

## マラリアに関する病態生理学的研究

### I. 実験マウスマラリアにおけるヘモグロビン酸素親和性の 変動とその要因

大友 弘 士<sup>1)</sup> 日置 敦 巳<sup>1)</sup> 吉野 昌 孝<sup>2)</sup>

(昭和59年4月21日 受領)

**Key words:** malaria, *Plasmodium berghei*, pathophysiology, hypoxia, blood oxygen affinity, glycolysis

#### 緒 言

*Plasmodium* 属原虫感染に基づくマラリアは、ほとんど全身の臓器・組織に病変を惹起する疾患であるが、なかでも熱帯熱マラリアは脳性マラリア、急性腎不全、肺水腫、その他の重篤かつ致命的な合併症の発現率が高く、マラリア死の最大要因となつている。これらの基本病因としては、赤血球に対する直接障害、非特異的炎症反応、免疫学的機序などの複雑な関与を成因とする赤血球の酸素運搬能低下、血管内皮細胞の障害、全身および局所の血流変化に基づく組織低酸素症が重要とされている (WHO, 1980; Chongsuphajaisiddhi, 1981)。しかしながら、マラリアの発症機構に関しては、未だ十分には解明されていない。

かかる状況下において、著者らはマラリア感染によつて惹起される低酸素症の病態生理学的意義を究明する目的で、実験マウスマラリアにおける血中ヘモグロビン酸素親和性の変動とそれに影響を及ぼす要因を追求した結果、若干の知見が得られたのでその概要を報告する。

#### 材料と方法

##### 1) 動物およびマラリア原虫

マラリア原虫の継代維持と実験感染には、5週令、雄の ddY マウス (静岡県実験動物農業協同組合) を使用し、いずれも温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度40~60%の条件下で飼

育した。原虫は ddY マウスに致死感染を起す *Plasmodium berghei* NK 65 を用い、感染マウスから心臓採血したヘパリン血の赤血球数とその原虫寄生率を算定し、生食水で適宜希釈して0.1 ml 中に感染赤血球 $10^7$ 個を含むように調整し、この希釈血液をマウスの腹腔内に0.1 ml 接種して感染させた。

##### 2) 採血

各種生化学的パラメーターの測定には、日内変動による成績のばらつきを防止するため6:00~8:00 a.m. の間に定時採血した血液を用いた。方法は非感染対照マウスならびに原虫接種 2, 3, 4, 5, 6 日後の感染マウスの腹腔内にネプタール (50 mg/kg) を注射して麻酔し、頸部を切開して頸動脈からヘパリンナトリウムを用いて全採血した。この際、ヘパリンナトリウム (pH 6.8~7.0) による pH の変動を防ぐため、その使用量は最小限にした。

##### 3) 除蛋白

氷冷0.6N 過塩素酸0.5 ml に採血直後の検体0.1 ml を混和、攪拌して除蛋白し、これを $0^\circ\text{C}$  に10~30分静置してから3,000 rpm で3分間遠心、その上清0.3 ml を $-30^\circ\text{C}$  に凍結して血中2,3-ジホスホグリセリン酸 (2,3-DPG) と ATP の測定用に保存し、残量は当日の血中乳酸の測定に供した。なお、本研究では2,3-DPG と ATP の測定には白血球と血小板を除去していない全血を供したが、これは2,3-DPG のほとんどが赤血球に含まれていることと、ATP についても全血に占める白血球と血小板の割合は赤血球に比して僅かなため、後述の  $P_{50}$  への影響は無視しうると考えたからである。

4) 血液の pH と酸素平衡曲線における酸素飽和度の測定

本研究の一部は昭和57年度文部省科学研究費一般C (課題番号 57570158) の補助を受けて行われた。記して謝意を表する。

<sup>1)</sup> 岐阜大学医学部寄生虫学教室 <sup>2)</sup> 横浜市立大学医学部生化学教室

採血後できるだけ迅速にガラス電極法により36°C の条件で pH を測定した。

また、上記血液の一部は二波長分光光度計測定法による Hem-O-Scan ヘモグロビン酸素平衡曲線作成装置 (Aminco 社) を用いて、その酸素平衡曲線を描出し、これにより酸素飽和度  $So_2=50\%$  を与える  $Po_2$  の値 ( $P_{50}$ ) を算出した。しかし、この酸素平衡曲線の描出には若干のばらつきが認められたので、各検体について少なくとも2回、ときに3~4回描出した曲線から算出した  $P_{50}$  の平均値をもって測定値とした。なお、酸素平衡曲線はヒトでは37°C で測定するのが原則であるが、本実験ではマウス直腸温の測定値が36°C であつたので、この温度条件下で測定し、pH もこの温度で測定した。

#### 5) 血液検査

虫血症は血液の薄層塗抹標本を作成して Giemsa 染色し、それを鏡検して約1,000個の赤血球を算え、それに占める感染赤血球の百分率で示した。ヘマトクリット (Ht) 値は、血液をヘマトクリット管にとり、その一端を SEAL-EASE (Clay Adams) で封じ、毛細管ヘマトクリット遠心機で11,000 rpm, 5分間遠心して求めた。ヘモグロビン (Hb) 濃度はシアンメトヘモグロビン法によるヘモグロビンをテストワコー (和光純薬) により測定した。

