

「結果」

熱帯熱マラリア原虫感染リスザル 4 頭では、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。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。1 頭は感染 8 日目(Parasitemia45%)に剖検を行った。死亡した 3 頭および剖検をした 1 頭から採取した脾臓はいずれも長軸で 2 倍に伸張した暗褐色の顕著な脾腫が観察された。感染リスザルの病理組織学的解析の結果、脾臓に単核系細胞の著しい集簇がみられ、赤脾髄においてマラリアピグメントを含む感染赤血球が貪食されているのが確認された。また、電子顕微鏡による超微形態学的観察を行った結果、病理組織学的観察と同様、多数の感染赤血球を含む単核細胞、および多数のマラリアピグメントを含む単核細胞が観察された。したがって、赤脾髄において単核細胞の貪食能が亢進されていることが示唆された。さらに、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、赤脾髄での MRP8/14 陽性マクロファージの著しい増加が認められた。タイマラリア患者血漿中の MRP8/14 濃度は、熱帯熱マラリアの severe malaria patients (n=21) では 75.5 ug/ml (± 14.8 ug/ml)、moderate malaria patients (n=19) では 45.7 ug/ml (± 9.4 ug/ml)、mild malaria patients (n=20) では 25.1 ug/ml (± 5.3 ug/ml)であり、三日熱マラリア患者 (n=15)の 13.4 ug/ml (± 2.1 ug/ml)や日本人健常者 (n=20) の 2.0 ug/ml (± 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 以下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 以下の群において、mild malaria patients 20.1 ug/ml (± 6.4 ug/ml)や三日熱マラリア患者の 10.5 ug/ml (± 2.5 ug/ml)と比較すると severe/Moderate malaria patients の血漿中の MRP8/14 が 65.2 ug/ml (± 13.6 ug/ml) と著しく高い値を示した。

「考察および結論」

リスザルを用いた重症化モデルで、マラリア脾腫の病態形成が赤脾髄において MRP8/14 陽性細胞の増加が関与していることが示唆された。MRP (MIF related protein)は、S100 protein family に属するカルシウム結合タンパクである。MRP8/14 は 1983 年に antimicrobial protein として好中球の細胞質にその存在が示唆され、近年では、マクロファージの浸潤を誘導し、リウマチや膀胱炎、オンコセルカなどの疾患での関与が報告されている。その機能は未だ不明だが、マラリア患者血漿中の MRP8/14 濃度は血液中の malaria parasites と相関するだけでなく、病態とも相関することが示唆されたことから、MRP8/14 が重症化および急性感染のマーカーとして有用であることが示された。

これらの結果はフランスのマルセイユで開催された Medicine and Health in the Tropics congress (2005年9月11-15日)において MRP8/14 as a marker for severity in falciparum malaria (Chizu Sanjoba, Nana Arakaki, Sornchai Looareesuwan, Shigeyuki Kano, and Y. Matsumoto) と題し報告した。

(様式10)

[若手研究者育成事業]
(新興・再興感染症研究推進事業)

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名 破入 正行
2. リサーチ・レジデント期間
平成17年4月1日 ～ 平成18年2月28日
3. 受入機関
名称： 群馬大学
所在地： 群馬県桐生市天神町1-5-1
4. 受入研究者
所属： 群馬大学工学部材料工学科
職名： 助教授
氏名： 奥 浩之
5. 研究課題
マラリア感染予防及び治療に関する研究
6. 研究活動の概要

平成17年4月1日より上記4の研究指導者の下においてマラリア感染予防及び治療に関する研究に関し、3点について成果を得た。すなわち(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効率的生産方法、(2)人工抗原を利用した徐放性ナノ微粒子の作成、(3)マラリア感染の検査キットに用いられるHRP-II関連分子の効率的合成法、について開発を行った。

「人工抗原の徐放性ナノ微粒子化」

マラリア対策に必要な人工抗原分子について我々は、群馬大学の鈴木・狩野らのフィールドワークから得られた、熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼ(Pfエノラーゼ)を用いている。これは日本人感染者をはじめとする非流行地域に多く、また、流行地域の小児が示す、急性マラリアに特有な抗原分子であり、予防免疫に効果のあることが期待されている。さらに、Pfエノラーゼ分子そのものや部分アミノ酸配列が人工抗原として適していることが、群馬大学と国際医療センターの共同研究グループにより明らかにされている。

そこで今回、生体の皮下で数ヶ月～1年の期間で分解し抗原分子を少しづつ必要なだけ放出することの可能な、徐放性微粒子の開発を行った。これは「流行地の居住者はマラリア原虫に間欠的に何度も感染することで免疫機構を維持し、重症化を防いでいるのではないか？」という仮説に基づ

ている。今回用いた、Pf エノラーゼの部分アミノ酸配列 (AD22) をスキーム 1 に示す。この配列はウサギやヨザルを用いた実験により免疫原性のあることが確認されている。

Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp

(スキーム 1)

