

図1. タイ・ランパン県メモ村におけるコガタハマダラカの水牛罫 (B)と人罫 (H)への襲来密度と襲来割合

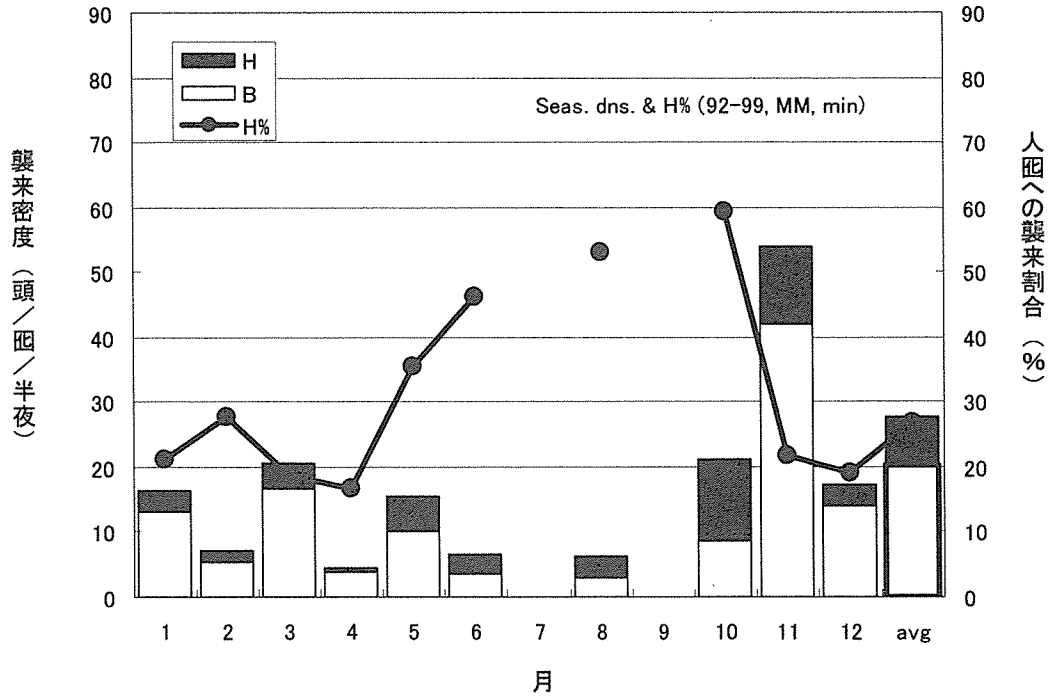
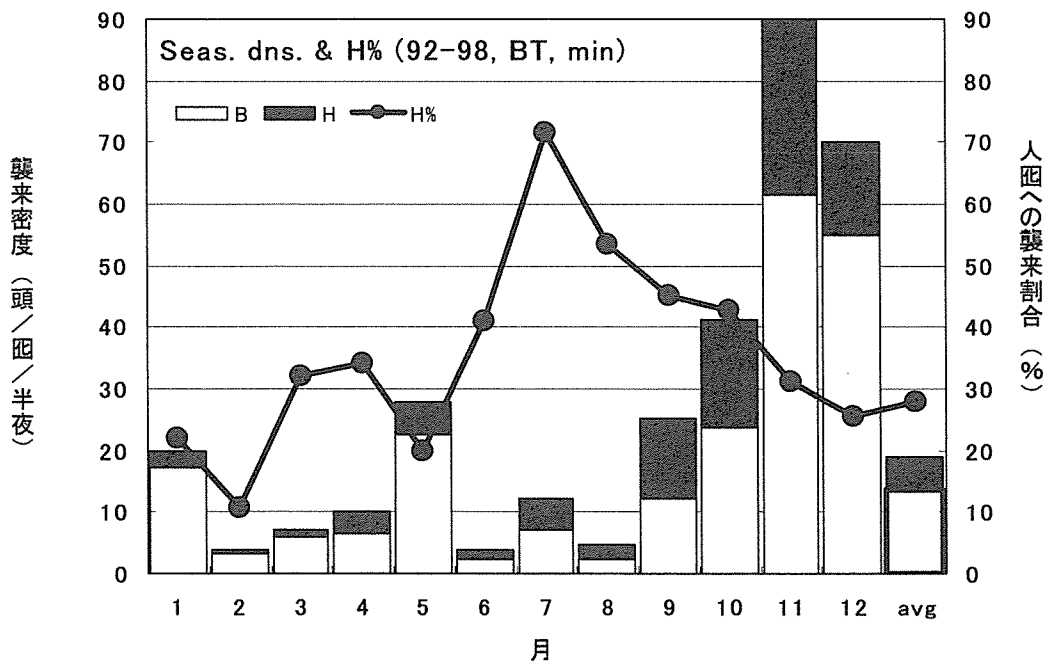


図2. タイ・ランパン県バンテ村におけるコガタハマダラカの水牛罫 (B)と人罫 (H)への襲来密度と襲来割合



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

動物モデルを用いたマラリア重症化機構に関する研究

—特に脳性マラリア発症機構について—

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)

研究協力者 Sornchai Looareesuwan (Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University・Professor)

熱帯熱マラリアに特徴的な脳性マラリアの発症機序は未だ不明である。本研究では実験的脳性マラリア発症リスザル脳組織を用い、病理組織学的、超微形態学および免疫組織化学的解析を行ない、内皮細胞の変性、血漿成分の浸出、非感染赤血球の漏出、さらには血管の破綻による輪状出血斑といった一連の病理学的変化が脳性マラリアの発症に伴って起こることを明らかにした。これらの実験的脳性マラリア発症リスザル脳組織で観察された病理学的変化は脳性マラリアで死亡した患者の脳組織においても観察された。これらの所見は脳性マラリアの発症が血液脳関門の破綻と深くかかわることを示唆し、さらに脳性マラリアの発症予知に新たな視点を提供した。今後の研究により重症マラリアの発症機序が明らかとなることで、新たな脳性マラリアの治療法の開発および患者管理に関する医療の向上に貢献することが期待できる。

#### A. 研究目的

マラリアは、マラリア原虫の感染によってひきおこされる。ヒトに感染するマラリア原虫は4種あり、その一つである熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)は、原虫血症(Parasitemia)やマラリアの三大徴候である発熱、貧血、脾腫に加え、しばしば脳性マラリアをはじめとする

