

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)

リーシュマニア症はリーシュマニア原虫によって引き起こされる原虫感染症で、WHO が指定する早急にコントロールが必要な 6 大疾患の一つである。本症は内臓型(VL)、皮膚型(CL)に大別され、そのうち VL は脾臓、肝臓に原虫が感染し、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。旧大陸においては *Leishmania donovani* などの *L. donovani* complex が VL を引き起こす主要な病原体であるとされ、世界で毎年 50 万人もの新規患者が発生しているとされる。特にインド亜大陸において *L. donovani* による VL が猛威を奮っているが、VL の病態解析においてマウスを用いた有用な病態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。本症の病態形成機序の解明にはヒトでは倫理的観点から研究が困難であることもあり、実験動物を用いた研究は重要であると考えられるが、これまでのマウスモデルでは感染初期において原虫数の増加が見られるものの、感染 4 から 8 週後に特に肝臓において原虫が排除されてしまう。従って、これまで進行性かつ重篤な症状を示す

VL に外挿出来るマウスモデルはなく、持続的な病態の悪化を示す VL マウスモデルの確立は必要不可欠である。

そこで本研究では有用な病態モデルの確立を目的として、まず第一章では持続的に病態が進行し、重篤な病態を示す *L. donovani* 感染マウスを開発した。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) (1×10^8 /head) を BALB/cA に感染させ、感染 12、24 週後に剖検した。脾臓、肝臓における原虫数の増殖を確認するために、押捺標本を用いて LDU (宿主有核細胞あたりの原虫数 \times 臓器重量 mg) を計数し、感染原虫数を定量的に評価した結果、両臓器の LDU は経時的に増加しており、感染 24 週では脾臓で 2096 ± 197 、肝臓で 6148 ± 567 であった。また両臓器の重量を測定した結果、両臓器とも経時的に増加し、特に脾臓重量は感染 24 週では未感染マウスと比較し、約 10 倍に達し顕著な肝脾腫が観察された。従って、本章で開発した *L. donovani* 感染 BALB/cA は VL の主徴である肝脾腫が観察され、脾臓、肝臓において持続的な原虫の増殖が確認され、持続的な病態の悪化を示す *L. donovani* 感染マウスが確立されたと考えられる。

第二章では本マウスモデルが VL の病態解析、免疫学的研究を行う上で有用であることを検討するために、*L. donovani* 感染による病態に抗原特異的な Th1 反応及び Th2 反応が関与していることを検討した。これまでの CL 研究において *L. major* 感染 BALB/cA ではヘルパー T 細胞が示す免疫反応のうち Th2 型の免疫反応が誘導されることで原虫の増殖及び皮膚病変の悪化が見られ、感染に対して感受性を示し、C57BL/6 では Th1 型の免疫反応が誘導されることで皮膚病変は形成されるものの、感染が進むにつれ自然治癒し、抵抗性を示すことが知られている。そこで BALB/cA 及び C57BL/6 に *L. donovani* (1×10^8 /head) を感染させ、感染 12、24 週後に原虫数および臓器重量の変動を評価した。まず BALB/cA の臓器 LDU は感染 12 週後では脾臓で 546 ± 195 、肝臓で 3138 ± 760 、感染 24 週後では脾臓で 2096 ± 197 、肝臓で 6148 ± 567 と両臓器において経時的に増え続けていた。一方、C57BL/6 は感染 12 週後では脾臓で 96 ± 67 、肝臓で 329 ± 122 、感染 24 週後では脾臓で 82 ± 66 、肝臓で 0 と、両臓器において BALB/cA に比べ明らかに原虫数が低く、更に感染が経過するにつれ減少傾向が見られた。また臓器重量を測定した結果、BALB/cA では脾臓、肝臓ともに重量は増加し続け、感染 24 週後の脾臓重量は未感染マウスと比較し約 10 倍、肝臓重量は約 1.6 倍に達し、重篤な

