交差反応性を調べた研究では、げっ歯類マラリア原虫間では弱い交差反応を示すものから強いものまで様々であった(66)。今回の検討ではタンパク質重量でノーマライズしている事もあり、**図13B**の交差反応性は妥当であると考えられる。以上の事から、治癒マウスは*P. yoelii* 17XL特異的抗体を獲得した事が示された。

3-5 *P. yoelii* 17XL 特異的抗体に対応する抗原の推定

治癒マウスが獲得した *P. yoelii* 17XL 特異的抗体と反応する抗原を推定するために、*P. yoelii* 17XL のライセートを一次元 (SDS-PAGE) および二次元電気泳動 (等電点電気泳動 + SDS-PAGE) により分離し、銀染色またはイムノブロットにより検出した (図 14)。2つの検出方法による結果を比較し、両検出方法で共通して検出されたスポット中に抗体と反応した抗原タンパク質が含まれると予想された事から、共通するバンドおよびスポットを解析候補として9個選択した (図 14 中、円でマークしたバンドとスポット)。この時使用した銀染色キットにはグルタルアルデヒドを含み、これがアミノ酸を架橋して質量分析前のタンパク質のゲル内消化効率を低下させるため、同様の泳動を行ってグルタルアルデヒドを含まない銀染色により検出後、選択したスポットを回収して nano LC-MS/MS 分析に供した。

nano LC-MS/MS および MASCOT 検索による解析の結果、1つのスポットから複数のタンパク質候補が挙がったが、その多くは別種のマラリア原虫のオルソログであるか、あるいは MASCOT 検索で有意なヒットと判断されなかった候補であったため、これらは除外して1つまたは2つの候補に絞った。続いて確認作業として、得られた候補タンパク質を BLAST 検索や PlasmoDB を用いてデータベース検索し、関連するタンパク質

を複数選択してClustalWによりアミノ酸配列を比較し、最終的に対象となるタンパク質を推定した。この結果、同定されたタンパク質は以下に示すものである。1: MSP1の前駆体、2、3: MSP1前駆体の断片タンパク質で、サンプル調製中により切断されたものと推定される、4: MSP1-83 (プロセス後のMSP1)、5: heat shock protein 70、6, 7: heat shock protein 70の相同タンパク質Pfhs70、8: MSP7-related protein 2、そして9: early transcribed membrane proteinまたは未同定のタンパク質と推定された (図12および表2)。

MSP1はワクチン候補としてよく知られており臨床試験まで進んだタンパク質である(67, 68)。MSP7-related protein 2は5つあるMSP7-likeファミリータンパク質の1つであるが、これらの*P. falciparum*の組換えタンパク質をマウスに接種した結果、MSP7-related protein 2が唯一抗体の産生が誘導されたとの報告がある(69)。また、heat shock proteinは宿主-寄生虫間の相互作用において重要な役割を果たしており(70)、マラリア患者および*P. yoelii*感染マウスの両方において血清中の抗heat shock protein 70抗体が顕著に上昇し(71)、さらにPfhs70はマラリアワクチン候補として提案されている(72)。原虫特異的抗体に対応する抗原の特定には今後さらなる検証が必要とされるが、これら同定されたタンパク質の中には抗原として機能したものが含まれる可能性がある。この様に、治癒マウスの血清中に含まれる複数の抗体が検出され (図14D-F)、またマラリア原虫に対するワクチン候補や免疫に関与する分子を抗原とする可能性が示唆さ

れた事から (表2)、これら治癒マウスが獲得した抗体は再感染から保護するために重要であると推察された。

4 考察

4-1 抗マラリア薬としての ALA/SFC の可能性

これまでの基礎研究により複雑な生活環や代謝経路を持つ寄生虫の生態が分子レベルで徐々に明らかになり、この様な状況を背景に様々な寄生虫に対する新規治療薬開発の試みがなされてきている(35, 73-75)。本研究では、経口によるALA/SFCの併用投与が致死性のマラリア原虫*P. yoelii* 17XLに感染したマウスの半数以上を治癒する事を示した。すべての感染マウスは一時的に体重減少および体温低下を示したが、これらのパラメータは治癒マウスではその後回復した。これらの結果は、ALAの治療効果を支持するものである。この体温の変化については、例えば、Swissマウスにげっ歯類マラリアの*P. chabaudi* ASや*P. berghei* NK65を感染させた場合にも体温低下を引き起こし(76)、また、C57BL/6Jマウスが*P. yoelii* 17XLに感染した場合も同様に体温低下を引き起こすが、脳マラリアを引き起こす*P. berghei* ANKAでは体温が上昇する事が報告されている(77)。感染マウスの体温変化に関する詳細なメカニズムについてはまだ明らかにされていないが、ヒトのマラリアの症状とは異なり、異常に低い体温はマラリア原虫が感染したマウスに特徴的な症状である。治癒マウスでは、1度マラリア原虫の排除が確認された後はマラリア原虫が潜伏していない事が診断PCRにより

確認されたため、再発は起きていないと考えられる。マラリア流行地域においては抗マラリア薬の投与は経口が必須であるため(30)、経口投与が可能なALA/SFCはマラリアに対して極めて望ましい化学療法である。

さらに、今回の実験ではALA/SFCの併用投与を感染マウスが完治するまで30日間以上にわたって投与を継続したが、目立った副作用を示さなかった。この結果はALA/SFCの長期間投与時においても安全である事を示している。実際、ALA/SFCは既にヨーロッパ系とアジア系の成人を対象とした第I相臨床試験を開発業務受託機関であるCovance社に委託してイギリスで実施され、高い安全性が既に確認されている。また食品、化粧品など様々な用途でのこれまでの利用から、人間に対して安全である事が証明されている。さらに、この成人ボランティアでの安全性試験（第I相臨床試験）の結果に続いて、2歳以下の幼児を対象としたALA/SFCによるミトコンドリア病治療の第II相臨床試験が日本で開始された

(<https://dbcentre3.jmacct.med.or.jp/JMACTR/App/JMACTRS06/JMACTRS06.aspx?seqno=4904>)。この試験で対象となる幼児は、ちょうどアフリカ等のマラリア流行地域において多くの命を失っている幼児たちと同様の年齢層である。非常に高い容量の鉄の投与は肝毒性や胃腸障害を引き起こす可能性も考えられるが、ラットにおいて1日1回1,000 mg/kgの反復投与までが安全レベルである事が示されたため、米国Food and Drug

AdministrationのGenerally Recognized as Safe通知に掲載され、食品添加物として米国でも承認されている(78)。加えて、栄養補助食品としてのALA/SFCの安全性に関する総説も発表され(79)、また抗糖尿病薬による治療下のII型糖尿病患者に対してALA/SFCの投与が安全である事も示されている(80)。つまり、これらの事実からALA/SFCは非常に安全であると考えられる。

このALA/SFCの高い安全性という観点から、ALA/SFCを基盤にしてアルテミシニンやクロロキンなど現在用いられている治療薬との併用療法を実施し、既存薬の投与量を減少させて副作用を軽減する事が期待できる。例えば、現在主力の化学療法であるアルテミシニン併用療法は安全であるとされていたが、最近では、聴覚神経に対する毒性、つまり聴覚障害の懸念が報告されている(81)。聴覚障害は発声、行動、言語の理解や獲得に重度の悪影響を及ぼし、この結果身体障害を引き起こして死亡率を上昇させるため、発育中の子供にとっては特に深刻な問題である。この点で、副作用を軽減できるALA/SFCとアルテミシニンの併用戦略は、子供のマラリア患者にとって有益であると考えられる。今後取り組む課題の1つとして、このALA/SFCとアルテミシニンの併用戦略の実施を現在計画しているところである。

マラリア流行地域でヒトのマラリアに対してALA/SFCを実用化するためには、低コストの医薬品の供給が不可欠である。ALAは発酵法による大量生産技術が既に確立さ

れているため、流行地での要求を満たすさらなるコスト削減が可能になってきている(82,83)。これに加えて、これまで述べてきた通りALA/SFCはマラリア原虫に有効で高い安全性を持つ特徴から有望な抗マラリア薬の候補である。

4-2 げっ歯類とヒトに感染するマラリア原虫の比較

今回用いた感染モデルでは、ALA/SFCによる治療はマラリア原虫*P. yoelii* 17XL（致死株）に感染したマウスのすべてを治癒はさせなかったが、実際には独立した*in vivo* 実験を2回実施し、どちらの実験でも最大で3/5のマウスが治癒した事を観察している。この薬効を制限する要因としてはいくつかの理由が考えられる。最も高い可能性の1つとして、ALA/SFCの増殖抑制効果はマラリア原虫の各ステージに対して異なる活性を有する事が考えられる。*P. falciparum*に対するALA/SFCによる増殖阻害は、非同調培養よりも5%ソルビトール処理により同調培養した時の方がより効果的であった(52)。さらに、5%ソルビトール処理を2回行って同調した後にALA/SFC 200/10 μ Mをリング、トロフォゾイトおよびシゾント期に添加した場合、トロフォゾイトとシゾント期に添加した場合には増殖阻害は起こらなかったが、リング型のマラリア原虫に添加した時には80%の増殖阻害活性を示した（K. Komatsuya *et al.*、未発表データ）。ここで注目すべき点として、げっ歯類に感染する*P. yoelii*はヒトに感染する*P. falciparum*

より短いライフサイクル（リング型の期間は*P. yoelii*の約12時間に対し、*P. falciparum*は約24時間）を持っている事が挙げられる。一般的に*in vivo*アッセイは非同調の条件である事を考慮に入れると、おそらく今回のマウスモデルではマラリア原虫のステージがランダムであったと推測される。従って、このALA/SFCのステージ特異的な活性のため、非リング型の*P. yoelii*が増殖阻害を回避し、そして感受性が高いリング型が*P. falciparum*に比べて短く十分な時間ALA/SFCに暴露されなかった事から、一部の感染マウスを治療できなかったと考えられる。

一方、これまでの情報ではALA/SFCはヒトのマラリア原虫に対して実際に効果的であった。つまり、ALA/SFCの摂取はソロモン諸島の子供のマラリア患者の症状を改善するには十分であり(52)、また*in vitro*培養した*P. falciparum*に対しても明確に増殖を阻害した(35)。この事から、ALA/SFCによる治療が今回実施したマウスモデルよりも、ヒトのマラリア症例でより有効である事が予想される。

4-3 鉄と薬効の関係

200 μ MのALAが*in vitro*で*P. falciparum*に対して増殖阻害を示すためにはSFCなどの二価鉄イオンの添加が不可欠である可能性が示されているが(35)、600 mg/kgのALA塩酸塩単独を投与した感染マウス（グループC）は二価鉄イオンを併用投与しなくても

一部が生存した。ALA単独の場合でも2 mMあれば*P. falciparum*の増殖を阻害する事が報告されており(54)、この事からALAは単独であっても高濃度であればマウス体内に寄生しているマラリア原虫の増殖を阻害し得る事を示唆している。さらに、今回の実験に用いたマウスは飼料から1日あたり60 mg/kg相当の元素鉄を摂取していると予想され(方法2-4を参照)、これに対して併用投与に用いた300 mg/kgのSFCは約30 mg/kgの二価鉄イオンに相当する。一方、鉄調節ホルモンであるヘプシジンは食事に含まれる鉄の小腸での吸収を減少させるが(84)、このホルモンはマラリア原虫に感染した宿主での発現が上昇する事が知られている(85)。確かに、このヘプシジンによる吸収抑制がどれだけ作用しているかは不明ではあるが、グループCのマウス(ALA単独投与)はSFCの投与がなくても、マラリア原虫の感染から回復するには十分な量の二価鉄イオンを飼料中から吸収したと考えられる。我々のグループでは、*in vitro*培養の*P. falciparum*に対してALA単独またはSFC単独を添加した場合と比べ、ALA/SFCを添加した条件では著しく活性酸素種のシグナルが増強し、また活性酸素種スカベンジャーであるNアセチルシステインを添加するとALA/SFCによる増殖抑制が低下した事から、活性酸素種により増殖抑制が起こる現象を見出している(文献(35)、supplemental data)。マウスモデルにおいても同様のメカニズムがこの役割を果たしていると考えられ、飼料由来の鉄が関与していると考えられる。

4-4 ALA/SFC 投与で治癒したマウスが獲得した再感染防御の重要性

本研究の重要な発見の一つは、ALA/SFC の投与が治癒したマウスに再感染に対する抵抗性をもたらした事である。以下に示す既存の化合物による治療も程度に差はあるが再感染に対する抵抗性を示し、初感染における治療でマラリア原虫の増殖を緩やかに抑制した点が ALA/SFC と共通する。最近、搾取後のオリーブ残渣から単離されたトリテルペン類の化合物であるマスリン酸が *P. falciparum* の増殖を抑制する事が *in vitro* で示された(86)。また、本研究でのマウスモデルで観察されたように、マスリン酸の腹腔内投与は *P. yoelii* 17XL に感染した多くのマウスを治癒し、そして治癒マウスは再感染に対する抵抗性を有しており再感染後に原虫は検出されなかった(56)。また、Mout らは放線菌から単離された大環状ポリケチドであるゲルダナマイシンの誘導体とクロロキンの腹腔内投与により、*P. yoelii* 17XL に感染した Swiss マウスが完治した1ヶ月後に再感染を行っているが、ゲルダナマイシン誘導体により治癒したマウスは3%程度、クロロキンで治癒したマウスは13%程度まで再感染後も感染率が上昇し、原虫の排除に21日間を要している(87)。さらに、Ma らが弱毒株の *P. yoelii* 17XNL に感染した BALB/c マウス、あるいは強毒株の *P. yoelii* 17XL に感染した DBA/2 マウスをクロロキンやアルテミシニンの経口投与で治療した約6週間後に再感染を実施し