様々な合併症を引き起こすことが知られている。意識障害や昏睡などの脳症状を現した脳性マラリアの場合、適切な処置が施されなければ致死的である。脳性マラリアについては、古くから病理組織学的所見として、感染赤血球の血管内栓塞像(sequestration)や脳実質での輪状出血像(ring haemorrhage)が知られている。また、

感染赤血球の血管内栓塞に深くかかわるとされる感染赤血球の血管内皮細胞への接着における宿主、寄生体由来の様々な分子の同定および分子論的機序が明らかにされてきた。しかし、これらの病理像あるいは感染赤血球の接着機構が脳性マラリアの発症とどのように関係するかはほとんどわかっていない。

多くの感染症において、病原体に誘導された宿主の免疫応答が生体防御のみならず病態形成にも深く関与していると考えられている。しかし、マラリアの病態形成機序について免疫病理学的観点から解析を行っている研究はきわめて少ない。感染症の病態を免疫病理学という観点から解析するうえで実験動物は重要である。マラリア原虫は宿主特異性が強く、熱帯熱マラリア原虫の場合、チンパンジーなど高等類人猿を除くとリスザル (*Saimiri sciureus*) およびヨザル (*Aotus trivirgatus*) の 2 種の新世界ザルが実験動物として知られているのみである。我々はこれまでに、熱帯熱マラリア原虫感染リスザルをドナーザルとして、得られた新鮮感染赤血球を大量に未感染リスザルに接種することにより実験的脳性マラリアを発症させることに成功した。そこで本年度は、脳性マラリア発症機序の一端を明らかにすることを目的に、脳性マラリア発症リスザルモデルを用い病理学的解析を行ない、更に、得られた

知見がヒトに外挿できるかを実証するためにヒト由来試料を用いて解析を行った。

## B. 研究方法

原虫は熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* Indochina-I/CDC 株、実験動物はボリビア型リスザルを用いた。感染赤血球のドナーとして、摘脾したリスザルに熱帯熱マラリア原虫を感染させ、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  $10^9$  個を 6 頭のリスザルに静脈内接種した。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) をギムザ染色血液塗沫標本により測定した。リスザルは安楽死後剖検に供した。対照として用いた非感染リスザルも同様に安楽死後剖検に供した。昏睡を来した後死亡したリスザルについては死亡直後に脳を含む各臓器を摘出し解析に用いた。採取したリスザルの脳を用い、病理学組織学的解析、超微形態学的解析および免疫組織化学的解析を行った。尚本研究における動物実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部の動物実験委員会の承認を受けて行った。

ヒト由来試料は、タイ国マヒドン大学熱帯医学部附属病院にて熱帯熱マ

ラリアで死亡した患者より採取、保管され、同大学の承認を受け提供された脳組織のパラフィン包埋組織であり、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部の人を対象とする研究倫理審査委員会より承認を受けて使用した。

病理組織学的解析には HE 染色切片を用いた。超微形態学的解析は感染リスザル脳組織を 2% glutaraldehyde および 1% osmium tetroxide で固定後、Epoxy 樹脂で包埋、超薄切片を作製し、JEOL JEM 100S 型透過型電子顕微鏡で観察することにより行なった。免疫組織化学的解析は 7.5-10%ホルマリン固定パラフィン包埋脳組織を用いフィブリノゲンおよび免疫グロブリンを標的抗原として行なった。フィブリノゲンの検出はヒトおよびリスザル由来試料ともに抗ヒトフィブリノゲン-家兎血清を一次抗体、HRP 標識抗ウサギ免疫グロブリン-ロバ血清を二次抗体として用いた。免疫グロブリンの検出はヒト試料においては抗ヒト IgG-家兎血清を一次抗体、HRP 標識抗ウサギ免疫グロブリン-ロバ血清を二次抗体として用い、リスザル試料においては抗リスザル免疫グロブリン-マウスモノクローナル抗体 (4H10) を一次抗体、HRP 標識抗マウス免疫グロブリン-ヒツジ血清を二次抗体として用いた。基質には 3,3'-diaminobenzidine を用い可視化した。

### C. 研究成果

新鮮な熱帯熱マラリア原虫感染赤血球  $10^9$  個を接種した 6 頭のリズザルは感染後 8-12 日までに Parasitemia が 20% 以上に達し、8-15 日までに全頭が昏睡を来たした (図 1)。3 頭は死亡し、他の 3 頭は死亡前に安楽殺を行ない剖検した。6 頭から得られた脳組織を用いて病理学的解析を行った。HE 染色標本において、全頭に輪状出血像 (図 2A) が観察された他、数個から十数個程度の赤血球が血管周囲に漏出した小規模な出血像が脳実質に広範囲に観察された (図 2B)。輪状出血像では、血管外赤血球に感染赤血球が認められるのに対して、小規模な血管外漏出においては漏出した赤血球に感染赤血球は認められなかった。透過型電子顕微鏡による超微形態学的解析の結果、血管内には感染赤血球が認められるものの漏出赤血球はすべて非感染赤血球であった。さらに、漏出した赤血球に隣接した血管の内皮細胞に小胞体およびミトコンドリアの空胞化など変性像が認められた。非感染赤血球は感染赤血球と比較して可塑性に富むことから、内皮細胞の変性や透過性の亢進が非感染赤血球の漏出の原因となることが考えられた。赤血球の血管外漏出は当然、血漿成分の浸出を伴うことが予想されたため、フィブリノゲンおよび IgG を指標に免疫組織学

的解析を行った結果、血管内腔のみならず血管壁や血管周囲に広く拡散した反応像が観察された(フィブリノゲン検出の結果のみ示す。図2C)。また、切片標本上漏出赤血球が観察されない、すなわち病理組織学的には異常が認められない血管周囲にも陽性反応が観察された。尚、これまでの報告に一致して感染赤血球による脳内血管の栓塞像(sequestration)は何れのリスザルにおいても顕著ではなかった。

これら実験動物モデルにおいて認められた所見が脳性マラリアを発症した患者にも認められるかを検証するため、タイにおいて脳性マラリアで死亡した患者の脳組織を用いて解析を行った。その結果、リスザルで観察されたと同様、輪状出血像に加え(図2D)、脳実質の広範囲にわたって数個から十数個程度の赤血球の血管外漏出が認められた(図2E)。ヒトにおいても、漏出赤血球はすべて非感染赤血球であった。また、フィブリノゲン、IgGに対する抗体を用いて免疫組織学的に解析した結果、リスザルと同様に、切片標本上漏出赤血球がみられない血管の周囲にも血管からの血漿成分の浸出を示す陽性反応が認められた(フィブリノゲン検出の結果のみ示す。図2F)。

