

Plasmodium berghei 感染マウス血液における 解糖系代謝の動向とその宿主病態への関与

日置敦巳¹⁾ 日置由香里²⁾ 大友弘士¹⁾

(平成元年9月19日掲載決定)

要 約

Plasmodium berghei 感染マウスを用いて、マラリア感染の進行に伴う解糖系のパラメーターの変動について調べた。感染の進行に伴って血液中における解糖の亢進が認められ、接種4日後には血液中ピルビン酸および乳酸の増加が、また5日後にはグルコースの減少が認められた。解糖系の律速酵素では、接種4日後よりヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、アルドラーゼの活性上昇が認められた。*In vitro*における赤血球の乳酸産生能は、反応液のpH7.40では接種3日後に、またpH7.00では接種4日後に上昇した。これは、前者では主として宿主赤血球内の解糖系酵素の脱阻害により、また後者では主として原虫由来の酵素の増加によって惹起されたものであると考えられた。なお、感染後期にみられた乳酸著増は、組織低酸素症によるものよりむしろ赤血球内での解糖亢進に起因するところが多いことが判明した。

Key words: malaria, *Plasmodium berghei*, mouse, glycolysis, lactate production

緒 言

マラリア原虫は宿主赤血球の中で、宿主のグルコースを分解することによってエネルギーとしてのアデニン三リン酸(ATP)を得ている(Homewood, 1977; Sherman, 1984)。この解糖の機序は宿主赤血球と同様、嫌氣的解糖であり、その結果として乳酸が産生される(Homewood and Neame, 1983)。私達は熱帯熱マラリアの病態モデルとして、ddYマウス-*Plasmodium berghei* NK65の系を用いた実験を行い、原虫の増殖に伴う血液中の乳酸の増加とこれに起因する血液pHの低下が重要な病態の一つであることを突き止めた(大友ら, 1984)。マラリア感染の進行に伴って起こる解糖系代謝の変化については、すでにKruckeberg *et al.* (1981), Sander and Kruckeberg (1982) が原虫寄生率の高い感染末期の赤血球を用いることによって、原虫由来の解糖系酵素活性による解糖の促進を証明している。本研究では、*P. berghei* 感染マウスにおける解糖系の主要なパラメーターの経時的な変動を調べ、感染の進行に伴う解糖系代謝の動向と宿主病態との関連について検討を行った。

材料と方法

実験にはddY系、雄、5週齢のSPFマウス(静岡実験動物農業協同組合)を用いた。マラリア原虫は、毎週、

- 1) 岐阜大学医学部寄生虫学教室
- 2) 岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設

感染血をマウス腹腔内に接種することによって継代維持している *P. berghei* NK65を用いた。

実験に際しては、まず、*P. berghei* 感染マウスから心臓穿刺によるヘパリン採血を行い、赤血球数および赤血球への原虫寄生率を求めた。赤血球への原虫寄生率は、ギムザ染色を行った薄層塗抹標本の鏡検により求めた。次に、原虫寄生赤血球が 10^8 個/mlとなるように生理食塩水でこれを希釈調整し、1匹あたり0.1mlを腹腔内に接種した。マウスは24-26℃、湿度40-60%、照明時間12時間に維持された部屋で、市販の固形飼料(CE-2, 日本クレア)と水を自由に与えながら飼育した。

P. berghei 接種の2, 3, 4, 5もしくは6日後に、マウス直腸温を測定し、次いでヘパリンを用いて心臓穿刺により全採血を行った。この血液について赤血球数および赤血球への原虫寄生率を測定するとともに、主要な解糖中間体として血液中のグルコース、ピルビン酸、乳酸の濃度を測定した。また、主な解糖系酵素として、律速酵素であるヘキソキナーゼ(EC 2. 7. 1. 1), ホスホフルクトキナーゼ(EC 2. 7. 1. 11), アルドラーゼ(EC 4. 1. 2. 13), ピルビン酸キナーゼ(EC 2. 7. 1. 40)を測定した。さらに解糖系代謝の変動の総合的指標として、赤血球の乳酸産生能の測定を行った。なお、解糖系酵素および乳酸産生能の測定には、それぞれ別のマウス2-3匹分の血液を検体として用いた。