#### 6) 血中乳酸の測定

3) に述べた除蛋白後の上清0.2 ml を用い、紫外部吸光度測定法によるラクテートテスト (Boehringer Mannheim) により測定した。なお、0.2 ml の上清が得られないときは、0.1 ml の上清に0.6N 過塩素酸を0.1ml 加えて検体とし、その測定値を補正した。

#### 7) 血中2,3-DPG と ATP の測定

-30°C で1~5日間凍結保存した除蛋白後の上清を室温解凍し、これに0.6N  $K_2CO_3$  を0.3 ml 加えて氷冷し、15分後3,000 rpm で3分間遠心し、その上清を2,3-DPG と ATP の測定に用いた。

まず、2,3-DPG は、上記上清0.1 ml を用いて UV 吸光度測定法による2,3-DPG テスト (Boehringer Mannheim) により測定した。ATP はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による生物発光を利用した CHEM-GLOW ATP 極微量測定システム (Aminco 社) を用いて測定したが、試薬には firefly lantern extract (Sigma Chemical Company) と標準化用の ATP (ヤマサ醤油) を使用した。

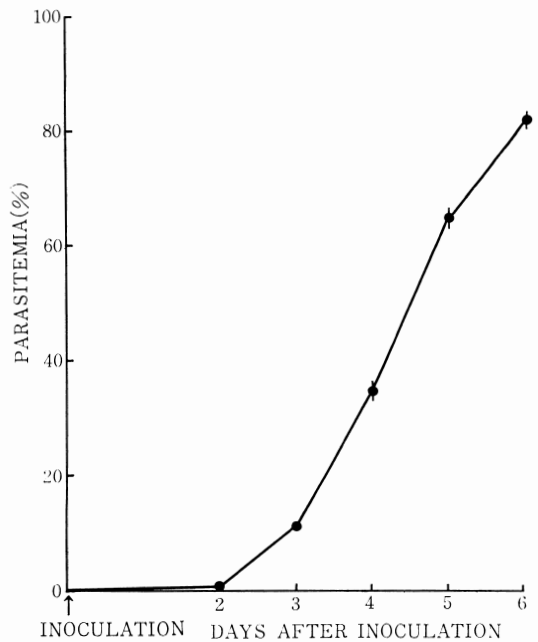


Fig. 1 Increase of parasitemia in mice after inoculation. Mean  $\pm$  SE

### 成 績

#### 1) 感染マウス内での原虫増殖

感染マウスあたりの原虫の増殖をみると (Fig. 1), 原虫接種2日後の0.8%から以後11.3%, 34.7%, 64.6%と経目的に上昇して6日後には81.6%となり、外見上も末期の病状を呈して6日から7日後にかけて死亡した。

#### 2) Hb, Ht および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)

Table 1のごとく、Hb 濃度は接種3日後より有意の減少を示し ( $p<0.01$ ), 4日から5日後と5日から6日後にかけて、さらに著しく減少した ( $p<0.001$ ). Ht 値は接種4日後から低値を示し ( $p<0.01$ ), 4日から5日後と5日から6日後にかけての低下が顕著であつた ( $p<0.001$ ). さらに、MCHC は接種3日後以降、非感染対照群のそれに比し低値を示した ( $p<0.01$ ).

#### 3) $P_{50}$ (Fig. 2)

$P_{50}$  は非感染対照群の39.8 mmHg に対し、感染群では接種3日後 (44.0 mmHg) から増加し ( $p<0.001$ ), 4日後にはさらに増加して 50.7 mmHg に達したが ( $p<0.001$ ), 4日から5日後と5日から6日後にかけては有意の変動を認めなかつた。

Table 1 Time course of changes in hemoglobin, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration in control and *Plasmodium berghei* infected mice

	Control (n=16)*	Days after inoculation				
		2 (n=15)	3 (n=14)	4 (n=14)	5 (n=15)	6 (n=15)
Hb (g/dl)	12.7±0.2	12.2±0.2	11.6±0.3	10.8±0.3	7.2±0.2	4.9±0.3
Ht (%)	40.8±0.6	39.5±0.6	40.3±1.1	38.1±0.5	26.6±0.7	17.5±1.2
MCHC (g/dl)	31.1±0.2	30.9±0.3	28.9±0.3	28.4±0.4	27.2±0.3	28.1±0.9

Values are means ± SE. Hb: hemoglobin, Ht: hematocrit, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration.