た例では、2/7 から 4/8 の再感染マウスで感染率が 1%程度（初感染の最大感染率は約 40%）まで上昇する事が認められた(88)。初感染の治療における穏和な増殖抑制は一見好ましくない結果のように思えるかもしれないが、短時間でマラリア原虫を排除する速効性の治療法と比べて、慢性感染を維持する程度の低容量の薬剤による治療の方が、優れた防御免疫を獲得する事が報告されており(89)、緩やかな増殖抑制が獲得免疫のために重要である事を示している。このため、上述の治療法の適度な増殖阻害効果により、マラリア原虫特異的な抗体の産生を増加させたと考えられる。従って、この様に感染マウスを薬剤で治療して生存すれば防御免疫が獲得される事は一般的ではあるが、ALA/SFC は経口投与で有効である点や、完治 6 週間後の再感染では PCR においても原虫が検出出来ない程の強い防御効果を示した点は、これら既存の化合物を上回る利点を有していると考えられる。

さらに、ALA/SFC 治癒マウスと同様に、*P. yoelii* 17XNL に感染した BALB/c マウスをマクロライド系抗生物質であるボレリデインの腹腔内投与による治療後に再感染を行った Azcárate らの研究では、長期的な防御免疫として初感染から 340 日後の抵抗性を示している(58)。しかし、この報告では初感染 75 日後にブースト免疫として再感染を行って抗体産生を促進した後の、3 回目の感染における抵抗性である。これに対し、本研究ではブースト免疫を施す事なく 33 週間（231 日）の感染間隔（文献(58)の

2回目と3回目の感染間隔である265日と同程度)をおいての防御効果を示している。

長期間の防御免疫を付与するためには記憶T細胞が重要な役割を果たす事が知られている(90)。そして、再感染により樹状細胞が抗原提示細胞として働き、ナイーブT細胞や記憶T細胞を活性化することによりこれらがサイトカインを産生して抗体産生を促進する(65)。ALA/SFCの免疫系に対する影響は明らかではないが、本研究で示した長期的な抵抗性もこの免疫記憶によるものであると推測される。長期の抵抗性について議論する際、加齢による免疫系への影響について触れる事も重要である。イムノブロットの結果では初感染30日後と再感染1日前(35週の間隔)で抗体の反応性にほとんど差が見られない事が示されたが、診断PCRの結果は時間経過と共に防御免疫が弱くなる事を示唆しているが、これには抗体とは別の因子も関係していると考えられる。免疫システムは加齢と共に二次免疫応答が低下する、いわゆる免疫老化が起り、液性免疫応答の減少やCD4陽性T細胞の変質等を伴うという報告がある(91)。

また、自然免疫系を担うナチュラルキラー細胞やマクロファージ等の機能も加齢により低下すると考えられている(92, 93)。そのため、44週齢の治癒マウスも免疫老化により自然免疫・獲得免疫系の機能が低下している事が予想され、これらの影響により再感染に対する応答が低下したと推察される。

RTS,S/AS01はマラリアワクチンとしては唯一第III相臨床試験で評価されて承認を

得たが、その試験結果は幼児と乳児の被験者に対してそれぞれ約 36% および 26% のマラリア感染症例を防ぐに留まった(94)。これらの値はワクチンとしては不十分であり、ワクチンによる予防接種と併せてこれとは別の免疫戦略が必要だと考えられる。

抗マラリア薬を用いた、chemoprophylaxis、intermittent preventive treatment、および controlled human malaria infection と言った、chemoprevention によって自然免疫を獲得する事が有益であると期待されている(95-97)。ALA/SFC の安全性および防御効果を考慮すると、この併用療法は以下の理由から chemoprevention によるアプローチにも適用できると判断できる。(i) ALA/SFC による治療中に感染マウスへ誘導された抗体は、代表的なワクチン抗原候補 MSP1 や防御免疫に関連する複数の分子を抗原とする可能性が示唆された。(ii) マラリアに対する防御効果の予備調査では、ALA リン酸塩 25 mg と SFC 28.68 mg のカプセルを 1 日 1 個継続的に摂取した結果、マラリア重度汚染地域で活動する人々が 1 ヶ月間マラリアへの感染を未然に防いだ事が報告されている(52)。一方、低用量の薬剤による慢性感染を維持するような治癒により薬剤耐性の出現が促進されるとの議論もあるが、最近の研究では薬剤感受性または薬剤耐性マラリア原虫、あるいは両方をマウスに感染させたモデルにおいて、根治療法より持続感染を起こす治療の方が薬剤耐性マラリア原虫の拡散が遅いという結果が示されている(98)。従って、本研究の結果は、穏和な抑制効果をもたらす化学療法は防御

免疫を獲得すると言う点では明らかにメリットがある事を実証したと考えられる。今後は、マラリアに対する chemoprevention の戦略をより現実的にするため、ALA/SFC の投与が宿主免疫を調節するメカニズムを解明する予定である。

4-5 今後の展望

本研究の動物モデルはげっ歯類に感染するマラリア原虫を使用したため、ヒト体内の *P. falciparum* に対して実際に有効かどうかの疑問は残る。*P. falciparum* はげっ歯類には感染しないがリスザルなどの非ヒト霊長類には感染が可能で、かつヒトと同様に発熱などの症状を呈するなど、ヒトの臨床例に近い病態を再現できるため非常に有益なモデルである(28)。そのため、リスザルを用いた *P. falciparum* の *in vivo* 感染モデルにおいてALA/SFCの有効性を評価する予定である。そしてこのサルマラリアモデルによる証明に続き、ビクトリア湖内の島およびその周辺地域で大阪市立大学の金子明教授らが実施予定の抗マラリア薬の集団投与に参加し、流行地でのALA/SFCの安全性や薬効評価を行う事を計画中である。さらに、医薬品開発の次のステップとしてヒトの患者を対象とした第II相臨床試験を予定している。これまでに三日熱マラリアを引き起こす *P. vivax* に対するALA/SFCの効果は評価されていないが、*P. vivax* も分布する地域で臨床試験を行う機会があれば *P. falciparum* と並行して試験を行いたいと考えている。

ALA は発酵法による大量生産法が確立されているが、マラリア流行地の要求を満たすほどのコストにはまだ到達していないため、更なるコストダウンを目指す必要がある。また、予防薬として展開するためには ALA の免疫系に対する影響を調べる必要もあり、そして学校給食に添加するなど、子供達が継続的に摂取可能な配布方法に関する工夫も必要である。今後はこれらの課題を 1 つずつ解決して実用化を目指していく予定である。

5 結論

ALA/SFCはサプリメントや化粧品として市販されており、また薬剤としての第I相臨床試験が完了した事からその非常に高い安全性と経口吸収率が確認されている。また、ALA/SFCへの曝露は光照射を行う事なくヒトに感染する熱帯熱マラリア原虫*P. falciparum*の増殖を阻害する事が*in vitro*で示されている(35)。本研究では、ALA/SFCの経口投与がマラリア原虫に感染したマウスを治癒するだけでなく、再感染を防ぐ持続的な感染防御を誘導する事を*in vivo*の実験によって示した。これらの知見は、ALA/SFCは有望な抗マラリア薬の候補である事を示している。

引用文献

1. World Health Organization, World Malaria Report 2015. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2015).
2. L. H. Miller, H. C. Ackerman, X.-Z. Su, T. E. Wellems, Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* **19**, 156–167 (2013).
3. N. J. White, *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis.* **46**, 172–173 (2008).
4. A. F. Cowman, B. S. Crabb, Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* **124**, 755–766 (2006).
5. E. M. Riley, V. A. Stewart, Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med.* **19**, 168–178 (2013).
6. European Medicines Agency, First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2015/07/news_detail_002376.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1 (2015).

7. N. M. Q. Palacpac, E. Ntege, A. Yeka, B. Balikagala, N. Suzuki, H. Shirai, M. Yagi, K. Ito, W. Fukushima, Y. Hirota, C. Nsereko, T. Okada, B. N. Kanoi, K. Tetsutani, N. Arisue, S. Itagaki, T. Tougan, K. J. Ishii, S. Ueda, T. G. Egwang, T. Horii, Phase 1b Randomized Trial and Follow-Up Study in Uganda of the Blood-Stage Malaria Vaccine Candidate BK-SE36. *PLoS ONE*. **8**, e64073 (2013).
8. O. F. Okumu, J. S. Moore, Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future. *Malar J*. **10:208**, 1–13 (2011).
9. H. O. Lobel, M. Miani, T. Eng, K. W. Bernard, A. W. Hightower, C. C. Campbell, Long-term malaria prophylaxis with weekly mefloquine. *Lancet*. **341**, 848–851 (1993).
10. D. Overbosch, H. Schilthuis, U. Bienzle, R. H. Behrens, K. C. Kain, P. D. Clarke, S. Toovey, J. Knobloch, H. D. Nothdurft, D. Shaw, N. S. Roskell, J. D. Chulay, Malarone International Study Team, Atovaquone-proguanil versus mefloquine for malaria prophylaxis in nonimmune travelers: results from a randomized, double-blind study. *Clin Infect Dis*. **33**, 1015–1021 (2001).

11. L. H. Miller, X. Su, Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell*. **146**, 855–858 (2011).
12. T. N. C. Wells, R. H. van Huijsduijnen, W. C. Van Voorhis, Malaria medicines: a glass half full? *Nat Rev Drug Discov*. **14**, 424–442 (2015).
13. T. Q. Tanaka, E. Deu, A. Molina-Cruz, M. J. Ashburne, O. Ali, A. Suri, S. Kortagere, M. Bogyo, K. C. Williamson, *Plasmodium* Dipeptidyl Aminopeptidases as Malaria Transmission-Blocking Drug Targets. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**, 4645–4652 (2013).
14. R. M. Packard, The origins of antimalarial-drug resistance. *N Engl J Med*. **371**, 397–399 (2014).
15. T. Mita, K. Tanabe, K. Kita, Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int*. **58**, 201–209 (2009).
16. K. Stepniewska, E. Ashley, S. J. Lee, N. Anstey, K. I. Barnes, T. Q. Binh, U. D'Alessandro, N. P. J. Day, P. J. de Vries, G. Dorsey, J.-P. Guthmann, M. Mayxay, P. N. Newton, P. Olliaro, L. Osorio, R. N. Price, M. Rowland, F. Smithuis, W. R. J. Taylor, F. Nosten, N. J. White, In vivo parasitological measures of artemisinin susceptibility. *J Infect Dis*. **201**, 570–579 (2010).