#### D. 考察

脳性マラリアの発症機序についてはこれまで様々な議論がされてきた

が、未だ納得行く説明は為されていない。病理学的に脳性マラリアの患者に高率に観察される感染赤血球の血管内栓塞像(sequestration)や脳実質での輪状出血像(ring haemorrhage)が脳性マラリアの発症に深くかかわる病理的变化と考えられてきた。本研究ではこれらの病理像に加え、非感染赤血球による小規模な血管外漏出像が脳性マラリア患者に見られる顕著な病理組織学的所見の一つであることを初めて示した。さらに、感染リスザルにおいて sequestration が顕著でないにもかかわらず昏睡を来し、昏睡を来したリスザルの脳実質の広範囲にわたって非感染赤血球の漏出像および血漿成分の浸出像が認められ、さらにこれらの病理学的所見が脳性マラリアで死亡した患者の脳組織においても認められることを示した。これらの所見は脳性マラリアにおいて脳の血管透過性の著しい亢進、あるいは内皮細胞の変性等、血液脳関門の何らかの異状あるいは破綻が起きていることを示唆している。これらの結果はまた、血漿成分の浸出、血液脳関門の異状を検出することによる脳性マラリア早期診断法の可能性を示唆するとともに、内皮細胞の変性を阻害することにより病態の重症化を阻止する新たな治療法の開発に結びつくと考えられる。

赤内型熱帯熱マラリア原虫の感染に伴い、感染赤血球の内皮細胞への接

着、マクロファージの貪食等により TNF 等様々な炎症性サイトカインが内皮細胞、マクロファージから放出されることが報告されている。炎症性サイトカインは内皮細胞に作用し、血管透過性の亢進等様々な病態生理学的変化を誘起することが知られている。次年度以降、マラリア感染によって誘起される血液脳関門の異状、破綻、特に内皮細胞の変化を免疫病理学および分子論的に明らかにして行く。

#### E. 結論

本研究は、脳性マラリアを発症するリスザルモデルを用い、脳性マラリアの発症に血液脳関門の異状、破綻が深く関与することを示し、同様の所見が脳性マラリアで死亡した患者の脳においても認められることを示した。脳性マラリアの発症における血液脳関門の関与は脳性マラリアの病態形成機序論に新たな一説を提供する。本研究はさらにリスザル感染系が有用な熱帯熱マラリア病態モデルであることを示した。

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

- 1) 新垣奈々、三條場千寿、片貝裕子、服部正策、狩野繁之、  
Emsri Pingponratn、Sornchai Looareesuwan、松本芳嗣：脳性マラリアで認められた非感染赤血

球の血管外漏出、第 47 回日本熱帯医学学会、長崎ブリックホール、2006.10.11-13

- 2) 新垣奈々、三條場千寿、片貝裕子、服部正策、狩野繁之、  
Emsri Pingponratn、Sornchai Looareesuwan、松本芳嗣：脳性マラリアで認められた血清成分の血管外浸出、第 66 回日本寄生虫学会東日本支部大会、国立感染症研究所、2006.10.21
- 3) Nana Arakaki, Masahito Asada, Chizu Sanjoba, Yuko Katakai, Shosaku Hattori, Shigeyuki Kano, Emsri Pongponratn, Srivicha Krudsood, Mario Riganti, Sornchai Looareesuwan, and Yoshitsugu Matsumoto : Evidence of serum exudation in the brains of patients with cerebral malaria and of squirrel monkeys with experimental cerebral malaria、Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Parasitic Diseases Panel, Tokyo, Japan, 2007.2.2-3
- 4) 新垣奈々、三條場千寿、片貝裕子、服部正策、狩野繁之、Emsri Pongponratn、Srivicha Krudsood、Mario Riganti、Sornchai Looareesuwan、松本芳嗣：脳性マラリアにおける非感染赤血球の血管外漏出および血漿成分の血管外浸出、第 76 回日本寄生虫学会大会、

大阪大学コンベンションセンター、  
2006. 10. 11-13

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

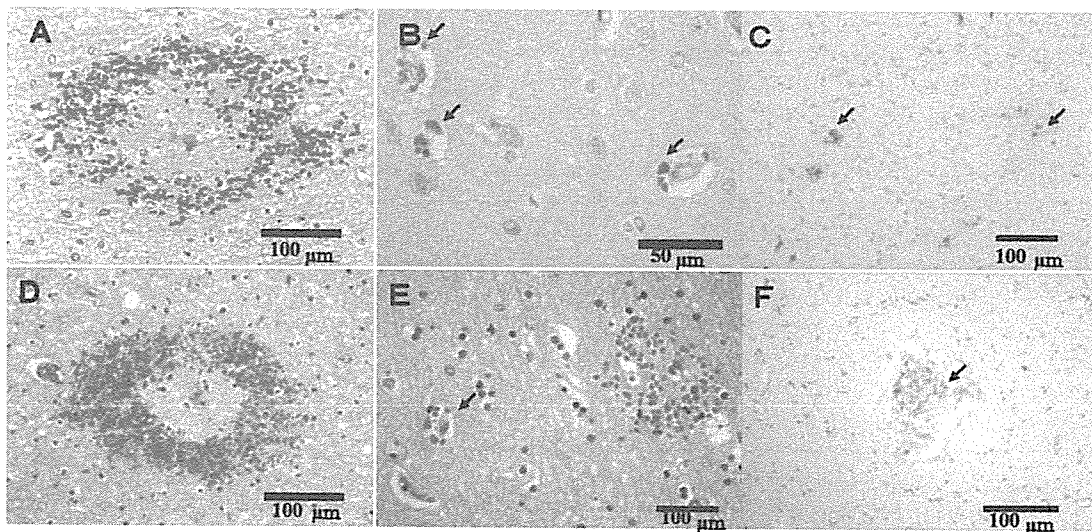
3. その他

なし

図1. *P. falciparum* 感染により昏睡を来した実験的脳性マラリア発症リスザル



図2. 実験的脳性マラリア発症リスザル及び脳性マラリア患者の脳組織における非感染赤血球の血管外漏出および血漿成分の浸出



(A-C)実験的脳性マラリア発症リスザルの脳組織における非感染赤血球の血管外漏出および血漿成分の浸出

実験的脳性マラリア発症リスザルの脳組織において観察された A; 輪状出血像、B ;非感染赤血球の血管外漏出像(矢印)、C ;免疫組織化学染色により血管内のみならず血管壁や血管周囲にIgG陽性(矢印)を示す反応像

