

症群に比べ有意に高かった。重症群の平均血小板数は  $56.5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 、平均血清総蛋白値は 6.1 g/dl、血清ナトリウム値は 132.5 mmol/l で、非重症群に比べ有意に低かった。平均 Hb 値、平均血糖値は、両群間で有意差はみられなかった。

#### 5. 転帰

重症群の平均入院期間は 41.5 日で非重症群 10.0 日に比べ有意に長かった。両群ともに全例軽快し、死亡例や再燃例は認められなかった。

#### D. 考察

日本人熱帯熱マラリア患者の重症化要因として発症後の受診の遅れが示唆された。

重症群と非重症群の間に有意差を認めた入院時臨床症状、検査所見の項目の中で痙攣、意識障害、高原虫血症、高ビリルビン血症（黄疸）は、本研究で重症マラリアの定義として用いた WHO 重症マラリア基準（1990 年）の項目である。WHO は下痢、血小板減少症、中等度の AST 上昇、低ナトリウム血症を、重症熱帯熱マラリアにおける臨床的特徴と位置づけている (Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 84(Suppl.2) : 1-65, 1990)。下痢は本研究で重症群の半数以上に認められており、日本人重症熱帯熱マラリア患者で高率に認められる臨床的特徴として考えられた。一方、貧血、低血糖、高体温は WHO 重症マラリア基準（1990 年）にあげられているが、Hb 値、血糖値、体温は両群間に差を認めず、日本人重症熱帯熱マラリア患者において必ずしも特徴的な所見ではなかった。

#### E. 結論

日本人重症熱帯熱マラリア患者は日本人の合併症のない熱帯熱マラリア患者と比較したとき、WHO 重症マラリア基準の項目では痙攣、意識障害を高率に認め、末梢血原虫寄生率、血清ビリルビン値が高値であった。下痢、血小板数減少、血清総蛋白値低下、AST 値上昇、LDH 値

上昇、血清ナトリウム値低下は WHO 重症マラリア基準にあげられていないが、日本人重症熱帯熱マラリア患者に特徴的な所見であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 吉川晃司、大友弘士ほか：熱帯熱マラリアに対するアトバコン/プログアニル合剤（マラロン®）の使用経験。日本臨床寄生虫学会雑誌 15 : 84-86、2004

##### 2. 学会発表

- 1) 吉川晃司：旅行者感染症の現状と対応、臨床現場における対応。第 19 回日本環境感染学会総会シンポジウム（2004 年 2 月、東京）
- 2) 吉川晃司、大友弘士ほか：合併症のない日本人熱帯熱マラリア患者に対するアトバコン/プログアニル合剤とアーテスネート・メフロキン併用療法の治療成績。第 78 回日本感染症学会総会（2004 年 4 月、東京）
- 3) 吉川晃司、大友弘士ほか：熱帯熱マラリアに対するアトバコン/プログアニル合剤（マラロン®）の使用経験。第 15 回日本臨床寄生虫学会総会（2004 年 6 月、東京）
- 4) 吉川晃司、大友弘士ほか：日本人重症熱帯熱マラリア患者の臨床的特徴。第 53 回日本感染症学会東日本地方会総会（2004 年 10 月、新潟）
- 5) 大友弘士、吉川晃司、吉田正樹：過去 3 年間に慈恵医大に入院したマラリア患者の治療状況。第 52 回日本化学療法学会総会（2004 年 6 月、沖縄）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

国外におけるマラリア流行調査

分担研究者 建野正毅 国立国際医療センター国際医療協力局 課長  
研究協力者 小林 潤 国立国際医療センター国際医療協力局 技官

研究要旨 初年度は、メコン圏のマラリア感染と対策の現状を報告したが、次年度は対策の戦略の見直しが必要と考えられたため追加報告を行う。さらに邦人が受けられる可能性のある治療について初年度は基本的解析をおこなったが、今年度は具体的に考慮すべき点を見出したので報告する。

1. メコン圏諸国のマラリア流行状況についての推移

A. 研究目的

初年度は、1990年代後半からはじまったメコン Roll Back Malaria Initiative にもとづく対策の成果を中心に報告した。今年度は流行地域のフォローアップをすることによって、同地域の疫学特性を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

本年度もタイ国で進行中の国際寄生虫対策アジアセンタープロジェクト（ACIPAC Project）をベースとして、周辺国であるラオス・カンボジアに焦点を当てて疫学解析を行った。

特に介入研究として、ヘルスプロモーションの途上国マラリア対策への応用が極めて有用であると提言し、マスコミや祭りを利用したキャンペーン活動の利用による情報のコミュニティーへ提供を推進した。すなわち、住民のマラリア対策へ向けたムーブメントをつくりだし、より継続性の高い対策としていくことを目論んだ。

さらに学校保健を切り口とした活動も、ヘルスプロモーションの一戦略としてマラリア対策に有効であることの実証を試みた。具体的には、学校という場の公共的利用を推進して対策を進める一方、学童をヘルスメッセージャーとしてコミュニティーへの情報の伝達をはかり、さらには行動変容に結びつける BCC（Behavior Change Communication）アプローチの導入を図った。これらのアプローチはタイを中心に始めたが、現在ではカンボジア、ラオスで試行されるにいたり、来年度はその展開も調査する予定である。

（倫理面への配慮）本研究は特定の人グループを対象としていないので、倫理的問題は生じない。

C. D. 研究結果と考察

研究グループが定期的にフォローしているラオス国カムアン県の高マラリア侵淫地域では 1990年代後半から 2001 年まで試行されたマラリア対策が著効したため、患者数が半減するまで流行はおさえこまれた。しかしながら、患者数の増加もみられ近年ぶり返しがおきていると考えられる。これは大規模な殺虫剤浸透蚊帳（Insecticide Treatment Materials: ITM の一つ）を中心とした対策が PHC（Primary Health Care）を基本コンポーネントとしたマラリア対策に息切れがでたためと考えられる。

マラリア対策はワクチンのような極めて有効な対策のツールがないために、PHC の一つの活動として総合的に対策を行うことが推奨されてきた。実際の PHC を広範囲に行う基本戦略は、TOT（Training of Trainer）を中心とした村落ヘルスポランテニアの養成が行われることが多い。これは、もちろん公的機関スタッフによる対策の試行の限界からコスト削減を考慮した戦略ではあったが、ドナーからの支援等がとだえると、ラオスやカンボジアなど経済基盤がいまだに弱い国では維持ができなくなるといえる。

カンボジアでは、ソーシャルマーケティングが戦略としていち早くとりいられてきた。これは ITM の一つとして、殺虫剤によって処理されたハンモックの森林労働者への普及のために行われた。また、早期診断と治療を目的とした簡易診断キットと治療薬の販売普及促進である。これらはテレビ、ラジオ等のマスコミの利用、ポスター等の従来の IEC 活動、また関係者間での直接のコミュニケーション強化によって情報の伝達をはかっていくことと市場開拓を基本とした活動である。その効果について 2002-3 年には報告がなされ普及が確

認された。しかしながらその後のフォローは行われていない現状がある。

ラオスにおいては、従来の殺虫剤浸透蚊帳についての再浸透についてソーシャルマーケティング導入がおこなわれたが効果について評価はされていない。ソーシャルマーケティングはアジアではHIV対策の一環としてコンドームの普及に大きな成果をあげてきたが、マラリア対策でもプライベートセクターの巻き込みによる継続性にある戦略としてフォローをしていく必要があるだろう。

また簡易診断キットと治療薬の販売普及については、カンボジアでは現在のマラリア治療の最終選択薬であるメフロキンとアーテスネートの混合治療を、医療従事者の指示なく一般市場で普及させている。これについてはやみくもに薬剤体制マラリアの出現を助長させているという意見もあり十分にモニターしなければならない一面ももっている。

## 2. 邦人海外渡航者が受けられるマラリアに対する医療事情の解析

### A. 研究目的

昨年度はマラリア診断については各国のレベルの向上が確認できたため、邦人についても速やかに各国の医療機関で早期診断治療することを勧め、無謀な自己診断をさけるように推奨した。しかしながら重症におちいった治療については、いまだ十分な体制が各国とられていないことが明らかになったので、本年度も引き続き、海外渡航者が受けられる医療体制について解析を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