17. A. M. Dondorp, F. Nosten, P. Yi, D. Das, A. P. Phyo, J. Tarning, K. M. Lwin, F. Arieu, W. Hanpithakpong, S. J. Lee, P. Ringwald, K. Silamut, M. Imwong, K. Chotivanich, P. Lim, T. Herdman, S. S. An, S. Yeung, P. Singhasivanon, N. P. J. Day, N. Lindegardh, D. Socheat, N. J. White, Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med.* **361**, 455–467 (2009).
18. J. Burrows, Microbiology: Malaria runs rings round artemisinin. *Nature.* **520**, 628–630 (2015).
19. E. A. Ashley, M. Dhorda, R. M. Fairhurst, C. Amaratunga, P. Lim, S. Suon, S. Sreng, J. M. Anderson, S. Mao, B. Sam, C. Sopha, C. M. Chuor, C. Nguon, S. Sovannaroeth, S. Pukrittayakamee, P. Jittamala, K. Chotivanich, K. Chutasmit, C. Suchatsoonthorn, R. Runcharoen, T. T. Hien, N. T. Thuy-Nhien, N. V. Thanh, N. H. Phu, Y. Htut, K.-T. Han, K. H. Aye, O. A. Mokuolu, R. R. Olaosebikan, O. O. Folaranmi, M. Mayxay, M. Khanthavong, B. Hongvanthong, P. N. Newton, M. A. Onyamboko, C. I. Fanello, A. K. Tshefu, N. Mishra, N. Valecha, A. P. Phyo, F. Nosten, P. Yi, R. Tripura, S. Borrmann, M. Bashraheil, J. Peshu, M. A. Faiz, A. Ghose, M. A. Hossain, R. Samad, M. R. Rahman, M. M. Hasan, A. Islam, O. Miotto, R. Amato, B. MacInnis, J. Stalker, D. P. Kwiatkowski, Z. Bozdech, A. Jeeyapant, P. Y. Cheah, T. Sakulthaew, J. Chalk,

- B. Intharabut, K. Silamut, S. J. Lee, B. Vihokhern, C. Kunasol, M. Imwong, J. Tarning, W. J. Taylor, S. Yeung, C. J. Woodrow, J. A. Flegg, D. Das, J. Smith, M. Venkatesan, C. V. Plowe, K. Stepniewska, P. J. Guerin, A. M. Dondorp, N. P. Day, N. J. White, Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med.* **371**, 411–423 (2014).
20. J. Guan, X. Wang, K. Smith, A. Ager, M. Gettayacamin, D. E. Kyle, W. K. Milhous, M. P. Kozar, A. J. Magill, A. J. Lin, Malaria Causal Prophylactic Activity of Imidazolidinedione Derivatives. *J Med Chem.* **50**, 6226–6231 (2007).
21. S. A. Charman, S. Arbe-Barnes, I. C. Bathurst, R. Brun, M. Campbell, W. N. Charman, F. C. K. Chiu, J. Chollet, J. C. Craft, D. J. Creek, Y. Dong, H. Matile, M. Maurer, J. Morizzi, T. Nguyen, P. Papastogiannidis, C. Scheurer, D. M. Shackleford, K. Sriraghavan, L. Stingelin, Y. Tang, H. Urwyler, X. Wang, K. L. White, S. Wittlin, L. Zhou, J. L. Vennerstrom, Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* **108**, 4400–4405 (2011).
22. M. Korsinczky, N. Chen, B. Kotecka, A. Saul, K. Rieckmann, Q. Cheng, Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* that are associated with atovaquone

- resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**, 2100–2108 (2000).
23. J. E. Siregar, G. Kurisu, T. Kobayashi, M. Matsuzaki, K. Sakamoto, F. Mi-ichi, Y. Watanabe, M. Hirai, H. Matsuoka, D. Syafruddin, S. Marzuki, K. Kita, Direct evidence for the atovaquone action on the *Plasmodium* cytochrome *bc*₁ complex. *Parasitol Int.* **64**, 295–300 (2015).
24. N. Juge, S. Moriyama, T. Miyaji, M. Kawakami, H. Iwai, T. Fukui, N. Nelson, H. Omote, Y. Moriyama, *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter is a H⁺-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* **112**, 3356–3361 (2015).
25. F. Arieu, B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A.-C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Ménard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J.-C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon, D. Ménard, A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* **505**, 50–55 (2014).

26. D. A. Fidock, T. Nomura, A. K. Talley, R. A. Cooper, S. M. Dzekunov, M. T. Ferdig, L. M. Ursos, A. B. Sidhu, B. Naudé, K. W. Deitsch, X. Z. Su, J. C. Wootton, P. D. Roepe, T. E. Wellems, Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. **6**, 861–871 (2000).
27. T. E. Wellems, *Plasmodium* chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. *Science*. **298**, 124–126 (2002).
28. H. Contamin, C. Behr, O. Mercereau-Puijalon, J. Michel, *Plasmodium falciparum* in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): infection of non-splenectomised animals as a model for exploring clinical manifestations of malaria. *Microbes Infect*. **2**, 945–954 (2000).
29. A. M. Vaughan, S. H. Kappe, A. Ploss, S. A. Mikolajczak, Development of humanized mouse models to study human malaria parasite infection. *Future Microbiol*. **7**, 657–665 (2012).
30. S. Nwaka, A. Hudson, Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov*. **5**, 941–955 (2006).

31. Z. Kang, J. Zhang, J. Zhou, Q. Qi, G. Du, J. Chen, Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B₁₂. *Biotechnol Adv.* **30**, 1533–1542 (2012).
32. D. Shemin, C. S. Russell, δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J Am Chem Soc.* **75**, 4873–4874 (1953).
33. H. A. Dailey, A. Smith, Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem J.* **223**, 441–445 (1984).
34. Y. Ohgari, Y. Nakayasu, S. Kitajima, M. Sawamoto, H. Mori, O. Shimokawa, H. Matsui, S. Taketani, Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. *Biochem Pharmacol.* **71**, 42–49 (2005).
35. K. Komatsuya, M. Hata, E. O. Balogun, K. Hikosaka, S. Suzuki, K. Takahashi, T. Tanaka, M. Nakajima, S. Ogura, S. Sato, K. Kita, Synergy of ferrous ion on 5-aminolevulinic acid-mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*. *J Biochem.* **154**, 501–504 (2013).

36. T. Amo, N. Kawanishi, M. Uchida, H. Fujita, E. Oyanagi, T. Utsumi, T. Ogino, K. Inoue, T. Shuin, K. Utsumi, J. Sasaki, Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by ferrochelatase inhibitors in human histiocytic lymphoma cell line U937. *Cell Biochem Funct.* **27**, 503–515 (2009).
37. M. Ishizuka, F. Abe, Y. Sano, K. Takahashi, K. Inoue, M. Nakajima, T. Kohda, N. Komatsu, S. Ogura, T. Tanaka, Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int Immunopharmacol.* **11**, 358–365 (2011).
38. Y. Ohgari, Y. Miyata, T. Miyagi, S. Gotoh, T. Ohta, T. Kataoka, K. Furuyama, S. Taketani, Roles of porphyrin and iron metabolisms in the δ -aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage of tumor cells. *Photochem Photobiol.* **87**, 1138–1145 (2011).
39. J. C. Kennedy, R. H. Pottier, Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol.* **14**, 275–292 (1992).

40. H. Barr, A. J. Dix, C. Kendall, N. Stone, Review article: the potential role for photodynamic therapy in the management of upper gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther.* **15**, 311–321 (2001).
41. F. S. De Rosa, M. V. Bentley, Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharma Res.* **17**, 1447–1455 (2000).
42. B. L. Rodriguez, J. D. Curb, J. Davis, T. Shintani, M. H. Perez, N. Apau-Ludlum, C. Johnson, R. Harrigan, Use of the Dietary Supplement 5-Aminiolevulinic Acid (5-ALA) and Its Relationship with Glucose Levels and Hemoglobin A1C among Individuals with Prediabetes. *Clin Transl Sci.* **5**, 314–320 (2012).
43. F. Higashikawa, M. Noda, T. Awaya, T. Tanaka, M. Sugiyama, 5-aminolevulinic acid, a precursor of heme, reduces both fasting and postprandial glucose levels in mildly hyperglycemic subjects. *Nutrition.* **29**, 1030–1036 (2013).
44. L. Sheiner, A. B. Vaidya, G. I. McFadden, The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. *Curr Opin Microbiol.* **16**, 1–7 (2013).

45. V. A. Nagaraj, D. Prasad, R. Arumugam, P. N. Rangarajan, G. Padmanaban, Characterization of coproporphyrinogen III oxidase in *Plasmodium falciparum* cytosol. *Parasitol Int.* **59**, 121–127 (2010).
46. P. A. Sigala, D. E. Goldberg, The Peculiarities and Paradoxes of *Plasmodium* Heme Metabolism. *Annu Rev Microbiol.* **68**, 259–278 (2014).
47. I. U. Heinemann, M. Jahn, D. Jahn, The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* **474**, 238–251 (2008).
48. I. J. Schultz, C. Chen, B. H. Paw, I. Hamza, Iron and Porphyrin Trafficking in Heme Biogenesis. *J Biol Chem.* **285**, 26753–26759 (2010).
49. N. Surolia, G. Padmanaban, *De novo* biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite. *Biochem Biophys Res Commun.* **187**, 744–750 (1992).
50. G. Padmanaban, P. N. Rangarajan, Heme metabolism of *Plasmodium* is a major antimalarial target. *Biochem Biophys Res Commun.* **268**, 665–668 (2000).
51. E. Yeh, J. L. DeRisi, Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* **9**, e1001138 (2011).

52. T. Tanaka, S. Kawata, T. Kohda, M. Nakajima, K. Kita, Antimalarial drug which contains 5-aminolevulinic acid or derivative thereof as active ingredient. International patent number: WO 2011/145343 A1 (2011).
53. D. X. Divaris, J. C. Kennedy, R. H. Pottier, Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration of 5-aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. *Am. J. Pathol.* **136**, 891–897 (1990).
54. T. G. Smith, K. C. Kain, Inactivation of *Plasmodium falciparum* by photodynamic excitation of heme-cycle intermediates derived from delta-aminolevulinic acid. *J Infect Dis.* **190**, 184–191 (2004).
55. D. Walliker, I. A. Quakyi, T. E. Wellems, T. F. McCutchan, A. Szarfman, W. T. London, L. M. Corcoran, T. R. Burkot, R. Carter, Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* **236**, 1661–1666 (1987).
56. C. Moneriz, P. Marín-García, J. M. Bautista, A. Diez, A. Puyet, Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Malar J.* **10:103**, 1–9 (2011).

57. C. J. Janse, A. P. Waters, p305-315. In Doolan DL (ed), *Malaria Methods and Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ (2002).
58. I. G. Azcárate, P. Marín-García, N. Camacho, S. Pérez-Benavente, A. Puyet, A. Diez, L. Ribas de Pouplana, J. M. Bautista, Insights into the preclinical treatment of blood-stage malaria by the antibiotic borrelidin. *British J Pharmacol.* **169**, 645–658 (2013).
59. K. Hikosaka, K. Kita, K. Tanabe, Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol.* **188**, 26–33 (2013).
60. B. Krammer, K. Plaetzer, ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol.* **7**, 283–289 (2008).
61. SBI Pharmaceuticals Co., Ltd., アラグリオ内用剤1.5gインタビューフォーム.
https://www.google.co.jp/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwj_rpWtn5DLAhVC6aYKHZ61CRQQFggbMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sbipharma.co.jp%2Fmedical%2Fpdf%2FALAGLIO%2520Pack%2520Insert%2520Over.2%2820130927%29.pdf&usg=AFQjCNFqK2ufdVS0NyFpSDFLq40jvZPgiw&sig2=e2tdlVTZCGpjYp5BISr5wA&bvm=bv.115277099,d.dGY&cad=rja (2013).

62. Eisai Co., Ltd., Ferromia[®] interview form.
<http://www.e-search.ne.jp/~jpr/PDF/EISAI07.PDF> (2014).
63. D. Adeyemi, Neonatal intestinal obstruction in a developing tropical country: patterns, problems, and prognosis. *J. Trop. Pediatr.* **35**, 66–70 (1989).
64. R. Dass, H. Barman, S. G. Duwarah, N. M. Deka, P. Jain, V. Choudhury, Unusual presentations of malaria in children: An experience from a tertiary care centre in North East India. *Indian J Pediatr.* **77**, 655–660 (2010).
65. M. M. Stevenson, E. M. Riley, Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol.* **4**, 169–180 (2004).
66. L. Kedzierski, C. G. Black, R. L. Coppel, Characterisation of the merozoite surface protein 4/5 gene of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol.* **105**, 137–147 (2000).
67. J. S. Richards, J. G. Beeson, The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immuno Cell Biol.* **87**, 377–390 (2009).
68. J. S. Richards, T. U. Arumugam, L. Reiling, J. Healer, A. N. Hodder, F. J. I. Fowkes, N. Cross, C. Langer, S. Takeo, A. D. Uboldi, J. K. Thompson, P. R. Gilson, R. L. Coppel, P. M. Siba, C. L. King, M. Torii, C. E. Chitnis, D. L. Narum, I. Mueller, B. S.

- Crabb, A. F. Cowman, T. Tsuboi, J. G. Beeson, Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. *J Immunol.* **191**, 795–809 (2013).
69. M. Kadekoppala, S. A. Ogun, S. Howell, R. S. Gunaratne, A. A. Holder, Systematic Genetic Analysis of the *Plasmodium falciparum* MSP7-Like Family Reveals Differences in Protein Expression, Location, and Importance in Asexual Growth of the Blood-Stage Parasite. *Eukaryot Cell.* **9**, 1064–1074 (2010).
70. S. H. Kaufmann, Heat-shock proteins: a missing link in the host-parasite relationship? *Med Microbial Immunol.* **179**, 61–66 (1990).
71. M. Zhang, H. Hisaeda, S. Kano, Y. Matsumoto, Y. P. Hao, S. Looaresuwan, M. Aikawa, K. Himeno, Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. *Microbes Infect.* **3**, 363–367 (2001).
72. S. Biswas, Y. D. Sharma, Human response to a malaria vaccine candidate antigen. *Vaccine.* **9**, 467–469 (1991).
73. T. Shiba, Y. Kido, K. Sakamoto, D. K. Inaoka, C. Tsuge, R. Tatsumi, G. Takahashi, E. O. Balogun, T. Nara, T. Aoki, T. Honma, A. Tanaka, M. Inoue, S. Matsuoka, H.

