

マウスマラリアモデルを用いた生薬の抗マラリア活性探索

申請代表者	平山 謙二	長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野	教授
所外共同研究者	Juntra LAOTHAVORN	長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野	教授
所外共同研究者	Mahamoud Sama CHERIF	長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野	助教
所外共同研究者	水上 修作	長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野	助教

■背景・目的

マラリアは世界規模で対策が必要な感染症であるが未だ有用なワクチンは存在しない。抗マラリア薬は古くから存在するものの、耐性などの問題も有り未だ満足なものはこれも存在しない。本研究課題では、富山大学より提供される和漢薬ライブラリーを用いて、生薬抽出物及び化合物の抗マラリア効果の検討を行い、優れた抗マラリア薬を発見することを目的とした。本研究課題から得られる結果は幅広くマラリア患者・研究者に有益なものとなると考える。

■結果・考察

平成27年度は既知の抗マラリア薬を用いて下記の実験を行い、実験系が抗マラリア効果の判定に使用可能かの確認を行った。

<マラリア原虫の準備> 今回マラリア原虫としては熱帯熱マラリア原虫のうち、抗マラリア薬クロロキン・Xフロキンに感受性を持つ3D7と耐性を持つDd2の2種類の株を用いた。培養はまずマラリア感染率5%程度の凍結ストック赤血球を新鮮赤血球を用いて感染率が0.1%程度になるように調整したのちに開始された。使用する赤血球は全て培養液によりHctを2%に調整したのちに使用した。感染赤血球を含むフラスコは混合ガス（N₂/O₂/CO₂）を注入後、密閉状態で37℃インキュベーター内に置かれた。感染赤血球は感染率が1-2%程度になった時点で新鮮赤血球により感染率0.1%に希釈され、実験に十分な量までマラリア感染赤血球を増殖させた。

<感染マラリア赤血球への薬剤添加> 感染率1%のマラリア感染赤血球を96ウェル透明平底プレートに50μLずつ準備し、ここに薬剤を含む培養液を50μLずつ加え、混合ガス存在下で48時間培養を行った。今回薬剤としては既知の抗マラリア薬であるアルテスネートを段階希釈したものを使用した。

<抗マラリア効果の測定> SYBRグリーンを含んだバッファーを用いて、感染赤血球破碎と原虫核酸の染色を行った。プレートリーダーを用いてSYBRグリーンの蛍光を測定し、これをマラリア原虫感染率の指標とした。非感染赤血球をマラリア0%（=阻害率100%）、DMSO処理感染赤血球をマラリア100%（=阻害率0%）のコントロールとして準備し、両者の結果との比較により添加した薬剤の抗マラリア効果を検討した。結果、上記の実験系はアルテスネートの抗マラリア効果と濃度依存性を検出可能であることがわかった。また実験系の高い再現性などが確認された。

■結論

上記の実験系は和漢薬ライブラリーを用いた抗マalaria効果の判定に十分足りうるものであると判断し、現在、和漢薬ライブラリーを用いた検討を行っている。