

マラリア予防 治療の効果判定に係る研究

分担研究者 奥 浩之 群馬大学工学部 助教授

研究要旨 本年度はマラリア感染者に於ける薬剤効果の判定に必要な材料の開発を目標とし、次の3点について研究を行った。(1) 薬剤耐性原虫の判別に有用なクロロキントランスポーター。(2) 急性期の病態を見分ける上で、検査効率の高い人工抗原ペプチドの形状。(3) 病態判定に有用な人工抗原の大量合成法。

A 研究目的

日本人海外渡航者による輸入マラリアのうち、臨床的に見られる症例の約90%が熱帯熱マラリア(Pf)と三日熱マラリア(Pv)である。これは1975年から1995年の21年間に都立駒込病院で診療されたマラリア症例159例(増田ら、1997)や、分担研究者木村らによる1999年4月から2003年5月までの届出のあった340症例の分析結果により明瞭に示されている。このうち1980年代からPfの症例が急激に増え、近年は輸入マラリア症例のうち46%を占めるまでになってきている。日本人にとってPfによる症例は、高度の緊急性をもつ急性疾患であり、早期診断と適切な処置が必要である。また世界に於ける薬剤耐性マラリアの拡散は極めて急速で、これに対応した予防薬 治療薬の選択は困難である。そこで本研究分担者は日本人症例に対する薬剤効果の判定に必要な材料の開発を目標とし、研究を行ってきた。

B 研究方法

今年度は以下の3点について研究を行った。(1) クロロキントランスポーター(PfCRT)による遺伝子診断法による薬剤耐性鑑別の妥当性。(2) 検査効率の高い人工抗原ペプチドの形状。(3) 薬剤効果判定用人工抗原の大量合成方

法。いずれもペプチド合成化学 構造化学の研究手法を用いている。

C 研究結果とD 考察

(1) クロロキントランスポーター

Pfに於けるクロロキンへの薬剤耐性の遺伝子診断には、PfCRTと呼ばれる膜蛋白質の部位突然変異が用いられる。この突然変異による薬剤耐性は分子論的なメカニズムとして証拠が示されたものではない。そこで、遺伝子診断へ分子論的な妥当性を与えるために、突然変異部位のアミノ酸配列を合成的に研究した。

耐性原虫に於けるPfCRTが消化胞からクロロキンをくみ出すと予想される部位のペプチド配列を化学的に3種類(CV1ET、SVMNT、CVMET)合成した。また感受性原虫の配列(CVMNK)についても同時に合成した。その結果、16残基合成配列のうちCV1ET SVMNT配列はクロロキンと相互作用していることが明らかになった。CVMET(耐性原虫)とCVMNK(感受性原虫)配列の2種はクロロキンと相互作用している証拠を得られなかった。特にCVMET配列は更に詳細な検討が必要である。

このように、耐性原虫に見られるPfCRTの突然変異部位はクロロキンと相互作用することで薬剤排出を行っている可能性が示唆された。従

って遺伝子診断による薬剤耐性原虫の判別には有用であると、分子メカニズムの観点から裏付けを得ることかできた。

#### (2) 検査効率の高い人工抗原の形状

人工抗原は従来、分岐した分子形状をもつヘフチドが多く用いられてきた。この分岐型形状はコンフォメーション安定化のために、抗体結合力が増すことを明らかにした。具体的には2分岐と4分岐の何れも診断材料として適当であった。

#### (3) 診断用人工抗原の大量合成方法

薬剤効果の判定に用いる、病態診断用人工抗原の大量合成を開始した。本年度は合成法の開発を行った。これは22残基または16残基のポリペプチドであり、純粋に数グラム(1-2万人分)得ることを目標としている。現在、フラグメントペプチドの合成が順調に進んでいる。今後はこれらの材料を実際に用いて検査デハイスを開発する。

### E 結論

本年度はマラリア感染者に於ける薬剤効果の判定に必要な材料の開発を目標とし3点の研究を行った。その結果、(1) PfCRTの突然変異は薬剤耐性原虫の判別に有用であることの分子メカニズムの観点からの裏付け (2) 急性期の病態を見分ける上で、分岐状人工抗原ペプチドは検査効率が高いこと、(3) 薬剤効果の判定に有用な人工抗原のについて大量合成方法を得ることかできた。

### I 健康危険情報

なし

### G 研究発表

#### 1 論文発表

(1) H. Oku, H. Suzuki, K. Yamada, and R. Katakai. Synthesis and Properties of Trans-Membrane Sequences from *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Protein (PfCRT). In *Peptide Science 2003*, M. Ueki, Ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2004, 367-370