- Saimoto, A. L. Moore, S. Harada, K. Kita, Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110**, 4580–4585 (2013).
74. D. K. Inaoka, T. Shiba, D. Sato, E. O. Balogun, T. Sasaki, M. Nagahama, M. Oda, S. Matsuoka, J. Ohmori, T. Honma, M. Inoue, K. Kita, S. Harada, Structural Insights into the Molecular Design of Flutolanil Derivatives Targeted for Fumarate Respiration of Parasite Mitochondria. *Int J Mol Sci*. **16**, 15287–15308 (2015).
75. K. Katsuno, J. N. Burrows, K. Duncan, R. Hooft van Huijsduijnen, T. Kaneko, K. Kita, C. E. Mowbray, D. Schmatz, P. Warner, B. T. Slingsby, Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov*. **14**, 751–758 (2015).
76. J. F. Day, J. D. Edman, The Importance of Disease Induced Changes in Mammalian Body Temperature to Mosquito Blood Feeding. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **77**, 447–452 (1984).
77. H. Zhao, T. Aoshi, S. Kawai, Y. Mori, A. Konishi, M. Ozkan, Y. Fujita, Y. Haseda, M. Shimizu, M. Kohyama, K. Kobiyama, K. Eto, J. Nabekura, T. Horii, T. Ishino, M. Yuda, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, M. Kinoshita, K. Tohyama, Y. Yoshioka, K. J.

- Ishii, C. Coban, Olfactory Plays a Key Role in Spatiotemporal Pathogenesis of Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe*. **15**, 551–563 (2014).
78. FDA, GRAS Notice No. 441.
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm322246.pdf> (2013).
79. M. H. Perez, B. L. Rodriguez, T. T. Shintani, 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA): Analysis of Preclinical and Safety Literature. *Food Nutr Sci*. **4**, 1009–1013 (2013).
80. N. Yamashita, A. Watanabe, H. Kondo, S. Kawata, Safety test of a supplement, 5-aminolevulinic acid phosphate with sodium ferrous citrate, in diabetic patients treated with oral hypoglycemic agents. *J Funct Foods Health Dis*. **4**, 415–428 (2014).
81. V. Ramos-Martín, C. González-Martínez, I. Mackenzie, J. Schmutzhard, C. Pace, D. G. Lalloo, D. J. Terlouw, Neuroauditory toxicity of artemisinin combination therapies—have safety concerns been addressed? *Am J Trop Med Hyg*. **91**, 62–73 (2014).
82. U. Ota, H. Sugihara, F. Abe, M. Nakajima, S. Ogura, T. Tanaka, 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA): a precursor of heme Fermentation, metabolism and usage. *ALA-Porphyrin Sci*. **1**, 3–17 (2013).

83. S. Nishikawa, 4. Production of 5-Aminolevulinic Acid and 5-Aminolevulinic Acid Derivatives, p 31-40. In Okura I and Tanaka T (ed), *Aminolevulinic acid—Science, Technology and Application*, SBI ALApromo and Tokyo Institute of Technology Press, Tokyo (2011).
84. T. Ganz, Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. **102**, 783–788 (2003).
85. S. Portugal, C. Carret, M. Recker, A. E. Armitage, L. A. Gonçalves, S. Epiphonio, D. Sullivan, C. Roy, C. I. Newbold, H. Drakesmith, M. M. Mota, Host-mediated regulation of superinfection in malaria. *Nat Med*. **17**, 732–737 (2011).
86. C. Moneriz, P. Marín-García, A. García-Granados, J. M. Bautista, A. Diez, A. Puyet, Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages. *Malar J*. **10:82**, 1–10 (2011).
87. R. Mout, Z.-D. Xu, A. K. H. Wolf, V. J. Davisson, G. K. Jarori, Anti-malarial activity of geldanamycin derivatives in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Malar J*. **11:54**, 1–10 (2012).

88. S.-H. Ma, L. Zheng, Y.-J. Liu, S.-Y. Guo, H. Feng, G. Chen, D.-M. Li, J.-C. Wang, Y.-M. Cao, *Plasmodium yoelii*: Influence of antimalarial treatment on acquisition of immunity in BALB/c and DBA/2 mice. *Exp Parasitol.* **116**, 266–272 (2007).
89. T. T. A. Long, S. Nakazawa, M. C. Huaman, H. Kanbara, Influence of antimalarial treatment on acquisition of immunity in *Plasmodium berghei* NK65 malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* **9**, 933–934 (2002).
90. A. Chandele, P. Mukerjee, G. Das, R. Ahmed, V. S. Chauhan, Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology.* **132**, 273–286 (2010).
91. M. Kuwahara, J. Suzuki, S. Tofukuji, T. Yamada, M. Kanoh, A. Matsumoto, S. Maruyama, K. Kometani, T. Kurosaki, O. Ohara, T. Nakayama, M. Yamashita, The Menin–Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat Commun.* **5**, 1–12 (2014).
92. M. Garg, W. Luo, A. M. Kaplan, S. Bondada, Cellular basis of decreased immune responses to pneumococcal vaccines in aged mice. *Infect. Immun.* **64**, 4456–4462 (1996).

93. R. Solana, E. Mariani, NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*. **18**, 1613–1620 (2000).
94. The RTS,S Clinical Trials Partnership, Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*. **386**, 31–45 (2015).
95. P. D. P. Geerligs, B. J. Brabin, T. A. Eggelte, Analysis of the effects of malaria chemoprophylaxis in children on haematological responses, morbidity and mortality. *Bull World Health Organ*. **81**, 205–216 (2003).
96. B. Greenwood, Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas. *Malar J*. **9**, S2 (2010).
97. E. M. Bijker, R. W. Sauerwein, Enhancement of naturally acquired immunity against malaria by drug use. *J Med Microbiol*. **61**, 904–910 (2012).
98. A. R. Wargo, S. Huijben, J. C. de Roode, J. Shepherd, A. F. Read, Competitive release and facilitation of drug-resistant parasites after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria model. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**, 19914–19919 (2007).
99. S. Das, N. Hertrich, A. J. Perrin, C. Withers-Martinez, C. R. Collins, M. L. Jones, J. M. Watermeyer, E. T. Fobes, S. R. Martin, H. R. Saibil, G. J. Wright, M. Treeck, C.

- Epp, M. J. Blackman, Processing of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. *Cell Host Microbe*. **18**, 433–444 (2015).
100. M. Kadekoppala, R. A. O'Donnell, M. Grainger, B. S. Crabb, A. A. Holder, Deletion of the *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 7 Gene Impairs Parasite Invasion of Erythrocytes. *Eukaryot Cell*. **7**, 2123–2132 (2008).
101. T. Spielmann, D. J. P. Fergusen, H.-P. Beck, *etramps*, a new *Plasmodium falciparum* gene family coding for developmentally regulated and highly charged membrane proteins located at the parasite-host cell interface. *Mol Biol Cell*. **14**, 1529–1544 (2003).
102. T. Y. Sam-Yellowe, L. Florens, T. Wang, J. D. Raine, D. J. Carucci, R. Sinden, J. R. Yates, Proteome analysis of rhoptry-enriched fractions isolated from *Plasmodium* merozoites. *J Proteome Res*. **3**, 995–1001 (2004).

图表

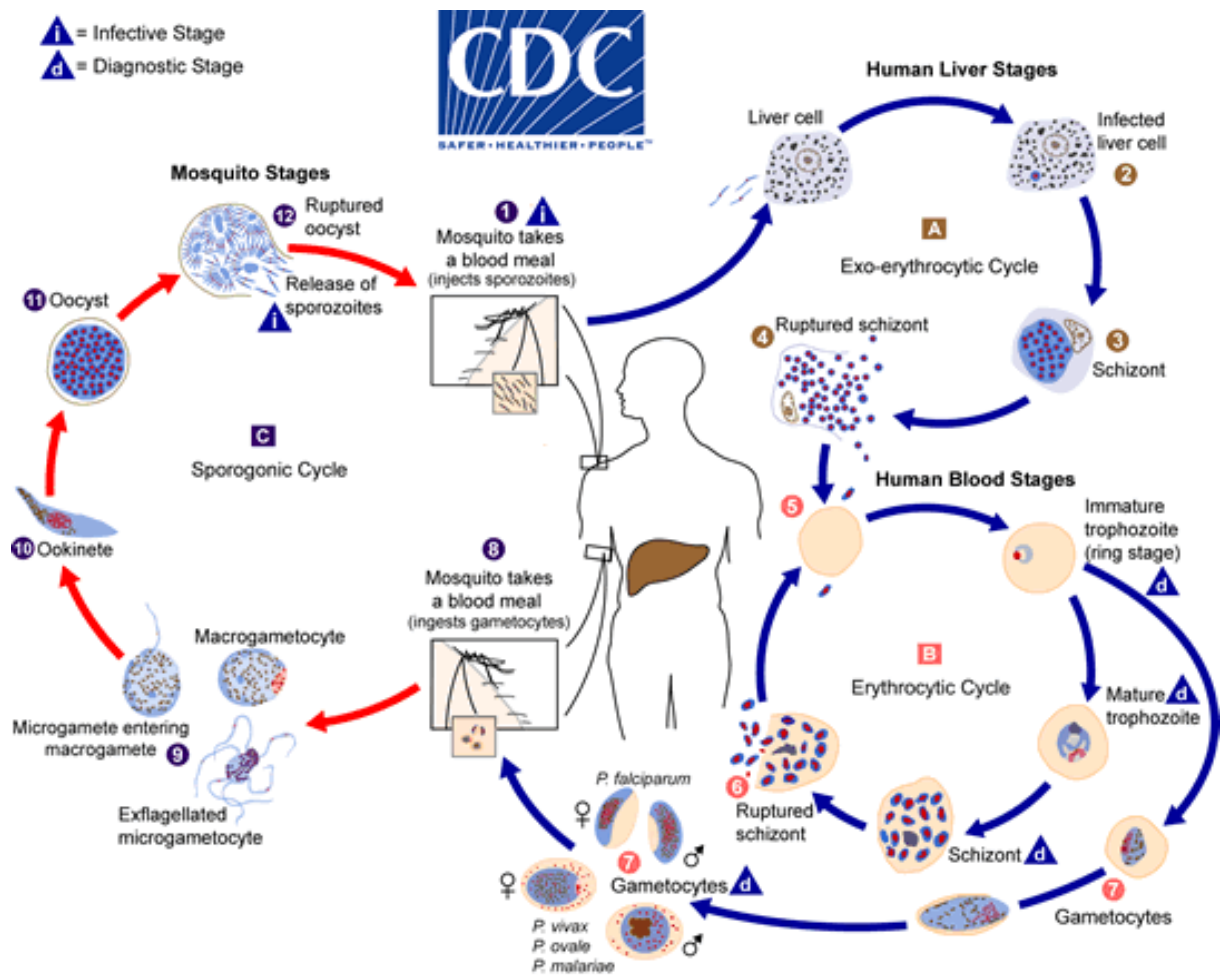


図 1 マラリア原虫の生活環

マラリア原虫に感染したハマダラカがヒトなどのほ乳類宿主に吸血する際、唾液中の sporozoite (スポロゾイト) が宿主の血流中に侵入する。スポロゾイトは肝細胞内に侵入して発達・増殖して merozoite (メロゾイト) を血流中に放出する (Human liver stages: 肝臓ステージ)。次にメロゾイトは赤血球に侵入し、ring form (リング型: 輪状体)、trophozoite (トロフォゾイト: 栄養体)、schizont (シゾン: 分裂体) とステージが進行し、赤血球を破裂させてシゾンより形成されたメロゾイトが血流に再び放出され、これが別の赤血球に侵入して同じサイクルを繰り返す (Human blood stages: 赤内期)。そして、赤内期の一部の原虫が gametocyte (ガメトサイト: 生殖母体) となり、ハマダラカの吸血時に蚊の体内に移行し、ここで有性生殖を行って成熟後にスポロゾイトを形成する (Mosquito stages: 蚊ステージ)。スポロゾイトを保有するハマダラカが宿主への吸血時に再びスポロゾイトを注入する事で生活環が成立する。

(<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology> より引用)