研究は (1) 抗原ペプチドの効果的合成、(2) 生体吸収性と徐放性を兼ね備えたマイクロ・ナノ微粒子の作成、の順に行った。詳細を下記に示す。

1. 抗原ペプチドの合成と合成法の効率化

一般に 20 残基程度のオリゴペプチドでも免疫原性を示すがその抗体価は低いと考えられている。有効な改善法の一つとして分岐型枝分かれペプチドと抗原ペプチドからなる多抗原ペプチドの利用があげられる。しかしながら、多抗原ペプチドは水溶性に乏しいため、ペプチドを用いた多抗原ペプチドを臨床の場に供する上で重要なのは水系溶媒への溶解性を獲得することである。以前、AD22 の N 末端側に Glu 残基を 5 個 (計 20 個)、分岐枝分かれ部位の C 端側に Glu 残基を 4 個導入した多抗原ペプチドの合成がすでに試みられている。多抗原ペプチドの合成は非常に困難ではあったが、水に対する溶解性が大幅に向上したことが認められた。そこで検査キットへの応用を指向するため、Cys の側鎖を利用することが考えられた。そこで、分岐型枝分かれ側の Glu 残基の C 端側に Cys 残基を導入した多抗原ペプチドの合成を検討した。多抗原ペプチドの合成は固相ペプチド合成法を用いた。その際、固相担体の種類を変えることで初期アミノ酸導入量に左右されず比較的簡単に粗生成物を得ることが可能となった。さらに、粗生成物の精製方法を 30%酢酸水溶液によるゲルクロマト法で行うことで、より簡便に精製できることを明らかにした。また、アミノ酸分析を行うことで得られた多抗原ペプチドは目的物であることであることを同定した。以上の知見は、マラリア原虫由来の抗原ペプチドの多抗原化を飛躍的かつ迅速に行うことができると考えられる。

2. 人工抗原を利用した徐放性マイクロ・ナノ微粒子の作成

一般に、疾病の治癒に必要な薬物を一度投与すれば疾病の完治まで有効濃度を維持できる方法、すなわち徐放性の薬物送達系は、医療の各分野で盛んに研究開発が行われている。我々は、「流行地の居住者はマラリア原虫に絶えず感染することで免疫機構を維持し、重症化を防いでいるのではないか？」という仮説を模擬的に再現するために、人工抗原を皮下で一定期間放出することの可能な徐放性マイクロ・ナノ微粒子を作成した。

徐放性人工抗原としてのマイクロ・ナノ微粒子の作成法、試薬、溶液の混合比は「リユープリン」の製造方法を参考にした。即ち、微粒子の基材はポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA と略称) のうち、乳酸とグリコール酸の組成比が 75 : 25 の基材を選択した。但し分子量は 2 万とリユープリンの 1 万より大きい。これはリユープリンが 1 ヶ月ほどで消失してしまうため、より高分子量で分解速度の遅い基材とした。また人工抗原ペプチドはゼラチン水溶液として用いた。これは「リユープリン」に於いては薬物を保護するためと説明されているが、球状微粒子の安定化にも必要であった。

PLGA のジクロロメタン溶液（揮発性の高い有機溶媒）5 mL と人工抗原（AD22-MAP）のゼラチン水溶液 0.8 mL を室温で混合し、超音波処理を 80 分行い、溶液が乳化することを確認した。この懸濁液に対し、0.5% PVA 水溶液 200mL を少しづつ加え再び超音波処理を 80 分行い、溶液が乳化することを確認した。こうして得られた W/O/W エマルジョンを 24 時間攪拌しナスフラスコから有機溶媒を揮発させ、微粒子を得た。析出した固形物をろ別、次いで蒸留水で洗浄し白色のパウダーを得た。粒径の大きな微粒子や不定形の固まりは沈殿し易く、粒径の小さな微粒子は分散しやすい。沈降速度の差で生成物は 3 つに分画した。このパウダーを走査型電子顕微鏡で観測したところ、形状は球形であった。最も小さな微粒子で数百 nm、大きな微粒子で 20 μ m 程度になった。

以上の結果より、人工抗原ペプチドを合成し、球形でマイクロン～ナノサイズの微粒子とすることに成功した。今後、抗原ペプチドの徐放挙動について免疫学的な検討のみならず、分析化学的な方法を合わせて研究の進展が期待される。

「熱帯熱マラリアの感染検査キットに用いられる HRP-II 関連分子の合成的研究」

熱帯熱マラリアの感染キットに最も多く用いられている蛋白分子、HRP-II は His-His-Ala 配列の繰り返し構造から構成されている。この HRP-II は配列中の Ala 残基を α -アミノイソ酪酸(Aib)に置換することで蛋白構造が安定化し、小分子量でも HRP-II と同様な生理活性や免疫反応性を示すことが期待される。そこで HRP-II 関連分子の化学合成を行った。

1. HRP-II 関連分子の化学合成

His-His-Aib 配列の繰り返しユニットを持つ、HRP-II 関連分子を化学的に合成した。製造の効率化を考え、His 誘導体及びそれらのペプチド合成は液相法により行った。その結果、低コストで大量に合成できる新規手法を確立した。