(2) M. Noi, T. Ishiguro, H. Oku, K. Yamada, K. Sato, S. Kano, M. Suzuki, R. Katakai. Solution-phase Synthesis and Structural Analysis of Multiple Antigenic Peptides Having Partial Sequences of *Plasmodium falciparum* Enolase. In *Peptide Chemistry 2002*, T. Yamada, Ed., Protein Research Foundation, Osaka, 2003, pp. 309-312

(3) H. Oku, K. Yamada, R. Katakai. *cis*- and *trans*- Conformers at the Urethane Linkage *tert*-butoxy carbonyl-L-Alanyl-L-Proline Methyl Ester (Boc-L-Ala-L-Pro-OMe). *Acta Cryst.*, E59, o1130-o1132 (2003)

#### 2 学会発表

奥 浩之、鈴木 宏、山田圭一、片貝良一「熱帯熱マラリア原虫に由来するクロロキン耐性蛋白質 (PfCRT) の膜貫通部分ヘフチドの合成とその性質」第40回ペプチド討論会 木更津, 2003.10

### H 知的財産権の出願 登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金（新興 再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

マラリアの病態モデル、薬剤評価に関する研究

分担研究者 松本芳嗣 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授

研究要旨 我か国で優先されるべき独自のマラリア予防、診断 治療技術の開発のため、我が国においてこれら技術評価系の確立が重要である。我々は *in vivo* モデルを用い熱帯熱マラリア病態における重症化メカニズムの解析とその予防 治療に関する研究を行なっている。これは、殺原虫効果のみならず病態発現を抑制する新規薬剤の開発にも役立つと考えられる。

A 研究目的

ヒトのマラリアには 4 種あるか、なかでも熱帯熱マラリアは脳性マラリア等重篤な合併症を併発することが知られており、脳症状を現した場合は適切な処置がなされなければ致命的である。わか国で優先されるべき独自のマラリアに対する予防、診断および治療技術の開発を行なうためにはまず、これらの技術の評価系として特に *in vivo* 熱帯熱マラリア感染病態モデルが必要不可欠である。しかしながら、熱帯熱マラリア原虫は宿主特異性が強く、チンパンシーなど高等類人猿を除くとリスザル *Saimiri sciureus* 及びヨザル *Aotus trivirgatus* の 2 種の新世界ザルで実験感染が成立するにすぎない。このため、熱帯熱マラリアの病態形成機構については未だ不明な点が多く残されている。したがって、本研究では、まずリスザルを用いたマラリアの病態モデルの確立を目的とした。

B 研究方法

原虫は熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* Indochina-I/CDC 株、動物はポリヒア由来リスザルおよびガイアナ由来リスザルを用いた。感染赤血球のトナーとして摘脾したリスザルに原虫を感染させ 新鮮な感染血液を採取した。遠心分離にて血漿を除去、

さらに白血球除去フィルターを通して白血球を除去し、得られた感染赤血球  $2 \times 10^7$  個あるいは  $5 \times 10^9$  個を別のリスザル 8 頭に静脈内接種した。マラリア原虫接種後、24 時間おきに末梢血感染赤血球数率 (Parasitemia) をギムザ染色薄層塗抹標本により測定した。死亡時には剖検し、病理組織学的検査を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては患者由来の材料は用いない。尚、感染実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従い、東京大学農学部で現有のハイオハザード動物実験室 (P2) で行っている。

C 研究結果

$5 \times 10^9$  個の感染赤血球を接種した 4 頭のリスザルでは 接種翌日から末梢血中に感染赤血球が認められ、その後赤血球感染率は急激に上昇し、接種 8~12 日目には 25~51% に達した。感染赤血球の原虫発育ステーションの比率は 赤血球に侵入直後のステーションであるリング期が大半 (84.1~100%) を占めるようになった。すべてのサルで昏睡など重篤症状が見られ、感染 8~12 日目にかけて 3 頭は死亡した。脳および心筋の病理組織学的検索では重篤マラリアで死亡したヒトの病理組織像に一致した感染赤血球の血管内栓塞像 (sequestration) が観察され、また大脳

皮質では同しくヒトで認められるのと類似した輪状出血斑が観察された。一方、 $2 \times 10^7$  個の感染赤血球を接種したりスサルでは 接種 2 日目から末梢血中に感染赤血球が認められ、接種 14 日目に 10~25% に達し、その後耐過した。