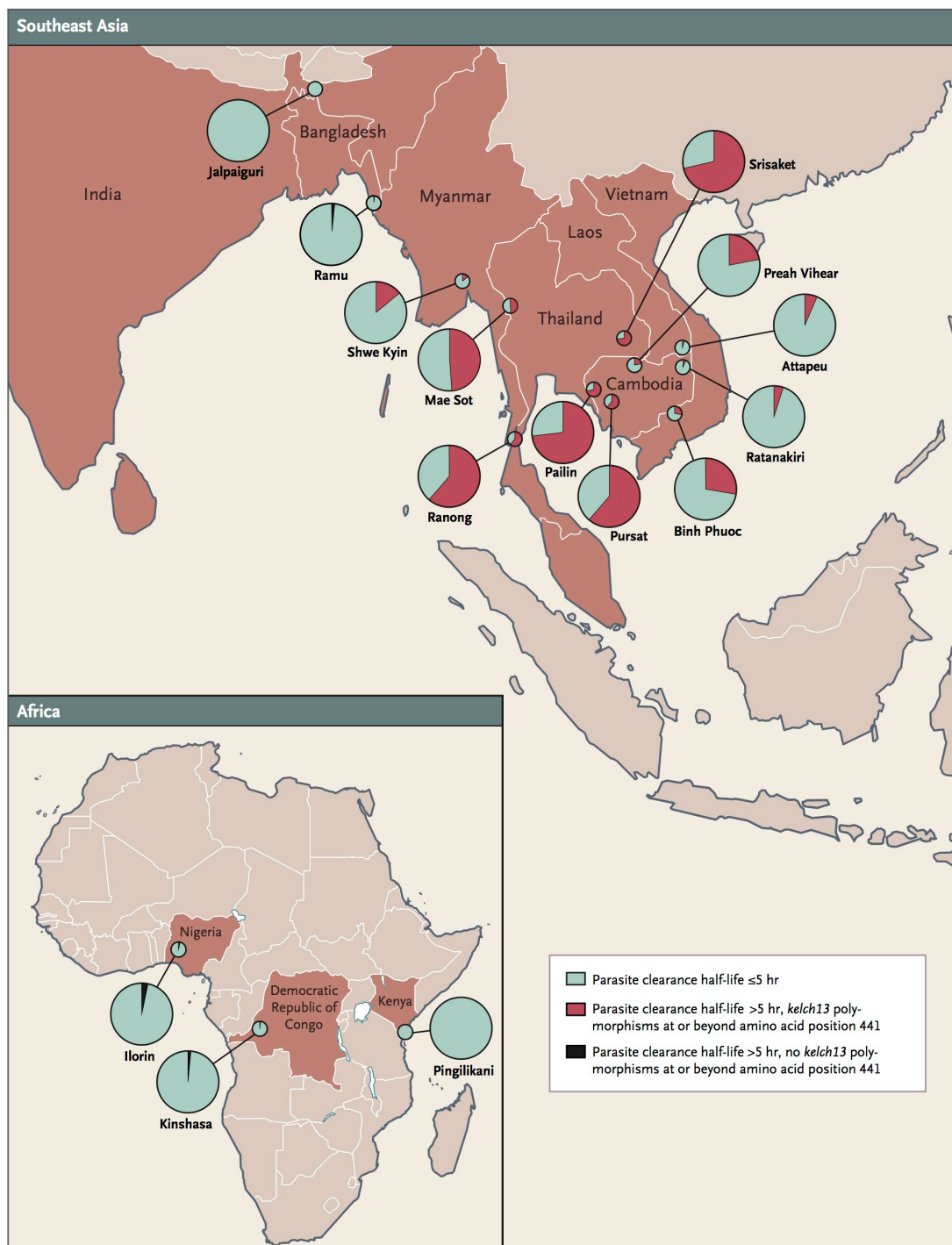


図2 アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の拡散

アルテミシニン投与における治療遅延（原虫排除の半減期が5時間以上）を示し、耐性マーカーである *kelch13* タンパク質のプロペラ領域 441 番目以降のアミノ酸に変異がある場合にアルテミシニン耐性と定義される（円グラフ中の赤）。また、治療遅延は起こるがマーカーに変異が見られない場合は円グラフ中の黒で示され、これらはアフリカでも発見されている（Ashley EA *et al.* N Engl J Med, 2014 より許可を得て転載、著作権は Massachusetts Medical Society にある）。

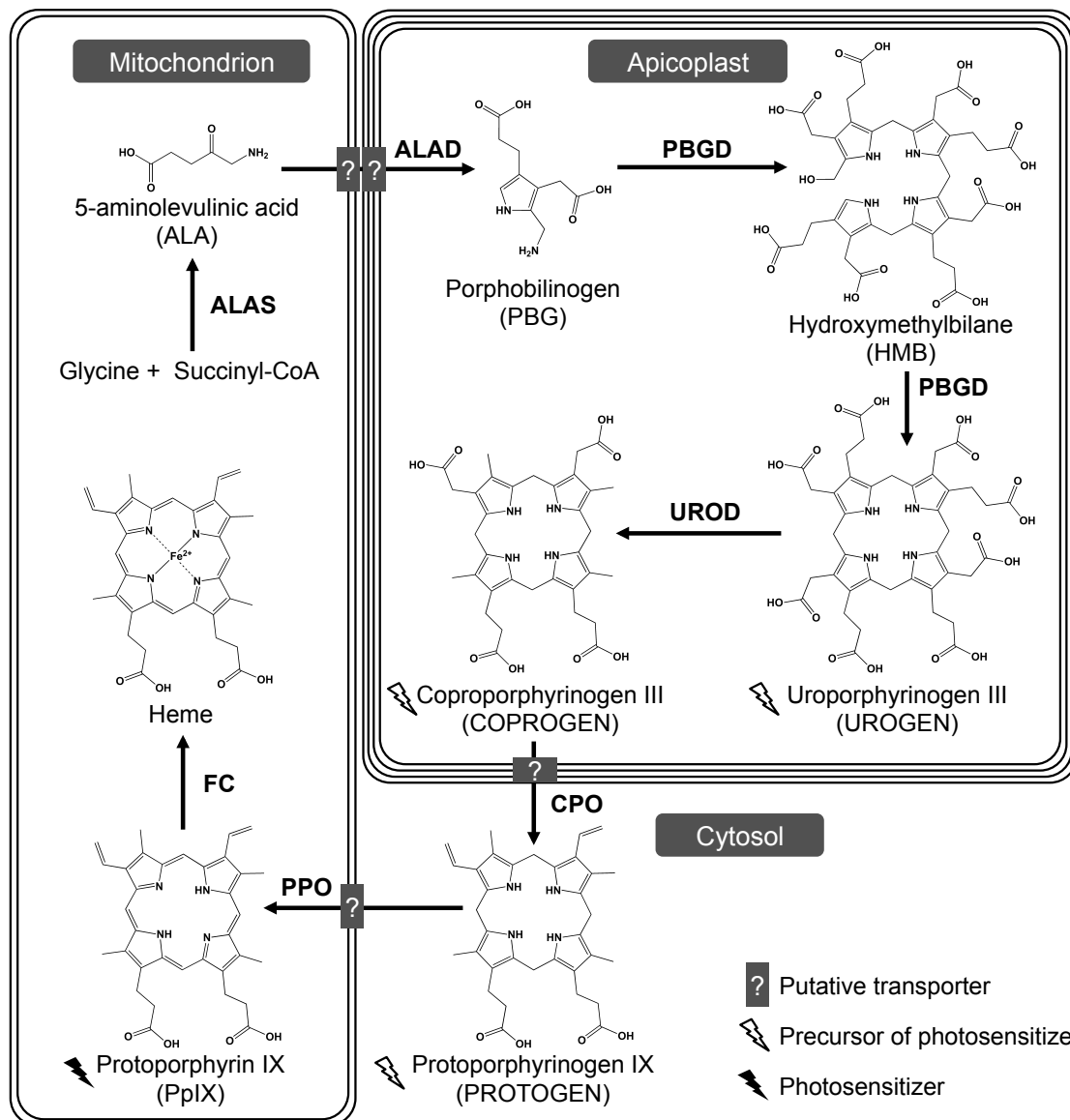


図3 マラリア原虫のヘム合成経路

ヘム合成を担う酵素群はmitochondrion (ミトコンドリア)、apicoplast (アピコプラスト)、およびcytosol (細胞質) に局在している。ALAS: ALA synthase、ALAD: ALA dehydratase (またはPBGS: porphobilinogen synthase)、PBGD: porphobilinogen deaminase、UROD: uroporphyrinogen III decarboxylase、CPO: coproporphyrinogen oxidase、PPO: protoporphyrinogen oxidase、FC: ferrochelatase、灰色の長方形: 推定上のヘム中間体トランスポーター、黒雷: 光増感剤、白雷: 光増感剤前駆体 (uroporphyrinogen III、coproporphyrinogen IIIおよびprotoporphyrinogen IXは酸化により、それぞれ光増感剤のuroporphyrin III、coproporphyrin IIIおよびprotoporphyrin IXへ変化)。マラリア原虫ではPBGDがuroporphyrinogen III synthase (UROS) 活性も有していると考えられている。

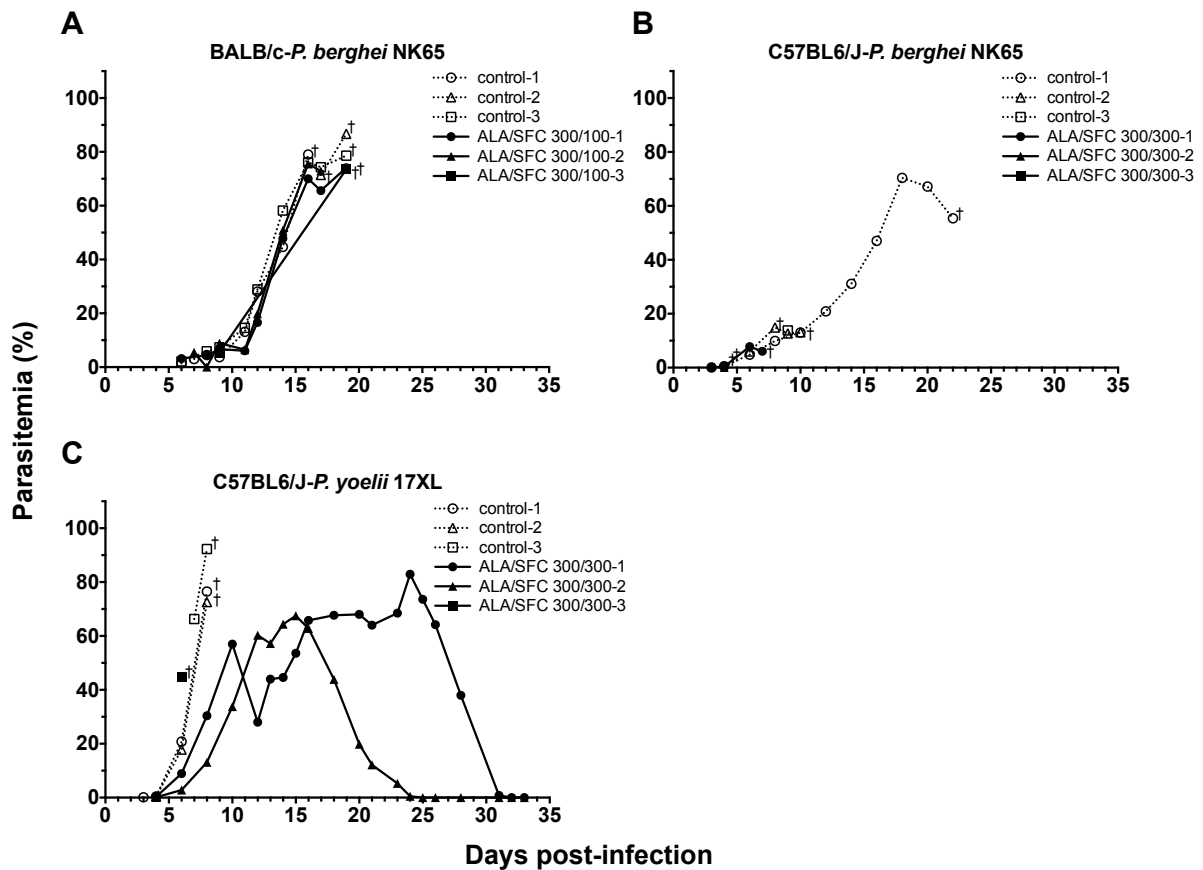


図 4 マラリア原虫の種とマウスの系統の組合せによる感染率への影響

メスの BALB/c マウスまたは C57BL/6J マウスに強毒株の *P. berghei* NK65 および *P. yoelii* 17XL の感染赤血球を 1×10^4 個を腹腔内接種して感染を行った。コントロール群には PBS を、治療群には ALA 塩酸塩と SFC を組み合わせて 1 日 1 回の経口投与で感染後 1 日目から開始した。(A) BALB/c マウスと *P. berghei* NK65: 治療群には ALA 塩酸塩/SFC を 300/100 mg/kg を投与 (n=5)。各群 5 匹のマウスのうち 3 匹を代表例として感染率算出を行った。全ての感染マウスが死亡。(B) C57BL6/J マウスと *P. berghei* NK65: 治療群には ALA 塩酸塩/SFC を 300/300 mg/kg を投与 (n=3)。全ての感染マウスが死亡。(C) C57BL6/J マウスと *P. yoelii* 17XL: 治療群には ALA 塩酸塩/SFC を 300/300 mg/kg を投与 (n=3)。治療群マウス 3 匹のうち 2 匹が生存。点線および白抜き印: コントロール群、実線および黒の印: 治療群、Days post-infection: 感染後日数、†: 感染マウスの死亡。