\*n: number of mice used

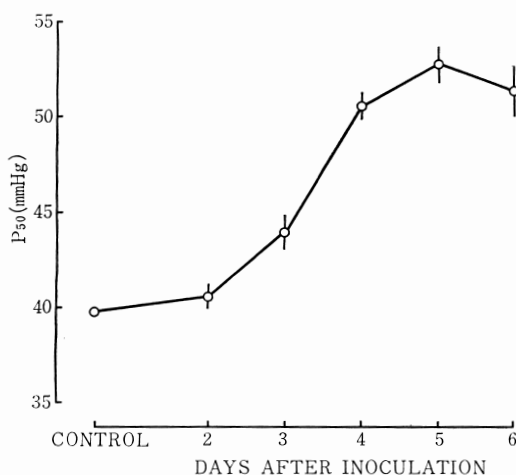


Fig. 2 Profile of P<sub>50</sub> increase in infected mice. Mean ± SE

#### 4) 2,3-DPG (Fig. 3)

2,3-DPG の測定値を Hb 1 g 当りに換算してその変動をみると、非感染対照群の 29.5  $\mu\text{mol/gHb}$  に比し、感染群では接種 3 日後 (25.3  $\mu\text{mol/gHb}$ ) から有意の減少がみられ ( $p < 0.01$ ), 4 日後 (23.0  $\mu\text{mol/gHb}$ ) から 5 日後 (16.5  $\mu\text{mol/gHb}$ ) にかけては、さらに著しい減少を認めたと、5 日から 6 日後にかけては有意の変動を認めなかった。また、2,3-DPG の測定値を赤血球 1 ml 当りに換算してその変動をみても、非感染対照群に比し、感染群では接種 3 日後以降に有意の減少がみられた ( $p < 0.001$ )

なお、各個体間における Hb 濃度と 2,3-DPG 濃度の変動には Fig. 4 に示したとき相関 ( $r = 0.7686$ ,  $p < 0.001$ ) が認められた。

#### 5) ATP 濃度と血液 pH

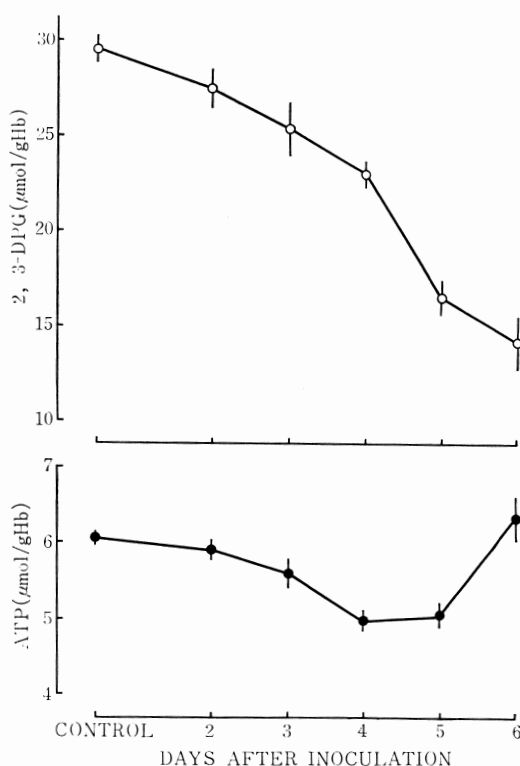


Fig. 3 Profile of 2,3-DPG and ATP concentration changes in infected mice. Mean ± SE

Hb 1 g 当りの濃度に換算した値で ATP の変動をみると (Fig. 3), 非感染対照群の 6.07  $\mu\text{mol/gHb}$  に比し、感染群では接種 3 日後に 5.61  $\mu\text{mol/gHb}$  ( $p < 0.05$ ), 5 日後にはさらに 5.05  $\mu\text{mol/gHb}$  にまで減少したが、6 日後には 6.34  $\mu\text{mol/gHb}$  に増加した ( $p < 0.001$ ).

血液 pH (Fig. 5) は非感染対照群の 7.42 に比し、感

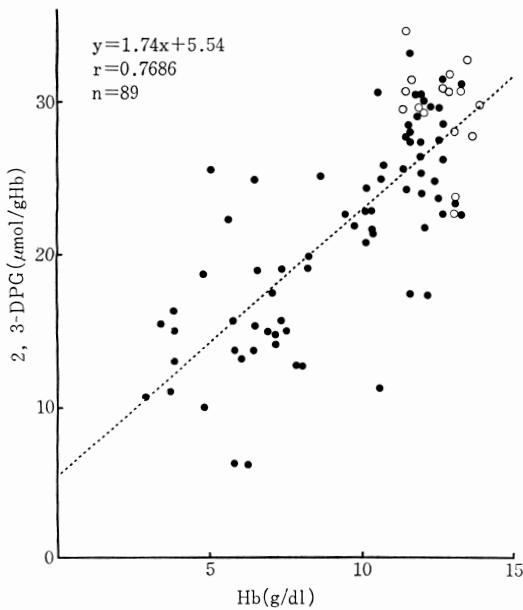


Fig. 4 Correlation between Hb and 2,3-DPG concentrations in non-infected control (O) and in infected (●) mice.