(D-F)脳性マラリア患者の脳組織における非感染赤血球の血管外漏出および血漿成分の浸出

脳性マラリア患者の脳組織において観察された D ; 輪状出血像、E ;非感染赤血球の血管外漏出像(矢印)、F ;免疫組織化学染色により血管内のみならず血管壁や血管周囲にIgG陽性(矢印)を示す反応像



薬剤耐性マラリアの流行拡散に関する疫学研究および  
海外の高リスク地域の評価に関する研究

分担研究者 小林 潤(国立国際医療センター国際協力局・厚生労働技官(医師))  
研究協力者 Pratap Singhasivanon(タイマヒドン大学熱帯医学部・学部長)  
Samlane Phompida(ラオス保健省マラリアセンター・所長)  
Sendara Vongsouvan(ラオス大学医学部・教授)  
Dong Sochet(カンボジア保健省マラリア対策センター・所長)  
Irene Ayi(ガーナ大学野口記念医学研究所・研究員)

東南アジア地域では、ミャンマーを除いては 1990 年代後半から開始された包括的アプローチによるマラリア対策の効果によって、全国的流行から辺境地域等の限局された地域での流行になりつつある。ACT (Artemisinin-derivatives Combination Therapy) による末端村落での治療が推奨されているが、Global Fund による各国の対策のなか薬剤の配布は必ずしも効率的に配布されていないことがわかった。また薬剤耐性マラリア等のモニタリングは配布に比してあまり行われていない。  
タイ国においては三日熱マラリア対策が重要になっており、周辺各国も熱帯熱マラリアにかわって重要な要素になりつつある。三日熱マラリア対策に重要な要素である再燃、再発についてその疫学的要因は明らかになっていないため、Literature Review によって調査すべき要因を明らかにした。

## A. 研究目的

邦人が海外渡航において感染のリスクのあるマラリア感染状況の実態を薬剤耐性マラリアの拡散とその起こる背景を明らかにすること、さらに疫学的に重要性の増している三日熱マラリアについて、再発の観点から疫学的背景をさぐることを目的とする。本研究の成果をもって、日本人からの海外渡航者のマラリア発生の予防や治療に当たっての薬剤の選択に関して、直接的に有用な情報が把握できる。さらには、流行各国のマラリア対策に対して、適切な薬剤の選択を含めた指針を示すことができ、翻って、わが国の国民の健康と生命を守るための感染制御につながると考えられる。

## B. 研究方法

1. タイ国マヒドン大学熱帯医学部、国際寄生虫対策アジアセンター(ACIPAC)を中心に、東南アジア各国のマラリア対策の戦略

と進行状況を調査する。同地域はマラリア感染が押さえ込まれつつあるが、マラリア感染地域のなかでも邦人の海外渡航者が特に多いため、感染のリスクが未だ高いと考えられるためである。特に、タイ、ラオス、カンボジア保健省のマラリア対策機関とタイアップして疫学的データの入手を図る。また実際にマラリア感染地区を訪問して、その実態を確認する。

2. また三日熱マラリアについてはタイにおいて、熱帯熱マラリアと異なり重要となる再発について、その疫学的背景を明らかにするために、三日熱マラリアが公衆衛生学的に問題となっているタイーミャンマー国境地域において調査を行うこととする。はじめに三日熱マラリア、再発について関連している論文を検索し(Literature Review)、再発に影響を及ぼしていると推測される要因を明らかにする。これをもとに、データ採取に

において実現性のある要因について、三日熱マラリア患者について調査する研究デザインを作成する。来年度は年間を通じて患者データを収集して、再発に関連する要因を疫学的に明らかにする。

3. 邦人が感染する例が増加しているアフリカ地区において、マラリア感染の実態と対策の進行状況の把握のため、ガーナ野口記念医学研究所を基盤に情報を収集する。

(倫理面への配慮)

上記研究2については、研究の基盤となるタイ、マヒドン大学の研究倫理委員会の承諾を得るとともに、対象患者個人全員のインフォームドコンセントを行う。また、対象患者に関するすべてのデータは本研究以外には一切使用しない。

上記研究1及び3については、個人に関するデータは一切使用しない。

### C. 研究結果

1. 東南アジア地域では、ミャンマーを除いては1990年代後半から開始された包括的アプローチによるマラリア対策の効果によって、全国的流行から辺境地域等の限局された地域での流行になりつつある。

研究分担者が長年調査しているラオスにおいては、殺虫剤浸透蚊帳は2005年には2,360,744人がカバーされていると報告されている。450万人の人口のうち360万人がマラリア危険地域に居住していると推定され、このうち61%がカバーされていると積算された。殺虫剤浸透蚊帳普及の対象地区人口は2,776,315人であり、これについては85%がカバーされているにいたっており、対象人口の50%以下しかカバーされていなかった2001年と比較して格段に普及が進んでおり、蚊帳の配布や殺虫剤の再浸透は公的機関主導の上、維持管理が進んでいると考えられた。しかしながら、住民自身の殺虫剤浸透蚊帳管理については十分でないことが研究者らの報告では明らかになっているため(Shirayama *et al* 2007)、国家マラリア対策戦略の5項目(初期診断と治療、殺虫剤浸透蚊帳の普及、マラリアネ

ットワーク従事者のスキルアップ、村落への啓蒙活動、関連オペレーショナルリサーチ)のうち村落への啓蒙活動については改善の余地があるといえる。

また、ラオス保健省マラリアセンターは、長年クロロキンをマラリア治療第一選択薬としてとりあげてきたが、世界的潮流のなかで2005年、ACTを治療のメインにおくことを正式にTreatment Policyとして示した。具体的にはArtemetherとLumefantrinの合剤を推奨するが、顕微鏡下簡易診断キット(RDT: Rapid Diagnostic Test)によって確定診断をおこなわないこととしている。また、ACTの使用は、中核医療機関のみならず、末端医療機関、村落内での治療にも推奨されている。RDTによる簡易診断がACTによる治療を医師でない末端医療機関従事者、村落内ヘルスポランテアにも可能にさせている。しかしながら、北部ウドムサイ県、南部セコン県でのわれわれの調査では、実際はRCTとACTは、末端医療機関に容易にアクセスできる地域への村落へも無償で配布されてしまっていること、さらには僻地マラリア高リスク地域には必ずしも届いていないことがあることが明らかになり非効率な薬剤の配布が行われていることが推定されている。一方、僻地では公的医療機関や村落ボランティアによる治療以外にも、薬局や売店等の小売商による治療が多いことも明らかになった。

