

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 長 田 康 孝

内臓型リーシュマニア症 (Visceral leishmaniasis, VL) は *L. donovani* complex に属する原虫によって引き起こされる感染症で、世界で毎年 50 万人もの新規患者が発生している。脾臓、肝臓で原虫が増殖し、肝脾腫、発熱、貧血、削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、*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おり、新規治療薬の探索も緊急の課題である。これらの研究に資する実験マウスモデルは確立されていない。本研究は重篤な病態を再現できる 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 *L. donovani* D10 株 (MHOM/NP/03/D10, 長崎大学熱帯医学研究所より分与) 原虫が 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 LDU (Leishman Donovan unit; 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、経時的に増加し (感染 24 週では脾臓で 2096、肝臓で 6140)、VL 患者の LDU に匹敵した。また、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 株原虫感染 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。さらに、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簡易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。

第二章では、近交系マウス 3 系統 (BALB/c、C57BL/6、および 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、肝臓で 329、感染 24 週後では脾臓で 82、肝臓で 0 と、両臓器において BALB/c マウスに比べ明らかに低く、また、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、肝脾腫は認められず抵抗性であると考えられた。

Leishmania donovani 感染において、明瞭な病態の違いを示す BALB/c、C57BL/6、および 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 産生量を測定して評価したところ、*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- γ 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 マウスでは 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。

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。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 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ンテルペノイドについて、本マウスモデルを用いて in vivo 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 7 週後に重篤な 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 LDU および培養法何れの方法でも感染原虫は観察されなかった。尚、このキノンテルペノイドを sargaquinoidatic acid と命名し、抗リーシュマニ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、世界的に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 病態を再現できるマウスモデルを世界で初めて作出し、その病態を詳細に解析し、2) 本症の重症化に Th2 型の免疫反応が、抵抗性に Th1 型免疫反応が強くかかわることを明らかにした。また 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、更に新規キノンテルペノイド sargaquinoidatic acid が VL の新規治療薬候補化合物として有望であることを示した。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 の研究に利用されることが期待される。

従って、審査委員一同は、当論文内容が博士(農学)を授与するに値する内容であると判断した。