特に、またアーテスネートを中心に偽薬剤がメコン地域では深刻な問題となっており、これについて現状調査をおこなった。

### C. 研究結果

Newtonらの調査(1999-2000年)によると、メコン圏5カ国の市場の38%のアーテスネートは偽薬剤であったと報告されている。また2003年にはカンボジアでキニンとテトラサイクリンの合財の偽薬剤がみついている。2002年よりWHOが中心にメコン圏5カ国で36箇所のセンチネルサイトを設定しモニターを開始した。またUSAIDの支援によって各国独自で薬剤のモニタ

ーを行えるよう機材供与と技術支援が開始された。又各国の法整備なども検討されているが、偽薬剤の広まりは現在も深刻な状態がつづいている。近年、アーテスネートを製造している中国の製薬会社が市場価格を下げて、偽薬剤の広がりを食い止めると表明され期待がもたれている。

### D. 考察

以上のような状況が明らかになったため、やみくもな自己診断と治療はさけるべきであるとあらためて示唆される。しかしながら診断レベルは格段に改善されているため、発熱などのマラリア疑いの症状ができれば速やかに医療機関にて診断をして、マラリア感染が確認されれば、各国の首都の国立医療機関にアクセスすることが最低限考慮されたい。またラオス、カンボジア、ミャンマー等であれば可能な範囲でタイの推奨されている医療機関での治療を考慮していくことが必要と考えられた。

しかしながら脳性マラリアなどの重症マラリアの場合は、むやみな患者の搬送を考えるより抗マラリア剤の早急な投与が重要と考えなければならないことも忘れてはならない。状況に応じた判断が関係者間で必要と考えられた。

### E. 研究発表

#### 1. 論文・著書発表

- 1) Thongthien P *et al.*: Malaria; Manual for Arrangement of Learning Activities Primary School Grade 4-6. OBEC, Ministry of Education and ACIPAC, Mahidol University, Thailand, 2003 (ISBN 974-91575-2-4)
- 2) Thongthien P *et al.*: Malaria; Additional Textbook for Primary School Students. OBEC, Ministry of Education and ACIPAC, Mahidol University, Thailand, 2003 (ISBN 974-91662-5-6)
- 3) Kobayashi J *et al.*: The effectiveness of impregnated bed net in malaria control in Laos. *Acta Trop* 89(3), 299-308, 2004

#### 2. 学会発表

- 1) 岡林広哲、Pimpimon Thongthien, Pratap Singhasivanon, 塚本勝之、小林潤、狩野繁之、小島莊明、竹内勤: タイ国ミャンマー国境における小学校でのマラリア予防教育の効果、第19回日本国際保健医療学会総会、2004

薬剤耐性マラリアの疫学・治療学研究

分担研究者 狩野繁之 国立国際医療センター研究所 部長

研究要旨 現在わが国のマラリア臨床研究・社会医学的研究は、渡航者の国内や海外でのマラリア発症例の増加をくい止める成果をあげられていない。薬剤耐性マラリアの疫学を正確に把握し、その迅速な診断、治療、そして予防にかかわる医療サービスの向上をめざした社会技術開発研究の充実が必要である。当該分担研究では、国内における患者管理の臨床研究、アジアの流行地におけるマラリア治療戦略研究の集積、学会における情報収集、エビデンスに立脚した薬剤耐性のゲノム疫学研究を合わせて展開し、国民や医療従事者に「適切な薬剤へのアクセスルート」の情報を提供しようと試みた。本年度は「マラリア予防ガイドライン」の作成という成果が得られたが、今後とも正確な疫学とマラリア治療法に関する徹底した情報収集を行い、その情報を基盤とした治療ガイドラインの作製を行うことが必要となる。

A. 研究目的

近年のわが国の海外渡航者の増加、世界における薬剤耐性マラリアを代表とする流行の再興、さらには国内における熱帯病に関する医療の質の低下が相俟って、わが国における現在のマラリア臨床研究・社会医学的研究は、渡航者の国内や海外でのマラリア発症例の増加をくい止める成果をあげられていない。すなわち今国際化の波の中を進むわが国で、マラリアの防疫上最も重要なことは、薬剤耐性マラリアの疫学を正確に把握し、その迅速な診断、治療、そして予防にかかわる医療サービスの向上をめざした社会技術開発研究の充実である。当該分担研究の目的は、国民や医療従事者に「適切な薬剤へのアクセスルート」の十分な情報を提供するために、世界のマラリア流行地における治療状況、欧米諸国の旅行医学的視点からみたマラリア対策情報など、正確な疫学とマラリア治療法に関する徹底した情報収集を行い、その情報を基盤としたガイドラインの作製を行うことである。

B. 研究方法

- 1) 国立国際医療センターの病院を訪れるすべてのマラリア患者の診断・治療に関する臨床データを集積した。
- 2) 薬剤耐性マラリアの流行に関する疫学研究は、アジアにおける流行フォーカスがあるタイ（マヒドン大学熱帯病病院）を中心に調査・解析を行った（同地域における薬剤耐性マラリアの治療実績は世界で最高レベルが維持されている）。
- 3) アジアにおける旅行医学的なマラリアの治療実績に関しては、アジア旅行医学会のネットワークを利用し、国際学会に参加するなどして収集した。
- 4) さらに、分担研究者の研究部に集積されている流行地患者検体を用いて、その分子疫学的なエビデンスにより、薬剤耐性のダイナミズムの解析を行なった。

（倫理面への配慮）

研究全般を通しては、原則的にはヘルシンキ宣言における臨床研究の基準を遵守する。

臨床検体を利用した研究をおこなうので、患者に対する事前の十分なインフォームドコンセントを書面で取るとはもちろんのこと、必要に応じて、分担研究者が所属する研究機関の「倫理委員会」の承認を得る。また、外国における臨床研究や検体の採取にあたっては、同様にカウンターパートとなる病院や研究機関の倫理委員会等の承諾を得た後に行う。

疫学研究に関わるので、わが国の文部科学省並びに厚生労働省が共同で作製した「疫学研究に関する倫理指針（平成14年6月17日）」に従い、流行地における疫学調査研究にも同様にあてはめる。それぞれの国・地域における対象となる住民や患者の不利益になることの無いよう最大限の配慮をおこなうことは当然である。なお、マラリア患者からのアンケート調査をとる必要性が生じた場合には、原則として匿名化とする予定である。しかしながら現在のところ介入研究を行う計画はなく、観察研究を中心とした疫学研究を行う予定であり、また患者の遺伝学的な背景に関する研究も行わない予定であるので、研究対象者に対する不利益や危険性を伴うような状況は想定されず、よって倫理面での問題が起きる可能性は少ないと判断される。

### C. 研究結果

1) 平成15年度本研究事業を開始するにあたり、過去5年間のすべてのマラリア症例38例の統計解析を行い、年齢分布、季節分布、地理分布にとどまらず、治療法やその転帰を整理したが、現在新たな症例も含めてまとめて本研究事業の成果としている。本成果の一部は、アジア旅行医学会で発表した。

2) アジア地域の薬剤耐性情報の収集を重ね、その感染防御の必要性和有効な治療法の検討を行い、具体的な治療指針をフローチャート化している。特に、薬剤耐性マラリア及び重症マラリアの治療法としては、現在 ACT: artemisinin-based combination therapy の有用性が強調されており、その基礎的な臨床研究成果を報告した。

3) マラリアの感染予防及び治療に関する研究は、いまや旅行医学の領域でその研究が大いに進展しており、アジアにおける個別のマラリアの流行状況や、各国におけるマラリアに関する医療体制に係る情報を入手するために、2年に1度開催される同学会は絶好の機会であった。