薬剤耐性マラリアについて、メコン各国は2000年にタイ9箇所、ラオス6箇所、カンボジア8箇所、ミャンマー4箇所、ベトナム5箇所においてモニタリングしていくことが決定された。2002年にはラオス、カンボジア、ミャンマーではクロロキン、ファンシダールの耐性は50%以下であるのに対して、タイやベトナムでは高率に耐性株があることを示している。ACTの薬剤耐性試験は現在各地で進められており、来年度に調査を行うものとする。

2. タイにおいては、熱帯熱マラリアの収束にしたがって三日熱マラリアは対策の重要な課題となっており、周辺諸国でも同様な

傾向はみられつつあり、邦人の感染例もみられている。三日熱マラリアの対策においては、感染の再燃、再発は重要な点となる。今回、その疫学的背景を明らかにするために三日熱マラリアと再発に関連した 200 編以上の科学論文をもとに Literature Review を行い、再発との関連にて調査すべき要因を明らかにした(表1)。

3. アフリカ地域のマラリア感染は東南アジア地域と異なり 1990 年代後半から始まった Roll Back Malaria Initiative にもとづく戦略が功をせず収束の傾向を見せていない。近年 WHO を中心に ACT における安価な薬剤の開発と、ドネーション、それらによる配布の動きは各国へ急速に広がっている。しかしながら、マラリア感染が深刻な貧困層にどれだけリーチしているか(末端への配布、住民の治療へのアクセス)は疑問が残ることが推定された。今回、ガーナ大学野口記念医学研究所にて情報収集を行った上、今後の研究協力体制を構築した。

#### D. 考察

薬剤耐性マラリアのモニタリングは、マラリア対策のなかで重要な要素であるが、それが拡散する背景にはマラリア対策においてどのような戦略がとられているかが重要である。様々な感染症対策は 1990 年代から包括的アプローチ、すなわち Primary Health Care の戦略を基盤にした戦略が行われてきた。しかしながらヘルスポランテアを中心にした戦略はそのスキルの不均一性が問題となっている。マラリア治療においては、末端医療機関での治療の向上が見直されてきた。マラリアのみならず、HIV-AIDS、土壌伝播性寄生虫症といった Neglected Diseases に対する安価な治療薬の開発とドネーションの動きは加速化しておりマラリアにおいては ACT の途上国への供給が第一への戦略の様を呈している。

われわれの東南アジアの調査では、最も感染が深刻な僻地貧困層の実際のマラリア初期治療は公的医療機関や村落ボランティアだけでなく、売店などの私的機関による治療が多いことがわかった。さらに ACT

へのアクセスはなされていない場合が多いことがわかってきた。クロロキン、ファンシダール、キニンのよる治療は、これらの地域では未だに頻繁に行われており、今後もモニターが必要であるといえる。

- また ACT の拡充に比して、薬剤耐性試験等のモニタリングは進んでいない。これについては公表されていないデータを含めて来年度詳細な調査を計画している。

さらに三日熱マラリアの再発に関連すると考えられ、モニタリングの実現性のある要因が明らかになったため、来年度はタイにおいて三日熱マラリア患者のモニターを開始してその関連性を調査する。

#### E. 結論

ACT によるマラリア治療が急速に各国へ拡大する一方、マラリア感染の高リスクな対象へのアクセスは未だ整っておらず、従来の治療も多く行われている。今後、薬剤耐性試験を含んだモニタリングは、両者の治療について行っていく必要があると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shirayama Y, Phompida S, Kuroiwa C, Miyoshi M, Okumura J, Kobayashi J: Maintenance behaviour and long-lasting insecticide-treated nets (LLITNs) previously introduced into Bourapar district, Khammouane province, Lao PDR. Public Health 121(2):122-9, 2007

##### 2. 学会発表

野中大輔、小林潤、加藤紀子、當眞弘、狩野繁之、神馬征峰: ラオスにおけるプライマリヘルスケアのためのマラリア初期治療、ワークショップ: マラリア対策の社会技術開発研究、第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006 年 10 月 長崎)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし

表1. 三日熱マラリア再発との関連で調査すべき要因

---

ヒトの要因

年齢、性別、人種、G6PD 欠損、ヘモグロビン E

臨床的要因

体温、熱帯熱マラリアとの重感染、D 型肝炎感染、土壌伝播性寄生虫感染、  
他寄生虫疾患の感染

三日熱マラリアの治療の要因

プリマキンの投与量 (per Kg)、投与のタイミング (症状を呈してからの日数)

医療従事者による直接観察による治療か患者自己管理による治療

寄生虫学的要因

三日熱マラリア原虫の Genotype

環境要因

住居および職場/学校の場所 (場所周辺の環境)

---

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

重症マラリア患者の管理および治療体制に関する研究

分担研究者 狩野 繁之(国立国際医療センター研究所・部長)  
研究協力者 三田村俊秀(国立国際医療センター研究所・室長)  
水野 泰孝(国立国際医療センター国際疾病センター・医師)  
木村 幹男(国立感染症研究所・室長)  
春木 浩介(獨協大学越谷病院臨床検査・教授)  
竹内 勤(慶応大学医学部・教授)  
奥 浩之(群馬大学工学部・助教授)  
畑生 俊光(群馬大学医学部・助手)  
Sornchai Looareesuwan  
(Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University・Professor)

世界における再興感染症であるマラリアの流行拡散は止まらず、わが国からの渡航者の数が増えるに従い、マラリアの防疫にかかる予防の問題、患者管理である治療の問題が山積している。特に薬剤耐性マラリアおよび重症マラリアの治療にかかる医療は、わが国ではほとんど対応できておらず、この臨床技術の開発と全国への均霑化が強く望まれるところである。これらの問題に一つ一つ答えてゆくために、1) マラリア予防ガイドラインの評価研究、2) 同ガイドラインの改訂、さらに3) ACT の有用性の解析と臨床応用を行い、わが国におけるマラリアの医療における最先端の臨床研究を展開し始めた。マラリア予防ガイドラインの実施基準に照らし合わせ、国立国際医療センター国際疾病センター渡航者健康管理室を訪れた相談者の内 107 人に予防用にメフロキンを投与し、55 人がフォローアップでき、そのうち 78%が予防を徹底でき、22 人には何らかの副作用が認められた。予防の徹底率の高さ、副作用の発現率の低さが注目された。これらの運用評価の成績を受けながら、同ガイドラインの改定の作業も行った。特に実施基準の項目に、渡航期間 7 日以上という「絶対的適応」の必要条件を追加したことを特記する。さらに、マラリア新規治療法であるアーテミスニン誘導体の混合療法は、マヒドン大学のマラリア患者 130 人の治療評価研究と、日本への輸入重症マラリア患者での臨床研究を行い、それぞれに極めて優れた治療成績を収めた。今後同混合療法の日本での適用が増えることが強く望まれる。

A. 研究目的

蚊が媒介する感染症の中で、マラリアは世界で最も患者数および死亡者数が多く、マラリア原虫の薬剤耐性の出現と拡散、さらには媒介蚊の殺虫剤抵抗性の出現によって、マラ

リアの予防・治療・流行対策は困難を極めて  
いる。本研究では、特にわが国における防疫  
と患者管理に特化して、マラリアの個人的感  
染予防法・重症化予防法の確立や、マラリア  
重症患者の救命・完治に向けた新規治療法

の開発研究を行い、その成果をもって国民の健康の安全確保に具体的に貢献することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1) マラリア予防ガイドラインの評価研究

先行する厚生労働科学研究費(H15-新興-22)の成果として、「日本の旅行者のためのマラリア予防ガイドライン」をまとめたが、本ガイドラインの臨床における効果の判定、特に予防内服薬としてのメフロキンの効果やその副作用についての評価研究を行った。対象としては、2004年11月～2006年10月に国立国際医療センター渡航者健康管理室(トラベルクリニック)を訪れた渡航前マラリア相談者の内、ガイドラインの適応条件に照らしてマラリア予防内服を行った107名で、帰国後にわたりフォローアップ調査を行った。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言における臨床研究の基準を遵守した。本研究は薬剤治験研究には当てはまらず、相談者に対して臨床的に不利益が生ずることはない。また、相談者情報の取り扱いに関しては十分な配慮を行うとともに、本研究の対象となることに対しては、相談者から書面による同意を得ているので、倫理上の問題は発生していないと考えられる。さらに、本研究者の中に、対象となる薬剤の製造・販売にかかわる製薬会社との利害関係をもつ研究者はいないことも付記する。

### 2) マラリア予防ガイドラインの改訂

上記評価研究の結果を受けて、ガイドライン自身の問題点の解析などを含めた運用評価研究を行い、ガイドライン改訂の作業を行った。改訂にあたっては、「マラリア予防専門家会議(当該分担研究の分担研究者、研究協力者、および防衛省、JICA、JOHACなどの専門家にも会議のメンバーとしての参加をお願いした)」を編成し、月1回のペースで8回の会議を行い検討した。

### 3) ACTの有用性の解析と臨床応用

薬剤耐性マラリアおよび重症マラリアに特に有効とされる青蒿素(チンハオスー/Qinghaosu: Artemisinin)誘導体との混合療法( Artemisinin-derivatives Combination Therapy: ACT)の有用性に関する臨床研究を、a)タイ・バンコクのマヒドン大学熱帯医学病院との共同研究で行い、初年度としては、合併症を伴わない三日熱マラリア、四日熱マラリア、卵形マラリアの治療成績と、治療前後におけるマラリア患者の臨床データの解析を行うことで、その有効性を評価した。さらに b) 本混合療法による治療を、国立国際医療センターに入院した重症例で用い、臨床評価を行った。(症例の詳細はC.研究結果に記載する)

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言における臨床研究の基準を遵守した。本臨床研究遂行にあたっては、事前にマヒドン大学の倫理委員会の審査を通過している。国立国際医療センターにおける臨床データの収集に関しては、薬剤投与前に患者家族に十分な説明を行い、書面にて同意を得ている。また治療後の報告は、医療センターにおける臨床カンファレンス、セミナー等で随時報告して、その研究の倫理面への配慮に関しても問題がなかったと了承されている。

## C. 研究結果

### 1) マラリア予防ガイドラインの評価研究

以下のような結果を得た。a)予防内服薬を投与した107人の内55人が帰国後再来院し、予防効果等のフォローアップができた。内42人(76%)は、渡航中に指定した予防内服(渡航前1週前にメフロキン1錠、渡航中1錠/週、帰国後1錠/週を4週間)を行った。b)12人は、渡航中に予防内服を中止した。c)1人はアドバイスに従わずに、予防内服を行わなかった。d)55人中12人(78%)に何らかの副

作用が発生した(表1)。しかしながら以上のコンプライアンスにもかかわらず、一人もマラリアには罹患しなかった。

## 2) マラリア予防ガイドラインの改訂

ガイドラインのすべての項目について、分担して文言を洗い直したが、特に予防内服の項目における実施基準の適応について、重点的に討議を行った。すなわち、現行では「絶対的適応」および「相対的適応」に分け、「絶対的適応」では以下の2項目両方に該当する場合とした。すなわち、a)熱帯熱マラリアの高度流行地域に滞在する、b)マラリア発症時に適切な医療対応が期待できない。しかしながらこの場合、滞在期間や流行地からの移動先の医療環境の問題で、医師がアドバイスしづらいケースが出てくるのが判明したので、「絶対的適応」にc)旅行期間が7日以上である、という項目を追加した。(その他変更部分は多岐にわたるが、詳細は本報告書では省略する)

## 3) ACTの有用性の解析と臨床応用

a) マヒドン大学の61例の三日熱マラリア患者、54例の四日熱マラリア患者、そして15例の卵形マラリア患者を、ACTで治療した。四日熱マラリアの治療プロトコールとしては、アーテスネート 200mg/日、1x、3日間と、メフロキン 8mg/kg/日、1x、3日間の併用。三日熱マラリアと卵形マラリアは、肝内型の休眠体の治療を追加して、初日はアーテスネート 200mg、1x、続いて100mg/日、x1、4日間、さらにプリマキン 0.6mg/kg、1x、14日間。その結果すべての患者で、原虫血症の治療失敗は認められなかった。

b) 一方、国立国際医療センターに入院した重症マラリア患者をアーテスネートの注射薬で救命することができた。患者は54才の日本人男性で、発熱と意識障害を主訴として来院した。西アフリカ5カ国に滞在して帰国し、その一週間後に39℃の発熱をきたした。赤血球寄生率10%の熱帯熱マラリア原虫を顕微

鏡下で確認し、急性腎不全、脳性マラリアを合併していた。アーテスネート注射薬、初回120mg、12時間後、24時間後にそれぞれ60mgを投与した(投与法は60mg/vialをNaHCO<sub>3</sub>液0.6mLに溶解した後、ブドウ糖液50mLで希釈して、数分かけて点滴静注)。また、メフロキン(メファキン「ヒサミツ」錠275)の併用は、48時間後に3錠、54時間後に2錠、72時間後に1錠を投与した。治療後24時間後にはほとんどの原虫が死滅し、同時に患者は解熱し、意識も清明となった。

## D. 考察

### 1) マラリア予防ガイドラインの評価研究

予防内服を指導した107人のうち55人が再来院し、その76%が渡航中の予防内服を全うすることができたとの報告は、渡航者への渡航外来での指導が徹底したと評価して良いと考える。しかしながら12人(22%)が途中で予防内服を中止したこと、そのうち5人が副作用の発現を理由にそれを中止したことが特記される。ただし、欧米の報告に比べれば副作用発生率が低いこと、さらに表1でも理解できるように、重篤な副作用は認められなかったと考えられる。本予防内服薬治療歴の聞き取り調査・研究で、メフロキンの予防内服の安全性、有効性を例証することができた。

### 2) マラリア予防ガイドラインの改訂

「絶対的適応」とは積極的に予防内服を実施すべきケースで、「相対的適応」とは状況を検討した上で予防内服を実施しえるケースである、とさらに実施基準のイントロで特記し、旅行期間に関する適応条件を追加したことで、外来での医師によるアドバイスをしやすくなったと考えている。なぜなら、マラリアの潜伏期間は短くても7日であり、発症はこれ以降になるため、流行地域に立ち入ってから帰国するまでの期間が7日以上である場合は海外での発症が予想されるが、日本国内で発症した場合は専門医療機関を受診すれば十分な

医療対応が期待できるため、7 日以内の旅行では予防内服の必要は無くなるからである。

### 3) ACT の有用性の解析と臨床応用

a) アーテミスイン誘導体の混合療法 ACT は、合併症を持たない 3 種のマラリアの治療に著効を示すことがわかった。さらに、これらのタイの患者におけるビルルビンの上昇、アミノトランスフェラーゼの上昇、アルカリフォスファターゼの上昇、アルブミンの減少が観察されたが、ACT の治療後速やかに快方に向かい、治療効果の有効性をさらに臨床的に保証した。

b) 一方、国立国際医療センターの輸入重症マラリアの治療例においては、アーテスネート注射薬で劇的に患者は快方に向かい、当該薬剤の有用性が強調された。わが国において輸入マラリア患者に投与することができる抗マラリア薬(薬価収載, 保険適用)は、ファンシダール錠、メフロキン錠、およびキニーネ末であるが、軽症の三日熱マラリア、四日熱マラリア、卵形マラリアは上記2錠剤で十分治療可能である。しかし、多剤耐性マラリアの世界的拡散により、日本国内で発症した輸入熱帯熱マラリア患者であっても、わが国の医療状況下では適切な治療ができない可能性がある。それどころか、重症マラリアの治療に関しては、特定の研究グループが常備しているオーファンドラッグに頼らざるを得ない。アーテスネート注射薬のわが国における使用報告例はきわめて限られ、これまでにわずか分担研究者(狩野)が関わった3例にすぎない。一人でも多くのマラリア患者を救命するためにも、重症マラリアの治療にきわめて有効なアーテスネート注射薬による治療実績を重ね、その有効性をさらに検証してゆかねばならない。

### E. 結論

本年度の当該分担研究では、1) マラリア予防ガイドラインの評価研究、2) 同ガイドライン

の改訂、さらに3) ACT の有用性の解析と臨床応用を行い、わが国におけるマラリアの医療における最先端の臨床研究を展開し始めたといえる。来年度はさらに改訂された新たなガイドラインの評価研究、そして ACT の有効性の検証を進め、わが国の国際感染症に関する政策医療の質の向上を図り、さらにその技術の均霑化を図ってゆく予定である。

### G. 研究発表(分担、協力研究者にアンダーライン)

#### 1. 論文発表

- 1) Noppadon Tangpukdee, Wipa Thanachatwet, Srivicha Krudsood, Nutthanej Luplertlop, Kanrchana Pornpininworakij, Kobsiri Chalermrut, Sasikarn Phokham, Chatnapa Duangdee, Shigeyuki Kano, Sornchai Looareesuwan and Polarat Wilairatana: Liver profile dysfunction in patients with *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*, Korean J Parasitol 44: 295-302, 2006
- 2) Yasutaka Mizuno, Koichiro Kudo, Shigeyuki Kano: Chemoprophylaxis according to the guidelines on malaria prevention for Japanese overseas travelers. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 37: 11-14, 2006
- 3) Yasutaka Mizuno, Yasuyuki Kano, Shuzo Kanagawa, Koichiro Kudo, Meiko Hashimoto, Masanari Kunimoto, Shigeyuki Kano: A case of postmalaria neurological syndrome in Japan. J infect Chemother 12: 399-401, 2006
- 4) 水野泰孝, 藤元瞳, 横田恭子, 加藤康幸, 源河いくみ, 金川修造, 川名昭彦, 岡慎一, 木村哲, 工藤宏一郎, 狩野繁之: アーテスネート静注と血液透析による支持療法で救命しえた重症熱帯熱マラリアの1例, 感染症学雑誌 80: 706-710, 2006
- 5) 狩野繁之: マラリア予防ガイドラインの概要, Clin Parasitol 17(1): 25-27, 2006
- 6) 狩野繁之: アーテミスニン系薬剤によるマ



マラリア治療の位置づけ、病原微生物検出情報  
28(1): 7-9、2007

## 2. 学会発表

1) Yasutaka Mizuno, Koichiro Kudo, Shigeyuki Kano: Evaluation of mefloquine

chemoprophylaxis against malaria at a travel clinic in Japan, Joint International Tropical Medicine Meeting 2006 and 6<sup>th</sup> Asia-Pacific Travel Health Conference, Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand, 29 November -1 December, 2006

2) Shigeyuki Kano: Malaria *In*:

Symposium-Travel Associated Infections, 10<sup>th</sup> Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Fukuoka International Congress Center, Japan, 3-6 December, 2006

3) 狩野繁之: 熱帯熱マラリア、シンポジウム「輸入感染症: 見逃すと死亡する可能性の高いあるいは社会的影響の大きい感染症」、第80回日本感染症学会学術講演会、ホテル日航東京、2006.4.20-21.

4) 水野泰孝、藤元瞳、加藤康幸、横田恭子、源河いくみ、金川修造、川名明彦、岡慎一、木村哲、工藤宏一郎、狩野繁之: アーテスネート静注薬と血液透析による支持療法にて救命しえた重症熱帯熱マラリアの1例、第80回日本感染症学会学術講演会、ホテル日航東京、2006.4.20-21.