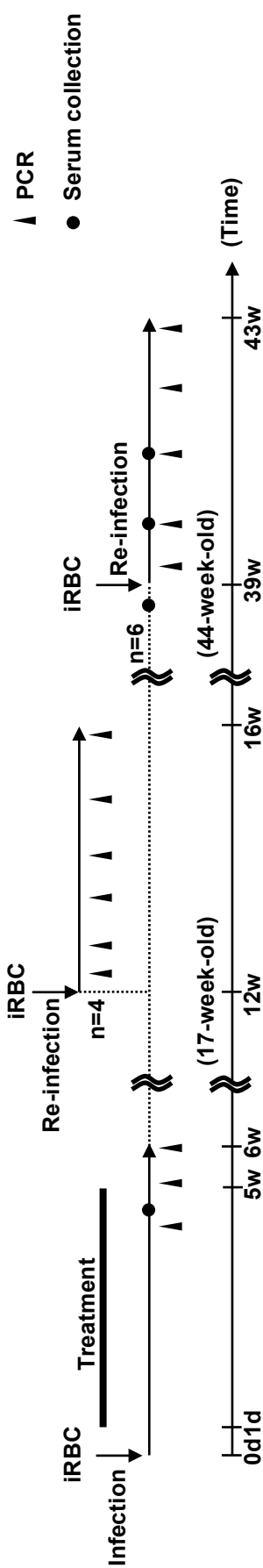


図5 感染治療実験のスケジュール

マラリア原虫 *P. yoelii* 17XL 感染赤血球 (infected red blood cell: iRBC) をメスの C57BL/6J マウスへ腹腔内接種することにより感染を開始した。初感染と再感染における、治療、診断 PCR および血清採取のスケジュールを示している。太線: 治療期間、実線矢印: フォローアップ期間、点線: 試験の間欠期、黒丸: 血清の採取時期 (初感染 30 日後、そして再感染 1 日前、5 日後および 14 日後)、黒三角: 診断 PCR (初感染 28 日後、38 日後および 44 日後; 17 週齢の治癒マウスの再感染 3 日後、7 日後、9 日後、14 日後、20 日後、および 27 日後; 44 週齢の治癒マウスの再感染 3 日後、5 日後、14 日後、20 日後、および 28 日後)。

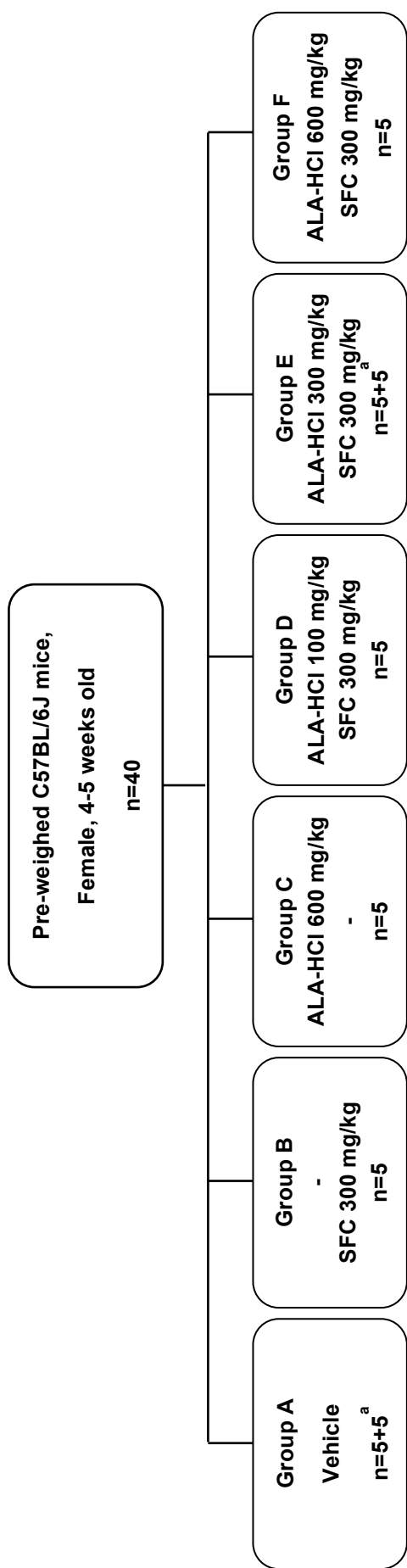


図 6 *P. yoelii* 17XL 感染マウスの投与グループ

あらかじめ体重を測定した 4 から 5 週齢のメスの C57BL/6J マウスを 1 グループ当たり 5 匹の 6 グループに無作為に振り分けた。グループ A: 滅菌済み 0.5%メチルセルロース (vehicle) 投与、グループ B: SFC 300 mg/kg 単独投与、グループ C: ALA 塩酸塩 600 mg/kg 単独投与、グループ D: ALA 塩酸塩 100 mg/kg および SFC 300 mg/kg 併用投与、グループ E: ALA 塩酸塩 300 mg/kg および SFC 300 mg/kg 併用投与、グループ F: ALA 塩酸塩 600 mg/kg および SFC 300 mg/kg 併用投与。

^a グループ A および E は独立した実験を 2 回実施し n=10 とした。

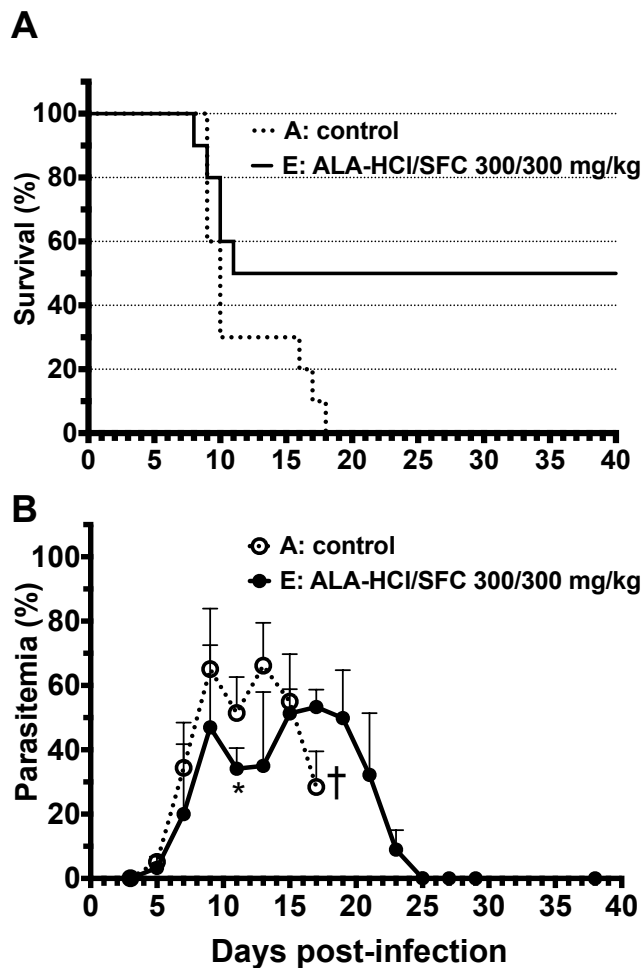


図 7 ALA 塩酸塩/SFC 投与の *P. yoelii* 17XL 感染マウスへの影響

メスのC57BL/6Jマウス（1群あたりn=10）に*P. yoelii* 17XL感染赤血球を 1×10^4 個を腹腔内に接種し、ALA塩酸塩、SFC、またはそれらの組み合わせを1日1回の経口投与で感染後1日目から開始した。感染マウスが治癒した投与群の代表例としてグループE（ALA/SFC 300/300 mg/kg）、およびコントロール群のデータを示している。それぞれのグループのデータは独立した実験2回の結果を合わせている。（A）各投与群の生存曲線。結果はsurvival %（生存率）として掲示している。Kaplan-Meier法によって分析した後にLog-rank検定を実行して統計解析を行った結果、両群間に統計的有意差が認められた（ $p < 0.05$ ）。（B）各投与群マウスのparasitemia（感染率）の推移。各算出日における全ての生存マウスの感染率を平均 + 標準偏差としてプロットしている（個々のマウスの感染率は図8を参照）。各タイムポイントの値をStudent's *t*検定により両群間で比較し、感染後11日目で統計的有意差が見られた（*、 $p < 0.05$ ）。Days post-infection: 感染後日数、†: すべての感染マウスが死亡。

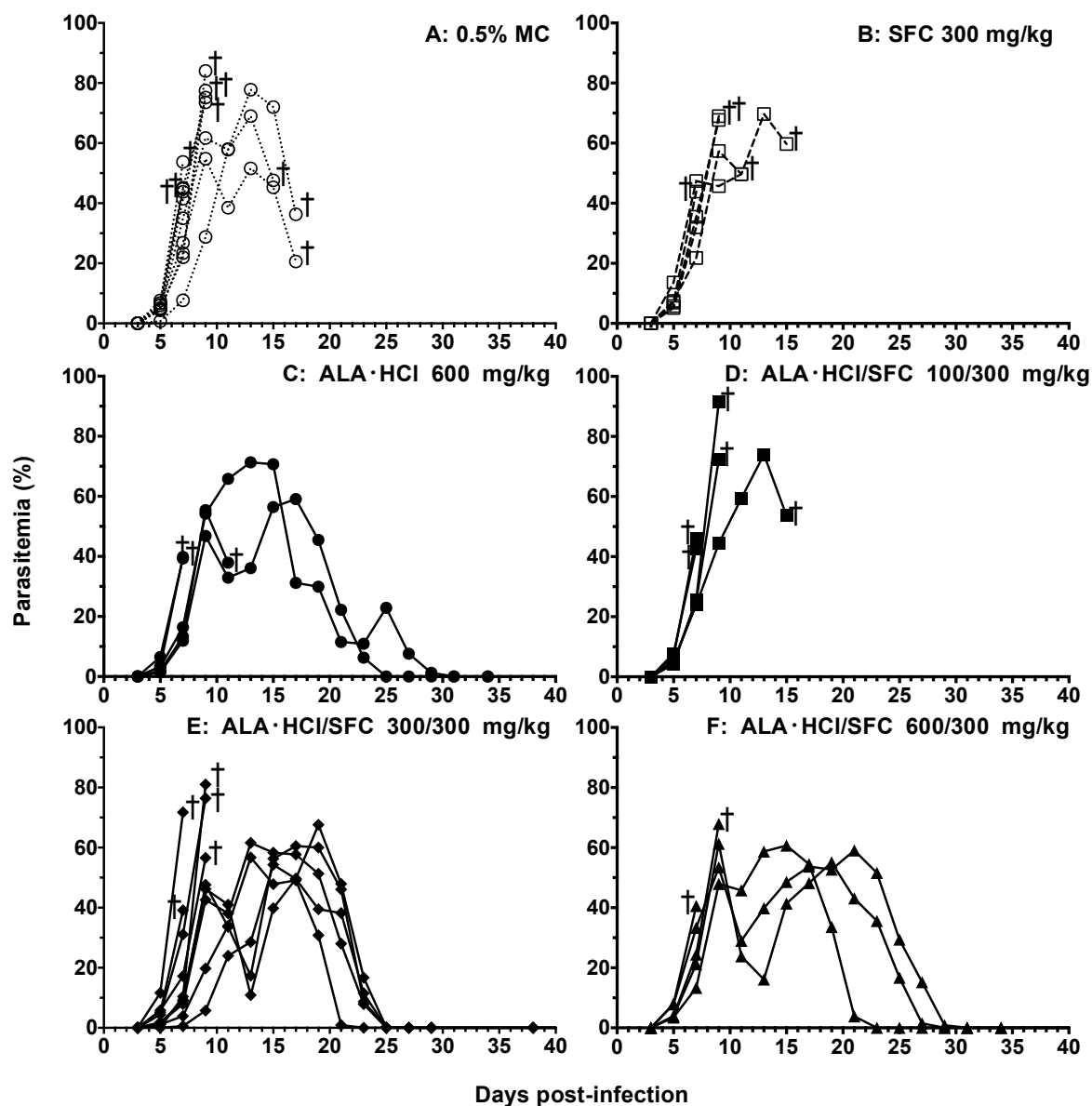


図8 各投与群における個々のマウスごとの parasitemia (感染率) の推移

メスの C57BL/6J マウス (1 群あたり n=5 または 10) に *P. yoelii* 17XL 感染赤血球を 1×10^4 個を腹腔内に接種し、ALA 塩酸塩、SFC、またはそれらの組み合わせを 1 日 1 回の経口投与で感染後 1 日目から開始した。各グループへの投与は次の通りである。グループ A: 滅菌済み 0.5%メチルセルロース (vehicle) 投与、グループ B: SFC 300 mg/kg 単独投与、グループ C: ALA 塩酸塩 600 mg/kg 単独投与、グループ D: ALA 塩酸塩 100 mg/kg および SFC 300 mg/kg 併用投与、グループ E: ALA 塩酸塩 300 mg/kg および SFC 300 mg/kg 併用投与、グループ F: ALA 塩酸塩 600 mg/kg および SFC 300 mg/kg 併用投与。グループ A および E のデータは独立した実験 2 回の結果を合わせた。Days post-infection: 感染後日数、†: 感染マウスの死亡。

