
原 著

抗エリスロポエチン抗体によるマラリア抑制効果

津 端 俊 介

新潟大学大学院医歯学総合研究科

細胞機能講座消化器内科学分野

(主任：青柳 豊教授)

国際感染医学講座免疫学・医動物学分野

(指導：安保 徹教授)

Protection Against Malaria by Anti-erythropoietin Antibody

Shunsuke TSUBATA

Division of Gastroenterology and Hepatology

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yutaka AOYAGI)

Division of Immunology and Zoology

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Toru ABO)

Abstract

In a series of recent studies ^{1)–3)}, we observed that erythropoiesis began in the liver and spleen of mice infected with malaria and that newly generated erythrocytes in the liver became good targets for malarial parasite infection. At such time, erythropoietin (EPO) increased in the sera of these mice. In the present study, we modulated the serum level of EPO by the administration of EPO (up-regulation) or anti-EPO antibody (Ab) (down-regulation). When mice were infected with a nonlethal strain (17NXL) of *Plasmodium (P.) yoelii* (i.e., blood-stage infection of 10⁴ parasitized erythrocytes/mouse), parasitemia continued for a month, showing a peak at day 17. Daily injection of EPO (200IU/day/mouse) from day 5 to 14 prolonged parasitemia, whereas

Reprint requests to: Shunsuke TSUBATA
Division of Gastroenterology and Hepatology
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8122 新潟市旭町通り1-757
新潟大学医学部 第三内科 津端俊介

that of anti-EPO Ab (1.5mg/day/mouse) every other day from day 5 to 28 decreased it. Erythropoiesis was confirmed in the liver, spleen and bone marrow by the appearance of nucleated erythrocytes (TER119⁺). When anti-EPO Ab was injected by the same protocol in mice infected with a lethal strain (17XL) of *P.yoelii*, all mice showed decreased parasitemia and recovered from the infection. These results suggest that the use of anti-EPO Ab after malarial infection may be of therapeutic value in severe cases of malaria.

Key words: Malaria, Erythropoietin, Anti erythropoietin antibody, Erythropoiesis, Parasitemia

はじめに

近年われわれは、マウスがマウスマラリア（以下マラリア）に感染すると、その肝や脾で赤血球が造血されること、そしてそのようにして発生した肝の幼弱赤血球はマラリア感染の標的になりうることを報告してきた^{1)–3)}が、今回われわれは、このようにマラリア感染に感染したマウスにおいて血清中のエリスロポエチン濃度が上昇することを観察しえた。

Plasmodium (P.) yoelii の非致死株 (17NXL) をマウスに感染させると、17日目にその感染濃度がピークを迎える。

ここで、エリスロポエチン (EPO) を感染成立5日目から14日目まで連続で投与すると、マラリア感染は遷延した。逆に、抗EPO抗体を5日目から28日目まで1日おきに投与したとき、感染は早期に終焉した。

同様に、*P.yoelii* の致死株 (17XL) を感染させたマウスに抗EPO抗体を投与したときにも、やはり感染が早期に終焉し、さらにマウスは生存した。

マラリア感染に対して、抗EPO療法が治療の一助となりうることを示唆するものと考えここに報告する。

材料と方法

マウスとマウスマラリア感染の成立

週齢8週のC57/BL6 (B6) を用いた。*P.yoelii* 17NXL (非致死株) は、脇誠治先生 (群馬大学医学部) より供与していただいた。マラリアの維持

は、骨髄細胞を介した方法³⁾で行った。感染は、10⁴のマラリア感染赤血球をマウスに腹腔内投与することで成立させた。寄生虫血症は、3日ごとに抹消血をギムザ染色することで測定した。

細胞の準備

マウスを屠殺したのち肝臓を採取した。肝内単核球は以下の方法により分離した。200ゲージのステンレススチールメッシュで濾し、2% NCS MEM-HEPES (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 液に浮遊させた。培養液で一度洗浄後、35%パーコール液 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 15mlを加え1200×g, 15分間密度勾配遠心法で細胞を分離した。分離後のペレットは赤血球溶血液 (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA-Na, 170mM Tris, pH7.3) を加えて無核赤血球を溶解し、2% NCS MEM-HEPES に再浮遊させた。脾と骨髄は、200ゲージステンレススチールメッシュで濾し、無核の赤血球を破碎したのち用いた。

