

## 論文の内容の要旨

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)

マラリアはマラリア原虫によって引き起こされる疾患である。ヒトに感染するマラリア原虫は 4 種類あり、その一つである熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)は原虫血症(parasitemia)や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、腎障害、不正出血、また感染者が妊娠していた場合は胎児が流産、死産、早産及び低体重症を起こす事が知られている。これらの重症症状の中には適切な治療を施さなければ致死的なものもあるがその病態形成機序についてはほとんど分かっていない。これら重症症状の病態形成機序の解明のため、実験動物は重要である。中でもネズミマラリアモデルは病原種は異なるもののマラリア原虫感染で見られる原虫血症を再現できるという報告がある。さらにヒトでは倫理的観点から研究困難な妊娠期の病態形成を詳細に解析でき、マラリアの重症症状モデルとしての有用性が期待できる。

そこで第 1 章ではマラリア重症症状の病態形成機序解明の一端としてネズミマラリア原虫を用いてマウスに致死的な感染を起こした際にどのような症状が起きるかをヒトの重症症状に準じて詳細に解析した。*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 に致死的な感染をおこした。マウスは感染 5 日目より立毛、体重減少が認められた。感染 6 日目には踞る姿勢が観察され、さらに褐色の尿が認められた。マウスは感染約 7 日に死亡した。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、感染前の RMBCS が  $19 \pm 0$  だったのに対し、感染 6 日目には  $6 \pm 2.28$  と有意に減少した。感染 3 日目より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 45% となった。感染 6 日目にマウスを安楽殺して解剖学的観点から解析を行った結果、感染マウス脾臓重量は非感染マウスと比較し約 1.5 倍に達した。さらに白色臓器である肺は感染マウスで赤色を呈した。また皮膚において点状の赤斑が認められた。次に *P. berghei* が母体に感染する事が胎仔に与える影響について検討した。C57BL/6 を交配し、交配翌日に膣栓を確認した日を gestation day 1(G1)とした。G12 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%、30%であった。また仔の重量は非感染では 1.23 g であったのに対して順に 0.75 g、0.93 g、1.09 g であった。以上の結果より *P. berghei* 感染 C57BL/6 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他、意識障害や運動障害、さらに肺の異常、血尿を伴う腎障害、及び皮膚での異常出血が起きていると示唆された。また母体が *P. berghei* 感染する事が胎仔の生存率の低下及び重量の減少に著しく関与し死産や低体重症を起こす事が分かった。

第 2 章では第 1 章で特に顕著な症状を示した肺に着目して、肺における重症症状の病態形成機序の一端を組織病理学的観点から明らかにする事を目的として実験を行った。*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肺胞壁を構成する毛細血管や肺胞被覆である上皮を構成する II 型肺胞細胞が明瞭に観察されたのに対して、感染マウス肺では肺胞壁を構成する毛細血管内に赤血球の集中像が観察され、肺胞壁の拡張が認められた。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、非感染マウス肺は白色だったのに対し、感染マウスの肺全体が濃く青く染色された。ここから evans blue の肺実質へ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 の肺では肺胞構造が変化し、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。

第 3 章ではヒトで解析困難な胎児の重症症状の病態形成機序の一端を解明するため、妊娠期に特異的に形成され胎児の発育に重要な役割を担う胎盤に着目し、胎盤の病理学的変化を詳細に解析した。C57BL/6 を交配し、G12 に *P. berghei* ANKA 株感染赤血球を  $1 \times 10^7$  個を腹腔内接種した。G18 に母体を安楽殺して胎仔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。結果胎仔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 が母体血液と胎仔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 *P. berghei* 感染母体では死産がおき、この時胎盤構造の著しい変化が起きていた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、マラリア原虫感染によ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実験動物が病態発症機序を病理学的に解析する上で有用である事を示した。