

わが国における重症マラリアの治療に関する研究

分担研究者 吉田 正樹 東京慈恵会医科大学感染制御部 講師

研究協力者 大友 弘士 東京慈恵会医科大学熱帯医学研究部 客員教授

研究要旨 日本人重症熱帯熱マラリア患者の治療成績について検討したところ、キニーネ点滴静注の有用性が確認された。また、非重症例に使用されているメフロキン単独投与群6例、アーテスネート(経口)+メフロキン投与群7例、アトバコン/プログアニル合剤投与群11例の治療成績を比較し、アーテスネート(経口)+メフロキン投与例が発熱消失時間、原虫消失時間ともに最も短時間であり、アーテスネートの即効性が確認され、重症例にも使用できる可能性が示唆されたが、今後、肝機能障害の副作用に関する検討が必要である。

A. 研究目的

わが国においては、マラリア患者は少なく、重症例もまれである。しかし、重症では死亡例もあり、その治療の標準化を図ることが重要である。そこで、重症熱帯熱マラリアに対するキニーネ非経口療法使用例の検証を行うとともに、合併症のない日本人熱帯熱マラリア患者（非重症例）に使用されている薬剤の中で、重症例にも適用できる抗マラリア療法について検討した。

B. 研究方法

1994年から2005年に本学で診療した輸入マラリア患者100例の中で、WHO重症マラリア基準を1つ以上満たした日本人重症熱帯熱マラリア患者（重症例）9例の治療成績について検討した。また、非重症例の中で、メフロキン単独投与群(250mg/錠 1回2錠、6時間後2錠または1錠)6例、アーテスネート(経口1200mg/5日間)+メフロキン(250mg/錠 1回2錠(アーテスネート投与終了後)、6時間後2錠または1錠)投与群7例、アトバコン/プログアニル合剤(アトバコン 250mg・プログアニル 100mg/錠 1日1回4錠、3日間)投与群11例の治療成績

を比較し、その中で重症例に使用できる可能性を検討した。

(倫理面への配慮) 薬剤投与に際しては、患者に効用、副作用について説明し、文章にて同意を得た。また、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

1. 重症例の治療成績

重症例9例に対して、キニーネの点滴静注例は7例で、追加投与としてアーテスネート投与1例、アーテスネート+ミノサイクリン投与1例、メフロキン投与2例、メフロキン+ミノサイクリン投与1例、アトバコン/プログアニル合剤投与2例であった。7例中2例に肝機能障害を認め、その原因を確定できなかったが、薬剤性肝障害は否定できず、アーテスネート投与が関与した可能性も示唆される。いずれの投与においてもマラリア原虫の消失とともに軽快

し、死亡例や再発例は認めなかった。

## 2. 非重症例の治療成績

発熱消失時間 (FCT)、原虫消失時間 (PCT) はメフロキン単独投与例で 60.5 時間、45.7 時間、アーテスネート(経口)+メフロキン投与例では 45.6 時間、39.9 時間、アトバコン/プログアニル合剤投与例では 103.3 時間、70.0 時間であり、アーテスネート(経口)+メフロキン投与例で発熱消失時間、原虫消失時間ともに最も短かった。薬剤投与中の原虫感染率の上昇はアトバコン/プログアニル合剤投与例で 15 例中 3 例に認めた。副作用では肝機能障害が多く、メフロキン単独投与例では 6 例中 3 例、アーテスネート(経口)+メフロキン投与例では 7 例中 5 例、アトバコン/プログアニル合剤投与例では 11 例中 4 例に認めた。

## D. 考察

日本人重症熱帯熱マラリア患者においても、重症熱帯熱マラリアの標準的な治療法であるキニーネ点滴静注の有用性が確認された。海外の報告では、アーテスネート点滴静注療法が、キニーネ点滴静注療法より死亡率が低かったとの報告もある。当院の重症例においてもアーテスネート経口投与は有効であったが、いずれも高度肝機能障害を認め、その使用については、更なる検討が必要と思われる。

日本人非重症熱帯熱マラリア患者の治療において、アーテスネート(経口)+メフロキン投与例が発熱消失時間、原虫消失時間ともに最も短時間であり、アーテスネートの即効性が確認された。今回、使用したアーテスネート剤は経口薬であり、点滴静注薬を使用すれば、より即効性が期待でき、非重症例だけでなく重症例に対しても、その臨床使用が期待できる。非重症例でも、肝機能障害の副作用が多く、この点については更なる検討が必要と思われる。アトバコン/プログアニル合剤は発熱消失時間、原虫消失時間に時間がかかり、投与後の原虫感染率の

再上昇も認めることから、重症例での単独使用には適さない。今後、日本人重症熱帯熱マラリア患者に対して、注射用アーテスネート剤+メフロキンまたはアトバコン/プログアニル合剤の有効性を検証することが必要と考える。

## E. 結論

日本人重症熱帯熱マラリア患者において、キニーネ点滴静注の有用性が確認された。アーテスネート(経口)+メフロキン投与例が発熱消失時間、原虫消失時間ともに短く、アーテスネートの即効性が確認され、今後、注射薬の重症例での使用の可能性が示唆されるが、肝機能障害の併発について検討が必要である。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文

- 1) 吉田正樹、吉川晃司、他：慈恵医大病院におけるマラリア症例の検討。日本臨床寄生虫学会雑誌 16(1), 2005 (in press)
- 2) 大友弘士、野崎正勝、他：ワクチン接種・治療の実際 - マラリア。Progress in Medicine 26 : 23-27, 2006

### 2. 学会発表

- 1) 吉田正樹、大友弘士、他：原虫症の化学療法 of 進歩 - マラリア。第 53 回日本化学療法学会総会シンポジウム、東京、2005 年 5 月
- 2) 吉田正樹、吉川晃司、他：慈恵医大病院におけるマラリア症例の検討。第 16 回日本臨床寄生虫学会総会、東京、2005 年 6 月
- 3) 吉田正樹、大友弘士、他：熱帯熱マラリアにおける治療法の比較検討。第 53 回日本感染症学会東日本地方会総会、東京、2005 年 10 月

## 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 昨年までの研究において、メコン圏のマラリア感染と対策の現状調査と、予防対策の戦略の見直しについての見地を報告した。今年度は、村落レベル、末端医療機関レベルでのマラリア治療の現状調査を行った。この結果、薬局等の Private Sector のマラリア治療への関与が明らかになり、さらなるマラリア対策の改善に向けての指針を報告する。さらに邦人が受けられる可能性のある治療については、末端から中核医療施設まで調査を行った。これは WHO 主導の下、マラリア治療の国家指針の改定が各国で進められる中、邦人が受ける治療の現状について調査検討を行った。この結果、現状では依然として中核病院以外での受療は避けたほうがよい現状が明らかになった。