4) TaqMan リアルタイム PCR 法を用いて、熱帯熱マラリア原虫のクロロキン耐性に強く相関すると考えられている耐性関連点変異遺伝子 *pfcr* を指標として、同一サンプル中に混在する感受性型/耐性型の比率を検出するアッセイシステムの構築を行った。*pfcr* は、野生型の遺伝子は感受性型であるが、SNP により 76 番アミノ酸のリジンがスレオニンに変異すると耐性型 (K76T) の表現型を示すと考えられているが、両型の原虫の混合比をリアルタイム PCR の測定値から推定することが可能であった。本報告はクアラルンプールで開催されたアジア旅行医学会で報告した。

### D. 考察

1) 国立国際医療センターで治療にあたった患者は、すべて治癒にいたって予後も良好であった。しかしながら、紹介の遅れにより重症化した例もあり、わが国における承認治療薬であるメフロキンやファンシダールでは治療しきれない症例もあった。ACT で完快したが、今後 artemisinin derivatives のわが国での臨床応用の必要性が強く認識された。

2) ついに WHO も、アジアでの薬剤耐性マラリアは ACT を中心に行うしかないと宣言しているが、その治療にかかる薬剤の投与法はまだ十分に確立していない現状にある。それどころか偽薬 (Counterfeit drugs) の流通が問題化され出し、今後これらの情報を十分に取って行く必要性がある。

3) アジア旅行医学会に参加し、わが国における最先端のマラリア診断法にかかる研究成果や、わが国の輸入マラリアに関する実態を発表し、参加者と討議を行うことができた。これらの発表や討議を通して、わが国における「マラリアの予防が

イドライン」作成にむけて、アジアのスタンダードの知見を得るために大きな成果が得られたと考えられる。

4) TaqMan リアルタイム PCR 法は、薬剤耐性マラリアのマーカ―を指標として、その感染率、genotype を定量的に示してくれるので、本法を疫学的な調査で応用して行けば、薬剤耐性マラリアの疫学に関わる有用な情報を得られるものと考えられる。今後とも本手法の応用研究を継続して行きたい。

#### E. 結論

国内における患者管理の臨床研究、アジアの流行地におけるマラリア治療戦略研究の集積、学会における情報収集、エビデンスに立脚した薬剤耐性のゲノム疫学研究を合わせて展開することで、今後 ACT を大いに活用して行くべき治療体制の確立が急がれることが認識された。本年度は「マラリア予防ガイドライン」の作成が叶ったが、いよいよ来年度は「治療ガイドライン」の作成に取り掛かるべき研究の遂行を行う。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

- 1) Shigeyuki Kano, Mikio Kimura: Review -Trends in malaria cases in Japan, *Acta Tropica*, 89(3), 271-278, 2004
- 2) Nao Taguchi, Toshimitsu Hatabu, Haruyasu Yamaguchi, Mamoru Suzuki, Kumiko Sato and Shigeyuki Kano: *Plasmodium falciparum*: Selenium-induced cytotoxicity to *Plasmodium falciparum*, *Experimental Parasitology*, 106, 50-55, 2004
- 3) K Na-Bangchang, S Krudsood, U Silachamroon, P Molunto, O Tasanor, K Chalermrut, N Tangpukdee, O Matangkasombut, S Kano and S Looareesuwan: The pharmacokinetics of

oral dihydroartemisinin and artesunate in healthy Thai volunteers, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(3), 575-582, 2004

- 4) Yuko Katakai, Rachatawan Chiabchalard, Kanako Komaki-Yasuda, Shin-ichiro Kawazu, Pratap Singhasivanon, Srivicha Krudsood, Sornchai Looareesuwan and Shigeyuki Kano: Application of real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis for detection and discrimination of malaria parasite species in Thai patients, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35 (supple 2), 10-14, 2004
- 5) Toshimitsu Hatabu, Shin-ichiro Kawazu, Somei Kojima, Pratap Singhasivanon, Srivicha Krudsood, Sornchai Looareesuwan and Shigeyuki Kano: A pilot field trial of an *in vitro* drug susceptibility test using the AnaeroPack malaria culture system on the Thai-Myanmar border, *Tropical Medicine and Health*, 32(4), 335-337, 2004
- 6) 畑生俊光, 田口直, M. Kaiissar Mannoor, 渡辺久実, 當眞弘, 狩野繁之: 野外調査地における熱帯熱マラリア *in vitro* 薬剤感受性試験の応用ーラオス人民民主共和国におけるマラリア疫学調査一、熱帯、221-225, 2004
- 7) 田沼順子, 大塚一美, 井上康子, 鳴戸弘, 岡慎一, 木村哲, 狩野繁之: シンポジウム「わが国の海外政策と臨床寄生虫学」青年海外協力隊における寄生虫感染対策、*Clinical Parasitology*, 15(1), 16-18, 2004
- 8) 狩野繁之: マラリアの現状と予防・治療法、日本医事新報、第4166号、109-111, 2004
- 9) 木村幹男, 狩野繁之: 輸入マラリアの現状と治療・予防、感染症、34(2), 29-39, 2004
- 10) 木村幹男, 狩野繁之: 輸入感染症、治療、86(増刊号)、506-508, 2004
- 11) 狩野繁之: 薬剤耐性マラリアの分子メカニズムと疫学、医学のあゆみー特集: 抗菌薬 UPDATE、209(9)、564-568, 2004
- 12) 狩野繁之: マラリア、図説感染症シリーズ、

- 医療、58(7), 431-433, 2004
- 13) 狩野繁之、木村幹男：マラリアの輸入は続く、保健の科学、46(8), 574-578, 2004
2. 学会発表
- 1) 片貝祐子、Rachatawan Chiabchalard、駒木—安田加奈子、Sornchai Looareesuwan、河津信一郎、狩野繁之：リアルタイム PCR を利用したマラリア原虫各種有用遺伝子検出システムの開発、第73回日本寄生虫学会大会、群馬県民会館、2004.4.3~4.
- 2) Tanuma J, Genka I, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Kimura S, Oka S, Kano S: A retrospective study of malaria infections in International Medical Center of Japan, 5th Asia Pacific Travel Health Conference, Sunway Lagoon Resort Hotel, Malaysia, 2004.10.4-7.
- 3) Katakai Y, Chiabchalard R, Yasuda KK, Kawazu SI, Singhasivanon P, Krudsood S, Looareesuwan S, Kano S: Correlation Between parasite densities and intensities of visible lines of the immunochromatographic test or copy numbers from a real-time PCR assay, 5th Asia Pacific Travel Health Conference, Sunway Lagoon Resort Hotel, Malaysia, 2004.10.4-7.
- 4) Toshimitsu Hatabu, Shin-ichiro Kawazu, Somei Kojima, Pratap Singhasivanon, Sornchai Looareesuwan, Shigeyuki Kano: *In vitro* drug susceptibility and genetic variation of *Plasmodium falciparum* isolates from Thai-Myanmar border, Joint International Tropical Medicine Meeting 2004, Ambassador Hotel, Bangkok, Thailand, 2004.11.29.-12.1.
- 5) 田口直、畑生俊光、高田剛、狩野繁之、佐藤久美子：Amphorericin B の抗マラリア効果の検討、第73回日本寄生虫学会大会、群馬県民会館、2004.4.3~4.
- 6) 上田晃弘、吉田邦仁子、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊地嘉、狩野繁之、岡慎一、木村哲：熱帯熱マラリア“エクリップスタイプ”の一例、第78回日本感染症学会総会、東京ドームホテル、2004.4.4~7.
- 7) 田沼順子、上田晃弘、吉田邦仁子、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊地嘉、岡慎一、木村哲、狩野繁之：当センターにおけるマラリア症例の検討、第78回日本感染症学会総会、東京ドームホテル、2004.4.4~7.
- 8) 片貝祐子、駒木—安田加奈子、河津信一郎、狩野繁之：リアルタイム PCR 法による熱帯熱マラリア原虫クロロキン耐性関連遺伝子 *pfprt* 耐性型/感受性型の定量的検出システムの開発と疫学応用、第19回日本国際保健医療学会総会、国際協力機構国際協力総合研究所、2004.10.9~10.
- 9) 岡林広哲、Pimpimon Thongthien, Pratap Singhasivanon, 塚本勝之、小林潤、狩野繁之、小島莊明、竹内勤：タイ国ミャンマー国境における小学校でのマラリア予防教育の効果、第19回日本国際保健医療学会総会、国際協力機構国際協力総合研究所、2004.10.9~10.
- 10) 倉辻忠彦、狩野繁之、西田美佐、松下竹次、佐藤典子、小宅泰郎、Stephen Chowdhury, Tran Tan Tram, Nguyen Trong Lan, Le Dang Ha, Pham Than Thuy, Ung Sam Anh, Soc Touch：小児マラリアの統合管理による診断、第19回日本国際保健医療学会総会、国際協力機構国際協力総合研究所、2004.10.9~10.
- 11) 狩野繁之：マラリア予防ガイドライン作成の目的、第45回日本熱帯医学会大会、北里大学薬学部、2004.10.15~16.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