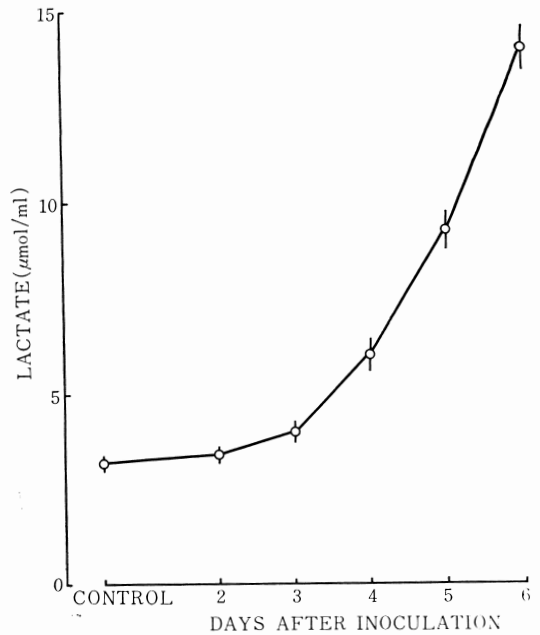


Fig. 6 Change of lactate concentration in blood from infected mice. Mean  $\pm$  SE

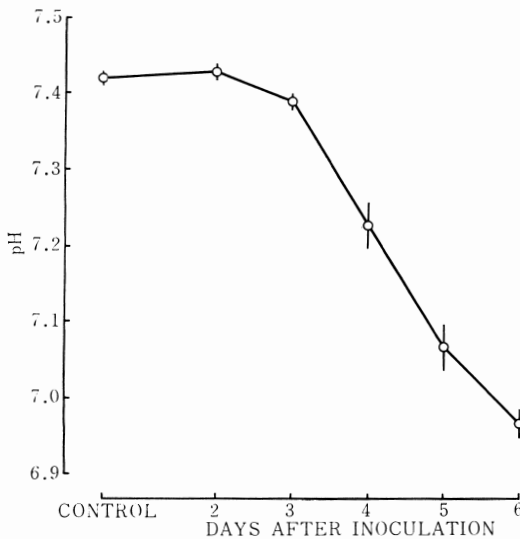


Fig. 5 Change of blood pH in infected mice. Mean  $\pm$  SE

染群では接種3日(7.39)から4日後(7.23)にかけて著しく低下し( $p < 0.001$ ), さらに5日から6日後(6.97)にかけても有意の低下が進行した( $p < 0.01$ ).

6) 血中乳酸 (Fig. 6)

非感染対照群の $3.21 \pm 0.74 \mu\text{mol/ml}$  に比し, 感染群

では接種3日後から増加し ( $p < 0.05$ ), 以後も経日的に有意の増加を示して ( $p < 0.01$ ), 6日後には対照群の4倍以上の $13.96 \mu\text{mol/ml}$  に達した.

考 察

マラリア研究に動物実験が不可欠であることは論をまたないが, 本研究に用いた ddY マウスとそれに致死感染をひき起す *P. berghei* NK 65 による実験系が人体マラリアの病態モデルとして適当であるかといえば, 少なからぬ問題もあるとするのが妥当であろう. その反面, 原虫の継代維持と実験感染が容易で, 本実験においても観察されたごとく, 原虫接種5日後に平均64.6% (46.7~73.2%), 6日後には81.6% (71.9~88.4%) に達する高い虫血症を呈するなど, これまでの報告をみても感染から死亡までの期間が短く (Greenberg and Kendrick, 1958; Ohtomo and Katori, 1972; Eling *et al.*, 1977; Contreras *et al.*, 1980), しかもその経過中に人体マラリアに共通する多くの病態を発現するため, マラリアの病態生理学的研究はもとより, 生物学的, 免疫学的研究, さらには抗マラリア薬の開発ならびにその感受性試験などに広く利用されている.

一方, 実験成績が示すごとく, 感染経過とともに増強する貧血を Hb 濃度を指標にしてみると, 接種3日後か

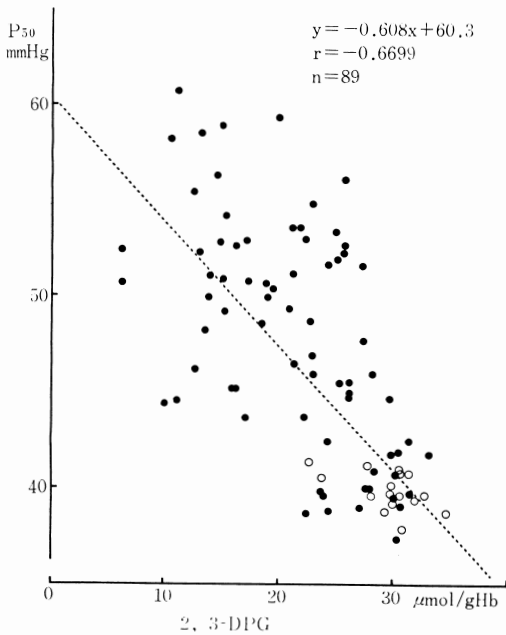


Fig. 7 Correlation between 2,3-DPG concentration and  $P_{50}$  value in non-infected control (○) and in infected (●) mice.

