

*Plasmodium berghei*感染マウスにおける急性 メトヘモグロビン血症誘発の影響

日置敦巳¹⁾ 日置由香里²⁾ 大友弘士¹⁾

(平成3年2月19日 掲載決定)

要 約

*Plasmodium berghei*感染マウスに亜硝酸ナトリウムを投与して急性メトヘモグロビン血症を誘発し、宿主への影響を調べた。血液総ヘモグロビン中に占めるメトヘモグロビンの割合は、マラリア感染の進行に伴って増加し、非感染対照群の0.57%に対して、原虫接種5日後には4.22%に、6日後には8.69%に達した。感染マウスにさらに急性メトヘモグロビン血症を誘発するために、亜硝酸ナトリウムを腹腔内に接種したが、そのLD₅₀は非感染対照群の193mg/kg体重に対して、接種5日後には50mg/kgに減少した。また、LD₅₀に相当する亜硝酸ナトリウムの投与により、メトヘモグロビンの割合は、非感染対照群では76.2%に達したが、接種5日後のマウスでは16.5%と低い値を示した。次に接種5日後のマウスと非感染対照マウスとで、亜硝酸ナトリウム投与後の血中メトヘモグロビン量の変動を比較した。その結果、感染マウスの血液では亜硝酸ナトリウム投与によるメトヘモグロビンの増加が著しく、感染マウスではメトヘモグロビンの減少が遅延した。以上の結果から、マラリア感染マウスでは急性メトヘモグロビン血症に対する耐性が低下していると考えられた。

Key Words : malaria, *Plasmodium berghei*, mouse, methemoglobinemia, sodium nitrite

著 言

貧血はマラリアの主要な病態の一つであり、局所的な血流量の減少とともに、組織への酸素供給量減少の原因となる (Miller *et al.*, 1971; Maegraith and Fletcher, 1972; Yoeli and Hargreaves, 1974; Polder *et al.*, 1983; Warrell, 1987)。マラリア原虫は、宿主赤血球の中で増殖して感染赤血球および非感染赤血球を破壊し、またヘモグロビンを分解して、宿主に貧血を引き起すが、このほかに、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化することも知られている (Friedman *et al.*, 1979; Yamada and Sherman, 1979)。こうしたメトヘモグロビンの増加は、マラリア感染個体の貧血をさらに増悪させる因子となりうる (Darling and Roughton, 1942)。著者らは、先に、*Plasmodium berghei*感染BALB/cマウスを用い、感染末期には血液総ヘモグロビン中に占めるメトヘモグロビンの割合が約10倍に増加して、血液の酸素運搬能を低下させていることを報告

した (Hioki and Ohtomo, 1986)。メトヘモグロビンの割合は、赤血球の中では、マラリア原虫の輪状体から分裂体への発育に伴って増加し、血液中においては、赤血球への原虫寄生率に比例して増加していた。正常赤血球においては、メトヘモグロビンは速やかにヘモグロビンに還元されるが、マラリア原虫寄生によって赤血球内でのメトヘモグロビン代謝が変化し、メトヘモグロビンが定期的に増加している可能性が考えられた。また、メトヘモグロビン代謝が変化することによって、メトヘモグロビン血症に対する耐性が低下していることも予測された。そこで本研究では、感染マウスにさらに急性のメトヘモグロビン血症を誘発し、宿主マウスへの影響およびメトヘモグロビン代謝の変化を調べることにした。

材料と方法

実験に際しては、宿主として ddY 系、雄、5週齢の SPF マウス (SLC) を用いた。マウスの飼育条件は、温度 25 ± 1 °C、湿度 50 ± 10% で、1日に12時間の照明を行い、市販の飼料および水道水を任意に摂取させた。マラリア原虫は、1週間ごとにマウスへの腹腔内接種により継代維持している *P. berghei* NK65 を用いた。感染は *P. berghei* 寄生赤血球 1 × 10⁷ 個を腹腔内に接種することによって行った。この条件ではマウスは接種 6 - 7