5) 加藤康幸、羽田野義郎、水野泰孝、上田晃弘、源河いくみ、川名明彦、金川修造、原田文植、高崎智彦、倉根一郎、狩野繁之、岡慎一、木村哲、工藤宏一郎: フラビウイルス IgM 抗体が偽陽性となった熱帯熱マラリアの一例、第80回日本感染症学会学術講演会、ホテル日航東京、2006.4.20-21.

6) 畑生俊光、田口直、鈴木守、狩野繁之、嶋田淳子: 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球に対する新規細胞接着因子としての膜結合型ケモカイン CXCL16 の同定、第75回日本寄生虫学会大会、弘前文化センター、

2006.5.19-20.

7) 畑生俊光、田口直、鈴木守、狩野繁之、嶋田淳子: 真菌由来化合物ヒポクレリン A の抗マラリア効果の検討、第75回日本寄生虫学会大会、弘前文化センター、2006.5.19-20.

8) 水野泰孝、工藤宏一郎、狩野繁之: 外来におけるマラリア疑い患者のフォローアップの重要性について-三日熱マラリア再発例より-、第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同学会、長崎ブリックホール、2006.10.11-13.

9) 水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、狩野繁之: Postmalaria neurological syndrome が疑われた1例、第55回日本感染症学会東日本地方会総会・第53回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、京王プラザホテル、2006.10.26-27.

10) 水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、狩野繁之: 当センターにおけるマラリア予防内服の現状、第81回日本感染症学会総会、国立京都国際会館、2007.4.10-11.

## H. 知的財産権の出願・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

表1:副作用の種類

番号	年齢	性別	Fa	Di	H	Na	Dr	S	Fe	R	副作用発生時期	所定の予防内服の
1	27	男	●								4-5週 持続	計画通り完結
2	37	男						●			初回投与後 1日間	計画通り完結
3	30	男				●					初回投与後 1日間	計画通り完結
4	28	女		●							初回投与後 1日間	計画通り完結
5	32	女	●	●				●			毎回投与後 1日間	残り2週間で中止
6	23	男	●		●						3-4週 持続	残り1週間で中止
7	27	女					●				1-2週 持続	残り2週間で中止
8	24	男	●		●						初回投与後 3日間	計画通り完結
9	24	女	●		●						初回投与後 4日間	初回で耐えられず中止
10	40	男		●					●		初回投与後 1日間	初回で耐えられず中止
11	32	男	●								初回投与後 1日間	計画通り完結
12	37	女				●					5回目投与後 1日間	計画通り完結
副作用の頻度			6	3	3	2	1	2	1	1		

Fa: 倦怠感, Di: めまい, H: 頭痛, Na: 嘔気, Dr: 眠気, S: 悪夢, Fe: 発熱, R: 皮膚発赤

研究成果の刊行に関する一覧表（平成18年度）

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
二瓶直子	感染症とは何か	村井俊治, 渡辺興亜, 安岡善文, 岡島成行, 二瓶直子	人とわざわい 下巻	エス・ビー・ビー	東京	2007	251-264

雑 誌

発 表 者 氏 名	論文タイトル名	発 表 誌 名	巻名	ページ	出版年
Higa Y, Hoshino K, Tsuda Y, Kobayashi M.	Dry-ice trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern part of Hokkaido, Japan	Med. Entomol. Zool.	57	93-98	2006
Tsuda Y, Suwonkerd W, Chawprom S, Prajakwong S, Takagi M.	Different spatial distribution on <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> along an urban-rural gradient and the relating environmental factors examined in three villages in northern Thailand	J. Am. Mosq. Control Assoc.	22	222-228	2006
Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K.	Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from <i>Culex</i> <i>pipiens</i> mosquito in Japan	Virology	359	405-414	2007
Roychoudhury S, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Saito N, Sawabe K., Kobayashi M.	Comparison of the morphology of oocysts and the phylogenetic analysis of four <i>Ascogregarina</i> species (Eugregarinidae: Lecudinidae) as inferred from small subunit ribosomal DNA sequences	Parasitol. Int.	56	113-118	2007
津田良夫, 比嘉由紀子, 倉橋 弘, 林 利彦, 星野啓太, 駒形 修, 伊澤晴彦, 葛西真治, 佐々木年則, 富田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林睦生	都市域における疾病媒介蚊の発生 状況調査—ドライアイストラップ を用いた2年間の調査結果—	Med. Entomol. Zool.	57	75-82	2006

津田良夫, 比嘉由紀子, 葛西真治, 伊澤晴彦, 星野啓太, 林 利彦, 駒形 修, 澤邊京子, 佐々木年則, 富田隆史, 二瓶直子, 倉橋 弘, 小林睦生	成田国際空港近接地と周辺地域の 媒介蚊調査 (2003, 2004年)	Med. Entomol. Zool.	57	211-218	2006
松本令以, 植田美弥, 佐藤雪太, 比嘉由紀子, 津田良夫, 澤邊京子, 村田浩一	よこはま動物園における鳥マラリ アの発生と対策	獣医畜産新報	59	827-830	2006
澤邊京子, 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 小滝 徹, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 江下優樹, 小林睦生	日本国内における蚊からのウエス トナイルウイルス検出法の検討	Med. Entomol. Zool.	57	279-286	2006
水田英生, 森 英人, 後藤郁夫, 白石祥吾, 杉本昌生, 藤川和生	疫学調査における蚊からのフラビ ウイルス検査法についての一考察	日本検疫医学会誌		投稿中	
小曾根恵子	横浜市における蚊成虫捕獲調査一 第3報 (2005年度)	ペストロジー学会誌	21(2)	53-56	2006
Onishi Y, Eshita Y, Murashita A, Mizuno M, Yoshida J	2-diethylaminoethyl(DEAE)-dextran- MMA graft copolymer for non-viral gene delivery	Bull.Res.Center Environ.Sci.Tech. Nippon Bunri University	5	8-13	2006
Dieng, H, Boots M, Eshita Y.	Some insights into the concept of body size in mosquitoes	House and Household Insect Pest	28(1)	47-62	2006
Dieng H, Boots M, Tamori N, Higashihara J, Okada T, Kato K, Eshita Y.	Some technical and ecological determinants of hatchability in <i>Aedes</i> <i>albopictus</i> , a potential candidate for transposon-mediated transgenesis	J. Am. Mosq. Control Assoc.	22(3)	382-389	2006
Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, K o m a l a m i s r a N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita, Y.	Two-dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae) with reference to sex and body size	Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.	17(4)	133-141	2006