解糖中間体の測定に際しては、全血に氷冷0.6N 過塩素酸を加えて除蛋白を行い、遠沈後、上清についてNADPHもしくはNADHの波長340nmでの吸光度の増減

を測定するヘキソキナーゼ・グルコース-6-リン酸脱水素酵素法 (Barthelmei and Czok, 1962) および Minakami *et al.* (1965) の方法によって求めた。解糖系酵素および赤血球の乳酸産生能の測定に当たっては、白血球および血小板による影響は無視しうる程度のものがあり、その除去は不要であるとされているが (Minakami *et al.*, 1965; Homewood, 1977), 今回の実験では、最初に血液を遠沈 (450 g, 7 分間) して血漿および buffy coat を除去した。次いで、これを冷生理食塩水で 3 回洗浄を行い、赤血球数が $300 \times 10^4 / \text{mm}^3$ 前後になるように希釈調整した後、赤血球数を算定するとともに、この赤血球浮遊液を冷水で 25 倍希釈して溶血させ、この溶血液について直ちに酵素活性測定を行った。(仁科, 1972; Beutler *et al.*, 1977)。赤血球の乳酸産生能は、解糖系酵素活性測定と同様に洗浄まで行った後、pH7.40 もしくは 7.00 の反応液 (100mM NaCl, 5mM KCl, 10mM MPO_4^{2-} , 10M グルコース, 30mM トリエタノールアミン緩衝液) を加えて 37°C で 1 時間反応させ、反応前後の乳酸濃度を測定して単位赤血球・単位時間あたりの乳酸産生量を求めた (Minakami and Yoshikawa, 1966)。反応液の pH は、非感染マウス血液および接種 6 日後のマウス血液を代表する 7.40 および 7.00 とした (大友ら, 1984)。

一部のマウスについては、頸椎脱臼によってと殺し、直ちに脳および肝の一部を摘出して液体窒素で凍結した。これを秤量後、ドライアイスで冷却した Potter 型ホモジナイザーに入れて摩砕し、3M 過塩素酸、1mM EDTA を加えてホモジナイズした後遠沈し、さらに上清に K_2CO_3 を加えて遠沈後、上清中のグルコース、乳酸および ATP を測定した (Kinter *et al.*, 1984)。

統計学的解析は *t* 検定によって行った。

成 績

赤血球への原虫寄生率は Table 1 に示したように、接種 2 日後以降著しく増加した。赤血球数は 4 日後より有意の減少を示した。マウス直腸温は接種 5 日後より低下

し、接種 6 日後には平均 30.0°C と低体温を示した。

血液中のグルコースは接種 5 日後より減少を示し ($p < 0.01$)、6 日後には非感染対照群の約 1/6 にまで減少した (Fig. 1)。ピルビン酸および乳酸は接種 4 日後より増加し、6 日後には非感染対照群の約 3.5 倍となった。解糖系酵素では、ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、アルドラーゼが接種 4 日後以降、活性上昇を示した。 ($p < 0.05$, Fig. 2)。

赤血球の乳酸産生能は、反応液の pH7.40 では接種 3 日後に著しく増加したのに対し、pH7.00 では 4 日後に

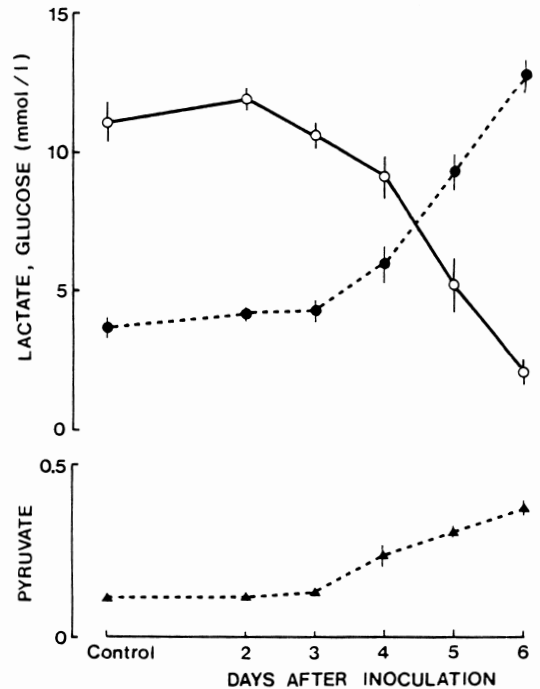


Fig. 1 Concentrations of blood glucose (○), pyruvate (▲) and lactate (●) in *Plasmodium berghei*-infected mice and uninfected controls. Each point represents the mean \pm SE of 8 mice.