2. HRP-II 関連分子の *in vitro* 系に於ける活性試験

HRP-II の生理作用は、原虫体内で発生する遊離のヘムを無毒化することにあると考えられている。すなわち、原虫は増殖に必要なアミノ酸を得るために赤血球に寄生しヘモグロビンを消化する。消化されたヘモグロビンは 4 分子のヘムを放出するがこのヘムを解毒しなければ原虫は生き延びられない。そのため原虫は体内の消化胞内でヘム分子から不溶性のヘモゾイン結晶を作り無毒化する。この時ヘムは同時にヘミンへと酸化されている。カルボキシレートが互いに配位した会合二量体を結晶学的格子に 1 つ含む、ヘモゾイン結晶の形成する場所は、原虫体内の消化胞であり、ここに局在する蛋白質(HRPII)が結晶生成を誘導すると考えられている。

そこで今回合成に成功した、化学的に合成した HRP-II 関連分子の *in vitro* 系に於ける活性試験を行った。即ちヘミンとの相互作用を検討した。溶液の pH は 7.2 のリン酸緩衝液および消化胞を模した 4.8 の酢酸緩衝液中で行った。検出に紫外吸収スペクトルを用いた。pH7.2 の緩衝液には HRP-II 関連分子は溶解しなかったが、pH4.8 では溶解した。さらに HRP-II 関連分子をヘミン溶液に加えると大きくスペクトルが変化した。この結果は、化学合成された HRP-II 関連分子はヘミンとの会合活性のあることを示している。

「まとめ」

本研究はマラリア感染予防及び治療に関する研究に関し、以下の成果を得た。(1)人工抗原用の分岐型ペプチドを合成した。合成のみならず、反応効率を大幅に改善した。(2)人工抗原を利用した徐放性ナノ微粒子の作成に成功した。(3)マラリア感染の検査キットに用いられる HRP-II 関連分子の合成研究を行った。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・治療に役立てるよう、特性評価や改良を進めてゆきたい。

「研究業績」

(原著論文)

Masayuki Hanyu, Keiichi Yamada, Hiroyuki Oku and Ryoichi Katakai: Synthetic study of Histidine-rich protein analogs from *Plasmodium falciparum*, *Peptide Science* 2005, in press.

(国内学会発表)

- 1) 破入正行、山田圭一、奥浩之、片貝良一：マラリア原虫由来ヒスチジンリッチプロテイン2アナログの合成研究、第42回ペプチド討論会、豊中市、千里ライフサイエンスセンター、2004.10.27-29.
- 2) 破入正行、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2アナログの合成と性質、日本化学会第86春季年会、船橋市、日本大学理工学部船橋キャンパス 2005.3.27-30.

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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
狩野繁之	マラリア	山崎修道	感染症予防必携 第2版	財団法人 日本公衆衛生協会	東京	2005	371-6

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
木村幹男, 狩野繁之	第2章 注目される感染症. 7. マラリア	臨床病理 レビュー	134 (特集)	75-82	2006
日谷明裕, 木村幹男	マラリア予防におけるスタ ンバイ治療の位置づけ	日本醫事新報	4225	26-31	2005
Miura T, <u>Kimura M</u> , Koibuchi T, Endo T, Nakamura H, Odawara T, Wataya Y, Nakamura T, <u>Iwamoto A</u>	Clinical characteristics of imported malaria in Japan: analysis at a referral hospital.	Am J Trop Med Hyg	73(3)	599-603	2005
Matsumura T, Fujii T, Miura T, Koibuchi T, Endo T, Nakamura H, Odawara T, <u>Iwamoto A</u> , Nakamura T	Questionnaire-based analysis of mefloquine chemoprophylaxis for malaria in a Japanese population.	J Infect Chemother	11	196-8	2005
大友弘士, 野崎正勝, 堀野哲也	ワクチン接種・治療の実際 マラリア	Prog Med	26	23-7	2006
吉田正樹, 吉川晃司ほか	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)	in print	2005

別紙 5

Hatabu T, Takada T, Taguchi N, Suzuki M, Sato K, <u>Kano S</u>	Potent plasmocidal activity of a heat- induced reformulation of deoxycholate- amphotericin B (Fungizone) against <i>Plasmodium falciparum</i> .	Antimicrob Agents Chemother	49(2)	493-6	2005
Hatabu T, Vanisaveth V, Taguchi N, Kobayashi J, Mannoor MK, Watanabe H, Toma H, Phompida S, <u>Kano S</u>	A pilot field survey of <i>in vitro</i> drug susceptibility on <i>Plasmodium falciparum</i> in Lao PDR.	Trop Med Hlth	33(2)	103-4	2005
Omi K, Kuriyama K, Yamada K, Oku H, <u>Kano S</u> , Sato K, Suzuki M, Katakai R	Synthetic study of antigenic peptide having a partial sequence from <i>Plasmodium falciparum</i> enolase.	Peptide Science	2004	637-40	2005
Hatabu T, Kawazu S, Kojima S, Sato S, Singhasivanon P, Looareesuwan S, <u>Kano S</u>	<i>In vitro</i> susceptibility and genetic variations for chloroquine and mefloquine in <i>Plasmodium falciparum</i> isolates from Thai- Myanmar border.	Southeast Asian J Trop Med Pub Health	36 (suppl 4)	73-9	2005
Mannoor MK, Vanisaveth V, Keokhamphavanh B, Toma H, Watanabe H, Kobayashi J, Hatabu T, Taguchi N, Hongvangthong B, Phetsouvanh R, Phompida S, <u>Kano S</u> , Sato Y	Pyrimethamine- sulfadoxine treatment of uncomplicated <i>Plasmodium falciparum</i> malaria in Lao PDR.	Southeast Asian J Trop Med Pub Health	36(5)	1092-5	2005