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

本研究の一部は文部省科学研究費 (No.61770267) の補助を受けて行われた。

日後にかけて死亡する。

最初に、ddY系マウスにおける感染の進行とメトヘモグロビン増加との関係を調べた。接種の2-6日後に、マウスをペントバルビタールナトリウムの腹腔内接種(50mg/kg体重)により麻酔し、頸動脈より全採血後、直ちにZwart *et al.* (1981)の方法によって、血液総ヘモグロビン中に占めるメトヘモグロビンの割合を測定した。次いで、シアンメトヘモグロビン法により血液中総ヘモグロビン濃度を求め(International Committee for Standardization in Haematology, 1978)、また、血液塗抹標本により赤血球への原虫寄生率を調べた。

次に、接種3-5日後のマウス、非感染貧血マウスおよび非感染対照マウスに亜硝酸ナトリウムを腹腔内注射してメトヘモグロビン血症を増悪させ、個体への影響を調べた(Egashira *et al.*, 1973)。非感染貧血マウスは、塩酸フェニルヒドラジン(50mg/kg体重)を2日または3日間皮下注射することによって作成した。亜硝酸ナトリウムのLD₅₀は、体重10gあたり0.1mlを投与するように生理食塩水で希釈した溶液を、各量6-8匹のマウスに腹腔内接種して2時間後までの死亡を調べ、Litchfield-Wilcoxon法により求めた(Litchfield and Wilcoxon, 1949)。次いで、LD₅₀量の亜硝酸ナトリウム投与後のメトヘモグロビンの割合を調べた。また、亜硝酸ナトリウム投与によるマウスの死亡が、血管拡張によるものではなくメトヘモグロビン血症によることを確認するため(Benowitz, 1983)、感染マウスと非感染対照マウスに、メトヘモグロビン還元を促進するメチレンブルー(4mg/kg体重)あるいは末梢血管抵抗を増大させるノルエピネフリン(0.04mg/kg体重)をあらかじめ皮下注射し、30分後にLD₅₀量の亜硝酸ナトリウムを投与して死亡率および誘発されるメトヘモグロビン血症の程度の変化を調べた。

生体内でのメトヘモグロビン還元能は、原虫接種5日

後のマウスと非感染対照マウスとで比較した。それぞれの群のマウスに、50または193mg/kg体重の亜硝酸ナトリウムを腹腔内接種し、その10, 20, 30, 60, 120, 180分後に心臓穿刺により採取した血液を用いてメトヘモグロビンの測定を行った。

血液中でのメトヘモグロビン還元能は、試験管内で血液に亜硝酸ナトリウムを加え、メトヘモグロビンの減少経過を調べることによって比較した。原虫接種5日後のマウス血液および非感染対照マウスの血液0.8mlに、亜硝酸ナトリウムを0.72または2.90mMとなるように加え、37°Cの恒温槽でインキュベートし、10, 20, 30, 60, 120, 180分後にそれぞれ血液0.1mlを採ってメトヘモグロビン量を測定した。同時に、亜硝酸ナトリウムによる溶血の程度を調べるために、遠心ヘマトクリット値を測定した。

接種5日後のマウス赤血球と非感染対照マウスの赤血球については、さらに、Scottの方法の変法により、メトヘモグロビン還元酵素のNADH-ジアホラーゼ活性を測定した(Scott, 1960; 仁科, 1972)。

感染による経日的変動の解析は分散分析(ANOVA)によって行い、有意差の認められた場合には、さらにNewman-Keulsの方法により水準間の比較を行った。メチレンブルー投与後の死亡率の変化については χ^2 検定により、また、投与後のメトヘモグロビン血症の程度の変化についてはt検定により比較を行った。