フローサイトメトリー法

フローサイトメトリー法にはFITC, PEで標識したモノクローナル抗体を用いた²⁾。使用したモノクローナル抗体は抗CD3抗体 (145-2C11) と抗赤血球抗体 (TER119) (BD Biosciences, Mountain View, CA) で、FACScan (BD Biosciences) により解析した。標的抗体による染色前に、抗体の非特異結合防止目的でCD16/32 (2.4G2; BD Biosciences) を加えた。死細胞はFSCおよびPI法により除去した。

エリスロポエチン

中外製薬の好意により組み換えの EPO と抗 EPO 抗体を提供していただいた。抗 EPO 抗体は、ヒト EPO に対するウサギのポリクローナル抗体であり、1mg の抗 EPO 抗体は、人・マウスにかかわらず約 10^4 IU の EPO を中和する。EPO (200IU/日) はマラリア感染後 5-14 日目に、腹腔内投与した。抗 EPO 抗体 (1.5mg/日) は、感染後 5-28 日目に隔日で腹腔内投与した。血清 EPO 濃度 (mU/ml) は、放射性免疫測定法 (SRL) で測定した。

結 果

P.yoelii 17NXL を感染させた 10^4 個の赤血球を C57/B6 (B6) に腹腔内投与し感染を成立させた。そして、寄生虫血症を末梢血から測定した (図 1A)。寄生虫血症は 5-7 日目より発現し、17 日目にピークを迎え、27 日目まで認める。ヘマトクリット値は感染前 50% だったものが 7 日目頃より徐々に減少し、最終的に 30% 未満にまでいたる。一方で EPO の血中濃度の亢進は、ヘマトクリット値が低下するより早く、感染後 5 日目頃より徐々に認め、7 日目にプラトーに達する。また、肝・脾・骨髄の有核細胞を、フローサイトメトリーにて解析した (図 1C)。TER119 (赤血球系の表面マーカー) と CD3 (T 細胞の表面マーカー) の 2 染色展開にて解析を行った。ここで、成熟した赤血球は無核であり、赤血球溶血液にて破碎処置を受けている。そのため、CD3-TER119⁺ 細胞は有核の赤芽球ということになる。そしてこの有核の赤芽球は、肝・脾においても感染 14 日目から発現する (矢印)。骨髄においては、赤芽球は感染前より発現しているが、感染後 7 日目にはその発現が増多している。

EPO の血中濃度を EPO と抗 EPO 抗体を用いて調節し、それが *P.yoelii* 17NXL 感染に及ぼす影響について検討した (図 2A, 左: EPO 投与時, 右: 抗 EPO 投与時)。

EPO は、感染後 5-14 日目に、200IU/日を腹腔内投与した。抗 EPO 抗体は、感染後 5-28 日

に、1.5mg/日を隔日投与した。EPO を投与したとき、マラリア感染が遷延した。一方、抗 EPO 抗体を投与したときマラリア感染は抑制された。各々について、EPO 血中濃度とヘマトクリット値を測定した。EPO 投与下においては、EPO 血中濃度は著明に上昇する (1000mU/ml 以上)。そして、フローサイトメトリー法を用いて肝・脾・骨髄の有核細胞を感染後 14 日目に解析すると、各々の臓器で赤血球の産生がみられるにもかかわらず (図 2C 矢印)、ヘマトクリット値は低下する。一方、抗 EPO 抗体投与下においては、EPO 血中濃度は著明に低下する (検出感度以下から 200mU/ml 以下)。肝・脾・骨髄の感染後 14 日目のフローサイトメトリー法による解析では、各々の臓器で赤血球の産生が抑制を受け (図 2C)、ヘマトクリット値も抑制を受ける (図 2B 右)。