らその減少を認め、以後急速に減少して重度の貧血を呈することが知られた。また、接種2日後から4日後にかけて認められた  $P_{50}$  の増加(酸素平衡曲線の右方偏移)は Hb 濃度の減少に起因する酸素運搬能低下に対する生体適応の一つと思われ、これは血液から組織への酸素供給を有利に導く状態をつくっているものと考えられる。

この  $P_{50}$  の増加に関与する因子には (1) 温度上昇, (2) pH 低下 ( $[H^+]$  増加), (3)  $P_{CO_2}$  上昇, (4) 2,3-DPG および ATP の増加, (5) MCHC の増加などが重要とされている (Bellingham *et al.*, 1971; Hlastala and Woodson, 1975)。ただし、本実験に用いた Hem-O-Scan は温度と  $P_{CO_2}$  が一定に保持されるため、この2因子による影響は除かれるが、*P. berghei* 感染マウスは病勢が進展した末期には体温が下降するので、 $P_{50}$  は *in vivo* のそれより若干高く測定されたと思われる。また、 $P_{CO_2}$  についても、熱帯熱マラリア患者の重症例では正常値より低下していることが、海老沢ら (1979), Martell *et al.* (1979), 駒ヶ根・松岡 (1980) によつて報告されており、かかる現象が感染マウスにもみられるならば、*in vivo* での  $P_{50}$  はさらに低値であるかも知れない。

MCHC の  $P_{50}$  への影響に関しては、それが 1 g/dl 増

加すると  $P_{50}$  が 0.5 mmHg 増加するとする Bellingham *et al.* (1971) の報告がマウスの場合にも適用されるとしても、非感染対照群に比し、感染群における接種3日後以後の MCHC の減少は 2~4 g/dl であるので、それによる  $P_{50}$  の減少は 2 mmHg 以下にすぎず、MCHC による  $P_{50}$  への影響は極めて軽微である。

2,3-DPG と ATP は酸素と競合する状態で特異的に Hb と結合して酸素親和性を低下させることが知られているが、ATP よりその赤血球内濃度が高くなるに高い 2,3-DPG の影響の方が著しい。ところが、本実験では 2,3-DPG が感染経過とともに減少し、 $P_{50}$  はこれと逆相関を示して増加したため (Fig. 7),  $P_{50}$  の変動は 2,3-DPG の変化によつては説明できない。また、ATP も接種5日後まで減少し、これでは  $P_{50}$  は実験成績とは逆に減少しなければならないことになる。もつとも、接種5日後から6日後にかけては ATP がやや増加しているが、これも 2,3-DPG に比較すれば僅かにすぎず、しかも通常、大部分の ATP は Mg 複合体を形成して Hb との結合力が弱い状態で存在することを考えると (Berger *et al.*, 1973; Gerber *et al.*, 1973; Hamasaki and Rose, 1974; Marshall *et al.*, 1977),  $P_{50}$  の増加には関与しないことと思われる。

血液 pH の変動は、接種3日後から5日後にかけての低下が著しく、 $P_{50}$  増加の主因になっていると考えられ、両側定値の間には高い負の相関関係 ( $r = -0.7553$ ,  $p < 0.001$ ) を認めた (Fig. 8)。この pH 低下に起因する酸素平衡曲線の右方偏移 ( $P_{50}$  増加) は Bohr 効果と呼ばれ、 $\log P_{50}$  の pH 依存性を示す Bohr 係数はマウスでは  $-0.63 \log P_{50}/\Delta pH$  とされている (Ulrich *et al.*, 1963)。本係数に基づいて非感染対照群で pH 7.42 のときに 39.8 mmHg を示した  $P_{50}$  の実測値を pH の変動がみられた感染群のそれに対比させると、接種3日後の pH 7.39 での  $P_{50}$  は 41.6 mmHg (実測値平均 44.0 mmHg) 4日後の pH 7.23 では 52.4 mmHg (同 50.7 mmHg), 5日後の pH 7.07 では 66.1 mmHg (同 52.9 mmHg) になることになる。また、接種4日後から5日後にかけては、2,3-DPG の減少のほか、MCHC 低下のごとき  $P_{50}$  を減少させる要因が加わつたため、 $P_{50}$  の変動には有意差を認めなくなつたものと思われる。なお、接種5日後に 7.07, 6日後に 6.97 と pH が低下しており、この間に 2,3-DPG と MCHC には有意の低下を認めなかつたにも拘わらず、 $P_{50}$  の増加がみられない。その原因の1つとして、メトヘモグロビン形成

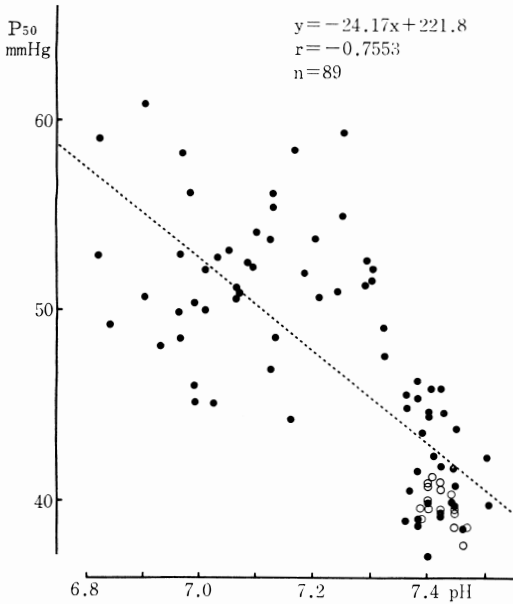


Fig. 8 Correlation between blood pH and P<sub>50</sub> value in non-infected (O) and in infected (●) mice.