別紙 5

Tangpukdee N, Krudsood S, Thanachartwet W, Chalermrut K, Pengruksa C, Srivilairit S, Silachamroon U, Wilairatana P, Phongtananant S, <u>Kano</u> 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
Hatabu T, Hagiwara M, Taguchi N, Kiyozawa M, Suzuki M, <u>Kano S</u> , Sato K.	<i>Plasmodium falciparum</i> : The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmodicidal effect on <i>P.</i> <i>falciparum</i> .	Exp Parasitol	112	179-83	2006
Susomboon P, Maneerat Y, Dekumyoy P, Kalambaheti T, Iwagami M, Komaki- Yasuda K, Kawazu SI, Tangpukdee N, Looareesuwan S, <u>Kano S</u>	Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with <i>Plasmodium falciparum</i> - infected erythrocytes.	Parasitol Int	16	in print	2006
<u>狩野繁之</u>	原虫感染症・マラリア	疾患別最新処 方、第4版	-	728-9	2005
<u>狩野繁之</u>	マラリアの新しい薬	BIO Clinica	20(11)	83-7	2005
<u>狩野繁之</u>	マラリア予防・治療ガイド ライン	感染症	35(5)	13-8	2005
<u>狩野繁之</u>	海外旅行とマラリア	化学療法の領域	21(10)	81-6	2005
<u>狩野繁之</u> 、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	-	166-70	2005

別紙 5

Okabayashi H, Thongthien P, Singhasvanon P, Waikagul J, Looareesuwan S, Jimba M, <u>Kano S</u> , Kojima S, <u>Takeuchi T</u> , Kobayashi J, <u>Tateno S</u>	Keys to success for school-based malaria control program in primary school in Thailand	Parasitol Int	55	in print	2006
小林 正規、今井栄子、 早川枝季、竹内 勤	マラリアなどの原虫検査	検査と技術	33(11)	1161-5	2005
<u>Oku H</u> , Kuriyama K, Omi K, Yamada K, Katakai R	<i>N</i> -tert-Butoxycarbonyl- O-Benzyl-L-Threonyl-L- Proline Trichloro-ethyl Ester (Boc-L-Thr (Bzl) - L-Pro-OTce)	Acta Cryst	E61	o3867-9	2005
Emori E, <u>Oku H</u> , Yamada K, Katakai R	Synthesis of sequential polydepsiptide microspheres as a controlled drug delivery system	Peptide Science	2004	621-624	2005
K. Shichiri K, <u>Oku H</u> , Yamada K, Katakai R	Synthesis and properties of a thermo-responsive polydepsiptide containing Hmb (2- hydroxy-3- methylbutanoic acid) residues	Peptide Science	2004	633-636,	2005
<u>松本芳嗣</u> 、三條場千寿	環境改変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
Kawada H, Maekawa Y, <u>Takagi M</u>	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	1-5	2005

VI. 研究成果の刊行物・別刷

感染症予防必携

第2版

編集

山崎 修道

井上 榮

牛尾 光宏

岡部 信彦

神谷 齊

倉田 毅

竹内 勤

千葉 峻三

西村 和子

箕輪 眞澄

雪下 國雄

吉川 泰弘

渡邊 治雄

財団法人 日本公衆衛生協会

マラリア Malaria (4類-全数)

ICD-10 B50-B54

I 臨床的特徴

1. 症状 マラリアは、発熱・貧血・脾腫をその3徴とする。典型例では、発熱に先立って、全身倦怠感、頭痛、食欲不振などを訴えることが多い。続いて、悪寒戦慄をともなう発熱と、発汗をともなった急速な解熱が観察される。発熱の周期性に感染マラリア原虫種で特徴があるが、これは赤血球に寄生する無性原虫の分裂周期に一致し、三日熱と卵形マラリアでは48時間、四日熱マラリアでは72時間（すなわち、三日熱・卵形マラリアでは1日おき、四日熱マラリアでは2日おき）である。しかし、発症初期には典型的な周期性を示さないことが多い。また、熱帯熱マラリアでは発熱は弛張または稽留することが多い。

熱帯熱マラリアの経過は急性で、治療が遅れると臨床症状として意識障害（昏睡、精神症状をともなう脳性マラリア）、呼吸困難、痙攣の多発、循環虚脱、肺水腫、血小板減少をともなう異常出血、黄疸などが観察され、検査データでは重症貧血、低血糖、酸血症、高乳酸血症、赤血球寄生率4%を超える高原虫血症、腎機能障害などが認められる（WHOの重症マラリア定義）。このような重症マラリアの合併例では、臨床的管理を強化しないと患者はしばしば致命的となる。

2. 病原体 ヒトに感染するマラリア原虫は、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum*、三日熱マラリア原虫 *P. vivax*、四日熱マラリア原虫 *P. malariae*、卵形マラリア原虫 *P. ovale* の4種である。また、2種以上の原虫が混合感染することもある。なお、三日熱と卵形マラリア原虫の肝細胞型に、分裂速度が緩慢な休眠体（ヒプノゾイト）が認められており、これら2種の感染者には、末梢血中の原虫の増殖を阻害する抗マラリア薬の投与に引き続き、肝内型原虫を殺滅する根治療法を併用しないと再発する確率が高い。