A. 研究目的

1) メコン圏諸国のマラリア流行状況についての推移

昨年度までは、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と、流行地域のフォローアップをすることによって得た見地について報告した。今年度は従来の公的マラリアネットワークによるデータでは見えてこない、村落レベルでのマラリア治療の実態を明らかにして、Private Sector を巻き込んだ対策の強化を図る指針を得ることを目的とした。

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

初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されたことから、各国の医療機関で早期診断治療を受けることとし、無謀な自己診断をさけるように推奨した。次年度は、アーテスネイトを中心に偽薬剤の存在を明らかにして、信頼できる医療機関で治療を受けることを付け加えた。今年度は、各国のマラリア治療の国家指針が改定されるなか、その実態を調査することによって、邦人が受けられる治療について新たに考察することを目的とする。

B. 研究方法

1) メコン圏諸国のマラリア流行状況についての推移

研究グループは、タイ国マヒドン大学内に設置された ACIPAC（アジア国際寄生虫対策アジアセンター）を基盤に調査・研究と人材育成による関連機関とのネットワーク構築を行ってきている。また、

村落レベルのマラリア流行の状況については、ACIPAC を中心に国西部のミャンマー国境地域と、ラオスについて研究をおこなっている。今年度は、特にマラリアが現在での猛威をふるっているラオス南部と、近年流行が抑えられてきた北部、それぞれ各一県について、Private Sector での治療実態を調査した。

対象地域は一つの郡として、一次医療施設（ヘルスポスト）、2 次医療施設（郡病院）がカバーする保健区域を推定し調査地域を設定した。この地域で、住民のマラリアに関する受療行動と、Private Sector でのマラリア治療薬の販売状況を調査した。

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

改定された、治療国家指針と、推奨される治療薬の普及について調査を行った。

C. 研究結果

1) メコン圏諸国のマラリア流行状況についての推移

住民へのアンケート調査によって、マラリアに関する受療行動が明らかになってきた。2 次医療施設に近い地域では、医療施設で治療を選択するものが多く、ついで薬局でのマラリア治療薬の購入するものが多かった。一方、一次医療施設（ヘルスポスト）が中心となる保健区では、伝統的治療を選択するものが多い村落、薬局での薬の購入による治療を選択するものが多い村落、ヘルスポストでの治療を選択するものが多い村落が見られた。また、マラリア治

療薬の治療、販売は、薬局、村落保健ボランティアのみならず、村落のなかにある商店、行商によっても販売されていることが明らかになった。

## 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

2005年にはWHO主導のもと、アジアにおいても各国でマラリア治療の国家指針の改定が行われた。これはアーテスネイトと他薬剤の合剤を第一選択薬とするものである。しかしながら、コアテム等の合剤についてはラオスやカンボジアにおいては3次病院において普及に至っているとはいえない。これは一般に高価であるために、援助による配布以外には一般には使われにくい現状があるからである。WHOでは2006年には、Private Sectorとの協調によって世界的に安価に入手可能な薬剤にするとしている。しかしながら現在マラリア流行が深刻な貧困僻地においては村落の民間治療の現場では、末端医療施設では殆ど普及していないのが現状であろう。

## D. 考察

### 1) メコン圏諸国のマラリア流行状況についての推移

現在、医療施設との距離等の地理的条件等との要因との関連を検討中であるが、マラリア侵淫地域においては、Private Sectorによる治療が大きな位置を占めていることがわかった。現在、アフリカにおいては公的医療機関やPHC戦略のなかでの村落保健ボランティアによる治療の限界によって、一般家庭での治療での推進が行われている。アジアメコン地域では、マラリアの流行は、Mekong Roll Back Malaria Imitativeに基づく対策によって急速に押さえ込まれつつある。これは公的医療機関、村落保健ボランティアの信頼性が高いことが一つの要素とも考えられる。しかしながら、未だマラリア感染が深刻な僻地貧困地域においては、公的医療機関を中心とした対策のみでは対応しきれないのが現状である。アフリカの対策のように家庭での治療を直接推進するものでなく、公的機関と薬局、村落のお店等との連携を促すことが解決になるかもしれない。またインフォーマルな薬の販売については、基本的には法的整備をすすめることを促すとともにより詳細な実態調査によって方針を考えていかなければならないと考えている。

### 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

邦人が、このような流行地域でマラリアを発症した場合、たとえアーテスネイトと他薬剤の合剤が入手されたとしても、現状では各国2-3次医療施設以上での治療を推奨せざるをえない。なぜなら、包括的小児疾患管理(IMCI)等の末端医療機関での

一般的治療の改善は十分でないため、マラリアの治療においても質の改善は十分に行われていない地域が多々みられるからである。しかしながら、県レベル(2-3次医療施設)での改善はされつつあるため、薬が安価になり普及がみられれば、今後マラリアに関しての治療の状況は大きく変わっていくことも予想される。

しかしながら、重症マラリアの治療に関しては、マラリアだけでなく他合併症の治療等、医師の患者管理が重要な要素となっているため、各国の中核病院以上での治療が依然として望まれるのはいうまでもないことは最後に付け加えなければならない。

## E. 結論

マラリア感染が深刻なアジアメコン地域の僻地貧困地域においては、公的医療機関を中心とした対策のみでは、患者管理に対応しきれないのが現状である。

一方、邦人海外渡航者が受けられるマラリアに対する医療の現状は、依然として中核病院以外での受療は避けたほうがよい現状が明らかになった。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文

1) Okabayashi H, Thongthien P, Singhasvanon P, Waikagul J, Looareesuwan S, Jimba M, Kano S, Kojima S, Takeuchi T, Kobayashi J, Tateno S: Keys to success for school-based malaria control program in primary school in Thailand. *Parasitol Int*, 2006 (in press, available on line)

2) Petsuvan R, Phompida S, Kobayashi J: The situation of malaria and its control in Lao PDR. *In: Asian Parasitology vol.6: Malaria in Asia*, edited by Shigeyuki Kano and Pilarita Tongol-Rivera, FAP Journal Ltd, Chiba, 85-104, 2005

### 2. 学会発表

1) 小林潤: アフリカで展開されるマラリア対策の展望、日本熱帯医学会総会、京都、2005

2) 野中大輔、他: ラオス、ウドムサイ県モデル校における学校保健アプローチのマラリア教育の効果について 国際保健医療学会総会、東京、2006

## 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

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の自然科学研究は、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科学技術開発研究の充実が必要である。当該分担研究では、1) 国立国際医療センターにおけるマラリアの予防・治療にかかる臨床研究、2) 薬剤耐性マラリアの新規治療薬としての抗真菌剤の応用研究、3) 薬剤耐性マラリアのアジアにおける疫学研究、4) 薬剤耐性/重症マラリア患者の臨床管理研究、そして、5) マラリアのワクチン開発研究、の成果をもって、国民や医療従事者に「適切な診断・治療・予防法へのアクセスルート」の情報を提供しようとした。本年度は「マラリア予防ガイドライン」の評価と「マラリア治療ハンドブック」作成のための研究へとつながった。

A. 研究目的

近年わが国の海外渡航者が再び増加し、世界における薬剤耐性マラリアの流行が再興する中で、マラリアの防疫を効果的に実行してゆく上で重要なことは、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、そして予防にかかる医療サービスの向上をめざした自然・社会科学技術の開発研究を充実させることである。当該分担研究の目的は、国民や医療従事者に「適切な診断・治療・予防法へのアクセスルート」の情報を提供するために、特に世界の薬剤耐性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予防情報など、正確な疫学とマラリアの臨床に関する徹底した情報収集を行い、薬剤やワクチン開発にかかる基盤的研究に立脚した臨床研究を展開することを目的とする。その成果をもって、マラリアの予防ガイドラインの作成・頒布とその評価、治療ハンドブックの作成などを行い、具体的な臨床現場に具体的な研究成果を還元してゆく。

B. 研究方法

- 1) 国立国際医療センターのトラベルクリニックを訪れるすべての渡航前マラリア相談、帰国後の患者の診断・治療に関する臨床データを集積し、昨年度に完成し本年度頒布したところの「マラリア予防ガイドライン」の評価を行い、また同時に典型的症例を報告した「マラリア治療ハンドブック」の作成にデータを提供した。
- 2) 抗真菌薬の応用で、薬剤耐性マラリアの治療に有効性を持つ治療方法を開発しようとした試み、*in vitro* の培養系でその有用性を評価した。用いた薬剤は、アンホテリシン B とグリオトキシンの2剤である。
- 3) 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、ラオス、フィリピンで *in vivo*、*in vitro*、薬剤耐性遺伝子の変異を指標として調査・解析を行った。
- 4) 世界の、特にアジアの薬剤耐性マラリアの治療に関しては、継続的にタイ国マヒドン大学熱帯医学部との共同研究で臨床管理に関する研究、新しい治療法の開発研究を行った。

5) マラリアのワクチンの開発研究では、マラリア原虫エノラーゼ部分人工抗原 (AD22-MAP) を材料としたワクチン実験、さらには、同蛋白抗原を徐々に放出できる材料 (徐放性人工抗原) の生成を行った。

(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した。

臨床検体を利用した研究を行ったので、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取った。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った。

疫学研究に関わるので、わが国の文部科学省、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) (平成16年12月28日全部改正) (平成17年6月29日一部改正)」を、流行地における疫学調査研究にもあてはめた。しかしながら介入研究は行わず、観察研究を中心とした疫学研究を行ったので、また患者の遺伝学的な背景に関する研究も行わなかった。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、倫理面での問題が起きる可能性は少ないと判断している。

### C. 研究結果

1) 平成17年6月までの8ヶ月間に国際医療センタートラベルクリニックに渡航相談に訪れた52人のクライアントの内、ガイドラインに沿ったマラリア予防の適用があると判断されたのは27人であった。この内7人に軽微な副作用 (嘔気、耳鳴り、頭痛など) が認められた。しかしながら、予防内服グループにマラリア感染者はでなかった。一方適用が無いと判断された25人の主な根拠は、滞在の長さ、副作用への不安、基礎疾患の合併などであった。

一方、熱帯熱マラリア重症患者を経験し、昨年度の課題として基礎的な臨床研究成果を報告した ACT: artemisinin-based combination therapy の有用性を例証する機会を得た。本患者は54才

の日本人男性で、帰国後7日間も正しいマラリアの診断治療にたどり着けずに重症化に陥っていた。国立国際医療センターに救急搬送された後、直ちにアーテスネート静注薬で治療して救命し、メフロキンを追加して良好な予後を得た。

2) グリオトキシシンおよびアンホテリシンBは、培養系でクロロキン感受性・耐性の両株の増殖を阻害することが判明した。特にグリオトキシシンは原虫プロテオソームのキモトリプシン活性を低下させることを証明し、アンホテリシンBは原虫の早期栄養体に特異的に抗原虫作用を示すことが分かった。

3) ラオスのマラリア流行地で、ピリメサミン/サルファー剤合剤の耐性原虫の拡散状況を *in vivo* 耐性試験で解明し、同薬による治療が耐性分布状況をかえって悪化させていることを生殖母体陽性血症の分布を指標に証明した。一方ラオスへの *in vitro* 薬剤感受性試験の技術移転を行い、高いクロロキン耐性マラリアの分布を報告した。

さらにタイ・ミャンマー国境地帯の熱帯熱マラリア原虫では、クロロキン耐性 *in vitro* フェノタイプが *pfprt* T76 および *pfmdr1* Y86 の SNP と強い相関を示すことも解明した。同様の所見がフィリピンの流行地でも判明しつつある。

4) マヒドン大学の熱帯熱マラリア患者180人の open randomized study で新規 ACT としての dehydroartemisinin と piperazine の合剤の有効性を証明し、さまざまな病態の臨床研究を通してその指針を記載した。

5) 生成したマラリアワクチン候補抗原分子 AD22 の粒子は、最も小さな微粒子で数百 nm、大きな微粒子で 20  $\mu$ m 程度になった。AD22 の抗原性、ワクチン効果は、組み換え体のエノラーゼと同等の効果があるものと考えられた。

### D. 考 察

1) 「マラリア予防ガイドライン」は、その適用に関する限り、効果的な医療提供に結びつくための道筋を示していることが例証されたと考えられている。しかしながら、わが国からの渡航者の旅

行形態はきわめて複雑になってきており、渡航スケジュールのバラエティーに合わせたマラリア予防は、ガイドラインの遵守だけでは追いつかない例も散見された。すなわち、わが国ではメフロキンしか予防用に投与できないこと、さらに最長12週を目安としていることから、長期渡航者や、頻回渡航者には対応しきれない場面が多かった。当該項目の研究成果は、G. 研究発表（論文14、学会発表5、11）の通りである。

治療に関する臨床研究では、重症熱帯熱マラリア患者をACTで治療して完快に導いたが、わが国ではキニーネの使用が困難なこともあり、アーテミスニン誘導体の導入の必要性を強く認識した症例であった。当症例を含んだ「治療ハンドブック」を出版して、マラリアの治療に関するわが国の医療レベルの向上に寄与したと考える。

2) グリオトキシシンおよびアンホテリシンBは、すでに確立された抗真菌薬として使用されているので、本剤がマラリアの治療に有効であることが判明したことは、世界に再興する薬剤耐性マラリアに対する新規薬剤の開発に増して、喫緊の課題に対応するために有用であると考えられた。当該項目の研究成果は、G. 研究発表（論文1、8、学会発表9、10）の通りである。

3) 特にメコン川流域における薬剤耐性マラリアの分布は、世界のマラリアの疫学動態を占う上で極めて注目を浴びているが、われわれの研究結果として、着実なクロロキン耐性、ファンシダール耐性が証明でき、一方マラロンの耐性は現在のところ確認できないことが分かった。わが国からの渡航者への予防、治療を行う上で、薬剤の選択に重要な示唆を与えた。また、フィリピンにおける薬剤耐性の分布も、世界の耐性マラリアの拡散を考える上で貴重なデータを提示している。当該研究項目の成果はG. 研究発表（論文3、5、6、学会発表3、8、12）の通りである。

4) マラリアの病態、診断、治療の開発研究を行い、その指針を著書、総説等で表すことができたので、わが国におけるマラリアの医療の向上に一定の貢献ができたものと考えている。当該研究項

目の成果はG. 研究発表（論文2、7、8、10、11、12、13、15、16、学会発表2、4、6）の通りである。

5) マラリアの予防の究極はワクチンの開発であり、その開発研究は道程は長くとも一時とも休めてはいけないものとする。本研究では、新たな候補抗原の材料をナノスケールで提供し、その有用性や効果を検証したが、人レベルでの実用性を追求すべく研究は続けたい。本報告はマルセイユで開催された世界熱帯医学会で報告した。成果は、論文4、学会発表1、7、特許出願1、2の通りである。

## E. 結 論

昨年度出版・頒布を行うことができた「マラリア予防ガイドライン」の適用に関する臨床研究を展開し、本ガイドラインの有用性・有効性に関して、一定の評価を与えることができたと考えている。また、薬剤耐性マラリアや重症マラリアの患者管理の臨床研究も、わが国における医療機関だけでなく、マヒドン大学熱帯医学部との共同研究を通して大いに展開できたので、その成果を多くの論文、著書、総説に表すことができた。わが国におけるマラリアの医療の向上に一定の貢献ができたと考えている。

一方、アジアの流行地における薬剤耐性マラリアの疫学データの集積、国際学会等における新規治療法に関する情報収集は、今後も精力的に続けていかないといけない。ACTを中心とした治療法の開発が、いま世界の大きな潮流となっているが、本法のわが国への適切な導入無くして、安全で安心なマラリア患者の臨床管理は望めない。今後の課題として「マラリア予防ガイドライン」の見直しと改訂を続け、また、いわゆるSevere and Complicated Malaria（合併症を持つ重症なマラリア患者）の適切な治療ができるためのガイドライン作りも急がれる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Hatabu T, Takada T, Taguchi N, Suzuki M, Sato K, Kano S: Potent plasmodicidal activity of a heat-induced reformulation of deoxycholate-amphotericin B (Fungizone) against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(2): 493-6, 2005
- 2) Krudsood K, Kano S, Looareesuwan S: Malaria in Thailand. *In: Asian Parasitology vol.6: Malaria in Asia*. Kano S and Rivera PT ed., FAP Journal Ltd, Chiba, 1-84, 2005
- 3) Hatabu T, Vanisaveth V, Taguchi N, Kobayashi J, Mannoor MK, Watanabe H, Toma H, Phompida S, Kano S: A pilot field survey of in vitro drug susceptibility on *Plasmodium falciparum* in Lao PDR. *Trop Med Hlth* 33: 103-4, 2005
- 4) Omi K, Kuriyama K, Yamada K, Oku H, Kano S, Sato K, Suzuki M, Katakai R: Synthetic study of antigenic peptide having a partial sequence from *Plasmodium falciparum* enolase, *In: Peptide Science 2004*, Shimohigashi Y. ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, pp637-40, 2005
- 5) Hatabu T, Kawazu S, Kojima S, Sato S, Singhasivanon P, Looareesuwan S, Kano S: *In vitro* susceptibility and genetic variations for chloroquine and mefloquine in *Plasmodium falciparum* isolates from Thai-Myanmar border. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 36: 73-9, 2005
- 6) Mannoor MK, Vanisaveth V, Keokhamphavanh B, Toma H, Watanabe H, Kobayashi J, Hatabu T, Taguchi N, Hongvangthong B, Phetsouvanh R, Phompida S, Kano S, Sato Y: Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Lao PDR. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36(5): 1092-5, 2005
- 7) Tangpukdee N, Krudsood S, Thanachartwet W, Chalermrut K, Pengruksa C, Srivilairit S, Silachamroon U, Wilairatana P, Phongtananant S, Kano S, Looareesuwan S: An open randomized clinical trial of Artekin vs artesunate-mefloquine in the treatment of acute uncomplicated *falciparum* malaria. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 36(5): 1085-91, 2005
- 8) Hatabu T, Hagiwara M, Taguchi N, Kiyozawa M, Suzuki M, Kano S, Sato K. *Plasmodium falciparum*: The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmodicidal effect on *P. falciparum*. *Exp Parasitol* 112(3): 179-83, 2006
- 9) Susomboon P, Maneerat Y, Dekumyoy P, Kalambaheti T, Iwagami M, Komaki-Yasuda K, Kawazu SI, Tangpukdee N, Looareesuwan S, Kano S : Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes. *Parasitol Int.* 2006 (in print, available on line)



- 10) 石橋康子、狩野繁之、岡 慎一、高橋康雄、渡辺清司、広瀬英治、中野貴司、鈴木紘一：国際的寄生虫症の臨床感染制御に関する研究—国立病院機構・国立高度専門医療センター共同臨床研究—、*Clin Parasitol* 16(1), 2005 (in print)
  - 11) 狩野繁之：マラリア、感染症予防必携、第2版、山崎修道、他、監修、財団法人日本公衆衛生協会、東京、371-376, 2005
  - 12) 狩野繁之：原虫感染症・マラリア、疾患別最新処方、第4版、矢崎義雄、菅野健太郎監修、メジカルビュー社、東京、728-729, 2005
  - 13) 狩野繁之：マラリアの新しい薬、クリニカルトピックス、*BIO Clinica*、20(11), 83-87, 2005
  - 14) 狩野繁之：マラリア予防・治療ガイドライン、感染症、35(5), 13-18, 2005
  - 15) 狩野繁之：海外旅行とマラリア、化学療法の領域、21(10), 81-86, 2005
  - 16) 狩野繁之、鈴木守：輸血後発熱が認められ、その後急速に傾眠傾向、意識消失をきたした症例、症例に学ぶEBM 指向輸血検査・治療、大戸齊、他編、医師薬出版株式会社、東京、pp.166-170, 2005
2. 学会発表
- 1) Kano S, Kawazu S, Komaki-Yasuda K, Yano K, Looareesuwan S, Konno K, Hatabu T, Taguchi N, Sato K, Oku H, Katakai R, Suzuki M: Malaria vaccine candidate using enolase antigen of *Plasmodium falciparum*. *Medicine and Health in the Tropics* (XVIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria), Marseille, France, 11-15 September, 2005
  - 2) Sanjoba C, Arakaki N, Looareesuwan S, Kano S, Matsumoto Y: MRP8/14 as a marker for severity in falciparum malaria, *Medicine and Health in the Tropics* (XVIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria), Marseille, France, 11-15 September, 2005
  - 3) Naoshima-Ishibashi Y, Iwagami M, Kawazu S, Looareesuwan S, Kano S: Analysis of cytochrome *b* mutations in *Plasmodium falciparum* isolates in Thai-Myanmar border, 1st International Conference of the Journal of Travel Medicine and Infectious Disease, Royal College of Surgeons of England, London, UK, 10-11 November, 2005
  - 4) Kano S: Treatment of malaria in Japanese travelers, Joint International Tropical Medicine Meeting 2005, The Grand Hotel, Bangkok, Thailand, 30 November – 2 December, 2005
  - 5) Mizuno Y, Kanagawa S, Kudo K, Kano S: Chemoprophylaxis against malaria according to the guidelines for Japanese oversea travelers: current analyses at a referral hospital, The Grand Hotel, Bangkok, Thailand, 30 November – 2 December, 2005
  - 6) Susomboon S, Maneerat Y, Dekumyoy P, Kalumbaheti T, Iwagami M, Kano S, Looareesuwan S: Early adhesion molecule induction by cytoadherence of malaria-infected red blood cells and comodulation of immune cells: the roles of parasite adhesion and time course, The Grand Hotel, Bangkok, Thailand, 30 November – 2 December, 2005

- 7) Kano S: Observations on the efficacy of a recombinant and a synthetic *Plasmodium falciparum* enolase vaccine in *Aotus trivirgatus*, The 40th Annual Meeting of the Parasitic Diseases Panel of the U.S. – Japan Cooperative Medical Science Program, Washington Hilton Hotel and Towers, Washington DC, USA, 10–11 December, 2005
- 8) 石上盛敏、駒木一安田加奈子、ピラリタ・リベラ、河津信一郎、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性株の *in vitro* 混合培養における薬剤耐性株の選択、第74回日本寄生虫学会大会、米子コンベンションセンター、2005.4.8–9.
- 9) 畑生俊光、高田剛、田口直、鈴木守、狩野繁之、佐藤久美子：熱処理アムホテリシン B による抗マラリア原虫効果の検討、第74回日本寄生虫学会大会、米子コンベンションセンター、2005.4.8–9.
- 10) 荻原昌樹、田口直、畑生俊光、鈴木守、狩野繁之、佐藤久美子：真菌由来抗生物質グリオトキシシンによる抗マラリア原虫効果の検討、第74回日本寄生虫学会大会、米子コンベンションセンター、2005.4.8–9.
- 11) 狩野繁之、水野泰孝、宮村和夫、春木宏介、奥沢英一、濱田篤郎、木村幹男：日本の旅行者のためのマラリア予防ガイドライン、第54回日本感染症学会東日本地方会総会、東京ドームホテル、2005.10.28.
- 12) 石上盛敏、Pilarita T. Rivera、畑生俊光、河津信一郎、狩野繁之：フィリピンで分離した熱帯熱マラリア原虫株のクロロキン (CQ) 耐性関連遺伝子 *pfprt* 変異 (K76T) と *in vitro* CQ 感受性の相関について、第65回日本寄生虫学会東日本支部大会、東京慈恵会医科大学大学1号館講堂、2005.10.29.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
- 1) 奥浩之、小見和人、栗山佳祐、山本隼也、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エノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法、特許協力条約に基づく国際出願 PCT/JP2005/017851 (平成17年9月28日)
- 2) 奥浩之、小見和人、栗山佳祐、山本隼也、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エノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法、タイ王国への国際出願 TH2005 /104703 (平成17年9月28日)
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28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。薬剤耐性とGSH総量は関連していた。又、クロロキン耐性株は、キニーネに対しても耐性を獲得しており、薬剤耐性は薬剤の efflux のみならず酸化ストレスの efflux も寄与していると思われる。ピペラジン誘導体は、キニーネに対する耐性も解除し、多剤耐性克服効果が期待される。

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：新規構造の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28化合物合成し、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。

4) キニーネについては BALB/c マウスを用い *Plasmodium chabaudi* (As strain : chloroquine - resistant 及び sensitive) で同様に検討した。

#### 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 1 2 3 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。

5) クロロキン耐性株は、キニーネに対しても耐性を有しており、DSP はこの耐性も解除した。感受性株では、DSP はキニーネの増感作用を示した。

#### D. 考察

薬剤耐性の一因として、GSH を介した酸化ストレスの efflux の亢進が考えられ、この為、1 つの薬剤に耐性を獲得すると、同時に多剤に対しても耐性を獲得すると考えられる。DSP はキニーネ耐性も解除し、GSH を介した酸化ストレスの efflux を抑制して薬剤耐性を解除していると考えられ、多剤耐性の解除についても期待される。

#### 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) 薬剤耐性の一因に酸化ストレスの GSH を介した efflux があり、DSP はこの efflux を抑制するものと考えられる。この為、DSP は多剤耐性の解除作用が期待できる。

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) Okabayashi H, Thongthien P, Singhasvanon P, Waikagul J, Looreesuwan S, Jimba M, Kano S, Kojima S, Takeuchi T, Kobayashi J, Tateno S: Keys to success for school-based malaria control program in primary school in Thailand. Parasitol Int, 2006 (in press, available on line)
- 2) 小林 正規, 今井栄子, 早川枝李, 竹内 勤: マラリアなどの原虫検査. 検査と技術 33(11) (増刊号), 1161-1165, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

- 1) 竹内 勤, 他, 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 (特開 2005-272354 号), 平成 17 年 10 月 6 日
- 2) Takeuchi T et al.: Dibenzosuberlyl piperazine derivatives and drug-resistance overcoming agents containing the derivatives (US 6,881,841) Apr 19, 2005

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 群馬大学工学部材料工学科 助教授

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)日本人に多く見られる急性期の病態に関連して、人工抗原分子の合成技術改良と国際特許出願(PCT 加盟国とタイ王国)。(2)これを利用した2種類の微粒子デバイス(徐放性粒子および金コロイド粒子)。(3)クロロキン耐性に関連した2種類の原虫蛋白質のペプチド材料(PfCRTとHRP-II)の製造。

A. 研究目的

近年盛んになった人や物資の国際移動に伴い、急速に増えつつある新興再興感染症の一つとして、日本人渡航者および入国者による輸入マラリアが問題となっている。特に日本人にとって Pf による症例は、高度の緊急性をもつ急性疾患である、熱帯熱マラリア (Pf) の症例増加が顕著であり、早期診断と適切な処置が必要とされている。一方に於いて、流行地への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について研究開発を行った。

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の化学合成する技術。その国際特許出願による権利化。  
(2) 人工抗原を利用した微粒子デバイス。(3) クロロキン耐性に関与する蛋白分子の化学合成。いずれもペプチド合成化学、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

この人工抗原は 22 残基のポリペプチドから構成され、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。今年度は大量合成(例えば、500 mg (約 1000 人分))に必要な技術課題の改良と特許の国際出願を行った。本技術は科学技術振興機構から高い評価を受けて、PCT 加盟国以外にタイ王国への出願を認められた。現在は指定国移行への手続きを行っている。得られた成果は、論文発表[1]・学会発表[2]・特許出願[1,2]を行った。

(2) 人工抗原を用いた微粒子デバイス

上記で製造された人工抗原を2種類の微粒子デバイスとすることに成功した。本年度は(a)徐放性マイクロ～ナノ微粒子、(b)金ナノ微粒子、を作成した。これは平成16年度の成果である検査用マイクロビーズと合わせて3種類の微粒子を得た。これらの詳細は特許出願後に公表を行う。そのうち徐放性微粒子の基材は、科学技術振興機構を通して国際特許出願(PCT 加盟国)を行った。現在は指定国移行の手続きを行っている。また徐放性基材に関して、論文発表(2)・学会発表(1,3,6)・特許出願(3)を行った。

(3) クロロキン耐性に関与する蛋白分子

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製造方法を研究した。クロロキントランスポーター(PfCRT)とヒスチジンリッチプロテインII(HRP-II)について得られた成果は、論文発表(3,4)・学会発表(4,5,7)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に関し 4 点の研究成果を得た。

(1) 徐放性人工抗原微粒子、(2) 人工抗原金微粒子、(3) クロロキン耐性に関与する蛋白分子の製造方法。これらを用いることで、日本人に多い急性期患者の予防・診断・治療時に於ける薬剤効果の判定に役立つことが期待される。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) H. Oku, K. Kuriyama, K. Omi, K. Yamada, and R. Katakai. N-tert-Butoxycarbonyl-O-Benzyl-L-Threonyl-L-Proline Trichloro-ethyl Ester (Boc-L-Thr (Bzl) -L-Pro-OTce). Acta Cryst., E61, o3867-o3869, 2005
- 2) T. Suda, Y. Chida, H. Oku, K. Yamada, R. Katakai. Synthesis and Properties of Sequential Depsipeptides for Drug Delivery System. In Peptide Science 2005, T. Wakamiya, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, in press.
- 3) T. Morota, H. Oku, K. Yamada, and R. Katakai. Synthesis and Properties of a Model Peptide Containing Mutant Transmembrane Sequences from *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistant Transporter (PfCRT). In Peptide Science 2005, T. Wakamiya, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, in press.
- 4) M. Hanyu, K. Yamada, H. Oku, and R. Katakai. Synthetic Study of Histidine-Rich Protein II Analogs from *Plasmodium falciparum*. In Peptide Science 2005, T. Wakamiya, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, in press.

### 2. 学会発表

- 1) 奥浩之、七里一彰、井上彩、山田圭一、片貝良一：温度応答性ポリデプシペプチドの合成と性質、日本化学会第 83 春季年会、横浜、2005.3.28

- 2) 小見和人、山本隼也、奥浩之、山田圭一、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液相合成研究、第 54 回高分子学会年次大会、横浜、2005.5.25
- 3) 須田智広、江森野歩、山田圭一、奥浩之、片貝良一：ポリデプシペプチドの合成及び生体材料への応用、第 54 回高分子学会年次大会、横浜、2005.5.25
- 4) 諸田委弘、奥浩之、山田圭一、片貝良一：熱帯熱マラリア原虫由来クロロキン排出トランスポーターの変異部位を有するモデルペプチドの合成・性質、第 42 回ペプチド討論会、豊中、2005.10.27
- 5) 破入正之、山田圭一、奥浩之、片貝良一：熱帯熱マラリア原虫由来ヒスチジンリッチプロテインアナログの合成研究、第 42 回ペプチド討論会、豊中、2005.10.26.
- 6) 須田智広、千田陽子、山田圭一、奥浩之、片貝良一：デプシペプチドの合成と DDS (ドラッグデリバリーシステム) への応用、第 42 回ペプチド討論会、豊中、2005.10.27.
- 7) 破入正之、山田圭一、奥浩之、片貝良一：Aib を含むマラリア原虫由来ヒスチジンリッチプロテイン II アナログの合成と性質、日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006.3.28.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

- 1) 奥浩之、小見和人、栗山佳祐、山本隼也、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エノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法、特許協力条約に基づく国際出願 (PCT/JP2005/017851)
- 2) 奥浩之、小見和人、栗山佳祐、山本隼也、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エノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法、タイ王国への国際出願 (TH2005 /104703)
- 3) 奥浩之、七里一彰、平 知広、井上彩、山田圭一、片貝良一：温度応答性デプシペプチドポリマー、特許協力条約に基づく国際出願 (PCT/JP2005/019332)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 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 摘脾した感染リスザル由来 *Plasmodium falciparum* 感染新鮮赤血球を大量にリスザルに静脈内接種することにより、重症熱帯熱マラリア患者と同様の様々な病態を再現することができる。本研究ではこの重症マラリアモデルを用いて、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、急性マラリア脾腫が赤脾髄における MRP8/14 陽性マクロファージや CD63 陽性マクロファージの増加によっておこることを明らかにした。また、血漿中の MRP8/14 濃度が感染前に比べ、死亡時に顕著に増加していることがわかった。さらに、タイ人熱帯熱マラリア患者の血漿中の MRP8/14 濃度が著しい高値を示すというこれまでの成果をふまえ、今回、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12 の各サイトカイン濃度を測定し、MRP8/14 濃度と比較したところ、MRP8/14 濃度が最も重症度を反映していた。さらに、重症度の高いマラリア患者において、MRP8/14 濃度と TNF- $\alpha$ 濃度に相関性があることが示唆された。これらの結果より、熱帯熱マラリアにおいて MRP8/14 が重症度の指標の一つとして有用であることが示唆された。

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、脾腫に加え、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、また脳症症状を伴う場合は適切な処置が施されなければ致死性である。ところが、熱帯熱マラリアの病態形成メカニズム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、摘脾した感染リスザルから得られた新鮮感染赤血球を大量にリスザルに静脈内接種することにより、ヒト重症熱帯熱マラリアと同様の様々な病態を再現することに成功した。今回、この重症熱帯熱マラリアモデルを用いて、感染早期に見られるマラリア脾腫の病態形成に関し、病理組織学的および抗 MRP8/14 抗体と抗 CD63 抗体を用いた免疫組織化学的解析を行い、さらに、血中の MRP8/14 レベルの測定を行った。また、タイ人重症熱帯熱マラリア患者の血漿中の MRP8/14 濃度が著しい高値を示したこれまでの成果をふまえ、血漿中の他のサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12)濃度と、MRP8/14 濃度を比較した結果を報告する。

B. 研究方法

原虫は熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* Indochina-I/CDC 株、動物ホリスザル(*Saimiri sciureus*)を用いた。感染赤血球(IRBC)のドナーとして、摘脾した感染リスザルから得られた新鮮な感染赤血球  $5 \times 10^9$  個を静脈内接種した。これら感染リスザルの脚臓について、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)および抗ヒト CD63 抗体による免疫組織化学染色を行った。MRP8/14 レベルはヒト MRP8/14 ELISA Kit (Buhlmann)を用いて測定し、450 nm における OD $\pm$ SE 値で示した。

タイのマラリア患者血漿は、全て Dr. S. Locareesuwan (Mahidol University) から供与された。末梢血塗抹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 患者に分け、さらに severe malaria グループは、その症状の程度により 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康者の血漿を用いた。サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12)濃度は ELISA 法を用いて測定し、濃度 $\pm$ SE pg/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有のバイオハザード動物実験室 (P2) にて

行った。また、文部科学省および厚生労働省が規定する「疫学研究に関する倫理指針」に従い、研究対象者からはインフォームドコンセントを受け、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

感染リスザルは、IRBC 接種後 8~12 日目に感染赤血球率が 25~51%に達し、すべてのサルで昏睡など重篤症状がみられ、死亡した。死亡時に剖検を行った 3 個体について脾臓を肉眼的に観察したところ、いずれの個体でも暗褐色を呈した顕著な脾腫が観察された。感染リスザル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と比べて赤脾髄で単核系細胞の増加が認められ、マラリアピグメントの著しい沈着がみられた。免疫組織学的解析の結果、赤脾髄で MRP8/14 および CD63 陽性マクロファージの増加が観察された。特に MRP8/14 陽性マクロファージの著しい増加が認められた。さらに、soluble form として血中に放出されることが知られている MRP8/14 の血中レベルの測定を行った結果、感染前が  $0.007 \pm 0.006$  であるのに対し、死亡時には  $0.227 \pm 0.032$  と著しく上昇していた。

タイ人マラリア患者の血液中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12 の各サイトカインの濃度を測定した結果、熱帯熱マラリアの severe malaria 患者 (n=21) では TNF- $\alpha$  が  $13.8 \pm 2.2$  pg/ml、IFN- $\gamma$  が  $79.6 \pm 17.5$  pg/ml、IL-12 が  $1.4 \pm 0.29$  pg/ml、moderate severe malaria 患者 (n=19) では TNF- $\alpha$  が  $16.7 \pm 5.2$  pg/ml、IFN- $\gamma$  が  $73.7 \pm 17.5$  pg/ml、IL-12 が  $1.2 \pm 0.28$  pg/ml、mild malaria 患者 (n=20) では TNF- $\alpha$  が  $12.7 \pm 3.4$  pg/ml、IFN- $\gamma$  が  $31.5 \pm 13.0$  pg/ml、IL-12 が  $0.6 \pm 0.04$  pg/ml であった。コントロールとして用いた vivax malaria 患者 (n=15) では TNF- $\alpha$  が  $23.9 \pm 11.2$  pg/ml、IFN- $\gamma$  が  $26.2 \pm 7.4$  pg/ml、IL-12 が  $0.7 \pm 0.09$  pg/ml、日本人健康者 (n=20) では、TNF- $\alpha$  が  $7.8 \pm 2.3$  pg/ml、IFN- $\gamma$  が  $5.8 \pm 2.7$  pg/ml、IL-12 が  $0.9 \pm 0.11$  pg/ml であった。マラリア患者における TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  濃度は、日本人健康者に比べて高い値を示した。また、severe および moderate severe malaria 患者の IFN- $\gamma$  濃度は mild malaria 患者や vivax malaria 患者に比べて高い値を示した。TNF- $\alpha$  および IL-12 濃度は、それぞれのマラリア患者間で差はみられなかった。しかしながら、severe および moderate severe malaria 患者グループにおいて、MRP8/14 濃度と TNF- $\alpha$  濃度に相関性がみられた。これらの結果は、MRP8/14 が重症化の指標の一つとして有用であることを示唆している。

### D. 考察

MRP8/14 は遊走阻止因子関連タンパク(MRP)8 およ

び 14 のヘテロダイマーで、機能は未だ不明だが、リウマチや膀胱炎やオンコセルカ症等の様々な急性の炎症に関連していることが知られている(Sorg. et al. 1998, Hogg et al. 1998, Sampson et al. 2002)。

MRP8 および 14 はマクロファージ、好中球が産生することが知られ、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。マラリア患者で高値を示した血中 MRP8/14 濃度は、脾臓マクロファージが主な産生細胞であることが示唆される。

TNF- $\alpha$  は重症マラリアとの関連性を示す報告があるが (Grau et al. 1989)、今回の結果は、TNF- $\alpha$  よりも MRP8/14 が熱帯熱マラリアの重症度との高い相関性を有することを示した。重症度の強いマラリア患者で相関性がみられた MRP8/14 と TNF- $\alpha$  の関係については今後解析を進めていく必要がある。

### E. 結論

重症マラリアにおいて、1)重症マラリアを呈したリスザルの脾臓の赤脾髄で MRP8/14 が増加し、2)血中 MRP8/14 レベルが顕著に増加し、更に 3)重症マラリア患者の血中 MRP8/14 濃度が、重症度と一致して高値を示した。これらのことから、脾臓で増加した MRP8/14 陽性マクロファージから血中に MRP8/14 が放出されることにより、血中 MRP8/14 濃度が増加することが示唆され、熱帯熱マラリアにおいて MRP8/14 が重症化の指標の一つとして有用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

1) 松本芳嗣、三條場千寿：環境変化による感染症流行の危機- 沙漠緑化と感染症の増加-、地球環境、10(1)：59-69、2005

#### 2. 学会発表

1) Arakaki N, Katakai Y, Hayano M, Hattori S, Sanjoba C, Baski S, Asada M, Saeki K, Onodera T, Kano S, Matsumoto Y: Experimental severe falciparum malaria in squirrel monkey. XVIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Marseille, France, 11-15 Sept, 2005

2) Sanjoba C, Arakaki N, Looareesuwan S, Kano S, Matsumoto Y: MRP8/14 as a marker for severity in falciparum malaria. XVIth International congress for Tropical Medicine and Malaria, Marseille, France, 11-15 Sept, 2005

### H. 知的財産の出願・登録状況 なし



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安全な、マラリア媒介蚊の吸血回避デバイスの提案をめざして、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の効果を、媒介蚊の多い熱帯現地にて評価した。試作品の吸血阻止効果は屋外においても顕著であった。効果は5 - 10 m<sup>2</sup>あたり2本使用で12週、4本では15週持続した。コスト低減が次の課題である。

A. 研究目的

近年海外渡航者の増加と行先の多様化が顕著である。特にエコツーリズム等に代表される熱帯の森林・山地や奥地・僻地への渡航の増加は、熱帯現地でマラリア原虫を保有したハマダラカの吸血に遭遇し、マラリアに感染する確率を確実に高めることになる。媒介蚊からの吸血を回避する手段としては、露出部減少、蚊帳、蚊取り線香、忌避剤塗布など種々の方法が知られているが、何れも多少の苦痛・不快や常用に対する健康不安を伴うので無条件に推奨出来るものではない。

最近、蚊取り線香などと同じピレスロイド系殺虫剤でありながら従来の物のように殺虫成分を空間に揮発させるのに加熱する必要がない、所謂常温揮発性のピレスロイドが開発された。ピレスロイドは、一方で蚊が忌避する効果も顕著である。新しいピレスロイド（薬品名：メトフルスリン）の上記ふたつの利点を最大活用した、一定空間に対する吸血回避デバイスが開発されれば、蚊の薬剤抵抗性発達を抑制しつつ手

軽かつ安全な感染リスク軽減方法を新たに提示することが出来る。

今年度は昨年度に引き続いてメトフルスリンを含有した空間に対する吸血回避デバイスの改良を進めた。特に徐放性の改善を追求課題の第一においた。

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、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

現地データはマラリア常在地である上記島の1郡にて2005年8月に実施した。前年より改良を施した、メトフルスリン5%練り込み輪状メッシュ樹脂（直径11.5cm、長さ37cm）を屋外の談笑用屋根付き壁無し縁台（現地名ブルガ）に一定数吊り下げ、人（2名）を囲として、日没後から24時まで、成虫の採集を試みた。薬剤から囲までの距離は何れも1.5m以内とした。別にメッシュ樹脂を吊り下げないブルガ数個を対照とした。

#### (倫理面への配慮)

罹患リスクを伴う方法での人囀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

前年の結果からメトフルスリンの吸血阻止効果と有効な濃度の概略は明らかになっていたので本年度は特に効果の持続性に注目し、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たメトフルスリン練り込み輪状メッシュ樹脂のみを供試した。その結果、上記試作品を2個吊り下げた状態では、前年並みの12週間まで有意に屋外のブルガにおける雌蚊の吸血を有意に阻止した。また、4個吊り下げた場合には15週間に亘って効果が認められた。

#### D. 考察

常温揮発性ピレスロイド(メトフルスリン)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2本使用で吸血阻止効果が約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である。徐放性をコントロール出来る見通しは立つので、残された課題はコストを如何に下げるかであろう。

#### E. 結論

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。その結果、上記デバイスの吸血阻止効果は明瞭で、効果は2個使用の場合約12週、4個使用では15週持続した。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

- 1) Kawada H, Maekawa Y, Takagi M: Field trial on the spatial repellency of metofluthrin-impregnated plastic strips for mosquitoes in shelters without walls (berga) in Lombok. Indonesia J Vec Ecol 30(2): 1-5, 2005

#### 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

## 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 |              |                    |  |
| 渡航目的及び見込まれる成果(全体)  |                                |              |                    |  |
| <p>日本人旅行者のマラリア対策が適切に行なわれるためには、その実態の把握、すなわちサーベイランスが適切に行われる必要がある。しかし現状では、近年複雑化した国際交流に対応するサーベイランスになってはいない。欧米先進国ではその点を考慮したサーベイランスを行なっているが、それらを把握し、わが国に最適なシステムを構築する必要がある。また、マラリア予防については旅行者の行動特性を把握し、適切なアドバイスに結びつける必要がある。今回の2つの会議はそのための絶好の機会である。</p> <p>申請者は日本における GeoSentinel サイトの選定に尽力し、また、第9回国際旅行医学会議のプログラム委員として準備に携わっていた。そのため、世界の旅行医学専門家との密な関係を確立している。</p> |                                |              |                    |  |
| 日程<br>(実績)   | 出発地                            | 到着地<br>(宿泊地) | 訪問機関名<br>訪問者名等     | 用務の概要<br>(個別欄)   |
| 4/29<br>～<br>4/30  | 成田                             | カスカイス        | GeoSentinel サイト長会議 | 旅行者感染症の定点サーベイランスを行なっている GeoSentinel の責任者会議にて、日本の旅行医学の現状と問題点について発表・討論し、日本のマラリアのサーベイランスについても議論した。                |
| 5/1<br>～<br>5/4  | カスカイス                          | リスボン         | 第9回国際旅行医学会議        | 旅行者の疾患予防を目的とする本会議において、日本人旅行者のマラリア予防、とくにスタンバイ治療の研究成果を発表・討論した。今後、日本人旅行者のマラリア予防につき、どのようなアプローチをすべきかについて有益な示唆が得られた。 |
| 5/5  | リスボン                           | 機中泊          |                    |  |
| 5/6  | 機中泊                            | 成田           |                    |  |

## 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         | 高木 正洋・長崎大学熱帯医学研究所  |                |                |  |
| 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  |                |                |  |
| 渡航目的及び成果(全体)      | <p>現在マラリア媒介蚊防除の主流は殺虫剤含浸蚊帳によるものであるが、これは行動の自由を奪う他、就寝時のみ有効という限界をもつ。スペースリペレントは、この弱点を克服できる防除手段として注目に値する。新しい忌避剤が開発されてきているのでこれを実験室でなく現実的な状況で評価するが、精度を保證するためには媒介蚊密度の高いことが必須で、そのためには熱帯のフィールドが有利である。ロンボク島はその条件を満たしており、日本からの渡航が増加しつつある点でも実施する意義が高い。</p> <p>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の効果を、ロンボク島で評価した。試作品の吸血阻止効果は屋外においても顕著であった。効果は5-10m<sup>2</sup>あたり2本使用で12週、4本では15週持続した。コスト低減が次の課題である。</p> |                |                |  |
| 日程<br>(実績)        | 出発地  | 到着地<br>(宿泊地)   | 訪問機関名<br>訪問者名等 | 用務の概要<br>(個別欄)                         |
| 8/18              | 長崎<br>(福岡空港) 発   | デンパサール         |                |  |
| 8/19<br>～<br>8/21 | デンパサール   | マタラム           | 西ヌサトゥンガラ州衛生局   | マラリア媒介蚊の空間忌避剤による防除臨地試験。蚊帳に頼らない防除方法の開発。 |
| 8/22              | マタラム   | デンパサール         |                |  |
| 8/22              | デンパサール   | 機中泊            |                |  |
| 8/23              | 機中泊  | (福岡空港) 着<br>長崎 |                |  |
| 旅費積算内容内訳          |  |                |                |  |