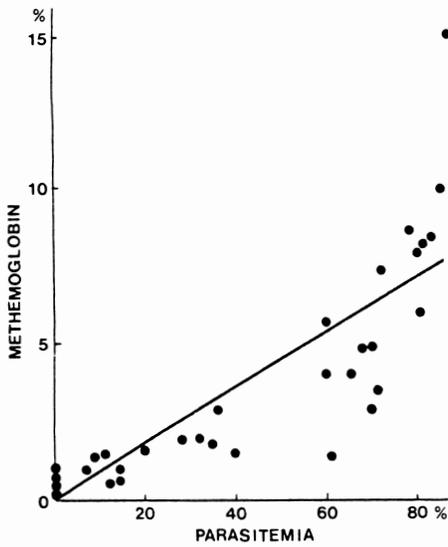
結果

血液総ヘモグロビン中に占めるメトヘモグロビンの割合は、マラリア原虫接種4日後より有意に増加し、5日後には4.22%、感染末期の6日後には8.69%と、非感染対照群の約15倍に達した(Table 1)。このメトヘモグロビンの割合を、赤血球への原虫寄生率との関連から見たものがFig. 1である。原虫寄生率とメトヘモグロビンの割合との間には強い相関が認められる($r = 0.853$,

Table 1 Hematological data of mice infected with *Plasmodium berghei*

	Uninfected controls	Days after inoculation				
		2	3	4	5	6
Number of mice	8	6	6	6	8	8
Parasitemia (%)	-	0.7 ± 0.2	10.5 ± 1.3	30.3 ± 2.7	64.9 ± 1.7	80.1 ± 1.7
Hb concentration (g/dl)	12.6 ± 0.1	11.9 ± 0.3	12.2 ± 0.4	11.3 ± 0.5	6.5 ± 0.4*	4.6 ± 0.7*
MetHb content (%)	0.57 ± 0.12	0.48 ± 0.16	0.91 ± 0.15	1.66 ± 0.28*	4.22 ± 0.63*	8.69 ± 1.11*
MetHb concentration (mg/dl)	70 ± 15	56 ± 18	110 ± 16	184 ± 28*	264 ± 34*	377 ± 44*

Values are represented as mean ± SE. Hb: hemoglobin, MetHb: methemoglobin. *p < 0.01 vs. uninfected controls.



$p < 0.001$ 。

亜硝酸ナトリウム腹腔内接種の LD_{50} 値は、非感染対照群では 193mg/kg 体重、接種 4 日後のマウスでは 166mg/kg であったのに対し、5 日後には 50mg/kg に減少した (Table 2)。一方、接種 5 日後のマウスと同程度の遠心ヘマトクリット値を有する非感染貧血マウスでは、 50mg/kg 体重の亜硝酸ナトリウム投与による死亡は認められず、 193mg/kg 投与時に約半数が死亡した (Table 3)。なお、亜硝酸ナトリウムによるマウスの死亡は投与後 90 分以内に認められ、そのほとんどは投与後 20–60 分の間であった。 LD_{50} 量の亜硝酸ナトリウム投与により、メトヘモグロビンの割合は非感染対照群では 76.2% に達し

Fig. 1 Relationship between parasitemia and methemoglobin content in *Plasmodium berghei*-infected ddY mice on days 2, 3, 4, 5 and 6 after inoculation. Solid line represents the regression line, "methemoglobin" = 0.090 "parasitemia" ($r = 0.853$, $p < 0.001$).

Table 2 Effect of sodium nitrite-induced methemoglobinemia on malarial mice

	Uninfected controls	Days after inoculation		
		3	4	5
LD_{50} value of intraperitoneal sodium nitrite (mg/kg body weight)	193	186	166	50
MetHb content in total hemoglobin after LD_{50} doses of sodium nitrite treatment (%)	76.2 ± 2.0	68.5 ± 3.5	59.5 ± 3.3	16.5 ± 2.1
Mortality following LD_{50} doses of sodium nitrite after methylene blue treatment	2/24*	NT	2/16*	6/26*
MetHb content at above listed LD_{50} doses of sodium nitrite after methylene blue treatment (%)	$32.5 \pm 3.4^*$	NT	NT	$8.5 \pm 1.0^*$

Values are represented as mean \pm SE of 6–9 mice each. MetHb: methemoglobin, NT: not tested.

* $p < 0.01$ vs. non-methylene blue treated controls.