3. 検査 従来マラリアの確定診断は、末梢血中の原虫を顕微鏡下に認めることによりなされてきた。しかし、最近のマラリア診断法の進歩は顕著で、DNA診断法、デップスティック法、間接蛍光抗体法などが導入されている。

1) 顕微鏡検査法 マラリアの急性期にある患者であれば、発熱時でなくても赤血球内に寄生した原虫が見いだされる。スライドグラス上に患者の血液を1滴落とし、薄層

塗抹標本を作製し、すばやく乾燥させた後、メタノールで1分間固定する。リン酸緩衝液(1/15M, pH.7.2)でギームザ原液を5% (V/V) に調整し、固定した塗抹標本を30分間染色する。十分に水洗後、油浸レンズを用いて1,000倍で顕微鏡下に観察し、赤血球内に寄生したマラリア原虫の検出ならびに形態による種の鑑別を行う。またマラリア原虫寄生赤血球率が重症度の指標となるので、その率をカウントする。血液の厚層塗抹標本は観察上の鋭敏度を増すが、むしろ診断に熟練を要する。マラリア患者は早急な治療を必要とするので、この顕微鏡検査は他のあらゆる検査に先立って行われなければならない。

2) マラリア原虫蛋白検出法 熱帯熱マラリア原虫由来の特異的蛋白(HRP-II)および、その他の原虫に共通な蛋白を同時に検出できる簡易キットが数種完成している(厚生労働省の国内での検査目的使用認可は下りていない)。デイツプスティックに少量の被検末梢血液を沁み込ませる方法で、陽性検体には有色の線が肉眼で観察できる。1検体10分ほどで検査が終了する。

3) 核酸検出法 PCR法による末梢血中のマラリア原虫のDNAを検出する方法が開発・応用されてきている。鋭敏度の上昇は特筆すべきであり、特異的プライマーの設定で4種のマラリアを鑑別することができる。基本的な技術や設備が整っている実験室で検査可能と考えられるが、診断になお数時間を要することなど、その優れた診断法としての有用性は臨床的に限定されることが多い。

4) 抗体検査法 マラリア患者は、発症後間もなくより治癒後およそ1年にわたり、マラリア原虫に対する抗体を血清中に保つ。間接蛍光抗体法は、信頼度の高い抗体検査法として、特にマラリアの既往診断に有用である。

II 疫学的特徴

1. 発生状況 マラリアは、熱帯、亜熱帯地方に広く蔓延する世界有数の疾患で、WHOの(2003)によれば、世界の100か国以上の流行地で、年間罹患者3~5億人、死亡者150~270万人(そのうち100万人が5歳以下の幼小児)が発生すると報告されている。一般に熱帯熱、三日熱マラリアは広く世界に分布し、四日熱マラリアの発生域は比較的限局され、卵形マラリアは西アフリカに主に分布する。クロロキン耐性熱帯熱マラリアの世界的拡散が、大きな問題となっている。特にタイおよびその周辺では、ファンシダールやメフロキンなどに対する多剤耐性熱帯熱マラリアの分布が深刻さを増しており、その地域からのマラリア患者の治療を困難にしている。三日熱マラリアのクロロキンに対する耐性の報告は1989年にパプアニューギニアで報告され出し、さらにプリマキンに対する感受性が低下しているとの報告も散見される。四日熱マラリアのクロロキンに対する臨床的耐性も、近年初めて報告された。卵形マラリアの薬剤耐性は現在のところ認められていない。マラリアの流行を再興させる要素として、この薬剤耐性マラリアの出現のほかに、流行地における大規模な開発事業とそれとともに人口移動や都市化、異常気象や自然災害、そして戦争などが大きく論じられ、こ

れらに加えて当該国でのマラリア流行の調査・対策組織の崩壊は、流行地の人々の生命に大きな脅威を与えている。

一方わが国にはかつて土着のマラリアが全土に存在し、1903年には年間20万人の罹患者と1,000人を超える死亡者があったと推定されている。ハマダラカを介した国内でのマラリア伝播は1960年以後は認められなくなっているが、流行地で感染し日本国内で発症するいわゆる「輸入マラリア」の患者報告数は年間100人を超え、その数は年々増加の傾向にある。そして不幸にも、適切な診断と治療が得られずに死亡するケースも報告されている。

2. 感染源 マラリアの直接感染源は、原虫感染ハマダラカ *Anopheles* である。病原巣はヒトであるが、高等猿類も病原巣となりうる。また、*P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. brasilianum*, *P. inui*, *P. schwetzi*, *P. simium* などのサルマラリア原虫もヒトに感染可能であるが、その自然感染は極めてまれであり、臨床的、疫学的に大きな問題とならない。

