

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 鈴木 重雄

【序論】

マラリアは年間約 2 億人以上が感染し、約 44 万人が死亡すると推定されているが、その被害を受けてい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、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。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、*Anopheles* 属のハマダラカによって媒介される。マラリア原虫の持つ複雑な生活環や抗原候補分子に多型が存在する事などに起因し、マラリアに対するワクチンはまだ実用化前の段階であるため、現状のマラリア対策は化学療法や蚊帳等に依存している。また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であり、現在主力のアルテミシニン併用療法に対してさえ耐性株が出現している。

5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid, ALA) は、自然界において広範に存在する天然のアミノ酸でありヘム生合成の前駆体である。ALA は様々な領域で既に実用化されており、がんの光線力学診断および光線力学療法、そしてサプリメントとして利用されている。興味深い事に、ALA とクエン酸第一鉄ナトリウム (Sodium ferrous citrate, SFC) のサプリメントとしての摂取が、ソロモン諸島において小児マラリア患者の典型的なマラリア症状を改善して早期回復を促進した。この事例に関連する研究として、Smith らが *Plasmodium falciparum* (熱帯熱マラリア原虫) に対して ALA による光線力学療法を適用したところ、ALA と白色光照射の組み合わせによって *P. falciparum* の増殖をほぼ完全に抑制する事が *in vitro* (血液培養) の実験で報告された。しかし光照射は実際の治療では非現実的であり、私の所属する研究グループは光照射の代わりとなる条件を探索した結果、ALA と SFC の併用が *P. falciparum* の増殖を阻害することを *in vitro* 実験で見出した。

この様に ALA と SFC の併用はマラリアに対する有望な新規化学療法になると期待できるが、マラリア患者を対象とした臨床試験へ進めるためには、マラリアの動物モデルにおいて有効性を実証する必要がある。そのため、本研究では *in vivo* 実験においてその薬効評価を行った。さらに、ALA と SFC の併用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。

【材料と方法】

最初に薬効評価に適切なマウスモデルを選定するための予備検討を行い、使用するマウスの系統 (BALB/c、C57BL/6J) とマラリア原虫の種 (げっ歯類のマラリア原虫で致死株の *P. berghei* NK65、*P. Yoelii* 17XL) の組み合わせおよび投与量を検討した。この結果を踏まえ、本実験ではメスの C57BL/6J マウスを 1 群当たり 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。*P. Yoelii* 17XL が感染した感染赤血球を各投与群のマウスの腹腔内に接種して感染を開始した。その後、ALA 塩酸塩 および SFC (ALA/SFC) を経口ゾンデにより 1 日 1 回の反復投与を行った。各投与群の投与液の組成は次の通りである。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、そしてグループ F: ALA 塩酸塩 600 mg/kg および SFC 300 mg/kg 併用投与である。治療効果は感染率、診断 PCR (ミトコンドリアゲノムの *cob* の部分配列を増幅) およびマウスの生存率を指標に評価した。さらに、体重と体温も計測して治療評価に加えた。

治癒したマウスに対し、初感染の回復から 6 週間後 (17 週齢) および 33 週間後 (44 週齢) の時点で同様の感染赤血球を腹腔内接種し、再感染への抵抗性を調べた。再感染後も感染率、診断 PCR およびマウスの生存率を指標に抵抗性を評価した。感染マウスおよび治療マウスから採血して血清を調製し、これをイムノブロットの一次抗体として用いた。また、感染赤血球からマラリア原虫のライセートを調製して抗原として用いた。抗原を SDS-PAGE または二次元電気泳動 (等電点電気泳動および SDS-PAGE) によって分離し、イムノブロットまたは銀染色によりタンパク質を検出し、両者を比較してマラリア原虫特異的な抗体により認識される抗原を選択した。さらに、これらの抗原を nano LC-MS/MS 解析によりタンパク質の推定を行った。

【結果】

感染マウスに対して各種投与液で治療を行った結果、Vehicle のみを投与 (グループ A)、300 mg/kg の SFC 単独投与 (グループ B)、または ALA/SFC 100/300 mg/kg の併用投与 (グループ D) を行った感染マウスはすべてが死亡した。これに対し、ALA 塩酸塩 600 mg/kg 単独投与 (グループ C)、ALA/SFC を 300/300 または 600/300 mg/kg 併用投与 (グループ E および F) では、致死株のマラリア原虫に感染したにも関わらず、それぞれ 2/5、5/10 および 3/5 の感染マウスが生存した。治療効果をより詳細に解析するため、代表データとしてグループ A および E の生存率と感染率を比較した。生存率では 2 群間に統計的有意差が認められた ($p < 0.05$)。感染率に関しては、統計的有意差がみられたのは感染後 11 日目のみ ($p < 0.05$) ではあったが、マラリア原虫に対する緩やかな増殖阻害が確認された。感染 1 ヶ月後には顕微鏡下ではグループ E のマウスの末梢血中にマラリア原虫が検出されず、その後診断 PCR より寄生虫の排除が認められて感染マウスの治癒を確認した。体重と体温は感染後に一時的に低下したが、感染率の減少とともにこれらの値も回復した。

続いて、治癒マウスに対して初感染と同じマラリア原虫を接種して再感染を試みた。17週齢の治癒マウスでは原虫およびそのDNAのいずれも検出されず、また44週齢の治癒マウスでは一時的にわずかに感染率が上昇したが(1%以下)、その後すぐに排除された。これらの事から、治癒マウスは再感染に対して抵抗性を持つ事が示され、しかもこの効果は初感染の治癒から追加免疫なしでも230日以上長期にわたって保持されることが明らかになった。

この抵抗性についてより詳細に解析するために再感染を試みたマウスの血清を用いてイムノブロットを行った。その結果、治癒マウスの血清中から*P. yoelii* 特異的な抗体が複数検出され、再感染に対する防御効果は液性免疫によるものである事が示された。さらに、検出された抗体に対応する抗原をnano LC-MS/MS解析により調べた結果、代表的なマラリアワクチンの候補抗原のMSP1等、免疫に関与すると報告されている分子が複数検出された。

【考察】

本研究では、経口によるALA/SFCの併用投与により、マラリア原虫*P. yoelii* XL(致死株)に感染したマウスの半数以上が治癒する事を示した。マラリア流行地域において抗マラリア薬の投与は経口が望ましく、経口投与が可能なALA/SFCはマラリアに対して好適な化学療法である。実際、ALA/SFCは既にヨーロッパ系とアジア系の成人ボランティアを対象とした第I相臨床試験が終了し、また食品、化粧品など様々な用途で利用されており、ヒトに対する安全性が証明されている。これらの特徴から、ALA/SFCは極めて有望な抗マラリア薬の候補であると考えられる。

ALA/SFCによる治療は一部の感染マウスを治療できなかったが、これは以下に起因すると推察される。ALA/SFCはリング型のマラリア原虫に対して最も効果的な阻害活性を示すと考えられるため、非リング型の原虫が増殖阻害を回避し、またリング型の期間が*P. falciparum*に比べて短い*P. yoelii*では十分な時間ALA/SFCに暴露されなかった可能性がある。これに加え、ALA/SFCによる*in vitro*での*P. falciparum*に対する増殖阻害やソロモン諸島で得ている小児マラリア患者の回復促進の事実を考慮すると、ALA/SFCによる治療は今回実施した様な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。ALA単独投与で治癒した感染マウスについては、飼料から十分な量の二価鉄イオンを摂取した事によりSFCの投与なしに回復したと考えられる。本研究で最も重要な発見の一つは、穏和な抑制効果をもたらす化学療法は宿主に優れた防御免疫を付与する点である。この防御効果と安全性という観点から、ALA/SFCによるマラリアに対するchemoprevention(化学予防)として利用することも可能である。

今後は、ALA/SFC併用療法の*P. falciparum*に対する有効性を*in vivo*で評価するため、サルマラリアモデルを用いて実験する予定している。さらに、医薬品開発の次のステップとしてヒトのマラリア患者を対象とした第II相臨床試験への展開を計画中である。将来的には新しい方向性の抗マラリア薬として利用される事が期待される。