薬剤耐性の克服に向けての新規薬剤の評価に関する研究

分担研究者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室 教授  
研究協力者 長瀬 博 北里大学薬学部・生命薬化学教室 教授  
小林正規 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室 助手  
宮田善之 ポーラ化成工業株式会社・横浜研究所・研究企画部 部長  
長由美子 北里大学薬学部・生命薬化学教室 助手

研究要旨 クロロキン耐性マウスマラリア原虫 (*Plasmodium chabaudi* (AS strain: chloroquine-resistant(3CQ)))を対象にクロロキン耐性解除を指標として25種の新規ジベンゾスベリルピペラジン誘導体およびジフェニルアセチルピペラジン誘導体を合成し、その効果を、マウスを用いるスクリーニング試験で確認した。その構造最適化因子を洗い出すために、1) 感染状態が進んだ状況で薬剤を投与する、マウス治療モデル系での検討、2) 薬剤の投与が及ぼすグルタチオン総量への影響の検討及び3) グルタチオンリダクターゼによるグルタチオン生成系への薬剤の直接的影響の検討を行った。マウス治療モデルでは、従来法に比べ、薬剤のより精密な評価が行えることが確認できた。又、感染状態、薬剤感受性、クロロキンの投与、耐性解除剤の投与がグルタチオン総量に大きな影響を与えていた。又、クロロキンも、耐性解除剤もグルタチオン生成系を直接的に抑制していた。

A. 研究目的

薬剤耐性マラリア克服の一手段としてマラリア原虫の薬剤への感受性を回復させる作用を有する化合物を合成し、耐性株の出現により棄却されつつある優れた抗マラリア薬の再利用を可能にすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 基本骨格と誘導体の合成：ジベンゾスベリルピペラジン誘導体 (DSP)、ジフェニルアセチルピペラジン誘導体 (DAP)、ジフェニルメチルピペラジン誘導体 (DMP) を合成し、マウスマラリアの系で、その耐性解除効果を確認した。  
2) 薬剤のスクリーニング：*Plasmodium chabaudi* (As strain: chloroquine-resistant (3CQ))をICRマウス(雌4-5週齢, 20-25g)に

$5 \times 10^6$  個/0.2ml のマラリア原虫感染赤血球を0.85%生理的食塩水にて調製しマウス尾静脈より接種した。化合物の調製はマウス1匹への1回当たりの投与量が5-50 mg/kg/0.2 mlの最終濃度になるよう生理食塩水に予め溶解させた。マラリア原虫接種72時間後に、クロロキンを生理的食塩水にて最終濃度が0.3mg/kg/0.1mlになるよう調製し、0.1ml腹腔投与した。その後24時間おきに3回同様に投与した。試験化合物は生理的食塩水にて最終濃度が20~50 mg/kg/0.1mlになるよう調製し、感染後96時間、120時間、144時間に経口投与した。効果判定は経時的に感染赤血球数を計数することにより行った。  
3) グルタチオン総量の定量はDNTB法に準じて行った。



### C. 研究結果

1) DSP、DAP、DMP は、何れもクロロキンが有効に働かない感染状態の動物を用いた、治療モデル実験において、クロロキンの効果を高め有効に働かす作用があることを確認した。

2) グルタチオン総量は、感染状態、クロロキンの投与、耐性解除剤の投与により、大きく影響を受けることが判った。

3) ローダミン123の排出試験結果は、血球にMRP1が発現しているのを示唆していた。又、排出作用は感染と感染株のクロロキン感受性と関連していることが示唆された。

4) DSP、DAP、DMP、クロロキンの何れもが直接的に還元型グルタチオンの生成を抑制する作用を有していた。

### D. 考察

マラリアのクロロキン耐性の発現にはグルタチオンが重要な役割を演じていることが示唆される。又、耐性発現には宿主細胞側の関与も示唆される。クロロキンは自身の排泄とともに還元型グルタチオンを汲み出すと同時に、還元型グルタチオン生成系を阻害し、抗マラリア作用を発現していると思われる。耐性解除剤は還元型のグルタチオンの生成系を阻害するとともに、グルタチオン関連トランスポーターによる排泄を阻害し、耐性を解除しているものと思われる。今後、薬剤の吸収・代謝・排泄の動態と、還元型と酸化型に分けてのグルタチオンの動態の検討を行い、それらを因子として構造最適化検討を行う必要がある。

### E. 結論

1) マウス治療モデルで、DSP、DAP、DMPの耐性解除効果が確認され、臨床応用の可能性が支持された。又、マウス治療モデルでの耐性解除効果は、構造最適化検討の因子となることを確認した。

2) クロロキン耐性発現、耐性の解除にはグルタチオンの動態が大きく関わっていることが明らかになり、グルタチオン関連トランスポーターが耐

性発現に関与していることが示唆された。グルタチオン動態に対する耐性解除剤の作用も構造最適化検討の因子となると考えられる。

3) クロロキン、DSP、DAP、DMP 何れも還元型グルタチオンの生成を阻害していた。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文

1) 竹内勤「マラリア治療薬の開発研究～人類史全般に亘って脅威を与え続けてきた疾病との戦いの最前線」Pharma VISION NEWS No.5(2005)

#### 2. 学会発表

1) Osa Y, et. al., Structural modification of dibenzosuberanylpiperazine and Diphenylacetyl- piperazine derivatives mainly for efficient reduction of chloroquine resistance in *Plasmodium chabaudi*, World Conference on Dosing of Antiinfectives Dosing the Magic Bullets and the Ehrlich Symposia (2004)

2) 長 由美子、他：芳香族ピペラジン誘導体の母核の構造変換と、マラリアの耐性解除作用の相関関係、日本熱帯医学会 (2004)

3) 宮田善之、他：ジベンゾスベラニルピペラジン誘導体のマラリアの耐性解除作用とグルタチオン量の変化」、日本熱帯医学学会 (2004)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許出願

1) 竹内勤他、特願2004-88135号、ジベンゾスベリルピペラジン誘導体及びそれを含有する医薬組成物

2) 竹内勤他、特願2005-52711号、ジフェニルメチルピペラジン誘導体及びそれを含有する医薬組成物

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

マラリア予防・治療の効果判定に関わる研究

分担研究者 奥 浩之 群馬大学工学部 助教授

研究協力者 片貝良一 群馬大学工学部 教授

研究協力者 山田圭一 群馬大学工学部 助手

研究要旨： 本年度はマラリア感染者に対する予防・治療効果の判定材料に関し、次の3点について成果を得た。(1) 日本人に多い、急性期患者の診断に特に有効な、人工抗原の大規模合成と(2) これを利用した病態検査キットの作成。(3) 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。

A. 研究目的

現在我が国を含めて、経済活動の拡大に伴い、地球規模での人や物資の移動が盛んになってきている。これに時期を同じくして日本人渡航者および入国者による輸入マラリアが急激に増え、特に1980年代より熱帯熱マラリア(Pf)の症例増加が顕著である。例えば近年は症例のうち46%を占めることが本研究分担者の木村らによって報告されている。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、これに対応した薬剤の選択は困難である。そこで本研究分担者は日本人のマラリア予防・治療効果の判定に適した材料の開発を目標に研究を行ってきた。

B. 研究方法

今年度は以下の3点を重点に研究を行った。

(1) Pf患者の診断に有効な人工抗原を純粋かつ大量に化学合成する技術と(2) これを利用した検査キットの作成。(3) 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蛋白質(PfCRT)。いずれもペプチド化学、構造有機化学、高分子化学の手法を用いている。

C. D. 研究結果と考察

(1) 診断用人工抗原の大量合成

昨年度より引き続き人工抗原の合成研究を行い、

必要な技術課題を達成した。

人工抗原は22残基または16残基のポリペプチドから構成されている。患者血清を用いたELISA検査より、この抗原は日本人に多い急性期患者の診断に特に有効であることや病態の経過を見るのに適していることがわかっている。今年度は大量合成(500ミリグラム(約1000人分))に必要な技術開発に成功し、論文発表(1)・学会発表(3,4,7)・特許出願(1)を行った。

(2) 人工抗原を用いた検査キットの作成

上記で製造された人工抗原を微粒子化し、検査キットの作成に成功した。

微粒子化の手法として、(a)放射線重合 (b)エマルジョン (c)自己組織化の3つを試みた。これらを用いて熱帯熱マラリア患者の鋭敏な検出に成功した。検査キットの詳細は特許出願後に公表を行う。微粒子化技術に関し論文発表(2,3)・学会発表(5,6,8)・特許出願(2)を行った。

(3) クロロキントランスポーター

世界に於ける薬剤耐性マラリアの拡散は極めて急速である。これに対応するべく原因蛋白質の合成的研究を行っている。

Pfに於けるクロロキンへの薬剤耐性には、PfCRTと呼ばれる膜蛋白質の部位突然変異が主な原因として考えられている。昨年度の本研究より、突然変異部位が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を合成的に明らかにした。今年度は特許出願を見据えた応用研究を計画し実用的な部分ペプチドの

開発を進めている。研究成果として学会発表(1)を行った。

#### E. 結論

本年度はマラリア感染者に於ける薬剤効果判定に必要な材料開発を目標とし3点の研究成果を得た。(1)人工抗原合成、(2)病態検査キット、(3)PfcRT 蛋白。これらを総合的に用いることで、日本人に多い急性期患者の診断や予防・治療時に於ける薬剤効果の判定に役立つよう、特性評価や改良を進めてゆきたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) K. Omi, K. Kuriyama, K. Yamada, H. Oku, S. Kano, K. Sato, H. Suzuki, and R. Katakai. Synthetic Study of an Antigenic Peptide Having a Partial Sequence from *Plasmodium falciparum* Enolase. In *Peptide Science 2004*, Y. Shimohigashi, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, in press.
  - (2) N. Emori, H. Oku, K. Yamada, R. Katakai. Synthesis of Sequential Polydepsipeptide Microspheres as a Controlled Drug Delivery System. In *Peptide Science 2004*, Y. Shimohigashi, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, in press.
  - (3) K. Shichiri, H. Oku, K. Yamada, R. Katakai. Synthesis of Sequential Polydepsipeptide Microspheres as a Controlled Drug Delivery System. In *Peptide Science 2004*, Y. Shimohigashi, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, in press.
- ##### 2. 学会発表
- (1) 奥浩之、鈴木宏、山田圭一、片貝良一「Peptide Models of Trans-Membrane Sequences from *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Protein (PfcRT)」第73回日本寄生虫学会、前橋、2004.4.4
  - (2) 石原亜矢、畑生俊光、奥浩之、鈴木守、佐藤久美子「Anti-Malarial Activity of the Components from Natural Plants」第73回日本寄生虫学会、前橋、2004.4.4
  - (3) 小見和人、栗山圭祐、山田圭一、奥浩之、狩

野繁之、佐藤久美子、鈴木守、片貝良一「熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼの部分配列を含む人工抗原ペプチドの合成研究」第41回生体関連化学シンポジウム、東京、2004.10.9

- (4) 小見和人、栗山圭祐、山田圭一、奥浩之、狩野繁之、佐藤久美子、鈴木守、片貝良一「Synthetic Study of an Antigenic Peptide Having a Partial Sequence from *Plasmodium falciparum* Enolase」第41回ペプチド討論会、福岡、2004.11.1
- (5) 江森野歩、奥浩之、山田圭一、片貝良一「Synthesis of Sequential Polydepsipeptide Microspheres as a Controlled Drug Delivery System」第41回ペプチド討論会、福岡、2003.11.3
- (6) 七里一彰、奥浩之、山田圭一、片貝良一「Synthesis and Properties Thermo-Responsible Polydepsipeptide Containing Hmb (2-hydroxy-3-methyl-butanoic acid) Residues」第41回ペプチド討論会、福岡、2004.11.3
- (7) K. Omi, K. Kuriyama, K. Yamada, H. Oku, S. Kano, K. Sato, H. Suzuki, and R. Katakai. Solution Phase Synthesis of an Antigenic Peptide Having a Partial Sequence from *Plasmodium falciparum* Enolase. 1<sup>st</sup> Gunma International Symposium on Chemistry, Kiryu, JAPAN, 2004.11.6
- (8) K. Shichiri, H. Oku, K. Yamada, R. Katakai. Synthesis and Thermo-Responsible Properties of Elastin Model Depsipeptides. 1<sup>st</sup> Gunma International Symposium on Chemistry, Kiryu, JAPAN, 2004.11.6

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許

- (1) 奥浩之、小見和人、栗山圭祐、山田圭一、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、河津信一郎、狩野繁之「熱帯熱マラリア原虫蛋白質の部分配列を利用したペプチドの化学合成法、およびこれを利用した人工抗原」特願2004-281518
- (2) 奥浩之、七里一彰、平知広、山田圭一、片貝良一「温度応答性デブシペプチドポリマー」特願2004-305

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 リスザルに *Plasmodium falciparum* 感染赤血球を静脈内接種することにより、ヒト熱帯熱マラリアと同様の様々な病態を再現することができる。本研究ではリスザルモデルを用いて特にマラリア脾腫に関する病理組織学的および免疫組織化学的解析を行い、parasitemia の増加に伴っておこる急性マラリア脾腫が主として赤脾髄における MRP8/14 陽性マクロファージ増加によることを明らかにした。これらリスザルで得られた知見をもとに、タイ人熱帯熱マラリア患者の血漿 MRP8/14 濃度を測定したところ、著しい高値を示すことが明らかとなり、血漿 MRP8/14 濃度がマラリア重症化の指標の一つとして有用であると考えられた。

A. 研究目的

熱帯熱マラリアはマラリア三大徴候と呼ばれる発熱、貧血、脾腫以外に、しばしば重篤な貧血、肺浮腫、腎不全、低血糖症等の症状を伴い重症化し、また脳症状を伴う場合は適切な処置が施されなければ致死的である。ところが、熱帯熱マラリアの病態形成機序については未だ不明な点が多く残されている。マラリア病態の解明のため、さらにマラリアに対する予防、診断および治療技術の開発における技術の評価系として *in vivo* 病態モデルは必要不可欠である。しかしながら、熱帯熱マラリア原虫は宿主特異性が強く、チンパンジ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。本研究分担者はこれまでに、リスザルが熱帯熱マラリア病態モデルとして有用であることを示した（研究発表1. 論文発表参照）。本年度は、リスザルモデルを用いて、特にマラリア脾腫の形成に関する解析を行い、赤脾髄の MRP8/14 陽性マクロファージの増加を明らかにした。さらにこれらの知見をもとに、タイ人マラリア患者の血漿 MRP8/14 濃度を測定しマラリア病態との関連を解析した。

B. 研究方法

原虫は熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* Indochina-\_/CDC 株を用いた。感染赤血球(IRBC)のド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。血漿および白血球除去フィルターにより白血球を除去し、得られた  $2 \times 10^7$  IRBC をリスザルに静脈内接種した。IRBC

接種後、24 時間おきに採血を行い、末梢血感染赤血球数率(Parasitemia)を測定した。感染 5、14、30 日目に剖検を行い、脾臓を採取し、病理組織学的解析および凍結切片を用いた抗ヒト MRP8/14 抗体(MAC387)による免疫組織化学染色を行った。タイのマラリア患者血漿は、全て Dr. S. Looreesuwan (Mahidol University) から供与された。末梢血塗沫ギムザ染色標本により原虫種(*P. falciparum*, *P. vivax*)を判別し、熱帯熱マラリア患者は、WHO の基準(1991)に準じ、脳性マラリアなどの合併症を伴う severe malaria グループと合併症を伴わない mild malaria グループに分け、さらに severe malaria グループは、その症状の程度により highly severe malaria 患者および moderate severe malaria 患者に分けた。コントロールとして、vivax malaria 患者および日本人健常者の血漿を用いた。MRP8/14 濃度はヒト MRP8/14 ELISA Kit (Buhlmann)を用いて測定し、濃度(ug/ml)で示した。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用のバイオハザード動物実験室(P2)にて行った。また、対象症例の人権および利益の保護には十分な配慮をはかり、個人が識別できる可能性のある情報は一切公表しないことを厳守した。

C. 研究結果

リスザルは IRBC 接種後、一過性の parasitemia の上昇を来した後、原虫は末梢血より消失し、耐過した(一例を示すと、感染 5 日目に 0.2%、感染 14 日目に 25.5%、感染 30 日目に 0%であった)。感染後 5、14、30 日目に剖検し、脾臓を肉眼的に観察した

ところ、感染 5 日目に軽度の脾腫が見られ、14 日目には暗褐色を呈し長軸で約 2 倍に伸張した顕著な脾腫が観察された。30 日目には脾腫は認められなかった。それぞれの脾臓の病理組織学的解析の結果、非感染リスザルの脾臓に比べて感染 5 日目に赤脾髄で単核系細胞の増加が認められた。感染 14 日目には脾臓の赤脾髄および白脾髄で単核系細胞の増加が認められ、赤脾髄においてマラリアピグメントの著しい蓄積がみられた。ヒト MRP8/14 に対する抗体を用いて免疫組織学的解析を行った結果、非感染個体で脾臓の辺縁部にのみ局在した MRP8/14 陽性細胞が、感染 5、14 日目には赤脾髄全体で認められた。赤脾髄に観察された MRP8/14 陽性細胞は、形態学的にマクロファージと考えられた。さらに、MRP8/14 は soluble form として血中に放出されることが知られていることから、血液中に MRP8/14 が増加していることが示唆された。タイ人マラリア患者血漿中の MRP8/14 濃度を測定したところ、熱帯熱マラリアの highly severe malaria 患者 (n=21) では 75.5 ug/ml ( $\pm 14.8$  ug/ml)、moderate severe malaria 患者 (n=19) では 45.7 ug/ml ( $\pm 9.4$  ug/ml)、mild malaria 患者 (n=20) では 25.1 ug/ml ( $\pm 5.3$  ug/ml)であり、vivax malaria 患者 (n=15)の 13.4 ug/ml ( $\pm 2.1$  ug/ml)や日本人健常者 (n=20) の 2.0 ug/ml ( $\pm 0.4$  ug/ml) に比べ高い値を示し、その重症度と一致した。さらに、タイ人マラリア患者を 1 ul の血液中の malaria parasites が 10,000/ul 以上の群と 10,000/ul 未満の群に分け比較検討を行った。その結果、血液中の malaria parasites が 10,000/ul 未満の群において、mild malaria 患者 20.1 ug/ml ( $\pm 6.4$  ug/ml)や vivax malaria 患者 10.5 ug/ml ( $\pm 2.5$  ug/ml)と比較すると severe malaria グループ (highly severe/moderate severe malaria 患者)の血漿中の MRP8/14 濃度が 65.2 ug/ml ( $\pm 13.6$  ug/ml) と著しく高い値を示し、マラリア患者血漿中の MRP8/14 濃度は parasitemia と相関するというよりはむしろ、病態の重症度と相関することが示唆された。

#### D. 考察

リスザルに *P. falciparum* を感染させることにより、ヒトマラリアにおけるのと同様の病態(発熱、貧血、脾腫および昏睡など)および病理組織学的変化 (sequestration、ring haemorrhage)を再現できる。本年度、リスザルモデルを用いてマラリア脾腫に関する病態の病理組織学的解析を行った結果、マラリアにおける脾腫は赤脾髄における MRP8/14 陽性マクロ

ファージの増加が深く関与していることが示唆された。MRP8/14 陽性マクロファージは、IRBC およびマラリアピグメントの貪食と関連すると考えられたが、その役割については今後更に検索を進める予定である。また、タイ人マラリア患者の血漿 MRP8/14 濃度を測定したところ、熱帯熱マラリア患者で著しい高値を示し、重症度と一致した。以上のことから、MRP8/14 が熱帯熱マラリアの病態形成に深く関与することが示唆され、今後、リスザルモデルを用いて MRP8/14 の機能を明らかにしていく予定である。

#### E. 結論

リスザルモデルを用いたマラリア脾腫の解析により、MRP8/14 陽性マクロファージが赤脾髄で増加することが示された。この知見をもとに、マラリア患者の血漿 MRP8/14 を測定し、MRP8/14 がマラリア患者血漿中に高濃度に検出され、重症化の指標の一つとして有用であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 堀井俊宏、松本芳嗣、太田伸生：マラリア原虫のアキレス腱を標的とする SE36 マラリアワクチンの開発 (Development of SE36 malaria vaccine targeting at Achilles heel antigen of *Plasmodium falciparum*.), 細胞工学雑誌, 23(7): 785-790, 2004

##### 2. 学会発表

1) 新垣奈々、Sukmawati Baski、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

#### 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  
研究協力者 川田 均 長崎大学熱帯医学研究所 講師

研究要旨 海外渡航者にとって手軽で、媒介蚊による吸血回避に有効なデバイスの提案をめざして、既存の蚊取り線香や試作品の効果を、媒介蚊の多い熱帯現地にて評価した。蚊取り線香は1巻きで8時間有効であった。ニームオイルの効果は疑問視された。常温揮発性ピレスロイドを樹脂製ネットに練り込んだ試作品では、殺虫効果、吸血阻止効果とも顕著であった。効果は約3ヶ月持続する。

A. 研究目的

我が国の海外渡航者は著しい増加傾向にある。この状況下で渡航者自身をマラリアを始めとする蚊媒介性感染症の罹患から守ることは、国内における二次感染リスクを断つ意味も含めて二重に重要な意味を持つ。渡航者のマラリア感染回避は、原虫に対する予防内服もさりながら、これが蚊媒介性感染症である限り、流行地滞在中に原虫保有蚊に吸血されない方策を含めて初めて達成される。然るに多々挙げられる吸血回避手段の、流行地における有効性に関する実証的情報は未だきわめて薄い。本年度の研究では、蚊取り線香など既存のツール、及び新しいピレスロイドの吸血阻止効果について、インドネシア・ロンボク島のマラリア流行地での試験結果を元に評価し、新しい防除技術の提示と、渡航者の感染回避に資する情報の整備をめざした。

B. 研究方法

マラリア常在地である上記島の1郡にて、一定数（量）の①蚊取り線香（加熱性ピレスロイド剤）、②ニームオイル、③常温揮発性ピレスロイド剤添加の屏風状濾紙、蜂の巣型不織布、メッシュ状樹脂を屋内外に設置し、人（2名）または牛（1頭）を囿として、日没後から24時まで、成虫の採集を試みた。薬剤から囿までの距離は何れも1.5m以内とした。どの場合も対照を設け効果を比較出来るようにした。③の常温揮発性ピレスロイド剤は、開発途上で試験段階のツールのため、有効性が認められる個数、有効性持続期間を中心に吟味した。（倫理面への配慮）罹患リスクを伴う方法での人囿採集は実施していない。マラリアコントロール事業全体としては、インドネシア当局と実施母体（長崎大学熱帯医学研究所）の倫理委員会の審査をクリアしている。

C. 研究結果

①蚊取り線香：蚊の発生の少ない時期に実験を実施せざるを得なかったため採集個体数が少なかったが、屋外人囿採集では、蚊取り線香は1巻きで、3回繰り返しのうち1回のみ6頭のイエカ属の襲来を受けただけであった。対照区（蚊取り線香無し区）では、マラリア媒介蚊であるハマダラカを含め、77頭を捕獲しており、従来の加熱型ピレスロイドを主成分とする蚊取り線香1巻きの吸血阻止効果は明らかであった。供試した蚊取り線香の燃焼持続時間は約8時間であった。吸血回避効果は8時間持続するといえる。

②ニームオイル：インド原産植物のニームから抽出されたオイルの幼虫殺虫効果と成虫に対する吸血阻止効果は古くから一部で注目されてきた。ここでは後者について吟味した。ニーム油を気化させるために灯油に3%の割合で混入し、ランプを点火させた。その結果、屋内人囿採集（ランプは1台点灯）、屋外人囿採集（1台）、屋外牛囿採集（2台）とも対照区との間に明瞭な差は認められなかった。繰り返しによってはニームオイルなしのランプを点灯した場合の方が蚊の襲来数が少ない傾向さえ見受けられた。ニームオイル混入ランプの吸血阻止効果は無しと結論した。尚、ニームオイルの混入率を3%以上に上げるとランプがうまく発火しなくなる。

③常温揮発性ピレスロイド剤（S1264）：まずこの新しいピレスロイド剤の屋外解放空間における殺虫効果を吟味した。その結果、蛇腹状濾紙に200mgのS1264を含浸させた短冊の直下50cmに設置したケージ内の供試虫は10分以内に、薬剤から150cmでも2時間以内に全てがノックアウト状態になった。24時間以内の死亡率は100%であった。次にS1264の、屋内または屋外解

放空間で薬剤から 1.5m 以内という条件下での、吸血阻止効果の濃度依存性を、蛇腹状濾紙に 200mg の S1264 を含浸させた短冊を吊り下げる方法で調べた。その結果、屋内では短冊 1 個、即ち 200mg の S1264 で 86%以上の阻止効果が 4 週間に亘って期待出来ることが判った。屋外の解放条件下で同等の効果を上げるには短冊 2 個を要した。即ち、屋外においては短冊 1 個/4.5 m<sup>2</sup> の処理量で約 4 週間吸血を阻止出来た。吸血阻止効果と有効な濃度の概略が明らかになったので、次に効果の持続性に注目した。持続性を長らえるには、吸血を阻止する有効濃度以上の薬剤成分の揮発期間をより長くすることが必要である。即ち、薬剤の徐放性の改善にかかっている。そこで、満足のいく徐放性を備えたオリセットネットの技術を転用して、メッシュ状樹脂に S1264 を練り込んだ試作品を作り、フィールド試験に供試した。その結果、屋外条件下で、上記試作品を 2 個吊り下げた状態で、現時点では最長の 1 2 週間まで有効に吸血を阻止することが出来た。

#### D. 考察

蚊取り線香の有効性は明らかである。但し、これは加熱する必要があり火災の危険もある。また、匂いや毎夜更新しなければならぬ問題もある。これに対し、常温揮発性ピレスロイド(S1264)を樹脂製ネットに練り込んだ試作品では、屋外の解放空間でも薬剤から 1.5m 内外の空間ならほぼ 100%の殺虫効果と吸血阻止効果が共に実現された。その効果も現段階の試作品で約 3 ヶ月持続したので、殺虫と吸血回避のための新しいデバイスとして有望と評価した。徐放性をどこまで延ばせるか、コストを如何に下げることが今後の課題であろう。ニームオイルの効果は疑問である。

#### E. 結論

蚊取り線香、ニームオイル、常温揮発性ピレスロイド含浸/練り込みデバイスの、媒介蚊に対する吸血阻止効果を、熱帯現地で評価した結果、現時点では、常温揮発性ピレスロイドを樹脂製ネットに練り込んだ試作品が、殺虫効果、吸血阻止効果とも最も有望であった。効果は約 3 ヶ月持続する。徐放性改善の延長が今後の課題である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nga PT, Parquet MC, Cuong VD, Ma S-P, Hasebe F, Inoue S, Makino Y, Takagi M, Nam VS & Morita K: Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. J General Virol 85:1625-1631, 2004.
- 2) Tuno N, Miki K, Minakawa N, Githeko A, Yan G & Takagi M: Diving ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. J Med Entomol 41(4):810-812, 2004.
- 3) Suwonkerd W, Overgaard HJ, Tsuda Y, Chowprom S, Tuno N, Prajakwong S & M Takagi: Changes in malaria vector densities over a twenty-three year period in Mae Hong Son Province, Northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 35(2):316-324, 2004.
- 4) Argueta TBO, Kawada H & Takagi M: Spatial repellency of metofluthrin-impregnated multilayer paper strip against *Aedes albopictus* under outdoor conditions, Nagasaki, Japan Med Entomol Zool 553:211-216, 2004.
- 5) Kawada H, Maekawa Y, Tsuda Y, & Takagi M: Laboratory and field evaluation of spatial repellency with metofluthrin impregnated paper strip against mosquitoes in Lombok Island, Indonesia. J Amer Mosq Cont Assoc 20(3):292-298, 2004.
- 6) Kawada H. & Takagi M: Photoelectric sensing device for recording mosquito host-seeking behavior in the laboratory. J Med Entomol 41(5):873-881, 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし。

## 旅行記録書 (実績報告書添付用)

研究課題名	マラリアの感染予防及び治療に関する研究			
渡航者・所属機関名	木村幹男・国立感染症研究所感染症情報センター			
主任研究者・所属機関名	狩野繁之・国立国際医療センター研究所、適正技術開発・移転研究部			
渡航目的及び成果（全体）				
<p>欧米では豊富なデータに基づき、マラリア予防内服が積極的に行われているが、欧米でこれらの研究やガイドライン策定に関わった人と直接討議し、日本人旅行者に適合したマラリア予防ガイドラインを策定する必要がある。また、国内で発売されているマラリア治療薬は少なく、症例数が少ないこともあって日本人での治療指針は確立されていないが、これについてもガイドラインの策定が必要と思われる。さらに、これらの基礎となるマラリア・サーベイランスの手法を学び、わが国でのサーベイランスの改善に活かす必要がある。</p> <p>今回の訪問では、マラリア予防・治療、およびサーベイランスの分野で中心的な役割を担う人物を訪問し、有意義な情報を得ることができた。ヨーロッパでも国により多少の違いはあるが、抗マラリア薬の予防的および治療的使用については変化が起こりつつある。また、ドイツ、英国での国家的サーベイランスのみならず、ヨーロッパ全体での旅行者感染症定点サーベイランス（TropNetEurop）を詳細に把握し、その討議を行なったことで、今後わが国におけるマラリアのサーベイランスで見直すべき点が明らかになった。さらに、ドイツにおける熱帯医学衛生協会、英国における NaTHNaC の活動は、今後わが国でも導入を考えるべきものと思われた。</p>				
日程 (実績)	出発地	到着地 (宿泊地)	訪問機関名 訪問者名等	用務の概要 (個別欄)
12/15～ 12/17	成田	ミュンヘン	1) ミュンヘン大学 T. Loescher 教授 2) ミュンヘン大学 H. Nothdurft 教授	1) ドイツにおけるマラリア予防、マラリア治療の説明を受け、討議を行なった。 2) ドイツおよびヨーロッパ（TropNetEurop）におけるマラリアのサーベイランスの説明を受け、討議を行なった。旅行医学におけるドイツ熱帯医学衛生協会の役割につき、説明を受けた。
12/18～ 12/21	ミュンヘン	ロンドン	1) ロンドン大学インペリアルカレッジ G. Pasvol 教授 2) ロンドン衛生熱帯医学校 R. Behrens 教授 3) NaTHNaC D. Hill 教授 4) Royal Free 病院 J. Zuckerman 博士	1) 英国における抗マラリア薬療法、重症マラリアの支持療法に関する説明を受け、討議を行なった。 2) 英国におけるトラベルクリニックの現状、旅行者に対するアドバイスのあり方につき、討議を行なった。 3) 英国における旅行医学専門機関 NaTHNaC、マラリアのサーベイランスの説明を受け、ガイドラインのあり方につき、討議を行なった。 4) 旅行医学、特にワクチン接種のあり方につき、討議を行なった。
12/22	ロンドン	機中泊		
12/23	機中泊	成田		
旅費積算内訳				

※国際学会等において、当該研究の研究成果の発表を行なった場合には、発表スケジュールの入ったプログラム等の写しを添付すること。

※到着地と宿泊地が異なる場合は、到着地の下に宿泊地を記載すること。

※旅費の積算内訳については、滞在地域により宿泊料及び日当の単価が異なるので厚生労働科学研究費補助金取扱細則に定める「旅費に係る単価表」を必ず参照すること。

※旅費の積算内訳については、当該研究に係る補助金の管理及び経理を機関の長へ委任する場合は記入を要しない。



旅行記録書  
(実績報告書添付用)

研究課題名	マラリアの感染予防及び治療に関する研究			
渡航者・所属機関名	吉川 晃司・東京慈恵会医科大学附属病院感染制御部			
主任研究者名・所属機関名	狩野 繁之・国立国際医療センター研究所、適正技術開発移転研究部			
渡航目的及び成果（全体）				
本邦におけるマラリアの治療法の確立およびマラリア等の熱帯病に対する臨床管理に役立てる目的で、マラリアとくに薬剤耐性マラリアの治療経験が豊富で、治療実績が高いタイ（マラリア流行地）の医療機関、医学施設を訪問した。タイにおけるマラリアの現況および最新のマラリア治療に関する情報を収集し、マラリアをはじめとする熱帯病に対する診療体制を見学した。				
日程 (実績)	出発地	到着地 (宿泊地)	訪問機関名 訪問者名等	用務の概要 (個別欄)
2/14 ～ 2/16	成田	バンコク	マヒドン大学熱帯医学部熱帯病病院： Assoc. Prof. Krudsood S. Assist. Prof. Silachamroon U. マヒドン大学シリラート病院寄生虫学教室： Assist. Prof. Tungtrongchitr A. シリラート医学博物館	慈恵医大病院で診療したマラリア患者について意見交換を行うほか、合併症のない熱帯熱マラリアおよび重症熱帯熱マラリアにおける最新のマラリア治療、診療状況に関する情報を収集し、マラリア等の熱帯病に対する診療体制や医学施設を見学した。
2/17 ～ 2/18	バンコク	チェンマイ	チェンマイ蚊媒介疾病センター: Mr. Cholphol S. チェンマイ大学: Prof. Kh-amboonruang C	タイにおけるマラリアの現況、熱帯熱マラリアにおける最新のマラリア治療およびマラリア等の診療状況に関する情報を収集し、マラリア等の熱帯病に対する診療体制や医学施設を見学した。
2/19	チェンマイ	バンコク		
2/20 ～ 2/21	バンコク	成田 (機中泊)	サミティヴェート病院スクムビット: Dr. Jarusiripipat C	熱帯病に対する診療体制や医学施設を見学した。
旅費積算内訳				

※国際学会等において、当該研究の研究成果の発表を行った場合には、発表スケジュールの入ったプログラム等の写しを添付すること。

※到着地と宿泊地が異なる場合は、到着地の下に宿泊地を記入すること。

※旅費の積算に内訳については、滞在地域により宿泊料及び日当の単価が異なるので厚生労働科学研究費補助金取扱細則に定める「旅費に係る単価表」を必ず参照すること。

## 旅行記録書 (実績報告書添付用)

研究課題名	マラリアの感染予防及び治療に関する研究			
渡航者・所属機関名	狩野繁之・国立国際医療センター研究所、適正技術開発・移転研究部			
主任研究者・所属機関名	狩野繁之・国立国際医療センター研究所、適正技術開発・移転研究部			
渡航目的及び成果（全体）				
<p>我が国の輸入マラリア患者数は年間 100 人前後であるが、その迅速かつ適切な診断法を開発し、患者を重症化に陥らせずに早期に治療を行う体制をわが国に作る事が重要である。今回のクアラルンプールへの出張の目的は、アジア旅行医学会に参加し、上記テーマに関して我々が昨年度より開始した研究の成果の発表を行うとともに、旅行医学の領域におけるアジアのマラリア研究者と討議することを目的とした。</p> <p>マラリアの感染予防及び治療に関する研究は、いまや旅行医学の領域でその研究が大いに進展しており、アジアにおける個別のマラリアの流行状況や、各国におけるマラリアに関する医療体制に係る情報を入手するために、2年に1度開催される同学会は絶好の機会であった。同学会に参加し、我が国における最先端のマラリア診断法にかかる研究成果や、我が国の輸入マラリアに関する実態を発表し、参加者と討議を行うことができた。これらの発表や討議を通して、我が国における輸入マラリアの予防・診断・治療に関するガイドライン作成にむけて、アジアのスタンダードの知見を得るために大きな成果が得られたと考えられる。</p>				
日程 (実績)	出発地	到着地 (宿泊地)	訪問機関名 訪問者名等	用務の概要 (個別欄)
10/3~6	成田	クアラルンプール	5th Asia Pacific Travel Health Conference (Sunway Lagoon Hotel)  Nor Shahidah Khairullah 会長 他	アジアにおける旅行医学を目的とした会議に出席し、我々の研究成果の発表を行い、参加者と討議を行うことにより、マラリアの予防及び診断に関する新たな知見の収集を行うことができた。
10/7	クアラルンプール	機中泊		
10/8	機中泊	成田		
旅費積算内訳				

※国際学会等において、当該研究の研究成果の発表を行った場合には、発表スケジュールの入ったプログラム等の写しを添付すること。

※到着地と宿泊地が異なる場合は、到着地の下に宿泊地を記入すること。

※旅費の積算内訳については、滞在地域により宿泊料及び日当の単価が異なるので厚生労働科学研究費補助金取扱細則に定める「旅費に係わる単価表」を必ず参照すること。

※旅費の積算内訳については、当該研究に係る補助金の管理及び経理を機関の長へ委任する場合は記入を要しない。



# Certificate of Attendance

This is to certify that

*Shigeyuki Kano*

---

participated in the

**5th Asia Pacific Travel Health Conference (5th APTHC)**

held on

4 - 7 October, 2004

in

**Sunway Lagoon Resort Hotel**

Dr Nor Shahidah Khairullah

Organising Chairman  
Asia Pacific Travel Health Conference (APTHC)

President  
Asia Pacific Travel Health Society

# Correlation Between Parasite Densities and Intensities of Visible Lines of the Immunochromatographic Test or Copy Numbers from a Real-Time PCR Assay

---

Y Katakai, R Chiabchalard\*, K K Yasuda\*, S I Kawazu\*, P Singhasivanon\*, S Krudsood\*, S Looareesuwan\*, S Kano\*

Research Institute, International Medical Center of Japan

## Summary

The objective of this study was to compare Now® ICT Malaria Test and a real-time PCR assay to expert microscopy for the determination of parasite densities in 50 *Plasmodium falciparum* and 50 *P. vivax* malaria patients.

Quantitative analysis was conducted by the ICT test, reading the intensities of positive lines in the test window subjectively by 4 grades (from 0: negative, 1: weak, 2: moderate, to 3: intense). Plotting the readings by 4 grades against the grade of parasite densities (< 100, 100-1000, 1000-10000 and >10000 pRBCs/ $\mu$ l), high correlations between the two groups were recognized. That is, Pearson's correlation coefficient (CC) was 0.642 between intensities of T1 lines and parasite densities in *P.falciparum* patients. For *P. vivax* patients, CC between intensities of T2 lines and parasite densities was 0.745. Likewise, we examined correlation between copy numbers of *Plasmodium* rRNA gene obtained by the PCR and parasite densities, and CC was 0.808 for *P.falciparum* and 0.586 for *P. vivax*.

The ICT test and the real-time PCR may represent a useful adjunct not only for the diagnosis of the species of malaria but also for determination of parasite densities in evaluating severity of the patients. Yuko Katakai, Rachatawan Chiabchalard, Kanako Komaki-Yasuda, Shin-ichiro Kawazu, Pratap Singhasivanon, Srivicha Krudsood, Sornchai Looareesuwan, and Shigeyuki Kano Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan; Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

---