3. 伝播様式 最も重要な伝播様式は、雌のハマダラカが刺咬時に唾液腺からヒトの末梢血中に孢子小体（スポロゾイト）を注入することである。世界の400種余りのハマダラカのうち、68種がマラリアを媒介すると報告されているが、流行地固有の種がその疫学相を左右する。また、蚊の吸血時間のピークは多くの種が深夜であるが、若干種が薄暮から夜明け前に固有の吸血ピークを持つ。流血中に注入されたスポロゾイトは、およそ30分以内には肝細胞に侵入して発育・分裂を開始する。三日熱と卵形マラリア原虫の肝内型には、長期間静止状態にとどまった後に分裂増殖を開始する休眠体（ピポゾイト）というステージがあり、両種に特有の再発の原因になる。肝細胞内で1万個以上まで分裂・増殖したメロゾイトは、肝細胞を破ってそれぞれ赤血球内に侵入し、一定周期の無性増殖（シゾゴニー）を繰り返す赤内型の発育を行う。分裂体（シゾン）感染赤血球が破裂するごとに、患者は特有の熱発作を起こす。なお、赤内型のメロゾイトの一部は分裂せずに1核のまま雌雄の生殖母体（ガメトサイト）に分化し、媒介蚊に取り込まれない場合は流血中でやがて死滅する。

吸血時に媒介蚊に取り込まれた雄性生殖母体は、蚊の中腸内で6～8個の雄性生殖体（マイクロガメート）を生じ、成熟した雌性生殖体（マクロガメート）と受精して融合体（ザイゴート）となる。さらに運動性のある虫様体（オーキネート）となって中腸壁に侵入し、漿膜下に胞嚢体（オーシスト）を形成する。オーシストの内部で発育した多数のスポロゾイトは、その壁を破って体腔に遊出し、最終的に唾液腺に集合してヒトへの感染能力を持つ。蚊の体内での原虫の成熟には、およそ1～2週間が必要である。

蚊による感染のほかに、まれではあるが汚染注射針による伝播、輸血、骨髄・臓器移植にともなう感染、経胎盤感染の報告もある。

4. 潜伏期 蚊からの伝播による自然感染の潜伏期の平均日数は、熱帯マラリアで12日、三日熱マラリアで15日、卵形マラリアで17日、四日熱マラリアでは28日と報告されている。ただし三日熱マラリアでは、6～12か月にもわたる潜伏期の例もまれではない。

5. 感染期間 媒介蚊に対する感染期間は、患者流血中に生殖母体が見られる期間。熱帯熱マラリアでは抗マラリア薬で解熱してからも血流中に1～2か月間生殖母体が残存することがある。わが国で熱帯熱マラリアを媒介できるハマダラカの棲息密度は極めて低いので、蚊による二次感染の危険はほとんどない。ほかの3種のマラリアでは治療が奏効すれば数日間で生殖母体も消失する。なお、保存血でのマラリア原虫の生存期間は4～6℃で14日との報告がある。

6. ヒトの感受性 一般に感染性が高く、マラリアに対して免疫を持たないヒトが、感染蚊に1回でも刺されれば感染が成立すると考えられている。また、自然感染による有効な獲得免疫は得ずらく、再感染もしばしば起こる。一方、遺伝的素因によるマラリア感染への抵抗性を示す集団も存在する。例えば、西アフリカの黒人に、三日熱マラリア原虫が赤血球に接着、侵入する際の赤血球膜上のレセプターを先天的に欠く例(Duffy negative)が多く、三日熱マラリアに対する抵抗性を有する。また、鎌形赤血球症患者(HbSS)およびその形質保有者(HbAS)は、熱帯熱マラリア原虫感染に強い抵抗性を示す。

Ⅲ 予防・発生時対策

A. 方針

1950年代後半から開始されたWHOのマラリア根絶計画は、殺虫剤であるDDTに対する抵抗性媒介蚊の出現ならびに熱帯熱マラリア原虫のクロロキン耐性株の出現とその拡散によって失敗に終わり、1976年をピークとする再燃現象が熱帯各地に起こってマラリア情勢は一挙に悪化した。そのため、WHOは1979年よりマラリア対策の目標を根絶から制圧に格下げし、流行国のプライマリーヘルスケア組織に包含する自助努力と、国際機関や先進国の援助による現実的な対策を推進させるよう指導するに至った。1992年に、アムステルダムで先進国のヘルスリーダーが集まる「マラリアサミット」が開催され、WHOは1993年から1999年に至るマラリア対策長期展望を具体性を持って整えた。また、1998年よりは「ロールバックマラリア」計画として、2010年までに世界のマラリア死亡者数を半減し、2015年までにさらに半減させるという目標を提示している。わが国もG8のリーダーとして、世界における寄生虫対策・マラリア対策に、政府を通じて積極的な支援を展開している。なお、2003年のわが国からの海外渡航者数は年間1330万人で(1997)、2000年に1781万人を記録して以来、テロ、戦争、SARSの発生などでその数は減少傾向にあるものの、熱帯地への旅行者や滞在者、あるいは輸入症例に対するマラリア対策は、以前にもまして重要な問題になっている。

B. 防疫

1. 流行地では幼虫の棲息場所となる水域の排水をよくするなど、衛生環境の整備や殺幼虫剤の利用、幼虫を捕食する淡水魚を放流する生物学的防除などが有効であることが多い。