Table 1 Summary of course of *Plasmodium berghei* infection in male ddY mice

| | Uninfected controls | Days after inoculation | | | | |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Parasitemia (%) | — | 0.7 \pm 0.2 | 10.7 \pm 1.2 | 30.7 \pm 2.6 | 66.3 \pm 1.9 | 81.0 \pm 1.9 |
| Red cell count ($\times 10^{10}/l$) | 753 \pm 8 | 764 \pm 7 | 788 \pm 11* | 685 \pm 11† | 371 \pm 26† | 229 \pm 34† |
| Body temperature (°C) | 36.6 \pm 0.2 | 36.3 \pm 0.1 | 36.5 \pm 0.2 | 36.6 \pm 0.3 | 34.5 \pm 0.4† | 30.0 \pm 1.1† |

Data are expressed as means \pm SE of 5–8 mice each.

* $p < 0.05$, † $p < 0.01$ as compared with uninfected controls.

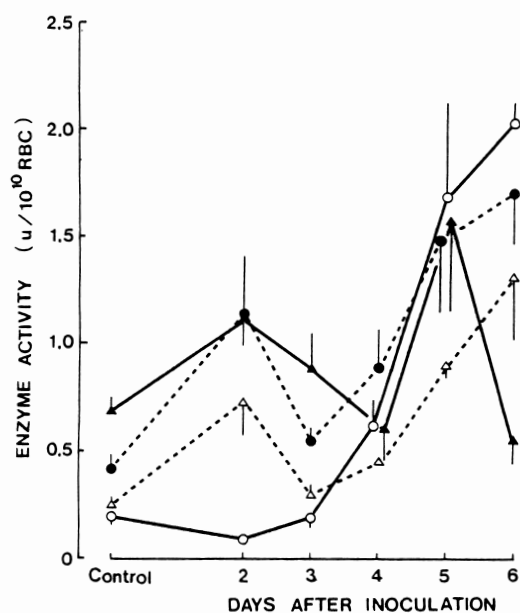


Fig. 2 Activities of red cell hexokinase (○), phosphofructokinase (●), aldolase (△) and pyruvate kinase (▲) in mice during *P. berghei* infection. Each point represents the mean \pm SE of 4-6 pooled blood samples.

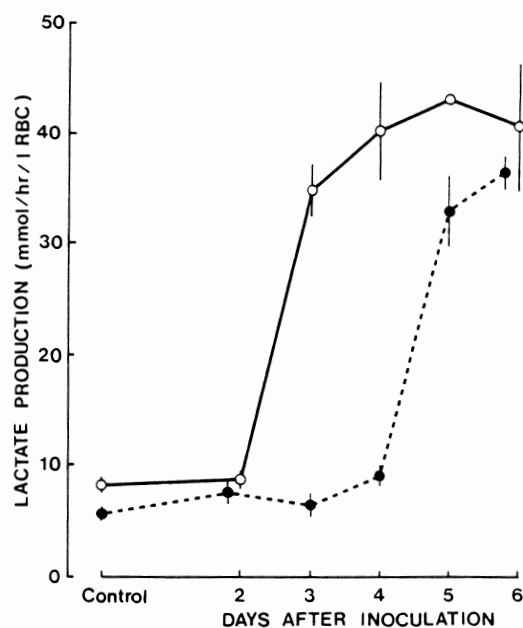


Fig. 3 The time course of red cell lactate production in *P. berghei*-infected mice and uninfected controls at pH 7.40 (○) and pH 7.00 (●). Each point represents the mean \pm SE of 4 pooled blood samples.

Table 2 Changes in glucose, lactate and adenosine triphosphate (ATP) concentrations in the brain and the liver of malaria-infected mice and uninfected controls

| | | Uninfected controls | Days after inoculation | |
|-------|------------------------|---------------------|------------------------|------------------|
| | | | 5 | 6 |
| Brain | Glucose (μ mol/g) | 2.57 \pm 0.37 | 1.08 \pm 0.04* | 1.11 \pm 0.14† |
| | Lactate (μ mol/g) | 5.29 \pm 0.37 | 9.88 \pm 0.99† | 8.19 \pm 0.63† |
| | ATP (μ mol/g) | 0.91 \pm 0.09 | 0.96 \pm 0.08 | 0.84 \pm 0.07 |
| Liver | Glucose (μ mol/g) | 11.78 \pm 1.11 | 8.50 \pm 2.10 | 1.99 \pm 0.36† |
| | Lactate (μ mol/g) | 3.21 \pm 0.25 | 8.30 \pm 1.25* | 9.40 \pm 0.78† |
| | ATP (μ mol/g) | 2.62 \pm 0.16 | 1.07 \pm 0.17† | 0.76 \pm 0.09† |

Data are expressed as means \pm SE of 5-6 mice each.