肝脾腫が観察された。一方、C57BL/6では感染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週後においても重量は約4倍と変化はなく、BALB/cAのような明らかな進行性の脾腫は観察されなかった。また肝臓においては重量の増加が一切観察されなかった。更にCL研究では自然治癒を示すC57BL/6とは異なり、C3Hでは感染初期において原虫が排除され、病態の悪化を示さず、感染に対してより抵抗性を示すことが知られている。そこでC3Hを含む近交系マウス3系統について感染12週後の感染動態を検討した。原虫数はBALB/cA及びC57BL/6と比較し、C3Hでは両臓器において原虫の感染が確認されなかった。また臓器重量についても重篤な肝脾腫を呈したBALB/cA及び一過性の脾腫を呈したC57BL/6とは異なり、C3Hでは両臓器とも未感染マウスと比較し増加していなかった。そこで、感染マウスにおける原虫抗原特異的Th1反応及びTh2反応を検討するために、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- γ 及びIL-4産生量を測定した。培養上清中のIFN- γ はBALB/cAで 1.93 ± 0.26 ng/ml、C57BL/6で 3.93 ± 2.18 ng/ml、C3Hで 5.34 ± 1.18 ng/mlであったのに対して、IL-4はBALB/cAで 47.31 ± 18.84 pg/ml、C57BL/6で 3.06 ± 2.46 pg/ml、C3Hで 11.55 ± 5.65 pg/mlであり、*L. donovani*感染に対して感受性を示したBALB/cAでは最も低いIFN- γ 産生、最も高いIL-4産生を示し、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。従って、本マウスモデルがVLの病態解析、免疫学的研究を行う上で有用であると考えられる。

第三章では本マウスモデルが本症の新規治療薬候補化合物の評価にも有用であることを検討するために、海藻由来化合物を用いてVLマウスモデルにおける抗リーシュマニア症活性を評価した。現在リーシュマニア症治療薬として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とされている。そこで本章においては褐藻類ヒバマタ目ホンダワラ科アズマネジモク(*Sargassum yamadae*)より単離したキノンテルペノイドを用いて治療実験を行った。まず、本海藻より単離した化合物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ところ、10種のうち6種が10 μ g/ml時に50%以上の増殖抑制効果を示し、そのうち

Sargaquinoidatic acid が 100%の効果を示した。そこで次に、in vitro で最も高い効果を示した Sargaquinoidatic acid について in vivo における原虫増殖抑制効果を評価した。まず *L. donovani* (1×10^8 /head)を BALB/cA に感染させ、感染 49 日後に剖検し、脾臓、肝臓 LDU を計数した結果、脾臓で 163 ± 24 、肝臓で 1529 ± 352 であった。感染 49 日目から Sargaquinoidatic acid を腹腔内投与(始めの 14 日間:1 mg/head、残りの 16 日間:2 mg/head)を 30 日間行い、治療が終了した次の日(感染 79 日目)に剖検した。対照として既知の治療薬である AmBisome($200 \mu\text{g}/\text{head}$)を用いた。まず LDU を計数した結果、未治療群の脾臓は 1132 ± 263 、肝臓は 2826 ± 333 と大幅に増加したが、双方の治療群の脾臓、肝臓では感染原虫は観察されず、両臓器ともに 0 であった。そこで、両臓器中に生存している原虫が残っていないことを検討するために、両臓器を用いた培養を行った結果、原虫は分離されなかった。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、未治療群の脾臓、肝臓は治療開始時と比較して増加し、特に脾臓においては未感染時の 5 倍以上に増大した。一方、両治療群では、治療開始時より減少し、未感染時とほぼ変わらない程であった。これらのことから、新規治療薬候補化合物として用いた Sargaquinoidatic acid が殺原虫効果及び臨床症状の改善を示したと考えられた。従って、本マウスモデルは自然治癒せず持続的な病態の悪化を伴うことから、正確な化合物の抗リーシュマニア症活性の評価が可能であると考えられる。

本研究において 1) *L. donovani* 感染において脾臓、肝臓で原虫が排除されず、持続的な病態の悪化、VL と類似する病態を示すマウスモデルが確立されたと考えられた。2) *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となり、VL の病態機序解明、免疫学的研究を行う上で有用であると考えられた。3) 本マウスモデルは新規治療薬候補化合物の評価に有用であると考えられた。従って本研究により、本マウスモデルは今後の VL 研究を加速させ、これまでの研究では困難であった進行性かつ重篤な症状を呈する VL の病態形成機序の解明、本症に対する防御免疫の解明などの免疫学的研究、更には新規治療薬、ワクチンの開発など多岐に渡る VL の研究に貢献すると考えられる。