2. ハマダラカの特に吸血後の休止習性を利用し、残留効果のある殺虫剤を屋内の壁

など、蚊の止まる場所に散布する必要がある地域がある。

3. 個人的感染防止策は、夜間吸血性の媒介蚊に刺されないように努める。外出時は、日中であっても長袖・長ズボンの着用などに心がける。住宅は、空調設備の整った部屋でない場合、窓に網戸をつけ、さらに蚊帳を吊って就寝するほか、蚊取線香や殺虫スプレー、昆虫忌避剤の適宜使用が効果的である。

4. 化学的予防は、抗マラリア薬の定期的な服用により発症を抑制するもので、感染を完全に防止するものではない。WHO (2003) は流行地における薬剤耐性熱帯熱マラリアの拡散状況と耐性の程度を勘案して、1) クロロキン (成人量：週1回300mg塩基)、2) クロロキンとプログアニル (200mg/日) の併用内服、3) メフロキン (週1回250mg塩基) またはドキシサイクリン (100mg/日) のいずれかで予防内服するように推奨している。近年では、肝内型の原虫にも効果のあるアトバコンとプログアニルの合剤による予防内服 (1錠/日) も勧めている。これらの薬剤の内服に当たっては、禁忌や副作用、最長投薬期間などを確認し、必ず医師の指導下で投薬されるべきである。

C. 流行時対策

現在のわが国の環境において、マラリアが流行性になる可能性はまず考えられない。しかし、わが国ではマラリアは全数届出の4類感染症に分類され、医師はマラリア患者を診断した時は、直ちにその者の氏名、年令、性別その他厚生労働省で定める事項を最寄りの保健所長を経由して都道府県知事に届け出なければならない (感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律第12条の1：平成15年一部改正)。

D. 国際的対策

1. マラリア媒介蚊が存在する地域から、すでに根絶されている地域に航行する船舶、航空機などは、定める方法でその駆除を実施すべきとされている (国際保健規則第68条、同83条)。

2. 検疫空港と港湾地域については、マラリア媒介蚊を含めた衛生害虫の調査と、必要に応じた対策措置を行うことができる (検疫法第27条)。

3. マラリアはWHOの疾病監視下におかれている疾患で、全世界の疫学状況に関する情報が毎年刊行されている。

E. 治療方針

1. 原虫増殖抑制療法 (成人量)

1) メフロキン (250mg/錠) 4錠, 分1~2。

2) スルファドキシシン・ピリメタミン合剤 (ファンシダール) 3錠1回内服。

3) クロロキン クロロキン塩基として第1日初回600mg, 第2回 (6時間後) 300mg, 第2日300mg, 第3日300mg内服。

上記いずれかで治療した後、三日熱と卵形マラリアにはプリマキン30mg塩基を1日1回, 14日間内服させて再発防止を図る (根治療法)。

2. 多剤耐性熱帯熱マラリア治療法 (成人量)

4) メフロキン (250mg/錠) 5錠, 分1~2。

5) アーテメサー・ルメファントリン合剤 (コアーテム) 第1日初回4錠, 8時間後4

錠，第2～5日4錠/日内服。

6) アトコバン・プログアニル合剤（マラロン）4錠，分1，3日間内服。

7) 硫酸キニーネ（1.5g，分3）＋テトラサイクリン（1g，分3）の併用療法を7日間。

3. 重症熱帯熱マラリア治療法

9) キニーネ注射液（キニマックス）480mgを500ml生理食塩水または5%ブドウ糖液に混じて，4時間以上かけて点滴静注。必要に応じ8～12時間後に反復する。患者が重症を脱したら速やかに経口療法に切り替える。

10) アルテミシニン誘導体（アーテメサー）（80mg/アンプル）初回2アンプル筋注，以後1アンプルずつ12時間間隔で4アンプル筋注。

11) アルテミシニン誘導体（アーテスネート坐剤）（200mg/カプセル）第1日2カプセル，分2。第2～5日1カプセル/日。

上記10) および11) のアルテミシニン誘導体は，重症マラリアからの回復には極めて有効であるが，再燃率が高いので，重症化を脱した後，上記4)～7) のいずれかを追加する。

なお，かかる療法が必要となる重症例の場合には，多彩な病態や合併症の発現が見られるので，特異療法だけでなく対症療法の強化が救命に必要となる。

付記 現在わが国で市販されている抗マラリア薬はメフロキンとファンシダールのみである。その他の抗マラリア薬が患者治療に必要な場合は，最寄りの大学医学部寄生虫学教室・熱帯医学教室・医動物学教室や国立国際医療センターに相談して入手する。

7. マラリア

木村 幹 男*1 狩野 繁 之*2

要 旨

熱帯熱マラリアでは短期間で重症化・死亡の危険がある。脳症の機序として sequestration の重要性が明らかとなり、細胞接着などに関係する分子が同定されている。マラリアの一般検査では特徴的な所見もあり、理解しておく役立つ。診断の gold standard は古典的な顕微鏡法であるが、抗原検出法、PCR 法などの併用も望まれる。治療においては熱帯熱マラリアでの薬剤耐性を考慮する必要がある。予防については主に「旅行医学」で扱われている。

Key words マラリア, 重症マラリア, 抗原検出法, 薬剤耐性, 熱帯病治療薬研究班(略称)