最後に、われわれは *P.yoelii* の致死株 (17XL) をマウスに感染させた。この致死株の感染を受けたマウスは、通常 10 日以内にすべて死にいたる。しかし、この感染マウスに抗 EPO 抗体を 5 日目から 28 日目まで隔日投与すると、マラリア感染は抑制されすべてのマウスは感染から回復し生存しえた (図 3)。

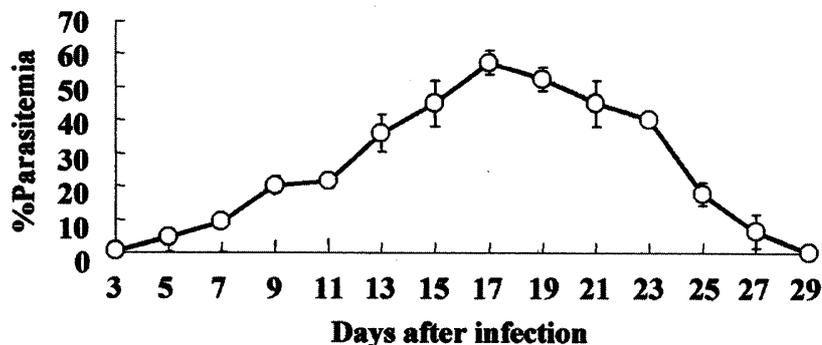
考 察

今回われわれは、EPO の血中濃度がマウスマラリア感染においてその重症度を決定する可能性について示した。マウスに EPO を投与すると、マラリア感染は遷延した。一方抗 EPO 抗体を投与すると、感染は抑制された。最も興味深いことは、致死株の感染を受けたマウスに抗 EPO 抗体を投与したときにも、感染は抑制され、最終的にそのマウスが生存しえたという事実である。

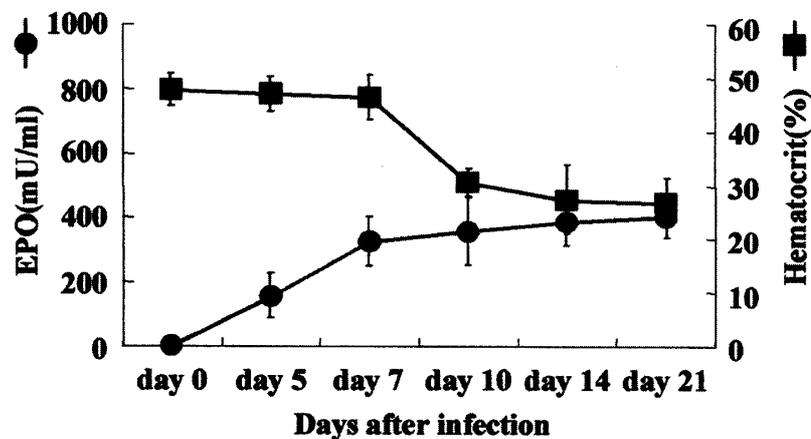
マウス感染に伴い貧血が起こる。そして、造血が亢進される。このときに発現する有核の赤芽球が、血液期におけるマラリアの感染経路となる。ここに抗 EPO 抗体を用いて造血を抑制したとき、この経路が抑制される。

われわれは、マラリア感染に際して肝や脾で造血が起こること、そして肝において造血された幼

A.



B.



C.

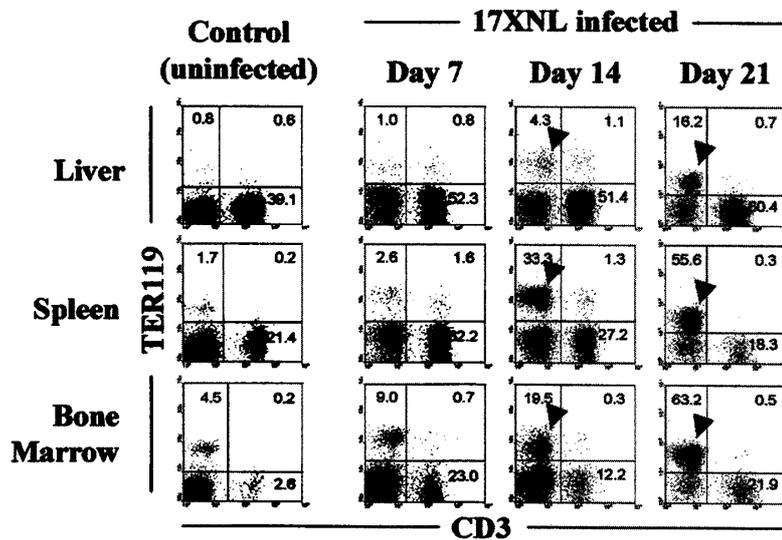
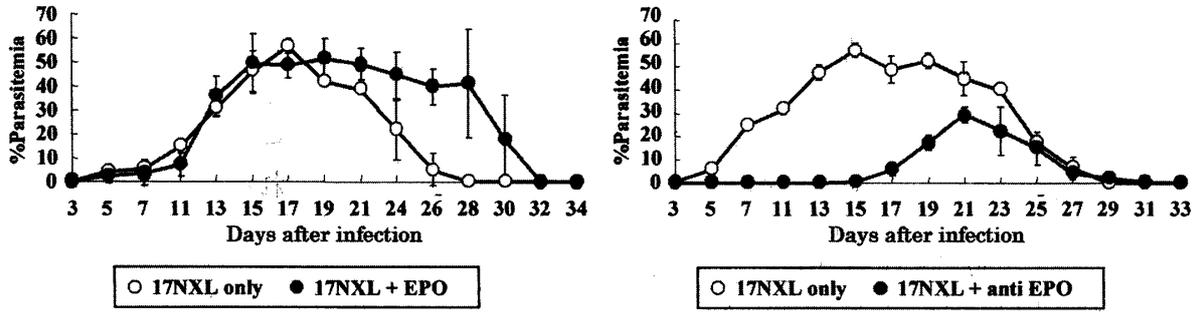


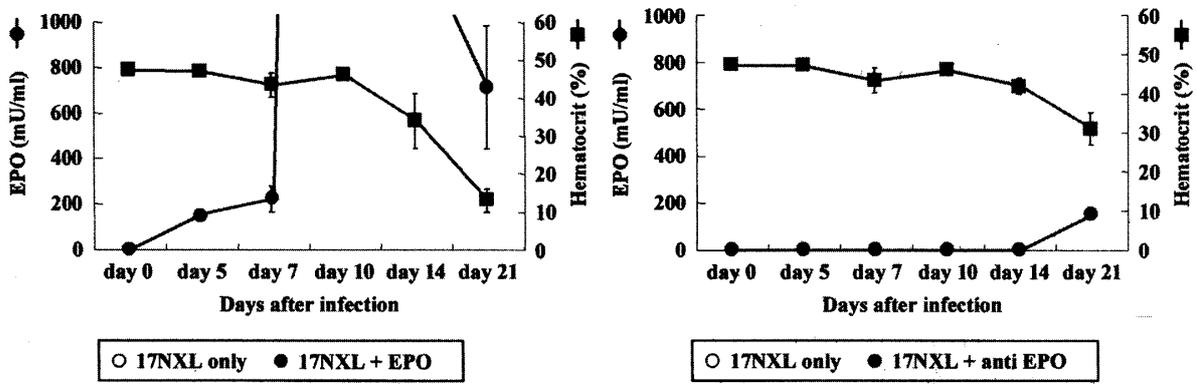
図1 *P.yoelii* の非致死株 (17NXL) 接種後の感染の経時的变化。

A. 寄生虫血症 (%), B. EPO 血中濃度, C. 肝, 脾, 骨髄における造血. 数字は各マーカーの陽性細胞の割合 (%) を示す. 矢印は造血された赤血球を示す.

A.



B.



C.

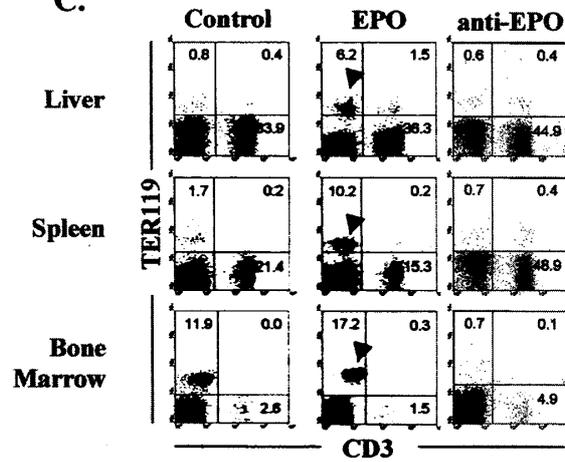


図2 マラリア感染における EPO や抗 EPO 抗体投与による影響.

A. 寄生虫血症, B. 血清 EPO 濃度とヘマトクリット値, C. 赤血球造血. マウスには *P.yoelii* の非致死株を感染させ, EPO または抗 EPO 抗体を投与した. 数字は各マーカーの陽性細胞の割合 (%) を示す.

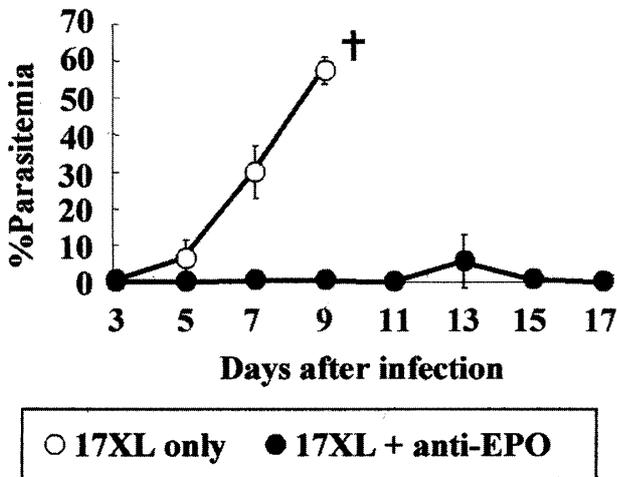


図3 抗 EPO 抗体による, *P.yoelii* の致死株 (17XL) に対する防御反応.

マウスに *P.yoelii* の致死株を接種し, 接種後 5-28 日目に隔日で抗 EPO 抗体 (1.5mg/日) を投与した.

弱赤血球に, マラリア感染が起こる現象を報告してきた¹⁾⁻³⁾. 有核で幼弱な赤芽球の方が, より成熟した無核の赤血球よりもマラリア感染の標的になりうる. 実際, マウスに放射線照射 (6Gy) を行い, 肝における造血を抑制すると, マラリア感染は抑制される³⁾.

成熟赤血球よりも幼弱赤血球のほうがマラリア感染の標的になりうるという報告は, 最近散見されており⁴⁾⁻⁸⁾, われわれもまた, 同様の報告をしてきた¹⁾⁻³⁾. 人間の場合, 赤血球の CD36 抗原が *P.falciparum* の感染の標的になることが知られている⁹⁾¹⁰⁾. そして, この CD36 抗原は幼弱な赤血球に発現する. つまり, ヒトマラリアにおいてもマウスマラリア同様に幼弱な赤血球が感染の標的になりうると思われる. これらの所見を元にわれわれは, 抗 EPO 抗体によって造血を抑制することで, マラリア感染を抑制しようと考えた. 抗 EPO 抗体によって造血は抑制されたが, マラリア感染時にみられる貧血ほどにはヘマトクリット値は低下しなかった. また, 抗 EPO 抗体投与時にみられる貧血は幼弱赤血球の抑制のみによって起こるのに対し, マラリア感染時にみられる貧血

は, 幼弱赤血球と成熟赤血球の双方が抑制することでおこるという意味で, より重大である¹¹⁾.

マラリア感染に対する宿主側の防御機構として, 肝由来の胸腺外分化 T 細胞 (TCR^{int}) が重要な役割を担っている^{1)-3), 12)-14)}. マラリア感染の標的となる幼弱の有核赤芽球は, MHC を有している²⁾. MHC と結合した, ある種の自己抗原やマラリア抗原が, 胸腺外分化 T 細胞の TCR^{int} によって認識され, 防御機構として働くものと考えられる.

この機序からみても, 肝における有核の幼弱赤血球の造血を抑制することがマラリア感染の抑制に有用であると考えられる.

謝 辞

稿を終えるに当たり, 御指導御校閲を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科免疫・医動物学分野, 安俣徹教授, 消化器内科学分野, 青柳 豊教授に深謝いたします. また直接御指導頂きました免疫・医動物学分野, 関川弘雄助教授, 川村俊彦講師, 川村宏樹講師, 教室員の皆様に深謝いたします.

なお, 本研究の一部は第 33 回日本免疫学会 (2003 年, 福岡) にて発表した.

参 考 文 献

- 1) Mannoor MK, Halder RC, Morshed SR, Ariyasinghe A, Bakir HY, Kawamura H, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T: Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169: 301-306, 2002.
- 2) Halder RC, Abe T, Mannoor MK, Morshed SR, Ariyasinghe A, Watanabe H, Kawamura H, Sekikawa H, Hamada H, Nishiyama Y, Ishikawa H, Toba K and Abo T: Onset of hepatic erythropoiesis after malarial infection in mice. *Parasitol Int* 52: 259-268, 2003.
- 3) Weerasinghe A, Sekikawa H, Watanabe H, Mannoor K, Morshed SR, Halder RC, Kawamura T, Kosaka T, Miyaji C, Kawamura H, Seki S and Abo T: Association of intermediate T cell receptor cells, mainly their NK1.1 (-) subset, with protection from malaria. *Cell Immunol* 207: 28-35,

- 2001.
- 4) Aikawa M and Atkinson CT: Immunoelectron microscopy of parasites. *Adv Parasitol* 29: 151 - 214, 1990.
 - 5) Chitnis CE and Miller LH: Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 180: 497 - 506, 1994.
 - 6) Plebanski M and Hill AV: The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol* 12: 437 - 441, 2000.
 - 7) Krzych U, Schwenk R, Guebre - Xabier M, Sun P, Palmer D, White K and Chalom I: The role of intrahepatic lymphocytes in mediating protective immunity induced by attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Immunol Rev* 174: 123 - 134, 2000.
 - 8) Taylor - Robinson AW and Phillips RS: Infective dose modulates the balance between Th1 - and Th2 - regulated immune responses during blood - stage malaria infection. *Scand J Immunol* 48: 527 - 534, 1998.
 - 9) Oquendo P, Hundt E, Lawler J and Seed B: CD36 directly mediated cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58: 95 - 101, 1989.
 - 10) Ockenhouse CF, Klotz FW, Tandon NN and Jamieson GA: Sequestrin, a CD36 recognition protein on *Plasmodium falciparum* malaria - infected erythrocytes identified by anti - idotype antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 88: 3175 - 3179, 1991.
 - 11) Chang KH and Stevenson MM: Effect of anemia and renal cytokine production on erythropoietin production during blood - stage malaria. *Kidney Int* 65: 1640 - 1646, 2004.
 - 12) Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanaga T, Takahashi - Iwanaga H and Abo T: Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1+ T cells in various immune organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* 155: 2972 - 2983, 1995.
 - 13) Schulz RJ, Parkes A, Mizoguchi E, Bhan AK and Koyasu S: Development of CD4 - CD8 - alpha beta TCR+ NK1.1+ T lymphocytes: thymic selection by self antigen. *J Immunol* 157: 4379 - 4389, 1996.
 - 14) Mannoor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Reza S, Morshed M, Ariyasinghe A, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T: Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1 (+) and NK1.1 (-) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. *Cell Immunol* 211: 96 - 104, 2001.
 - 15) Watanabe H, Miyaji C, Seki S and Abo T: c - kit+ stem cells and thymocyte precursors in the livers of adult mice. *J Exp Med* 184: 687 - 693, 1996.

(平成 17 年 1 月 12 日受付)