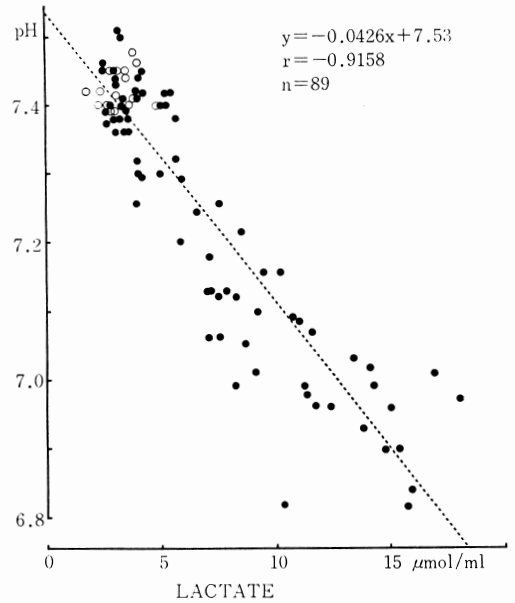


Fig. 9 Correlation between lactate concentration and blood pH in non-infected control (O) and in infected (●) mice.

により血液の酸素親和性が高くなる Darling-Roughton 効果が考えられる (Darling and Roughton, 1942). すなわち, Van Assendelft 法で求めたメトヘモグロビン量は非感染対照群で  $0.7 \pm 0.3\%$  (Mean  $\pm$  SD), 接種 3 日後  $0.9 \pm 0.3\%$  であつたのに対し, 4 日後  $1.7 \pm 0.7\%$ , 5 日後  $4.8 \pm 1.5\%$ , 6 日後  $8.2 \pm 4.2\%$  と増加しており (未発表), これが P<sub>50</sub> を減少させる方向に作用しているものと考えられる. また, この他にも Bohr 係数の変化 (Hlastala and Woodson, 1975) により P<sub>50</sub> の増加が小さくなつたこと, あるいは Hb に結合する 2,3-DPG の減少が P<sub>50</sub> の減少に反映したことなどが考えられるが, なお今後の検討にまつべき問題が少なくない. さらに, この Bohr 係数はヒトでは  $-0.48 \log P_{50}/\Delta pH$  とされているが (Roughton and Severinghaus, 1973), 熱帯熱マラリア患者において pH 7.128 (海老沢ら, 1979)ならびに pH 7.17 (Martell *et al.*, 1979) の報告例もあるので, ヒトでもこのような P<sub>50</sub> の著増が起りうる事が示唆される.

なお, 本実験では pH は全血について測定したのみであるが, Hb の存在する赤血球内の pH についても測定する必要がある. すなわち, 通常赤血球外 pH (pHe) は赤血球内 pH (pHi) より高く, 有機リン酸塩濃度の

上昇とともに赤血球内外の pH 較差 (pHe-pHi) が増加することが知られているが (Duhm, 1972), マラリア感染赤血球では 2,3-DPG の低下に加えて, 赤血球膜の透過性変化に基づく, pH 較差も変動するものと考えられるからである. しかし, Deslauriers *et al.* (1982) はマウスの正常血液と感染血液における赤血球内外の pH 較差を <sup>31</sup>P-NMR (核磁気共鳴装置) を用いて測定した結果, 両者の pH 較差は等しく, ともに 0.15 であつたと報告している.

pH の低下に関しては哺乳類赤血球とマラリア原虫の両者がその ATP 産生を嫌氣的解糖に依存していることから (Homewood, 1977), 解糖中間体とその最終産物である乳酸が大きな影響を及ぼしているものと示唆された. 換言すれば, 感染経過とともに増加する乳酸とそれに随伴する pH の変動との間に高い負の相関関係 ( $r = -0.9158, p < 0.001$ , Fig. 9) を認めたことは, 乳酸が pH 低下の主因になつていていることを説明するものであろう. また, 既述のごとく, 赤血球外の pH は赤血球内のそれより高く, しかもマラリア感染の進展とともに増強する溶血が pH を一層低下させる付加要因になつていていることも考えられる.

一方, Pco<sub>2</sub> の酸血症への関与に関しては, 本実験では

血液ガスの分析を実施していないので言及することができない。しかし、前述のごとく、熱帯熱マラリア患者では、重症時に  $P_{CO_2}$  の低下がみられ、これによりむしろ呼吸性にアシドーシスを代償する方向に作用しているものと考えられる。

ところで解糖の促進、すなわち乳酸生成は解糖の律速酵素 phosphofructokinase (PFK, EC 2.7.1.11) の活性化、あるいは阻害の解消に起因するが、なかでも阻害剤としての ATP の減少 (Uyeda, 1979)、赤血球においては 2,3-DPG の変動、さらには遊離型 2,3-DPG 量の調節因子である deoxy Hb が重要な役割を果す (Ramaish, 1974)。第 1 に感染経過とともに著しい減少がみられる 2,3-DPG は赤血球内 PFK の脱阻害を起し、解糖進行に大きく害与している。また、感染とともに増加する  $P_{50}$  は赤血球内の低酸素状態、deoxy Hb の増加を意味しており、増加した deoxy Hb への 2,3-DPG の結合は赤血球内遊離 2,3-DPG を一層減少させる結果を招来し、PFK の脱阻害をさらに増大する (Minakami and Yoshikawa, 1966; Ponce *et al.*, 1971)。第 2 に感染による ATP の減少もまた PFK の脱阻害を起し、解糖を促進する機能をもつことが報告されており (Uyeda, 1979; Ramaish, 1974)、これらの効果が解糖促進、乳酸生成の増加に大きく関与しているものと考えられる。