はじめに

マラリアは流行地における morbidity と mortality, 経済損失などの要因として重要な疾患である。また、先進国から流行地への渡航者や滞在者が増え、逆に流行地から先進国への入国者も増えているので、輸入感染症としても重要性を増している。さらにわが国のみならず欧米先進国でも、不十分なマラリア予防、発症後の受診の遅れ、医療機関での診断の見逃しや遅れ、治療の遅れや不適切な治療などが問題となっている。本稿では渡航者のマラリアに焦点を

絞って解説し、国内の医療機関で適切な医療対応が行われることを目指すものである。

I. 概 説

マラリアはハマダラカ属の蚊に媒介される疾患である。病原体は原虫に属し、ヒトに感染するマラリア原虫としては熱帯熱(病原体は *Plasmodium falciparum*), 三日熱 (*P. vivax*), 卵形 (*P. ovale*), および四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*) の4種類がある。このなかで熱帯熱マラリアは短期間で重症化や死亡の危険があり(重症マラリア), また薬剤耐性が深刻な点で最

Malaria.

*1 Mikio KIMURA, MD

Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases

国立感染症研究所 感染症情報センター(〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1)

*2 Shigeyuki KANO, MD

国立国際医療センター研究所 適正技術開発移転研究部(〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1)

も重要であり、見逃してはならない疾患である。しかし最近、三日熱マalariaでも頻度は少ないが重症マalariaの症候を呈することが示されており、注意が必要である。

世界的にはマalariaは熱帯・亜熱帯に広く分布する。最も流行が高度なのはサハラ以南アフリカで、しかもそこでは熱帯熱マalariaが殆どを占める。北アフリカ、中東、インド亜大陸では三日熱マalariaが多くを占める。東南アジアでも三日熱マalariaが多いが、熱帯熱マalariaも広域に分布し、特にタイ・ミャンマーやタイ・カンボジアの国境地帯では薬剤耐性が最も深刻である。パプアニューギニア、ソロモンなどのメラネシアでも三日熱マalaria、熱帯熱マalariaの両者がみられ、中南米では一般に三日熱マalariaが多いが、アマゾン流域では熱帯熱マalariaも少なくない。

わが国では現在マalariaは土着していないので、輸入マalariaとして扱われる。1999年4月のいわゆる感染症法施行以降のマalaria報告数は、1999(この年のみ4~12月)~2001年では年間100例を超えていたが、2002~2004年では73~83例と減少している。最近の減少の理由としては、米国同時多発テロ、SARS流行などによる渡航者数の減少、ハイリスク渡航者における防蚊対策や予防内服の徹底などが考えられる。

II. 病態生理

蚊の刺咬によりスポロゾイトとして体内に入ったマalaria原虫は、血中から速やかに肝細胞に侵入する(一次肝臓内ステージ)。その後、一定期間後に肝細胞内で数千個に分裂してからメロゾイト(分裂小体)として血中に放出され、それらは赤血球内に侵入する。赤血球内では輪状体(幼弱栄養体)、栄養体(成熟栄養体)、分裂体のステージを経過し、分裂体を有する赤血球が壊れて放出されたメロゾイトは新たな赤血球に侵入し、上記の過程を繰り返す(赤血球内サイクル)。一次肝臓内ステージでは無症状であり、発熱を含むマalariaの症状は赤血球内サイクル

により引き起される。さらに、三日熱、卵形マalariaでは肝細胞内に潜伏するヒプノゾイト(休眠原虫)が形成され、これが一定期間後に分裂・増殖を開始して血中に侵入すると再発を来す。マalariaの特徴である発熱は、多数の分裂体が破裂するとき生ずる。

熱帯熱マalariaでは栄養体、分裂体など後期ステージの原虫が感染した赤血球が、脳などの細小血管に閉塞しており、sequestrationと呼ばれる。それにより局所の循環障害、原虫からの毒性物質の遊離などが考えられるが、後者の実態は明らかではない。また、感染に伴って宿主組織からTNF、IL-1、IFN- γ およびその他の炎症性サイトカイン、および種々の抗炎症性サイトカインの遊離が生じ、発熱、全身倦怠などの症状、場合により脳症などの臓器障害に関与する可能性があるが、十分に解明されたとは言えない。TNFにより誘導される酸化窒素(NO)が神経伝達を遮断する機序も考えられている。病理学的には、脳の閉塞血管の周囲に輪状の出血が見られることがある。

Sequestrationの機序としては細胞接着、すなわち感染赤血球表面のknob(電子顕微鏡的突起物)に表出するマalaria原虫関連抗原と、血管内皮細胞上の接着分子による結合が重要である。前者の分子としては、150にも上るvar遺伝子にコードされるPfEMP1が挙げられ、後者の分子としてはCD36、ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1、CSA(コンドロイチン硫酸A)などが知られている²⁾。これらの中で、脳ではICAM-1、臓器一般ではCD36、胎盤ではCSAを介した細胞接着が重要と考えられる。Sequestrationにおいては細胞接着以外に、感染赤血球が周囲に非感染赤血球を結合する現象、すなわちロゼット形成も関係すると思われるが、これはPfEMP1とCR1(補体レセプター1)との結合を介するとされている。

熱帯熱マalariaでの他の臓器病変については、脳症ほどには解明が進んでいない。肺毛細血管では感染赤血球の閉塞は顕著ではなく、むしろ好中球の接着像がみられるが、補体系を介した