* $p < 0.05$, † $p < 0.01$ as compared with uninfected controls.

有意に増加し5日後に著増した。なおpH7.40での乳酸産生能は常にpH7.00でのそれを上回った (Fig. 3)。

脳および肝組織中のグルコース、乳酸、およびATPの変動については、Table 2に示した。グルコースは脳では接種5日より増加を示し、また肝では6日後に著しい減少を示した。乳酸は脳、肝ともに接種5日後より増加

した。ATPは脳では非感染時に比べて有意の減少は認められず、肝では接種5日後には有意の減少を示した。

考 察

重症の熱帯熱マラリアでは通常、マラリア原虫寄生赤血球が著しく増加しており、これに伴って低血糖、高乳

酸血症がみられることが報告されている (White *et al.*, 1983, 1987)。私達はこの病態について解明するため、赤血球への高い原虫寄生虫と高乳酸血症のみられる ddY マウス-P. berghei NK65の系を用いた実験を行った。

血液中のグルコース、ピルビン酸および乳酸の濃度は接種3日後より解糖の亢進傾向を示唆し、4日後にはピルビン酸および乳酸が有意の増加を示している。これに対し、赤血球の解糖系酵素でもヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、アルドラーゼの活性が接種4日後に上昇しており、ともにこの時期の解糖亢進を裏付けるデータとなっている。

赤血球の乳酸産生能は、反応液の pH7.40と pH7.00の場合を比較すると、感染の各時期を通じて pH7.40で高くなっており、これは解糖系酵素の至適 pHが弱アルカリ性であることを示唆するものといえる。乳酸産生能の上昇は、pH7.40では接種3日後より、また pH7.00では4日後より認められたが、解糖系の律速酵素は接種3日後には有意の活性上昇を示しておらず、4日後以降になって上昇を示している。これらのことから、pH7.40における接種3日後の乳酸産生能上昇は赤血球内 ATP, 2, 3-ジホスホグリセリン酸 (2, 3-DPG) および遊離 2, 3-DPGの減少に起因する赤血球内解糖系酵素の脱阻害によるものであると考える (Uyeda, 1979; Ramaish, 1974; Ponce *et al.*, 1971; 大友ら, 1984)。しかしながら生体内においては、速やかに pH低下等によってフィードバックがかかるため解糖が進行しないのであろう。pH7.00における接種4日後の乳酸産生能上昇は、原虫が増殖して原虫由来の解糖系酵素が増加し、この酵素が酸性領域にも及ぶ幅広い至適 pHを有することから、乳酸の蓄積に起因する pH低下による解糖のフィードバックの抑制が起らなくなったためと考えられる (Kruckeberg *et al.*, 1981; Sander *et al.*, 1982)。この結果、乳酸は過剰に産生され、pH低下を引き起こすことになる。てんかん発作や運動後にみられる乳酸増加・pH低下は、すぐに回復がみられるが、マラリアでは血液中での乳酸産生量が常に除去量を上回っているために増加していくものと考えられる。脳および肝組織中の乳酸量は、血液中の濃度と比較すれば低くなっており、これは乳酸増加が、組織の低酸素症よりむしろ血液中での解糖亢進に起因するものであることを示すものといえる。

なお、私達の用いた実験系では発熱がみられず、末期には逆に体温が低下する点がヒトでの熱帯熱マラリアの場合と大きく異なっている。この体温低下の原因および体温低下による病態への影響については、今後追及すべき課題である。