また、解糖促進、乳酸生成と pH 変動とは密接な関連を有し、一般に解糖の進行に伴う乳酸の蓄積によって pH が低下すると解糖はフィードバック的に抑制される。この機構は解糖の律速酵素 PFK の至適 pH が弱アルカリ領域にあるため、pH 低下により大きく活性低下を来たすことに起因している。しかし、マラリア感染赤血球では原虫由来の PFK は酸性領域にも及ぶ幅広い至適 pH を有し、乳酸によって pH が低下した場合でも活性が低下しないため解糖のフィードバック機構が作動せず、乳酸の過剰生成を起すことになる。その結果生じた pH 低下は Bohr 効果として  $P_{50}$  を増加させ、低酸素状態への代謝適応の一つともなっている。

## 結 語

マラリア発症に関与する低酸素症の病態生理学的意義を究明する目的で、実験マウスマラリアにおける  $P_{50}$  の経日的変動とそれに影響を及ぼす諸因子について検討し、次の知見をえた。

1) 5週令、雄の ddY マウス腹腔内に *P. berghei* NK 65 感染赤血球を  $10^7$  個接種したところ、2日後の

0.8%から以後 11.3%, 34.7%, 64.7%, 81.6%と経日的に感染赤血球の割合が増加し、感染マウスは 6 日ないし 7 日間で死亡した。

2) Hb 濃度は接種 3 日後から減少し、Ht 値は 4 日後から低下した。

3) 非感染対照群の  $P_{50}$  は 39.8 mmHg であったのに対し、感染群のそれは接種 3 日後に 44.0 mmHg、4 日後には 50.7 mmHg にまで増加したが、5 日後ならびに 5 日から 6 日後にかけては有意の増加を認めなかった。

4) 血中 2,3-DPG と ATP は接種 3 日後から減少し、 $P_{50}$  の増加因子になつていないことが判明した。また、ATP に関しては、接種 5 日から 6 日後にかけての増加を認めたが量的に極めて僅かだったため  $P_{50}$  への影響は考え難かった。

5) 血液 pH は非感染対照群の 7.42 に比し、感染群では接種 3 日後以降は 7.39, 7.23, 7.07, 6.97 と経日的に低下して  $P_{50}$  の変動との間に高い負の相関がみられたため、 $P_{50}$  の増加要因になつているものと考えられた。ただし、接種 4 日から 5 日後と 5 日から 6 日後にかけては 2,3-DPG などの因子が付加されたため、 $P_{50}$  の増加をみなかったものと思われる。

6) 血中乳酸は接種 4 日後から著増し、感染末期における pH 低下の主因になつているものと考えられた。

7) マラリア病態の発現に直接関与する感染赤血球における解糖促進、乳酸生成の増加機構と  $P_{50}$  増加との関連について考察を加えた。

## 文 献

- 1) Bellingham, A. J., Detter, J. C. and Lenfant, C. (1971): Regulatory mechanisms of hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkalosis. *J. Clin. Invest.*, 50, 700-706.
- 2) Benesch, R. and Benesch, R. E. (1969): Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. *Nature*, 221, 618-622.
- 3) Berger, H., Jänig, G.-R., Gerber, G., Ruckpaul, K. and Rapoport, S. M. (1973): Interaction of haemoglobin with ions. Interactions among magnesium, adenosine 5'-triphosphate, 2,3-bisphosphoglycerate, and oxygenated and deoxygenated human haemoglobin under simulated intracellular conditions. *Eur. J. Biochem.*, 38, 553-562.
- 4) Chongsuphajaisiddhi, T. (1981): Pathophysiology of malaria. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 12, 298-307.