#### D 考察

感染赤血球の接種に際してドナーザルからの新鮮血を用いることにより、培養ヒト感染赤血球の接種あるいは凍結保存されていた感染リスザル血液を融解し接種する方法より接種量に比例した再現性ある結果が得られた。接種感染赤血球数を多くすることにより昏睡を来す重症マラリアを発症させることかてき、病理組織学的所見からも、ヒトにおける重症マラリアのモデルに成り得ると考えられる。一方、接種感染赤血球数を少なくすることにより耐過(免疫獲得)モデルとして用いることが可能であった。

#### E 結論

マラリアの治療、予防、診断技術の評価が可能となり さらにマラリアの病態解析にこれらリスザル感染モデルを用いることにより、我が国におけるマラリア感染予防に大きく貢献すると考えられる。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

(1) Aki Morisawa, Emiko Hatori, Sukmawati Basuki, Nana Arakaki, Haruki Otsuka, Yoshitsugu Matsumoto and Yasunobu Matsumoto. Identification of a dominant and cytoadherent *var* gene expressed in *Plasmodium falciparum* ItG parasites. The Journal for Protozoology Research 2004 (In press)

(2) 松本芳嗣、三條場千寿、 沙漠緑地化に伴う新たな感染症の流行、沙漠雑誌 3 巻 201-208 2003 年

##### 2 学会発表

(1) 新垣奈々、Sukmawati Basuki、後藤康之、八重樫順子、佐伯圭一、小野寺節、相川正道、松本芳嗣(東大 院農 応用免疫) *Plasmodium berghei* ANKA 株感染モデルの急性脾腫における MRP8 および MRP14 陽性マクロファージの関与、第 73 回日本寄生虫学会大会、2004 年 4 月 3~4 日、群馬

(2) 新垣奈々、Sukmawati Basuki、八重樫順子、佐伯圭一、小野寺節、松本芳嗣(東大 院農 応用免疫) 急性マラリア脾腫におけるマクロファージ遊走阻止因子関連蛋白 MRP8/14 陽性マクロファージの増加、日米医学寄生虫疾患専門部会、2004 年 1 月 24 日、東京

(3) 新垣奈々、Sukmawati Basuki、岡本真明、佐伯圭一、小野寺節、相川正道、松本芳嗣(東大 院農 応用免疫) 急性脾腫を呈するマラリア原虫感染マウスの赤脾髄でみられたマクロファージ/RES 系細胞の増殖、第 63 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2003 年 10 月 4 日 横浜

(4) 新垣奈々<sup>1</sup>、片貝祐子<sup>1</sup>、服部正策<sup>2</sup>、佐伯圭一<sup>1</sup>、小野寺節<sup>1</sup>、相川正道<sup>1</sup>、松本芳嗣<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東大 院農 応用免疫 <sup>2</sup>東大 医科研 奄美病害動物研究施設) *Plasmodium falciparum* 感染リスザルの脾臓内にみられたマラリアピグメントの蓄積、第 72 回日本寄生虫学会大会、2003 年 3 月 28~30 日、久留米

#### H 知的財産の出願 登録状況

##### 1 特許取得

なし

##### 2 実用新案登録

なし

##### 3 その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興 再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

マラリア媒介蚊の分布及び吸血行動に関する研究

分担研究者 高木正洋 長崎大学熱帯医学研究所 教授

研究要旨 温暖化の進行に伴う熱帯性感染症媒介蚊の我が国への分布拡大が懸念されていることに鑑み、アジアの主要なマラリア媒介蚊である *Anopheles dirus*, *An. minimus*, *An. stephensi* について、気温と幼虫発育速度の関係を吟味し発育零点の推定を行った。現実的な評価を得るべく実験は恒温 恒湿下の室内ではなく、あえて長崎市の屋外自然条件下で実施した。3種とも4月から10月の気温条件下（長崎市）では発育を完了し成虫が羽化することか確かめられた。3種の発育零点は各々摂氏9-4度（*An. dirus*）、9-3度（*An. stephensi*）、5-7度（*An. minimus*）であった。長崎市では平均気温が10度以下の日か冬季の78%、5度以下の日も36%を占める。このことから現状で供試した3種のマラリア媒介蚊が長崎とその近隣に定着する可能性はほぼ否定された。但し、国内でも石垣島では厳寒期も10度以下になることかないので温度条件だけからみれば3種の定着は十分に可能で、現実に *An. minimus* は普通種として定着している。

A 研究目的

地球温暖化の進行は事実であり、それが熱帯性疾病媒介蚊の北上を伴えば、当然ながらマラリアなど蚊媒介性感染症の北への分布拡大も懸念されるわけで、疾病媒介蚊の温度反応は実証的に吟味されなければならない。この研究では、自然温度条件下でアジアの主要マラリア媒介蚊3種を飼育し続け、発育の経過を観察し、これらの蚊の日本への定着リスクを評価することを目指した。

B 研究方法

暴露実験 長崎大学熱帯医学研究所の恒温 恒湿蚊飼育室にて孵化後2-4時間以内の *Anopheles dirus*, *An. minimus*,

*An. stephensi* 1令幼虫各々50匹を、100mlの水と共に直径9cm、深さ5cmのカラス容器に入れ、屋外の温湿度条件下に暴露して飼育した。野外条件への暴露実験は4月から10月まで約1ヶ月ごとに7回実施した。暴露された幼虫の発育状態と生存数を、すべての個体が成虫になるかあるいは死するまで、毎日記録した。蛹化した個体はフィルムケースに入れ、成虫が羽化するまで同じ野外条件下で飼育した。成虫羽化後 蛹殻を回収して体サイズを測定した。また、暴露実験期間中の最低 最高気温を毎日記録し これらから暴露期間中の平均気温を求めて分析に用いた。

回帰分析 幼虫の発育日数を  $t$ 、調査期

間中の平均気温を  $T$ 、発育零点を  $c$  とすると、昆虫類の発育日数と気温条件の間には次のような関係が成り立つ。

$$1/t = (T - c) / k$$

ここで、 $k$  は発育を完了するのに必要とされる有効積算温量である。 $t$  および  $T$  を暴露実験結果から求め、上式に基づいた回帰分析を行って、発育零点  $c$  を推定した。

(倫理面への配慮)

屋外自然条件下での飼育は幼虫期間のみで、拡散の可能性のある成虫は一匹も発生していない。人および周辺環境への影響は全くないと考えて良い。

#### C 研究結果

3種とも4月から10月の気温条件下(長崎市)では、高い生存率で正常に発育を完了し、成虫が羽化することを確認された。実験に用いた3種類のハマダラカ全てで、はっきりした発育日数の温度依存的変化が観察された。即ち、発育日数の逆数を求め、これと暴露期間中の平均気温の関係を、回帰分析したところ、*Anopheles minimus* の雄を除き、統計的に有意な直線関係が得られた。回帰係数とY切片から、発育零点を推定した。発育零点は、*Anopheles dirus* 雌=9.43℃、雄=9.06℃、*Anopheles stephensi* 雌=9.33℃、雄=9.70℃であった。これに対して *An. minimus* 雌の発育零点は5.66℃とやや低い推定値であった。

#### D 考察

長崎市では1-2月の平均気温が10度以下の日か冬季の78%、5度以下の日も36%を占める(1964年から1990年の平均値)。このことから現状

で供試した3種のマラリア媒介蚊が、長崎とその近隣に、現時点で年間を通して定着する可能性はほぼ否定された。但し、国内でも石垣島では厳寒期も10度以下になる日は1-5%に過ぎない(1968年から1990年の平均値)。このことから石垣島では、温度条件だけからみれば3種の定着は十分に可能である。現実に3種の内 *An. minimus* は普通種として定着している。

#### E 結論

冬季の平均気温と、供試した3種のアシアにおける主要マラリア媒介蚊の発育零点の比較から、*Anopheles dirus* と *An. stephensi* の日本における定着は、今のところ否定された。但し、発育零点の低い *An. minimus* は、やや北方にまで分布する可能性がある点留意しておく必要がある。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

(1) Hu, X, M. Tsuda Y and Takagi, M. Survival and development of larvae of three tropical malaria vectors (Diptera: Culicidae) under a seasonally changing temperature condition in Nagasaki, Japan. Med. Entomol. Zool., 54(4): 371-379 (2003)

##### 2 学会発表

なし

#### H 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Oku H, Suzuki H, Yamada K, Katakai R	Synthesis and Properties of Trans-Membrane Sequences from <i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter Protein (PfCRT)	Ueki M	Peptide Science 2003	The Japanese Peptide Society	Osaka	2004	367-370
Noi M, Ishiguro T, Oku H, Yamada K, Sato K, Kano S, Suzuki M, Katakai R	Solution-phase Synthesis and Structural Analysis of Multiple Antigenic Peptides Having Partial Sequences of <i>Plasmodium falciparum</i> Enolase	Yamada T	Peptide Chemistry 2002	Protein Research Foundation	Osaka	2003	309-312

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kano S, Kimura K	Trends in malaria cases in Japan	Acta Tropica	89(3)	271-278	2004
Mizuno Y, Kawazu S, Kano S, Watanabe N, Matsuura T, Ohtomo H	In-vitro uptake of vitamin A by <i>Plasmodium falciparum</i>	Annals Trop Med Parasitol	97(3)	237-243	2003
Krudsood S, Chalermrut K, Pengruksa C, Srivilarit S, Silachamroon U, Treeprasertsuk S, Kano S, Brittenham GM, Looareesuwan S	Comparative clinical trial of two-fixed combinations dihydroartemisinin-naphthoquine trimethoprim and artemether-lumefantrine (Coartem/Riamet) in the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria in Thailand	Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth	34(2)	316-321	2003
Hatabu T, Kawazu S, Suzuki J, Valenzuela RF, Villacorte EA, Rivera PT, Kano S	<i>In vitro</i> susceptibility of <i>Plasmodium falciparum</i> isolates to chloroquine and mefloquine in southeastern Mindanao Island the Philippines	Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth	34(3)	546-551	2003
狩野繁之、増田剛太	マラリア	病理と臨床	21(増)	208-214	2003
狩野繁之	マラリア 新世紀の感染症学 (上) -ゲノム グローバル時代の感染症アップデート	日本臨床	61(増2)	598-602	2003
狩野繁之	薬剤耐性マラリア 新世紀の感染症学 (下) -ゲノム グローバル時代の感染症アップデート	日本臨床	61(増3)	214-220	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi J (建野班研究協力者), Phompida S, Toma T, Looareesuwan S, Toma H, Miyagi I	The effectiveness of impregnated bed net in malaria control in Laos	Acta Tropica	89(3)	299-308	2004
Toma T, Kobayashi J (建野班研究協力者), Inada Y, Arakawa T, Nakajima Y, Laymanivong S, Vannachone B, Manivong K, Phompida S, Sato Y	Field application and evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of <i>Plasmodium falciparum</i> infection among the inhabitants of Lao PDR	Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth	34(1)	43-47	2003
木村幹男 名和行文	寄生虫症の治療3 稀用薬の保 管体制の進歩	治療学	37	621-626	2003
木村幹男 重松美加	旅行者感染症に関する情報の 入手	医学のあゆみ	206	434-438	2003
木村幹男, 金恵淑 編 矢有佑	話題の抗微生物薬をめぐっ て 4 抗原虫薬 マラリア	臨床と微生物	30	621-630	2003
Kimura M, Suzuki A, Matsumoto Y, Nakajima K, Wataya Y, Ohtomo H	Epidemiological and clinical aspects of malaria in Japan	J Travel Med	10	122-127	2003
Osa Y, Kobayashi S, Sato Y, Suzuki Y, Takino K, Takeuchi F, Miyata Y, Sakaguchi M, Takayanagi H	Structural Properties of Dibenzosuberanylpiperazine Derivatives for Efficient Reversal of Chloroquine Resistance in <i>Plasmodium</i> <i>chabaudi</i>	J Med Chem	46	1948-1956	2003
Miyata Y, Osa Y, Sato Y, Takino K, Kobayashi S, Takeuchi F, Takayanagi H	Crystal Structure of 1-[4- (2,2-Diphenylacetyl) piperazine-1-yl]-3-buten- 2-ol	Analytical Sciences	20	in press	2004
Hu XM, Tsuda Y, Takagi M	Survival and development of larvae of three tropical malaria vectors (Diptera: Culicidae) under a seasonally changing temperature condition in Nagasaki, Japan	Med Entomol Zool	54(4)	371-379	2003
Koibuchi T, Nakamura T, Miura T, Endo T, Nakamura H, Takahashi T, Kim HS, Wataya Y, Washizaki K, Yoshikawa K, Iwanoto A	Acute disseminated encephalomyelitis following <i>Plasmodium vivax</i> malaria	J Infect Chemother	9	254-256	2003
Morisawa A, Hatori E, Basuki S, Arakaki N, Otsuka H, Matsumoto Yoshi, Matsumoto Yasu	Identification of a dominant and cytoadherent <i>var</i> gene expressed in <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> ItG parasites	J Protozoology Res		in press	2004
松本芳嗣, 三條場千寿	沙漠緑地化に伴う新たな感染 症の流行	沙漠雑誌	3	201-208	2003
Oku H, Yamada K, Katakei R	<i>cis</i> - and <i>trans</i> - Conformers at the Urethane Linkage <i>tert</i> - butoxycarbonyl-L-Alanyl- L-Proline Methyl Ester (Boc-L-Ala-L-Pro-OMe)	Acta Cryst	E59	1130-1132	2003
大友弘士 吉川晃司	理解して実践する感染症診 療 投薬カイト、マラリア	総合臨床	52(増)	1176-1182	2003
大友弘士、水野泰孝 吉川晃司	輸血関連感染症検査 2 マラリア	Medical Technology	31	1427-1432	2003



20030536

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。