- 1) Barthelmai, W. and Czok, R. (1962): Enzymatische Bestimmung von Glucose in Blut, Liquor, und Harn. Klin. Wschr., 40, 585-589.
- 2) Beutler, E., Blume, K. G., Kaplan, J. C., Lohr, G. W., Ramot, B. and Valentine, W. N. (1977): International committee for standardization in haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. Br. J. Haematol., 35, 331-340.
- 3) Homewood, C. A. (1977): Carbohydrate metabolism of malarial parasites. Bull. WHO, 55, 229-235.
- 4) Homewood, C. A. and Neame, K. D. (1983): Conversion of glucose to lactate by intraerythrocytic *Plasmodium berghei*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 77, 12-129.
- 5) Kinter, D., Fitzpatrick, Jr. J. H., Louie, J. A. and Gilboe, D. D. (1984): Cerebral oxygen and energy metabolism during and after 30 minutes of moderate hypoxia. Am. J. Physiol., 247, E475-E482.
- 6) Kruckeberg, W. C., Sander, B. J. and Sullivan, D. C. (1981): *Plasmodium berghei*: Glycolytic enzymes of the infected mouse erythrocyte. Exp. Parasitol., 51, 438-443.
- 7) Maegraith, B. and Fletcher, A. (1972): The pathogenesis of mammalian malaria. Adv. Parasitol., 10, 49-75.
- 8) Minakami, S., Suzuki, C., Saito, T. and Yoshikawa, H. (1965): Studies on erythrocyte glycolysis. I. Determination of the glycolytic intermediates in human erythrocytes. J. Biochem., 58, 543-550.
- 9) Minakami, S. and Yoshikawa, H. (1966): Studies on erythrocyte glycolysis. III. The effects of active cation transport, pH and inorganic phosphate concentration on erythrocyte glycolysis. J. Biochem., 59, 145-150.
- 10) 仁科甫啓 (1972): 血球内酵素. In: 臨床検査技術全書, 第3巻, 血液検査, 三輪史朗(編), 医学書院, 東京, 306-319.
- 11) 大友弘土・日置敦己・吉野昌孝 (1984): マラリアに関する病態生理学的研究. I. *Plasmodium berghei* 感染マウスにおける血液酸素親和性の変動とその意義, 寄生虫誌, 33, 525-533.
- 12) 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.
- 13) Ramaish, A. (1974): Pasteur effect and phosphofructokinase. Curr. Top. Cell Regul., 8, 297-345.
- 14) Sander, B. J. and Kruckeberg, W. C. (1982): *Plasmodium berghei*: Glycolytic intermediate concentrations of the infected mouse erythrocyte. Exp. Parasitol., 52, 1-8.
- 15) 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.
- 16) Sherman, I. W. (1984): Metabolism. *In: Anti-malarial Drugs I*, Peters, W. and Richards, W. H. G., eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York and Tokyo, 31–81.
- 17) Uyeda, K. (1979): Phosphofructokinase. *Adv. Enzymol.*, 48, 193–244.
- 18) White, N. J., Warrell, D. A., Chanthavanich, P., Looareesuwan, S., Warrell, M. J., Krishna, S., Williamson, D. H. and Turner, R. C. (1983): Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.*, 309, 61–66.
- 19) White, N. J., Miller, K. D., Marsh, K., Berry, C. D., Turner, R. C., Williamson, D. H. and Brown, J. (1987): Hypoglycaemia in African children with severe malaria. *Lancet*, i, 708–711.

[*Jpn. J. Parasitol.*, Vol. 38, No. 6, 339–343, December, 1989]

Abstract

CHANGES OF GLYCOLYTIC METABOLISM AND ITS INFLUENCES ON THE
PATHOGENESIS OF MALARIA IN MICE INFECTED WITH
PLASMODIUM BERGHEI

ATSUSHI HIOKI¹⁾, YUKARI HIOKI²⁾ AND HIROSHI OHTOMO¹⁾

¹⁾Department of Parasitology and ²⁾Institute of Anaerobic Bacteriology,
Gifu University School of Medicine, Gifu 500, Japan)

Parameters of glycolytic system were evaluated in severe murine malaria, using mice infected with *Plasmodium berghei* (NK65). When 5 weeks old male ddY mice were inoculated with 1×10^7 of *P. berghei*-infected red blood cells, the mice died 6–7 days after inoculation. Parasitemia in these mice increased rapidly from day 3 after inoculation. Blood glucose concentration decreased on day 5, while blood pyruvate and lactate concentration increased on day 4. These glycolytic changes became more severe on day 6. Activities of hexokinase (EC 2.7.1.1), aldorase (EC 4.1.2.13) and pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) increased on day 4. These data indicate that glycolysis progressed rapidly from day 4 in malarial mice. Lactate production of the infected mouse red blood cells increased markedly on day 3 at pH 7.40 and on day 4 at pH 7.00. These data indicate the increased glycolytic rate on day 3 was caused by the disinhibition of host glycolytic enzymes and that on day 4 by the increased enzyme activity of parasite origin. Influences of the increased glycolytic metabolism were smaller in the brain than in the liver. It was concluded that increased lactate concentration in the blood in the last stage of infection was mainly due to increased glycolytic rate in red cells rather than to tissue hypoxia.