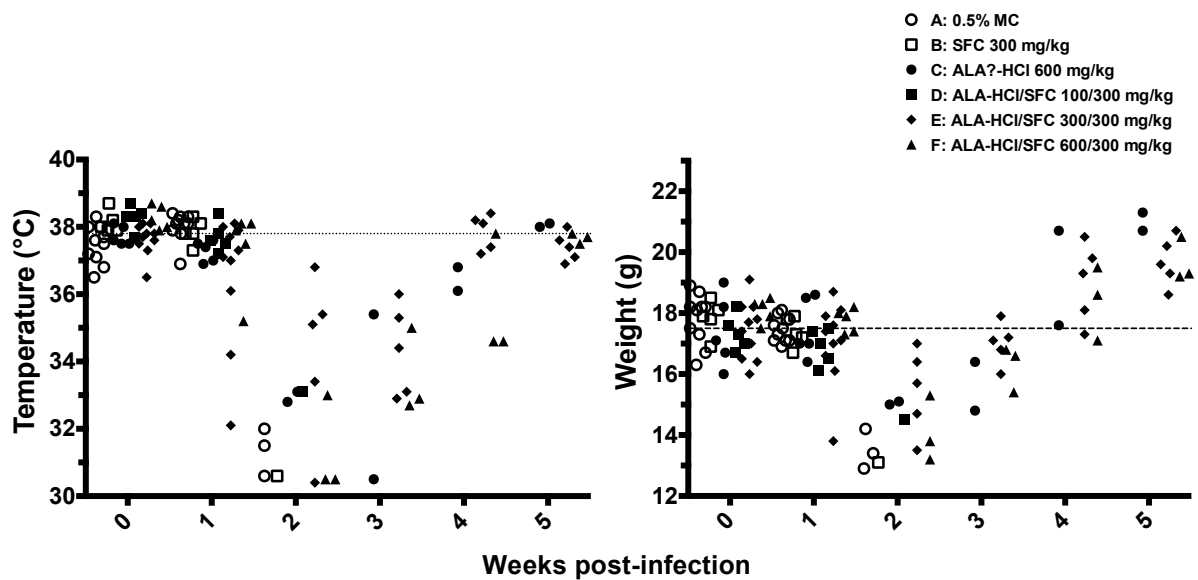


図 9 各投与群における個々のマウスの体温および体重の推移

メスの C57BL/6J マウス (1 群あたり n=5 または 10) は *P. yoelii* 17XL 感染赤血球を 1×10^4 個を腹腔内に接種し、ALA 塩酸塩、SFC、またはそれらの組み合わせを 1 日 1 回の経口投与で感染後 1 日目から開始した。個々のマウスの体温 (左パネル) および体重 (右パネル) を、感染前および感染後に毎週測定してプロットし、感染後の推移として表示している。グループ A および E のデータは独立した実験 2 回の結果を合算した。Weeks post-infection: 感染後週数、点線および破線: それぞれ感染前の平均体温および体重、x 軸上のゼロ: 感染前に対応。

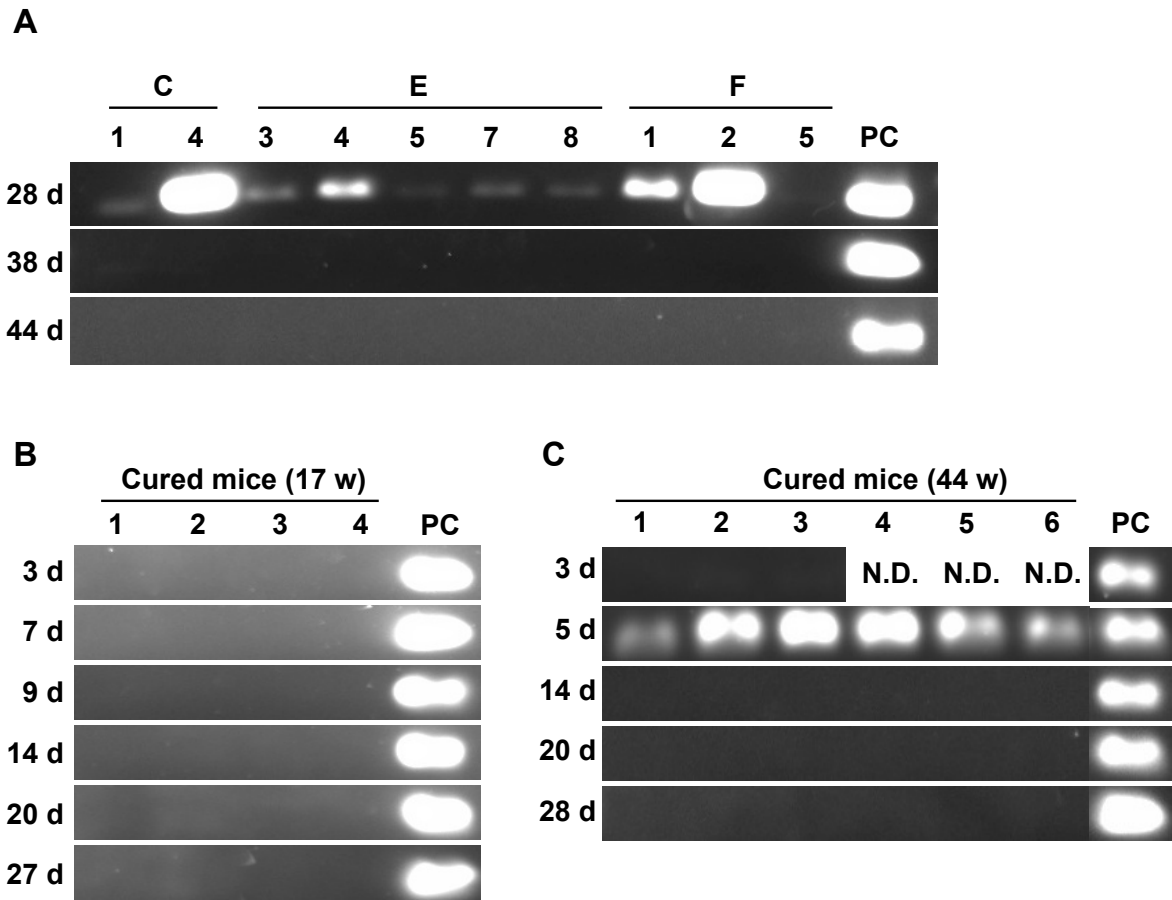


図 10 初感染および再感染から生存したマウスに対する診断 PCR

感染マウスの血液から全 DNA を抽出し、*P. yoelii* 17XL のミトコンドリアゲノムにコードされている *cob* 遺伝子の断片 (426 bp) を PCR により増幅した。PCR 産物は 1.2% アガロースゲル上で電気泳動した。(A) 初感染 28 日後、38 日後および 44 日後の結果。グループ E のデータは独立した実験 2 回の結果を合わせた。顕微鏡観察では初感染 28 日後に生存しているマウス 10 匹中 3 匹でのみマラリア原虫が検出されたが (図 8 を参照)、マラリア原虫の DNA は生存マウス 10 匹中 9 匹で検出された。(B) 17 週齢 (初感染回復から 6 週間後) の治癒マウスに対する再感染 3 日後、7 日後、9 日後、14 日後、20 日後および 27 日後の結果。(C) 44 週齢 (初感染回復から 33 週間後) の治癒マウスに対する再感染 3 日後、5 日後、14 日後、20 日後および 28 日後の結果。ポジティブコントロール (PC) として、*P. yoelii* 17XL への感染後何も治療を施していないマウスの血液から単離した全 DNA を用いた。N.D.: Not determined (未検)。

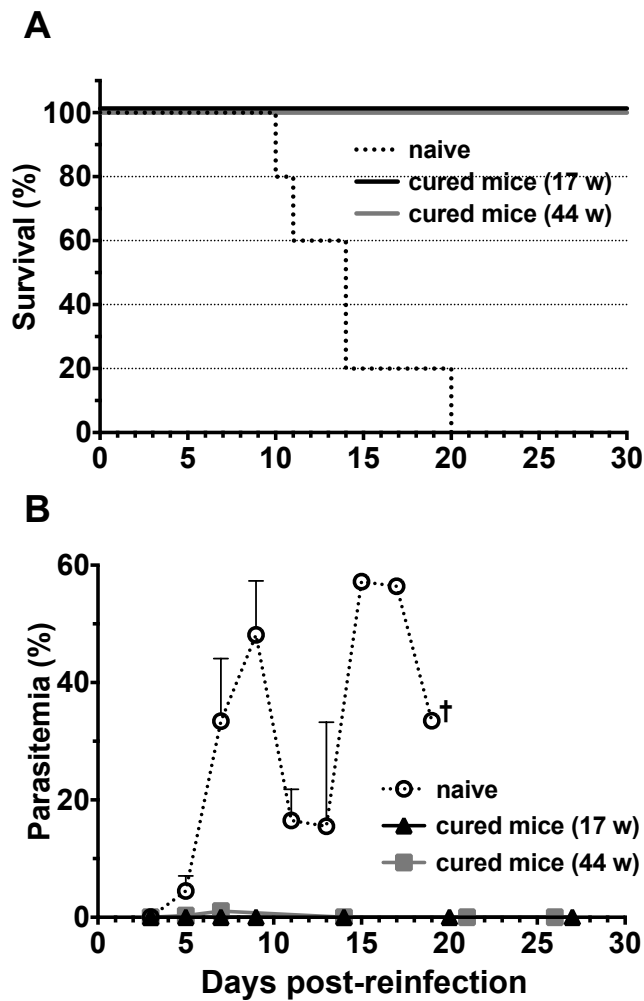


図 11 治癒マウスに対する再感染の影響

17 週齢の未感染マウス (コントロール、n=5)、17 週齢 (n=4) および 44 週齢 (n=6) の治癒マウスの腹腔内に 1×10^4 個の *P. yoelii* 17XL 感染赤血球を接種した。(A) 各群の生存曲線。結果は survival % (生存率) として示している。Kaplan-Meier 法によって分析した後に Log-rank 検定を実行して統計解析を行った結果、3 群間に統計的有意差が認められた ($p < 0.001$)。 (B) 各群マウスの parasitemia (感染率) の推移。値は平均+標準偏差としてプロットしている。点線: 未感染マウス、黒の実線: 17 週齢の治癒マウス、灰色の実線: 44 週齢の治癒マウス、†: すべてのコントロールマウスの死亡。

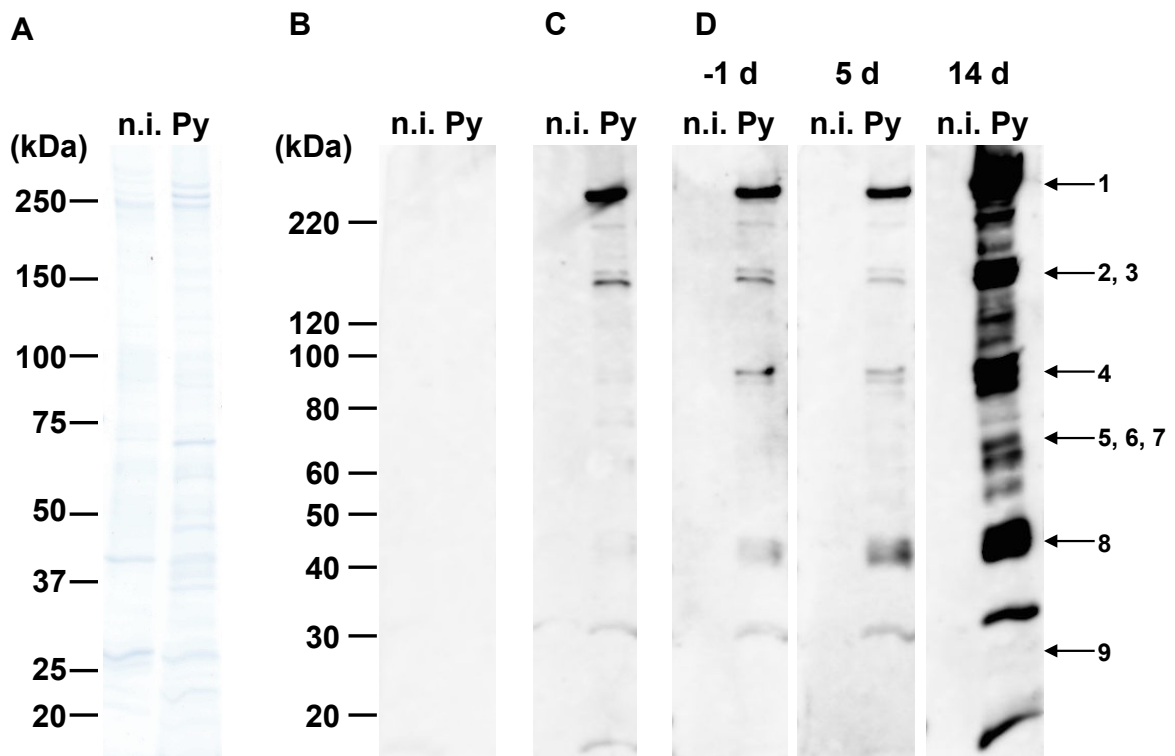


図 12 感染マウスの血清中に含まれるマラリア原虫に対する抗体の時間変化

P. yoelii 17XLライセートおよび非感染赤血球のライセート（ネガティブコントロール）各3 μg を、5-20%のグラジエントゲル上で分離した後、クマシー染色によりバンドを検出し（**A**）、または泳動後のゲルをPVDF膜上に転写した。転写膜は非感染マウス、初感染マウスおよび再感染マウスから調製した血清を1次抗体として用いてプローブした。抗原に結合した抗体をanti-mouse IgG-horseradish peroxidaseにより検出した。非感染赤血球および*P. yoelii* 17XLライセートに対して非感染マウス（**B**）、初感染マウス30日後（**C**）、または44週齢の治癒マウス（再感染1日前: **D**左パネル、5日後: **D**中央パネル、および14日後: **D**右パネル）から採取した血清を使用したイムノブロット分析の結果。この実験で使用した血清の希釈率は、再感染14日後のマウス血清のみ1/1,000で使用し（**D**右パネル）、それ以外は1/250で使用した。図中の矢印はnano LC-MS/MS解析により推定された抗原を示す（抗原の推定の詳細はそれぞれ図14および表2を参照）。n.i.: 非感染赤血球ライセート、Py: *P. yoelii* 17XLライセート。

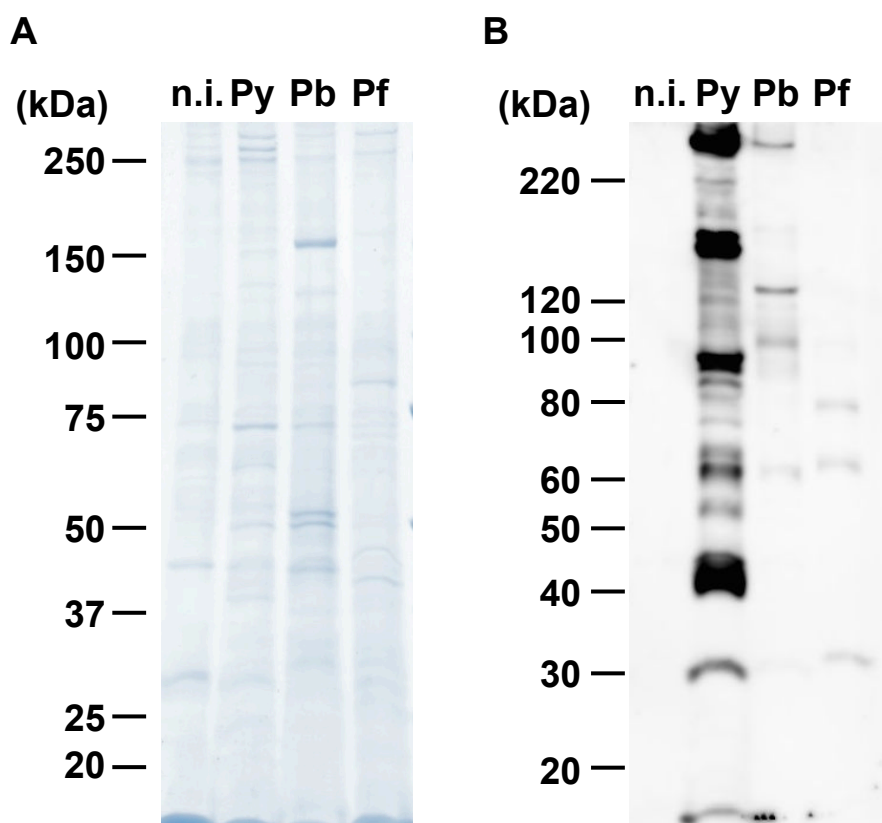


図 13 感染マウスの血清中に含まれるマラリア原虫に対する抗体の種特異性

各種マラリア原虫のライセートおよび非感染赤血球のライセート（ネガティブコントロール）各3 μ gを、5-20%のグラジエントゲル上で分離した後、クマシー染色によりバンドを検出し（**A**）、または泳動後のゲルをPVDF膜上に転写した。転写膜は44週齢の治癒マウスの再感染14日後に採取した血清を1次抗体として用いて反応させ、抗原に結合した抗体をanti-mouse IgG-horseradish peroxidaseにより検出した（**B**）。この実験で使用した血清は1/1,000に希釈して使用した。n.i.: 非感染赤血球ライセート、Py: *P. yoelii* 17XLライセート、Pb: *P. berghei* NK65ライセート、Pf: *P. falciparum* 3D7ライセート。

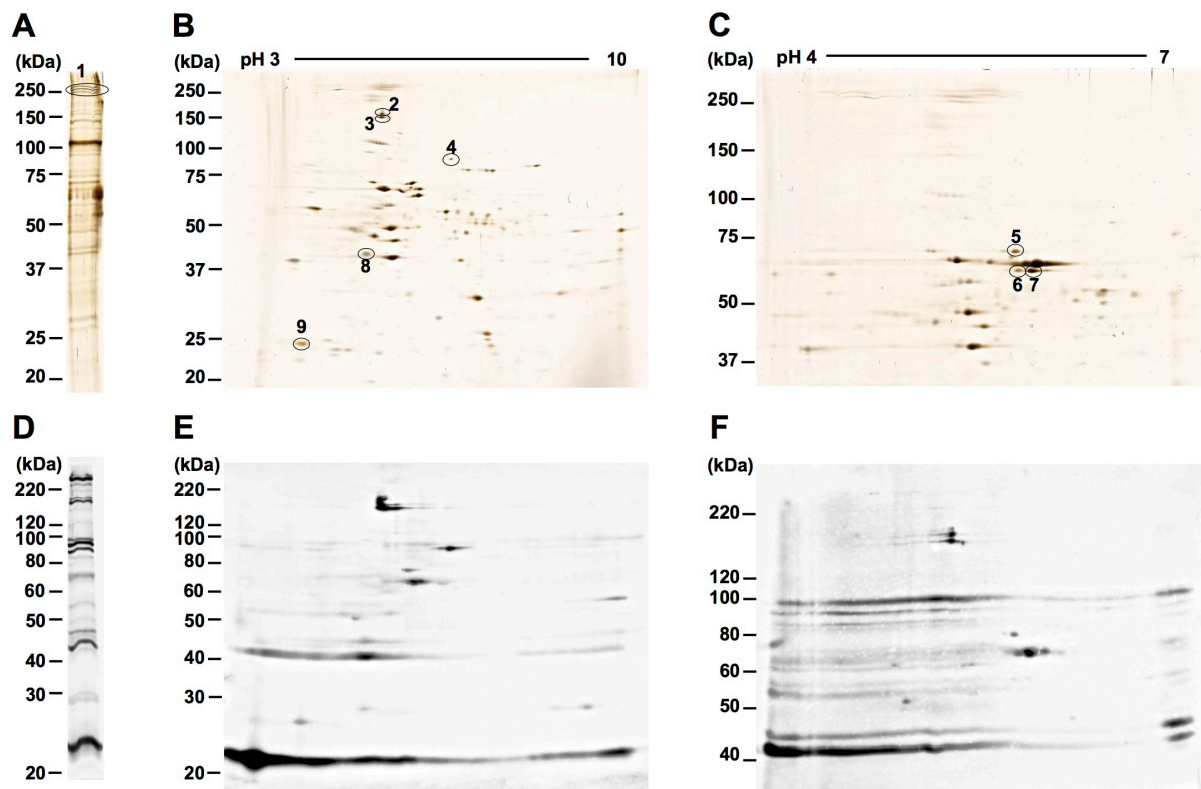


図 14 治癒マウスの血清と特異的に反応するタンパク質の検出

P. yoelii 17XL ライセートはそれぞれ次の条件で分離および検出した。(A、D) 10%ゲル上での SDS-PAGE、(B、E) 二次元電気泳動、pH 3-10 の範囲の等電点電気泳動の後、10%ゲル上での SDS-PAGE、(C、F) 二次元電気泳動、pH 4-7 の範囲の等電点電気泳動後、7.5%ゲル上での SDS-PAGE。電気泳動の際、各ゲルにロードしたサンプル量は (A) 0.3 μg 、(B) 60 μg 、(C、E、F) 20 μg 、(D) 3 μg 、である。(A-C) 銀染色、(D-F) イムノブロット、44 週齢の治癒マウスの再感染 14 日後に採取した血清で反応させ anti-mouse IgG-horseradish peroxidase によって検出した (血清の希釈率は 1/1,000)。円でマークしたバンドおよびスポットを血清中の抗体へ特異的に結合する抗原であると判断し、それらを同定するために nano LC-MS/MS 解析用のサンプルとして選択した (抗原の推定の詳細については表 2 を参照)。

表1. ALA塩酸塩、SFCまたはその併用投与が*P. yoelii* 17XL感染C57BL/6Jマウスの生存率に与える影響

Group	Dose (mg/kg)		Survival rate ^b (living/infected ^c)
	ALA·HCl	SFC	
A ^a	-	-	0/10 ^d
B	-	300	0/5
C	600	-	2/5
D	100	300	0/5
E	300	300	5/10 ^d
F	600	300	3/5

^a Vehicle として滅菌済み 0.5%メチルセルロースを投与

^b 初感染 30 日後の survival rate (生存率)

^c 使用したマウスすべてが感染した

^d 独立した実験 2 回の結果を合わせた

表 2 nano LC-MS/MS および各種データベース検索で推定された抗原

Band or Spot #	Peptide ^a	Coverage ^a	MASCOT Score ^b	MW	Protein	Gene ID (PlasmoDB)	Comments
1	38	24	1,172	197,231	MSP1 precursor [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY05748	MSP1 precursor (arising MSP1-83, MSP1-42, MSP1-40 and MSP1-38, which MWs are 83, 42, 40 and 38 kDa, respectively, after cleavage by proteases)(99).
2	4	2	116	197,231	Fragment protein of MSP1 precursor [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY05748	Fragment protein from detergent-promoted cleavage of the MSP1 precursor(100).
3	7	5	122	197,231			
4	8	4	176	197,231	MSP1-83 [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY05748	MSP1-83 arisen from processing MSP1 precursor(99).
5	27	39	1,189	74,280	Heat shock protein 70 [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY06158	
6	34	50	1,528	73,194	Heat shock protein hsp70 homologue Pfhs70-3 [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY06981	Heat shock proteins (HSPs) may play important roles in host-parasite interaction(70-72).
7	38	53	2,086	73,194			
8	7	21	248	43,038	MSP7-like protein (MSPR2) [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY17X_1354000	The specific antibody against recombinant MSPR2 was developed in mice(69).
9	5	31	154	18,550	Fragment protein of Early transcribed membrane protein (ETRAMP) [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY17X_0203000	Membrane transport protein localized at parasitophorous vacuole and involved in parasite-erythrocyte transportation(101).
	3	15	139	25,161	Uncharacterized protein [<i>Plasmodium yoelii</i>]	PY00763	Identified as rhoptry protein by proteome(102).

^a nano LC-MS/MS 分析で検出された断片ペプチド数および推定タンパク質のアミノ酸配列に対する被覆度

^b nano LC-MS/MS 分析および MASCOT 検索によって同定されたタンパク質の蓋然性

謝辞

本研究を行うに当たり、この研究を行う機会を与えて下さり、直接ご指導いただきました東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室（現長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科長）、北潔教授に心より感謝致します。また、北潔教授より紹介教員を引き継ぎご指導に当たって頂きました、東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室渡邊洋一准教授に心より感謝致します。

本研究に着手するに当たり、この研究を行う機会を与えて下さり、数々の有益な助言を下さりました SBI ファーマ株式会社、田中徹博士、中島元夫博士、高橋究博士に深く感謝致します。

げっ歯類に感染するマラリア原虫の取り扱いおよび動物実験技術をご指導して下さい、多数の貴重な助言を下さいました現千葉大学大学院医学研究院感染生体防御教室、彦坂健児博士および東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室、Emmanuel O. Balogun 博士に心から感謝致します。

熱帯熱マラリア原虫の培養実験およびサンプルを提供して下さい、有益な助言を下さいました東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室、小松谷啓介博士に心から感謝致します。

げっ歯類に感染するマラリア原虫の提供および実験に関する数々の有益な助言を下さいました杏林大学医学部感染症学講座寄生虫学部門、小林富美恵教授および新倉保博士に深く感謝致します。

最後に日々ご指導いただき多くの有益な助言を下さり研究を大きく前進させて下さいました、東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室の皆様ならびに SBI ファーマ株式会社の皆様に感謝の意を表します。

図 3、5、6、7、8、9、10、11、12B-D、13B、14、また表 1、2 のオリジナルの著作権は“Shigeo Suzuki, Kenji Hikosaka, Emmanuel O. Balogun, Keisuke Komatsuya, Mamoru Niikura, Fumie Kobayashi, Kiwamu Takahashi, Tohru Tanaka, Motowo Nakajima, Kiyoshi Kita. *In Vivo* Curative and Protective Potential of Orally Administered 5-Aminolevulinic Acid plus Ferrous Ion against Malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (11), 6960-6967.”にあり、American Society for Microbiology の許可を得て使用した。

利益相反

私は SBI ファーマ株式会社と雇用関係にあり、東京大学北教授と SBI ファーマ株式会社の共同研究の一環として本研究を行った。その他に言及すべき利益相反は無い。