Table 3 Influence of sodium nitrite treatment on the mortality of uninfected anemic mice

	Uninfected controls	Five days after inoculation	Uninfected anemic mice	
Packed cell volume (%)	40.5 ± 0.4	23.2 ± 1.4	24.1 ± 0.8	20.2 ± 0.8
Mortality following 50 mg/kg body weight of sodium nitrite treatment	0/8	LD_{50} dose	0/8	0/8
Mortality following 193 mg/kg body weight of sodium nitrite treatment	LD_{50} dose	NT	4/8	4/8

Values of packed cell volume are represented as mean \pm SE of 8 mice each. NT: not tested.

たが、接種5日後のマウスでは16.5%であった。メチレンブルー皮下接種の前処置を行ったマウスでは、LD₅₀量の亜硝酸ナトリウム投与時のメトヘモグロビン量および死亡率が低下した（ともに、 $P < 0.01$ ；Table 2）。これに対し、ノルエピネフリンの前投与による死亡率の低下は認められなかった（データ省略）。

マウスへの亜硝酸ナトリウムの腹腔内投与により、メトヘモグロビンは30分後にピークに達し、生存マウスでは以後、漸次減少した（Fig. 2A）。亜硝酸ナトリウム50mg/kg体重の投与で誘発されるメトヘモグロビンの割合は、原虫接種5日後のマウス、非感染対照マウスともに同程度であったが、感染マウスではメトヘモグロビンの減少が遅延した。

試験管内でのメトヘモグロビン誘発実験では、亜硝酸ナトリウム添加20分後にメトヘモグロビン量がピークに達した。この時のメトヘモグロビン量は、同濃度の亜硝酸ナトリウム添加に対して、感染マウス血液の方で増加が著しく、亜硝酸ナトリウム濃度0.72mMの感染マウス血液と2.90mMの非感染対照マウス血液で同程度のメト

ヘモグロビン量となった（Fig. 2B）。しかし、ヘモグロビンへの還元速度には相違が認められなかった。また、インキュベート前後で遠心ヘマトクリット値には差がみられなかった（データ省略）。

赤血球中のNADH-ジアホラーゼ活性は、非感染対照群の $0.43 \pm 0.05 \Delta OD / \text{分} / \text{g}$ メトヘモグロビン/mlに対し、接種5日後では $0.13 \pm 0.03 \Delta OD / \text{分} / \text{g}$ メトヘモグロビン/mlに減少した（ $p < 0.01$ ）。

考 察

亜硝酸ナトリウムの、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する毒性を利用し（Bucklin and Myint, 1960；Wolff and Wasserman, 1972）、マラリア感染マウスにメトヘモグロビン血症を誘発して生体への影響およびメトヘモグロビン血症に対する反応を調べた。亜硝酸ナトリウム腹腔内投与のLD₅₀は、原虫接種5日後のマウスで著しく低下し、LD₅₀量の亜硝酸ナトリウム投与時のメトヘモグロビン濃度も著しく低下した。非感染貧血マウスではこのような低下は認められなかったことから、感染マウスでみられたLD₅₀の低下は単に感染に起因する貧血によるものではないといえる。亜硝酸ナトリウム投与によるマウスの死亡はメトヘモグロビンのピークとほぼ一致しており、また、メチレンブルー皮下注射の前処置により、LD₅₀量の亜硝酸ナトリウム投与後のメトヘモグロビン量および死亡率が低下した。これらの事実は、亜硝酸ナトリウム投与によるマウスの死亡がメトヘモグロビン増加によるものであることの裏付けとなる。マラリア感染マウスでは、急速に進行するメトヘモグロビン血症により、低酸素症がさらに悪化して生存できなくなったものと推測する。もちろんこうした事実は、マラリアの病態へのメトヘモグロビン血症の関与が大きいことを示すものではないが、亜硝酸化合物、アセトアニリド、フェナセチン、スルフォンアミド類、リドカイン等のヘモグロビン酸化を促進する薬物がマラリア患者に重大なメトヘモグロビン血症を惹起する可能性も考えられる（Martin, 1969；Smith and Olson, 1973；Frayling *et al.*, 1990）。

生体内でのメトヘモグロビン血症誘発実験では、マラリア感染マウスと非感染対照マウスとで、誘発されるメトヘモグロビンの割合に差がみられなかったが、試験管内で血液に亜硝酸ナトリウムを加えた場合には、原虫接種5日後のマウス血液の方が容易にメトヘモグロビンが増加した。この結果は、感染マウスの血液ではヘモグロビンが酸化され易い状態にあることを意味する。しかし、生体内においては、感染の有無によって、誘発されるメトヘモグロビンの割合に差が認められず、感染マウスでは、非感染対照マウスに比して亜硝酸ナトリウム濃度が低くなっているものと推測する。一方、感染マウスでは

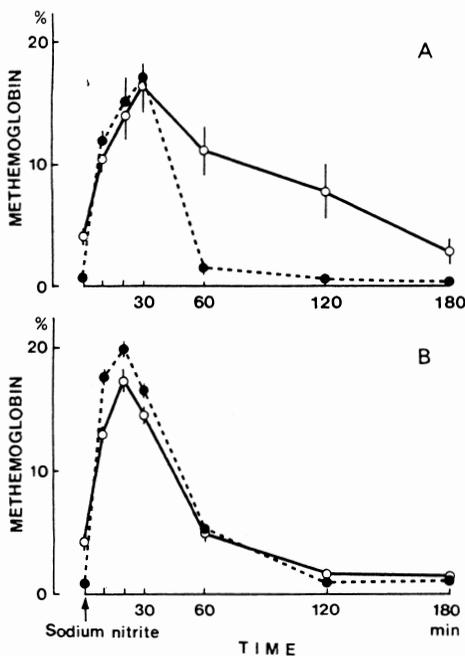


Fig. 2 Time course of sodium nitrite-induced methemoglobinemia *in vivo* (A) and *in vitro* (B). A: Sodium nitrite (50 mg/kg body weight) was intraperitoneally injected into infected (day 5 post infection) (●) and uninfected (○) mice. Vertical bars indicate means \pm SE of 6–7 mice each. B: Sodium nitrite was added to infected (●) (0.72 mM) and uninfected (○) (2.90 mM) mouse blood and incubated at 37°C.

メトヘモグロビンの減少が遅延した。感染マウス血液ではメトヘモグロビンの還元速度の遅延が認められなかったことから、感染マウスでは亜硝酸ナトリウムの代謝の遅れあるいはその他の理由によってメトヘモグロビンの減少が遅延していることが考えられる。なお、亜硝酸ナトリウム加血液のインキュベート前後で遠心ヘマトクリット値には減少が認められず、このことから赤血球NADH-ジアホラーゼ活性の低下にもかかわらず、メトヘモグロビンは赤血球内で還元されたことが分かる。寄生している原虫が栄養体、分裂体と発育するにつれて、メトヘモグロビン還元能が低下している可能性はあるが、そのような赤血球ではヘモグロビン量も減少しているため、血液全体としてみればメトヘモグロビンは順調に減少しているようにみえるのかもしれない。

これらの結果から、マラリア感染マウスでは亜硝酸ナトリウム投与に起因するメトヘモグロビン血症に対する耐性が低下し、メトヘモグロビンの致死濃度が低下したものと考える。こうした耐性の低下は、局所への血流減少等の、マラリア感染における貧血以外の病態に由来する低酸素症をさらに悪化することにより起こったものであり、メトヘモグロビン還元能の関与は少ないものと結論する。

References

- Benowitz, N.L. (1983): Nitrites and nitrates. In: Clinical management of poisoning and drug overdose. Haddad, L.M. and Winchester, J.F., eds., W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, Mexico city, Rio de Janeiro, Sydney, and Tokyo, 882-886.
- Bucklin, R. and Myint, M.K. (1960): Fatal methemoglobinemia due to well water nitrates. *Ann. Intern. Med.*, 52, 703-705.
- Darling, R.C. and Roughton, F.J.W. (1942): The effect of methemoglobinemia on the equilibrium between oxygen and hemoglobin. *Am. J. Physiol.*, 137, 56-68.
- Egashira, T., Kaneko, O., Sawada, J., Kim, G., Sadaoka, K. and Sho, S. (1973): Studies on monoamine oxidase (Report 23). Effect of NaNO_2 and NH_2OH on monoamine oxidase in rat brain and liver. *Folia Pharmacol. Japon.*, 69, 969-976.
- Frayling, I.M., Addison, G.M., Chatterjee, K. and Meakin, G. (1990): Methaemoglobinaemia in children treated with prilocaine-lignocaine cream. *Br. Med. J.*, 301, 153-154.
- Friedman, M.J., Roth, E.F., Nagel, R.L. and Trager, W. (1979): *Plasmodium falciparum*: Physiological interactions with the human sickle cell. *Exp. Parasitol.*, 47, 73-80.
- Hioki, A. and Ohtomo, H. (1986): Influence of methemoglobinemia on the blood oxygen supply in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Acta Sch. Med. Univ. Gifu*, 34, 1215-1222.
- International Committee for Standardization in Haematology (1978): Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977). *J. Clin. Pathol.*, 31, 139-143.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949): Simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 96, 99-113.
- Maegraith, B. and Fletcher, A. (1972): The pathogenesis of mammalian malaria. *Adv. Parasitol.*, 10, 49-75.
- Martin, E.W. (1969): United States compendium of drugs. *Lex et Scientia*, 6, 49-53.
- Miller, L.H., Fremont, H.N. and Luse, S.A. (1971): Deep vascular schizogony of *Plasmodium knowlesi* in *Macaca mulata*. Distribution in organs and ultrastructure of parasitized red cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20, 816-824.
- 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.
- Polder, T., Jerusalem, C. and Eling, W. (1983): Topographical distribution of the cerebral lesions in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Trop. Med. Parasitol.*, 34, 235-243.
- Scott, E.M. (1960): The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. *J. Clin. Invest.*, 39, 1176-1179.
- Smith, R.P. and Olson, M.V. (1973): Drug induced methemoglobinemia. *Semin. Hematol.*, 10, 253-268.
- Warrell, D.A. (1987): Pathophysiology of severe falciparum malaria in man. *Parasitol.*, 94, S53-S76.
- Wolff, I.A. and Wasserman, A.E. (1972): Nitrates, nitrites, and nitrosamines. *Science*, 177, 15-19.
- Yamada, K.A. and Sherman, I.W. (1979): *Plasmodium lophurae*: Composition and properties of hemozoin, the malarial pigment. *Exp. Parasitol.*, 48, 61-74.
- Yoeli, M. and Hargreaves, B.J. (1974): Brain capillary blockage produced by a virulent strain of rodent malaria. *Science*, 184, 572-573.
- Zwart, A., Buursma, A., van Kampen, E.J., Oeseburg, B., van der Ploeg, P.H.W. and Zijlstra, W. (1981): A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five hemoglobin derivatives. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 19, 457-463.

Abstract

**INFLUENCE OF ACUTE METHEMOGLOBINEMIA INDUCTION 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, 40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan.

Methemoglobin content in blood total hemoglobin increased concomitantly with the progress of the malarial infection in mice infected with *Plasmodium berghei*, and became fifteen times higher than that of uninfected control on day 6 post infection, the terminal stage of infection. Influence of additional acute methemoglobinemia induction by intraperitoneal injection of sodium nitrite on malarial host was examined. The LD₅₀ values of intraperitoneal sodium nitrite injection were 50 mg/kg body weight in 5 day post infected mice compared to 193 mg/kg in uninfected controls. Sodium nitrite-induced methemoglobin content at LD₅₀ doses were 16.5% and 76.2% in 5 day post infected and uninfected control mice, respectively. Pretreatment with subcutaneous methylene blue reduced peak methemoglobinemia and mortality of mice at LD₅₀ doses of sodium nitrite. The degree of sodium nitrite-induced methemoglobin production in infected mouse blood *in vitro* significantly increased. The rate of methemoglobin reduction in infected mice *in vivo* decreased. These data indicate that tolerance to additional acute methemoglobinemia induction in malarial mice was significantly decreased.