- 5) Contreras, C., June, C. H., Perrin, L. H. and Lambert, P.-H. (1980): Immunopathological aspects of *Plasmodium berghei* infection in five strains of mice. Clin. Exp. Immunol., 42, 403-411.
- 6) Darling, R. C. and Roughton, F. J. W. (1942): The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin. Am. J. Physiol., 137, 56-68.
- 7) Deslauriers, R., Ekiel, I., Kroft, T. and Smith, I. C. P. (1982): NMR studies of malaria. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance of blood from mice infected with *Plasmodium berghei*. Biochim. Biophys. Acta, 721, 449-457.
- 8) Duhm, J. (1971): Effects of 2, 3-diphosphoglycerate and other organic phosphate compounds on oxygen affinity and intracellular pH of human erythrocytes. Pflügers Arch., 326, 341-356.
- 9) 海老沢 功・谷 莊吉・黒川 颯(1979): マラリアーとくに熱帯熱マラリアの死亡と頻死例—診断と治療, 67, 2012-2015.
- 10) Eling, W., van Zon, A. and Jerusalem, C. (1977): The course of a *Plasmodium berghei* infection in six different mouse strains. Z. Parasitenk., 54, 29-45.
- 11) Gerber, G., Berger, H., Jänig, G.-R. and Rapoport, S. M. (1973): Interaction of haemoglobin with ions. Quantitative description of the stage of magnesium, adenosine 5'-triphosphate, 2,3-bisphosphoglycerate, and human haemoglobin under simulated intracellular conditions. Eur. J. Biochem., 38, 563-571.
- 12) Greenberg, J. and Kendrick, L. P.(1958): Parasitemia and survival in mice infected with *Plasmodium berghei*. Hybrids between Swiss (high parasitemia) and STR (low parasitemia) mice. J. Parasitol., 44, 492-498.
- 13) Hamasaki, N. and Rose, Z. B. (1974): The binding of phosphorylated red cell metabolites to human hemoglobin A. J. Biol.Chem., 249, 7896-7901.
- 14) Hlastala, M. P. and Woodson, R. D. (1975): Saturation dependency of the Bohr effect: interactions among H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>, and DPG. J. Appl. Physiol., 38, 1126-1131.
- 15) Homewood, C. A. (1977): Carbohydrate metabolism of malarial parasites. Bull.WHO, 55, 229-235.
- 16) 駒ヶ嶺正純・松岡健平 (1980): 59. 発熱, 黄疸, 乏尿. 内科から病理へ, 第3集, 日本臨床, 38, 3422-3423.
- 17) Marshall, W. E., Costello, A. J. R., Henderson, T. O. and Omachi, A. (1977): Organic phosphate binding to hemoglobin in intact human erythrocytes determined by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta, 490, 290-300.
- 18) Martell, R. W., Kallenbach, J. and Zwi, S. (1979): Pulmonary oedema in falciparum malaria. Brit. Med. J., 1, 1763-1764.
- 19) Minakami, S. and Yoshikawa, H. (1966): Studies on erythrocyte glycolysis. II. Free energy changes and rate limiting steps in erythrocyte glycolysis. J. Biochem., 59, 139-144.
- 20) Ohtomo, H. and Katori, M. (1972): Reliable evidence of involvement of the kinin system in mouse malaria. Japan. J. Pharmacol., 22, 493-509.
- 21) Ponce, J., Roth, S. and Harkness, D. R. (1971): Kinetic studies on the inhibition of glycolytic kinases of human erythrocytes by 2,3-diphosphoglyceric acid. Biochim. Biophys. Acta, 250, 63-74.
- 22) Ramaiah, A. (1974): Pasteur effect and phosphofructokinase. Curr. Top. Cell Regul., 8, 297-345.
- 23) Roughton, F. J. W. and Severinghaus, J. W. (1973): Accurate determination of O<sub>2</sub> dissociation curve of human blood above 98.7% saturation with data on O<sub>2</sub> solubility in unmodified human blood from 0° to 37°C. J. Appl. Physiol., 35, 861-869.
- 24) Sander, B. J., Lowery, M. S. and Kruckeberg, W. C. (1982): *Plasmodium berghei*: Acid-insensitive phosphofructokinase in infected mouse erythrocytes. Exp. Parasitol., 53, 11-16.
- 25) Ulrich, S., Hilpert, P. and Bartels, H. (1963): Über die Atmungsfunktion des Blutes von Spitzmäusen, weissen Mäusen und syrischen Goldenhamstern. Pflügers Arch., 277, 150-165.
- 26) Uyeda, K. (1979): Phosphofructokinase. Adv. Enzymol., 48, 193-244.
- 27) WHO (1980): The clinical management of acute malaria. WHO Regional Publications. South-East Asia Series, No. 9, 85p.



**Abstract**

PATHOPHYSIOLOGICAL STUDY ON MALARIA  
I. CHANGES IN HEMOGLOBIN OXYGEN AFFINITY AND ITS  
FACTORS IN MICE INFECTED WITH  
*PLASMODIUM BERGHEI*

HIROSHI OHTOMO<sup>1)</sup>, ATUSHI HIOKI<sup>1)</sup> AND MASATAKA YOSHINO<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>*Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine, Gifu  
500, Japan;* <sup>2)</sup>*Department of Biochemistry, Yokohama City  
University School of Medicine, Yokohama 232, Japan)*

The relationship between the carriage of oxygen by blood and the stimulation of glycolysis in the erythrocytes was investigated in mice infected with *Plasmodium berghei*. Serial determinations of the oxygen equilibrium curve of blood, hemoglobin (Hb) content, pH and some metabolites in blood were carried out.

1) Male ddY mice were inoculated intraperitoneally with  $10^7$  red cells infected with *Plasmodium berghei* NK 65, a strain which is lethal in 6-7 days with a parasitemia than 80 %.

2) All mice were severely anemic; the oxygen equilibrium curve of blood was shifted right as compared to controls, and the  $P_{50}$  values increased with the progress of the infection.

3) The levels of 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) and ATP in red cells decreased markedly during the late stage of the infection.

4) All mice with infection were severely acidotic, and the decline in pH closely correlated with the increase in serum lactate.

The right shift of the oxygen equilibrium curve as a metabolic adaptation to hypoxia can be accounted for by the decline in pH (Bohr effect), which results from the stimulation of glycolytic flux by the decrease in the levels of ATP and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG).