

図1 尿中IgA検出例

図1-1

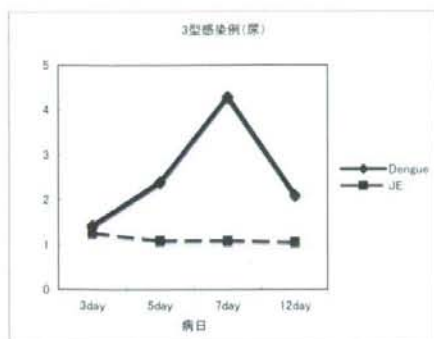


図1-2

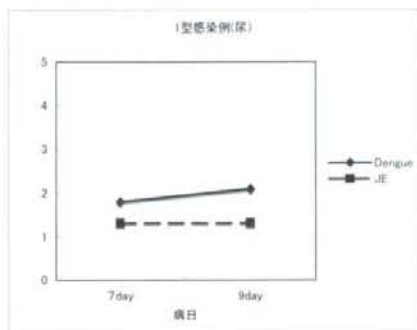


図2 唾液IgA検出例

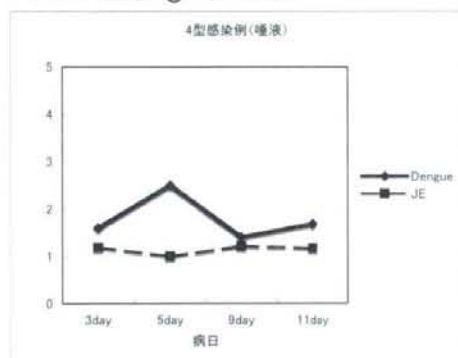


図3 唾液および尿中IgA検出例

図3-1(唾液)

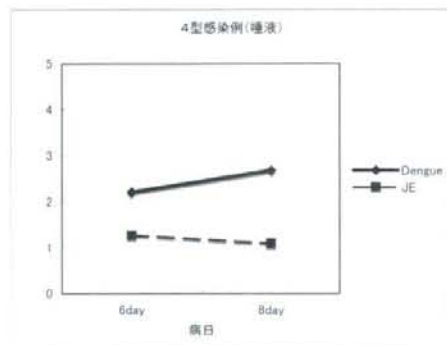
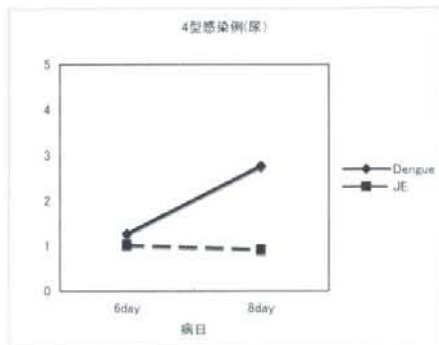


図3-2(尿)



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

ベトナムを中心とした東南アジア地域のヒトマラリア媒介蚊：
ハマダラカ属 *Leucosphyrus* グループに関する分子系統学的研究

研究分担者 高木正洋（長崎大学・熱帯医学研究所・副所長・教授）
研究協力者 高野宏平（長崎大学・熱帯医学研究所・産学官連携研究員）

研究要旨 ベトナム各地およびインドネシア・スンバワ島で採集されたヒトマラリア媒介蚊：ハマダラカ属 *Leucosphyrus* グループの標本について DNA シーケンスした結果、2つの新種の存在が示唆された。形態的には、1種はインドシナ各国森林域の主要媒介蚊である *Dirus* 種群に酷似しており、もう1種はインドネシアからフィリピンにかけての主要媒介蚊に酷似していた。本研究の結果は、現在20種が報告されている同グループの分類学的再検討をせまるものである。

A. 研究目的

日本とベトナムとの人及び物の往来は、近年とみに頻繁になってきた。このため熱帯病流行地からの罹患者の入国と熱帯病媒介蚊の侵入リスクは確実に増大しているといえる。さらに今後の温暖化の進行によって、ベトナム産の熱帯病媒介蚊が本邦南部に定着しないとはいえない。

一方でベトナムを含むインドシナ地域各国では、特に国境沿いに残る森林マラリアが問題になっている。森林域のマラリア媒介蚊はハマダラカ属の *Leucosphyrus* グループだが、このグループは形態の酷似した複数の種を含む。これらの同胞種にはヒトマラリアの媒介種として重要なものとそうでないものが含まれる。真に重要な媒介種の抽出は、効果的なマラリア対策の構築のために必須の研究手続きである。

アジアにおけるマラリア流行に係るか

ような背景と環境を考慮すると、現時点で *Leucosphyrus* グループを精査し学術的情報を蓄積しておくことが重要である。また、我が国に対する期待が大きいベトナム国に対する国際貢献の観点からもこうした研究は意義深い。

そこで、ベトナム各地から採集された *Leucosphyrus* グループ *Dirus* 種群および本研究グループによってインドネシアのスンバワ島から採集された *Leucosphyrus* グループの蚊を DNA シーケンスすることで、東洋区から20種が報告されている同グループについて分子系統学的に再検討することを目的とした。

B. 研究方法

共同研究機関であるベトナム国立マラリア学寄生虫学昆虫学研究所・分子生物学部門のスタッフによってベトナム各地から採集された *Leucosphyrus* グループの蚊を外部形態および産地に基づいて[1]

Anopheles dirus s.l. (26 個体) と [2] *An. leucosphyrus* Con Son Form (4 個体)、[3] *An. sp. like takasagoensis* (2 個体) に予備的に分類した。レファレンスとして中国海南島産の *An. dirus s.s.* 飼育系統 (10 個体) を用いた。また、本研究グループの前川芳秀氏によってインドネシアのロンボク島およびスンバワ島から採集され、分類学の専門家である Rampa Rattarithikul 博士によって *An. balabacensis* と同定された 10 個体も解析に加え、上記の計 62 サンプルについて DNA シーケンスを行った (表 1)。

Leucosphyrus グループ 20 種のうち 13 種を用いて分子系統解析を行った Sallum *et al.* (2007) の結果と比較するために、Sallum *et al.* (2007) に従って mtDNA の *COI* (221 bp) および *ND6* (349 bp) 遺伝子座部分配列をダイレクトシーケンスした。詳細を以下に述べる。Sigma 社 REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit を用いて各サンプルの脚 1~3 本から DNA を抽出した。標本の状態によっては脚以外の部位も用いたが、サンプルが雌の場合は、交尾した相手雄の精子が蓄えられている可能性のある腹部は除くようにした。この DNA 抽出液 1 μ l をテンプレートとして、TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version を用いて合計 20 μ l 容量で PCR を行った。サイクル条件は *COI* でプライマー濃度 0.5 μ M \cdot (94°C 30 秒 \cdot 37°C 30 秒 \cdot 72°C 40 秒) \times 5 サイクル \rightarrow (94°C 30 秒 \cdot 48°C 30 秒 \cdot 72°C 40 秒) \times 45 サイクル \rightarrow 72°C \cdot 2 分間 \rightarrow 4°C で保存、*ND6* でプライマー濃度 1 μ M \cdot (94°C 30 秒 \cdot 37°C 30 秒 \cdot 72°C 40 秒) \times 5 サイクル \rightarrow (94°C 30 秒 \cdot 50°C 30 秒 \cdot 72°C 40 秒) \times 45 サイクル \rightarrow 72°C 2 分間 \rightarrow 4°C で保存とした。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動

およびエチブロ染色で確認し、GEヘルスケアバイオサイエンス社 ExoSAP-IT の 10 倍希釈液で 30 分間処理することにより精製した。電気泳動で確認された濃度を参考に 0.5~2 μ l の PCR 産物をテンプレートとし、Applied Biosystems 社 BigDye® Terminator ver. 3.1 を用い合計 10 μ l 容量 \cdot プライマー濃度 2~6 μ M (PCR 用プライマーと同じ) でサイクルシーケンス反応を行った。シーケンス反応産物は 96 ウェルプレートを用いたエタノール沈殿法で精製し、Applied Biosystems 社 ABI Prism 3730 Avant Genetic Analyzer でフォワード \cdot リバース双方向から DNA 塩基配列を解析した。得られた波形を目視で確認し、フォワードとリバースの相補配列を結合することで各サンプルの塩基配列を決定した。本研究で得られた塩基配列情報に加え、Sallum *et al.* (2007) で報告された *Leucosphyrus* グループ各種 (アクセッション番号 DQ897936-DQ897972 [*COI*] \cdot DQ899796-DQ899832 [*ND6*]) を合わせて解析し、アウトグループとしては以下を利用した。COI: *An. aquasalis* AF417697 \cdot *An. albimanus* AF417695 \cdot *An. gambiae* L20934 \cdot *An. quadrimaculatus* A NC_000875 / *ND6*: *An. aquasalis* U35260 \cdot *An. albimanus* U35259 \cdot *An. gambiae* L20934 \cdot *An. quadrimaculatus* A NC_000875。今回比較した塩基配列間で挿入 \cdot 欠失は認められなかったため、各塩基配列の羅列をそのままアラインメントとした。*An. sp. like takasagoensis* は *COI* 遺伝子座しか解析できなかったため、まずは *COI* 遺伝子座のみを用いて解析した。その後 *An. sp. like takasagoensis* を除き、*COI* と *ND6* 遺伝子座を結合したデータを用いて解析を行っ

た。分子系統樹はフリーのソフトウェア MEGA4を用いて最節約 (MP) 法および近隣接合 (NJ) 法で作成した。

C. 研究結果

Anopheles. sp. like *takasagoensis* は *Dirus* 種群とは離れた位置に付き、*An. balabacensis* や *An. macarthurii* とクレードを形成した (図1)。

An. leucosphyrus Con Son form は、いくつかのデータベース上の *An. dirus* s.s. および *An. baimaii* あるいは今回解析された他のベトナム地域の *An. dirus* とまったく同じ塩基配列を保有し、他の種を含む *Dirus* 種群のクレードに含まれた。

インドネシアのロンボク・スンバワ両島から採集され *An. balabacensis* と同定されていたサンプル群は 100% のブートストラップ値でデータベース上の *An. balabacensis* とは離れた場所に独立したクレードを形成した。

D. 考察

Anopheles. sp. like *takasagoensis* 今まで一部の研究者には *An. dirus* と同種であると考えられてきたが、今回得られたシーケンスはデータベース上のどの塩基配列とも異なる特異なものであり、*Dirus* 種群とも離れた位置に付いたため、新種であると考えられた。

An. leucosphyrus Con Son form は、*An. dirus* s.s. あるいは *An. baimaii* と同じ塩基配列を保有し *Dirus* 種群のクレード含まれたことから、*An. leucosphyrus* Con Son form Payton 1989 は *Dirus* 種群に含めることが適当だと考えられるが、独立した種であるかどうかは今回の解析では明らかにできなかった。

インドネシアのロンボク・スンバワ両島から採集され *An. balabacensis* と同定されていたサンプル群は 100% のブートストラップ値でデータベース上の *An. balabacensis* とは離れた場所に独立したクレードを形成したことから、独立した新種である可能性が高い。*An. balabacensis* はインドネシアからフィリピンまで広く分布するとされているが、今回の結果は隠蔽種の存在を示しており、当該種の分布の再検討をせまるものである。

今回解析した遺伝子座の組み合わせでは 50% 合意樹の解像度は低く、*Leucosphyrus* グループ内における種間の系統関係 (近縁関係) を完全に明らかにすることは出来なかった。

今後は今回明らかになった新種の正式な記載や分布状況の把握をすすめ、さらにはヒトマラリア媒介における重要性を明らかにしていく必要がある。こうした情報の蓄積が、日本を含むアジアにおけるマラリア流行に関する効果的な媒介蚊対策を構築する上で重要である。

E. 結論

重要なマラリア媒介蚊を含むハマダラカ属 *Leucosphyrus* グループでは 20 種が報告されているが、ベトナムとインドネシアから 1 種ずつ (計 2 種) の新種の存在が分子系統学的解析によって明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

2. 学会発表

Takano (Takenaka) K., T. H. N. Nguyen, T. H. B. Nguyen, D. M. Nguyen and M. Takagi : Molecular and morphological evidence of a new species of the *Leucosphyrus* Group of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) from northern Vietnam.. Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases. National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), December, 2008, Hanoi, Vietnam

高野(竹中)宏平・T. H. N. Nguyen・T. H. B. Nguyen・D. M. Nguyen・高木 正洋 : DNA シーケンスによるベトナム産ハマダラカ *Leucosphyrus* グループ 1 新種の確認. 第60 回日本衛生動物学会大会 2008年4月 (下野市)

Takano K, Nguyen T.H.N, Nguyen T.H.B, Nguyen D.M, Takagi M.: Molecular evidence of a new species of the Dirus Complex of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) from Northern Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. December 15-16, 2008, Sapporo, Japan

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

表1 本研究でシーケンスされたOUT (Operational Taxonomical Unit) の一覧

Tentative Species name	Taxon ID	Date	Collector	Sex	Country	Location	備考
1 <i>dirus</i>	S1	24-X-2005	T. Sunahara	M	Vietnam	Binh Phuoc, Dak Nhai, Dak Lien	Larval collector
2 <i>dirus</i>	S2	24-X-2005	T. Sunahara	M	Vietnam	Binh Phuoc, Dak Nhai, Dak Lien	Larval collector
3 <i>dirus</i>	S3	24-X-2005	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Dak Nhai, Dak Lien	Larval collector
4 <i>dirus</i>	S4	25-X-2005	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Dak Nhai, Dak Lien	Larval collector
5 <i>dirus</i>	S5	25-X-2005	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Dak Nhai, Dak Lien	Larval collector
6 <i>dirus</i>	S6	25-X-2005	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Dak Nhai, Dak Lien	Larval collector
7 <i>dirus</i>	S7	8-XI-2005	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, My Thanh	Larval collector
8 <i>dirus</i>	S8	8-XI-2005	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, My Thanh	Larval collector
9 <i>dirus</i>	S9	8-XI-2005	Sunahara T.	M	Vietnam	Binh Phuoc, My Thanh	Larval collector
10 <i>dirus</i>	S10	19-XII-2006	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Light trap
11 <i>dirus</i>	S11	19-XII-2006	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Light trap
12 <i>dirus</i>	S12	19-XII-2006	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Light trap
13 <i>dirus</i>	S13	19-XII-2006	Sunahara T.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Light trap
14 <i>dirus</i>	V24	2002	Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Khanh Phu	
15 <i>dirus</i>	V25	2002	Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Khanh Phu	
16 <i>dirus</i>	V27	2002	Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Khanh Phu	F1
17 <i>dirus</i>	V43		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Binh Phuoc	
18 <i>leucosphyrus</i> Con Son Form	V47	2005	Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Con Son island	Payton, 1989
19 <i>leucosphyrus</i> Con Son Form	V48	2005	Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Con Son island	Payton, 1990
20 <i>leucosphyrus</i> Con Son Form	V49	2005	Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Con Son island	Payton, 1991
21 <i>leucosphyrus</i> Con Son Form	V50	2005	Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Con Son island	Payton, 1992
22 <i>dirus</i>	V51		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Phu Yen	
23 <i>dirus</i>	V52		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Phu Yen	
24 <i>dirus</i>	V53		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Phu Yen	
25 <i>dirus</i>	V54		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Phu Yen	
26 <i>dirus</i>	V71		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Binh Thuan	
27 <i>dirus</i>	V72		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Binh Thuan	
28 <i>dirus</i>	V73		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Binh Thuan	
29 <i>dirus</i>	V74		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Cat Tien forest	
30 <i>dirus</i>	V76		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Cat Tien forest	
31 <i>balabacensis</i>	M24	23-V-2002	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Lombok island	Larval collector
32 <i>balabacensis</i>	M124	17-VI-2002	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Lombok island	Larval collector
33 <i>balabacensis</i>	M132	10-VI-2002	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Lombok island	Larval collector
34 <i>balabacensis</i>	M174	2-VII-2002	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Lombok island	Human landing
35 <i>balabacensis</i>	M177	2-VII-2002	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Lombok island	Human landing
36 <i>balabacensis</i>	M968	20-VIII-2002	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Lombok island	Human landing
37 <i>balabacensis</i>	M800	8-VI-2004	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Sumbawa island	Larval collector
38 <i>balabacensis</i>	M801	8-VI-2004	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Sumbawa island	Larval collector
39 <i>balabacensis</i>	M802	8-VI-2004	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Sumbawa island	Larval collector
40 <i>balabacensis</i>	Mtibe	19-VII-2005	Maekawa Y. et al.	F	Indonesia	Sumbawa island	Human landing
41 <i>dirus</i>	1-3	14-XII-2006	Takano T.K. et al.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Larval collector
42 <i>dirus</i>	1-5	14-XII-2007	Takano T.K. et al.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Larval collector
43 <i>dirus</i>	1-12	14-XII-2008	Takano T.K. et al.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Larval collector
44 <i>dirus</i>	3-6	14-XII-2005	Takano T.K. et al.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Larval collector
45 <i>dirus</i>	3-7	14-XII-2010	Takano T.K. et al.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Larval collector
46 <i>dirus</i>	3-14	14-XII-2011	Takano T.K. et al.	F	Vietnam	Binh Phuoc, Phu Rieng	Larval collector
47 <i>dirus</i>	PM01804		HD.Trung et al.		Vietnam	Nge Anh	Larval collector
48 <i>dirus</i>	PM01805		HD.Trung et al.		Vietnam	Nge Anh	Larval collector
49 <i>dirus</i>	PM01866		HD.Trung et al.		Vietnam	Nge Anh	Larval collector
50 <i>dirus</i>	PM01914		HD.Trung et al.		Vietnam	Nge Anh	Larval collector
51 <i>dirus</i>	H1				China	Hai Nan island	Reared strain
52 <i>dirus</i>	H2				China	Hai Nan island	Reared strain
53 <i>dirus</i>	H3				China	Hai Nan island	Reared strain
54 <i>dirus</i>	H4				China	Hai Nan island	Reared strain
55 <i>dirus</i>	H5				China	Hai Nan island	Reared strain
56 <i>dirus</i>	H6				China	Hai Nan island	Reared strain
57 <i>dirus</i>	H7				China	Hai Nan island	Reared strain
58 <i>dirus</i>	H8				China	Hai Nan island	Reared strain
59 <i>dirus</i>	H9				China	Hai Nan island	Reared strain
60 <i>dirus</i>	H10				China	Hai Nan island	Reared strain
61 sp. like <i>takanogensis</i>	V45		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Bac Can	Resting in a cow shed
62 sp. like <i>takanogensis</i>	V46		Nguyen D.M. et al.	F	Vietnam	Bac Can	Resting in a cow shed

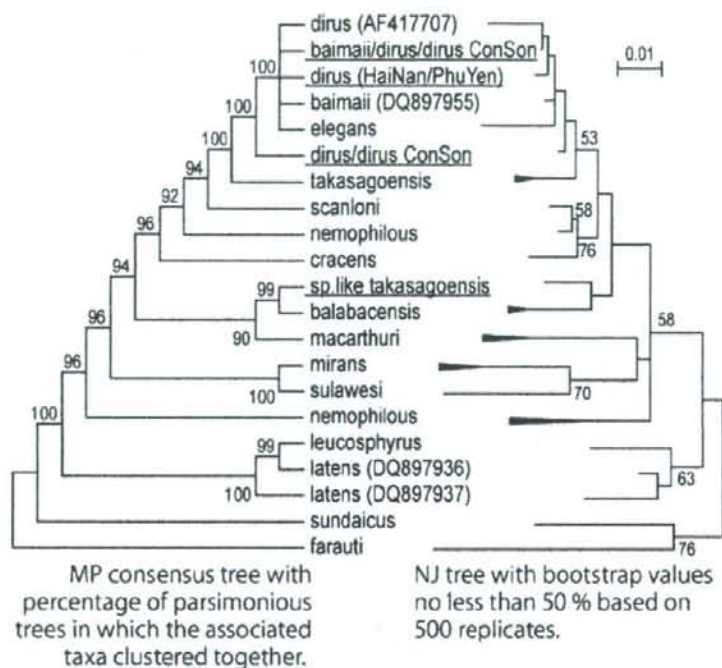


図1. *COI*遺伝子座 221塩基配列に基づく *Leucosphyrus* グループの分子系統樹。

左は最節約法・右は近隣接合法で作成した。下線は本研究で得られたシーケンスを示す。いままで *An. dirus* とされてきた *An. sp. like takasagoensis* は固有のシーケンスを示し *Dirus* 種群とは離れた位置に *An. balabacensis* や *An. macarthurii* とクレードを形成したことから、独立した新種であると考えられる。

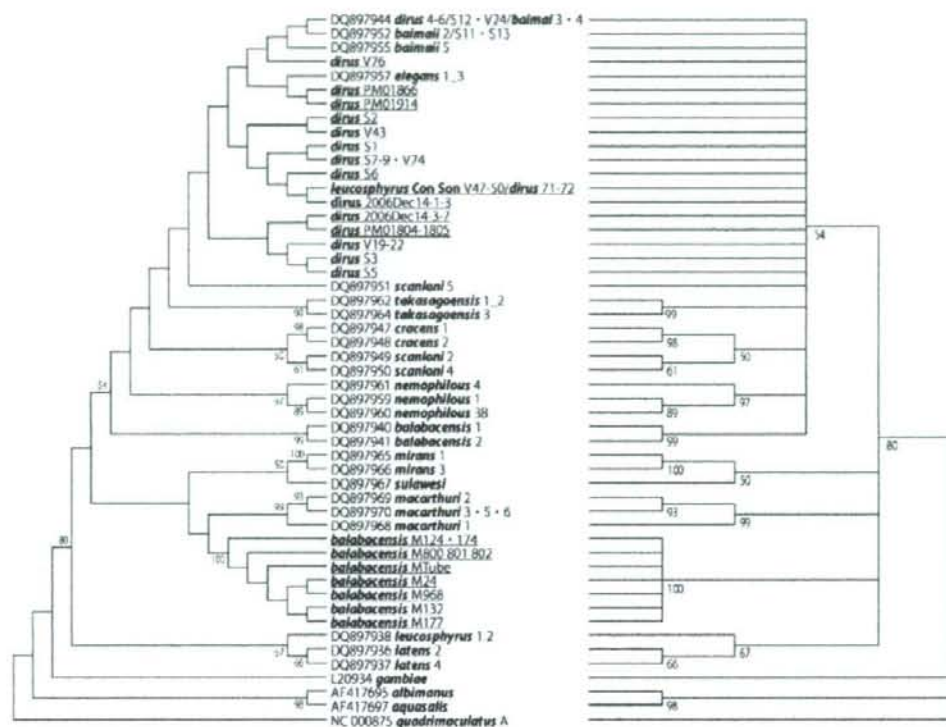


図2. COIとND6の結合データから作成された最節約系統樹。

2000回のブートストラップに基づくブートストラップ合意樹(左)およびその50%合意樹(右)。50以上のブートストラップ値のみを枝の横に示した。下線は本研究で得られたシーケンスを示す。データベースから得られた配列の頭にある記号は、同一の配列を持つサンプルを代表する一つのサンプルのCOI塩基配列に対応するアクセッション番号である。

The MP tree was obtained using the Close-Neighbor-Interchange algorithm with search level 3 in which the initial trees were obtained with the random addition of sequences (10 replicates). There were a total of 564 positions in the final dataset, out of which 142 were parsimony informative.

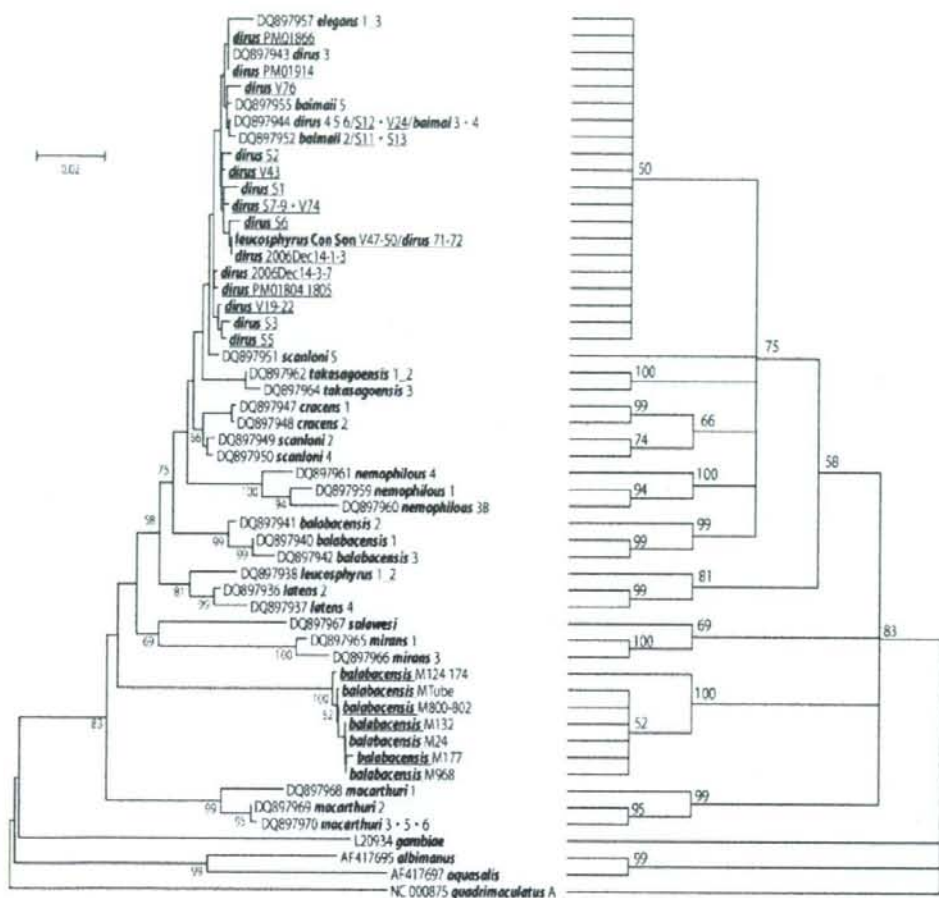


図3. COIとND6の結合データから作成されたNJ系統樹。

500回のブートストラップに基づくブートストラップ合意樹(左)およびその50%合意樹(右)。50以上のブートストラップ値のみを枝の横に示した。下線は本研究で得られたシーケンスを示す。データベースから得られた配列の頭にある記号は、同一の配列を持つサンプルを代表する一つのサンプルのCOI塩基配列に対応するアクセッション番号である

The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree (left). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 545 positions in the final dataset.

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
—特に重症化の指標となるバイオマーカーの探索—

研究分担者 松本芳嗣（東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授）
研究協力者 三條場千寿（東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員）

研究要旨 マラリア重症化の予知および重症マラリアの治療技術の開発のためにバイオマーカーの探索は必須である。さらに、これらのバイオマーカーに関する研究はマラリア病態形成機序の解明のためにも有用な情報を提供できるものとする。今年度は昨年度に引き続きマラリア重症化のバイオマーカーとして尿中肝臓型脂肪酸結合タンパク（L-FABP）に注目して検討を行った。ヒト L-FABP (hL-FABP) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、マラリア感染の進行に伴い尿中 hL-FABP 量が増加することを示し、またマラリア感染からの回復に伴い尿中 hL-FABP 量が減少することを示した。これらの結果により新たな重症マラリアの治療法の開発、治療の判定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三大徴候と呼ばれる発熱、貧血、脾腫を主徴とする。ヒトの4種のマラリアの中で熱帯熱マラリアは悪性マラリアとも呼ばれ、三大徴候に加え、しばしば重篤な貧血、肺浮腫、腎不全、低血糖症等の合併症を伴い重症化し、脳症状を伴う場合は適切な処置を施さなければ致死性である。マラリア重症化の予知、予防、診断および治療技術の開発のために重症化の指標となるバイオマーカーの探索は必須である。一方、熱帯熱マラリアにおいてみられる合併症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。マラリアの重症化に伴って変動するバイオマーカーの研究は、マラリア病態形成機序の解明のためにも有用な情報を提供できるものとする。

本分担研究者らは昨年度までに *Plasmodium berghei* 等ネズミマラリア赤内型原虫接種マ

ウスおよび *P. falciparum* 赤内型原虫接種リスザルを用いた研究により、原虫血症の亢進に伴い MRP8 および MRP14 の血中濃度が増加することを明らかにした。マウスおよびリスザルを用いた研究により、血中 MRP 濃度の上昇は脾臓における MRP8 および MRP14 産生マクロファージの増加に起因することが考えられた。これら動物実験により得られた成果をもとに、急性期のマラリア患者における重症度を判定するバイオマーカーとしての有用性を明らかにするため、患者血清中の MRP8 および MRP14 の測定を行った。その結果、MRP8 および MRP14 の血中濃度がマラリア重症度に相関して上昇することを明らかにした。

本年度は昨年度に引き続き、新たなバイオマーカーとして肝臓型脂肪酸結合タンパク（L-FABP）に着目し研究を行った。L-FABP は、FABP (Fatty Acid-Binding Protein) family に属する 14.4 KD の分子である。血中の遊離

脂肪酸は血清アルブミンと結合し、糸球体で濾過された後、近位尿細管でアルブミンとともに再吸収される。遊離脂肪酸の取り込みは尿細管上皮細胞の L-FABP の発現を up-regulate することが知られている。細胞質内で L-FABP は遊離脂肪酸のミトコンドリアあるいはペルオキシソームへの移送に関与すると考えられている。また近年多臓器不全により尿中に L-FABP が排泄されることが知られ、微小循環障害を示すバイオマーカーとして注目され始めている (Yamamoto, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2007)。特に腎移植後の血流回復を示すバイオマーカーとしての有用性が示されている。一方、悪性マalaria である熱帯熱マalaria に特異的な病理学的所見として微小血管におけるマalaria 原虫感染赤血球の内皮細胞への接着像 (sequestration) が知られており、脳性マalaria の発症に深く関わると考えられている。すなわち sequestration は全身の微小血管で起こるが脳実質の微小血管で sequestration が起こることにより血流障害と下流域の無酸素状態により昏睡等が引き起こされるものと考えられている。重症マalaria における hL-FABP の挙動に関してはこれまで全く報告がない。そこで昨年度、我々はマalaria 重症化のバイオマーカーとして尿中 L-FABP に注目し、ヒト L-FABP (hL-FABP) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、マalaria 感染の進行に伴い尿中 hL-FABP 量が著しく亢進することを示した。今年度はさらに *P. chabaudi* を用いた自然耐過モデルにおいて、さらに *P. berghei* を用いた致死モデルに治療を施すことにより、マalaria 感染の回復に伴う尿中 hL-FABP 量の検討を行った。

B. 研究方法

【自然耐過モデルにおける尿中 hL-FABP 量】

ネズミマalaria 原虫の一種である *Plasmodium chabaudi* は Balb/c マウスに対して、一過性の原虫血症を引き起こすが、その後、原虫血症は消失しマウスは耐過する。そこで感染実験では *P. chabaudi* 赤内型原虫、動物は Balb/c を遺伝的背景とするヒト L-FABP 遺伝子導入マウス (hL-FABP Tg マウス) を用いた (Kamijo, A. et al., J. Lab. Clin. Med., 2004)。受け身免疫の影響を避けるため *P. chabaudi* 原虫を Balb/cA RAG-2 ノックアウトマウスに感染させ、感染赤血球のドナーとして用いた。感染 RAG-2 ノックアウトマウスより得られた新鮮な感染赤血球 1×10^5 個を hL-FABP Tg マウス (N=10) およびコントロールとして Balb/c マウス (N=3) に腹腔内接種した。マalaria 原虫接種後、これらマウスにおける末梢血感染赤血球率をギムザ染色血液塗抹標本により測定した。また、連日、代謝ケージにより自然排尿を採取した。尿中 hL-FABP 濃度は Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) (ヒト型 L-FABP 測定キット、IBL) により測定した。マalaria 原虫感染 20 日目の感染 hL-FABP Tg マウスおよびコントロールとして非感染 hL-FABP Tg マウスを剖検し、腎臓の免疫組織化学的解析を行った。

【致死モデルにおける尿中 hL-FABP 排出量およびクロロキン治療の影響】

ネズミマalaria 原虫の一種であるが、Balb/c マウスに対して致死的な感染を惹起する *Plasmodium berghei* ANKA 株を用い、クロロキンによる治療試験を行い尿中 hL-FABP 濃度を検討した。実験動物は上記 *P. chabaudi* 感染実験と同様 hL-FABP Tg マウスを用い、感染 RAG-2 ノックアウトマウスより得られた新

鮮な感染赤血球 1×10^6 個を腹腔内接種した。マラリア原虫感染 7 日目より、治療群 (N=5) には生理食塩水に溶解したクロロキンを治療第 1 日目 15 mg/kg、第 2 日目より第 5 日目まで 5 mg/kg の処方にて腹腔内に連日投与した。非治療群 (N=5) には生理食塩水のみを腹腔内に投与した。マラリア原虫接種後、これらマウスにおける末梢血感染赤血球率をギムザ染色血液塗抹標本により測定した。また、連日、代謝ケージを用い自然排尿を採取した。尿中 hL-FABP 濃度は Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) (ヒト型 L-FABP 測定キット、IBL) により測定した。

【動物実験】

なお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動物実験委員会および同遺伝子組換え生物等委員会の承認を受けて行った。ヒト試料は用いていない。

C. 研究成果

【自然耐過モデルにおける尿中 hL-FABP 排出量】

非致死的なマラリア原虫 *P. chabaudi* 接種後の hL-FABP Tg マウスにおける末梢血感染赤血球率は原虫接種 4 日目より上がり始め、接種 10 日目に最も高い値を示した (29.1%)。その後、感染赤血球率は下がり始め、接種 12 日目に 8.58%、接種 14 日目で 0.9%、感染 20 日目で 0% となった (図 1、A)。Balb/c マウスにおける末梢血感染赤血球率も同様に原虫接種 4 日目より上がり始め、接種 10 日目に最も高い値を示した (24.37%)。その後、感染赤血球率は下がり始め、接種 12 日目に 5.03%、接種 14 日目で 0.73%、感染 20 日目で 0% となり、hL-FABP Tg マウスとの感染率の差は認められなかった (図 1、B)。尿中

hL-FABP 量は、原虫接種前で 5.9 ng/ml、接種 10 日目で感染赤血球率同様、5801.6 ng/ml と最も高い値を示した。その後、尿中 hL-FABP 量は下がり始め接種 12 日目で 26.3 ng/ml、接種 14 日目で 24.7 ng/ml、接種 20 日目で 4.8 ng/ml と感染赤血球率の増減と一致した (図 2、A)。クレアチニン補正 (hL-FABP (ng) /クレアチニン (mg)) を行った結果を図 2B に示す。原虫感染 20 日目の hL-FABP Tg マウス腎臓を用いた免疫組織化学的解析では、腎皮質の近位尿細管から髄質外層部位まで hL-FABP 陽性領域の拡大が観察され、マラリア感染によってマウス腎臓で hL-FABP の発現が増強していることが示唆された (図 3)。

【致死モデルにおける尿中 hL-FABP 量およびクロロキン治療の影響】

致死的なマラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種後の末梢血感染赤血球率は、接種 4 日目には hL-FABP Tg マウスにおいて 3.5% であり、その後感染赤血球率は急激に上昇し、クロロキンによる治療を開始した接種 7 日目には 26.35% に達した。未治療群の 1 頭は感染 9 日目に死亡し、残り 4 頭の感染赤血球率は 12 日目では 29.3% であった (図 4、A)。一方、治療群の末梢血感染赤血球率は治療開始翌日より急激に減少し、接種 8 日目で 11.6%、9 日目で 1.0% となり、10 日目以降は 0% であった (図 5、A)。hL-FABP Tg マウスにおける尿中 hL-FABP 量は、マラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種前で 10.5 ng/mg Cr、であったものが、感染の進行に伴い増加し、接種 4 日目で 22.2 ng/mg Cr、接種 7 日目では 194.8 ng/mg Cr であった。未治療群の尿中 hL-FABP 量は感染の進行に伴い尿中への hL-FABP の排出が著しく上昇し、接種 9 日目では 83181.2 ng/mg Cr まで達した (図 4、B)。治療群の尿中 hL-FABP 量は接種 9 日目では 60.7 ng/mg Cr

にまで減少し、12日目では42.6 ng/mg Crであった(図5、B)。

D. 考察

ヒトではL-FABPは腎臓において近位尿細管上皮細胞において産生され、一部は尿中に排出される(Kamijo, A. et al., J. Lab. Clin. Med., 2004)。さらに、腎毒性薬剤や虚血などのストレスによって近位尿細管細胞のL-FABP発現が増加することが報告されている(Nakamura, T. et al., Am. J. Med. Sci., 2007)。一方、マウスのL-FABPは腎臓においては産生されず、尿中に排出されることもない。hL-FABP Tgマウスにおける尿中hL-FABP量の増加、および免疫組織化学的解析像におけるL-FABP陽性領域の拡大は、マラリア感染によってマウス腎臓でhL-FABPの発現が増強していることを示している。これらの結果は、原虫血症の増加を反映するバイオマーカーとなることを示唆している。さらにマラリア感染からの回復に伴い、尿中hL-FABP量も速やかに減少することを示した。抗体、原虫抗原、原虫遺伝子を検出するこれまでの診断技術では、原虫の抹消血からの消失をすみやかに判定することはできない。すなわち治療の効果は、原虫血症の消失および臨床症状の改善により判断せざるを得なかった。この点、尿中L-FABP量の測定は抹消血の原虫の消失を素早く反映するため、マラリア重症化を示すバイオマーカーとしてのみならず、治療後の経過を判断する有用なバイオマーカーとなり得ることを示した。また、尿を検体として用いることができることから重症マラリアの診断のための新たな非侵襲的検査法としての有用性も期待できる。マラリア感染によって何故、どのように腎臓でhL-FABPの産生が亢進するのかは今後の研究によって明らかにする予定である。マラリア原虫を接種した

hL-FABP TgマウスおよびBalb/cAマウスにおいて、感染後のマウスの挙動および末梢血感染赤血球率において差が認められなかったことから、hL-FABP TgマウスはL-FABPのマラリア感染の病態に及ぼす影響を研究する上で有用なモデルマウスであることが示された。

E. 結論

本研究では、ヒト肝臓型脂肪酸結合タンパク(hL-FABP)遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、マラリア感染時の末梢血感染赤血球率の増減と尿中hL-FABP量の増減が一致することを示した。得られた成果は従来のマラリア特異的診断法と併用することにより、マラリア患者における尿中hL-FABPがマラリア重症化の早期予知のみならず、治療効果の判定に有用なバイオマーカーであることを示唆している。今後マラリア患者の尿中hL-FABP量と重症度との関連を明らかにすることにより、我が国におけるマラリア患者の予後の判定および治療に大きく貢献できるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Chizu Sanjoba, Yasutaka Osada, Masahito Asada, Sambuu Gantuya, Kousuke Negishi, Takeshi Sugaya, Eisei Noiri, Yoshitsugu Matsumoto: Liver type fatty acid-binding protein (L-FABP) as a novel biomarker for malaria infection, Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Forty-third Joint Conference on Parasitic Diseases, Tokyo, Japan, 2009. 1. 7-8

- 2) 三條場千寿、長田康孝、麻田正仁、Sambu
Gantuya、根岸康介、菅谷健、野入英世、
松本芳嗣：マラリアに伴う尿中肝臓型
脂肪酸結合タンパク(L-FABP)の上昇、第
78回日本寄生虫学会大会、法政大学市ヶ
谷キャンパス、2009.3.27-28

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特願 2008-238680

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1: *P. chabaudi* 接種 hL-FABP-Tg マウスおよび BALB/c マウスにおける末梢血感染赤血球の増加

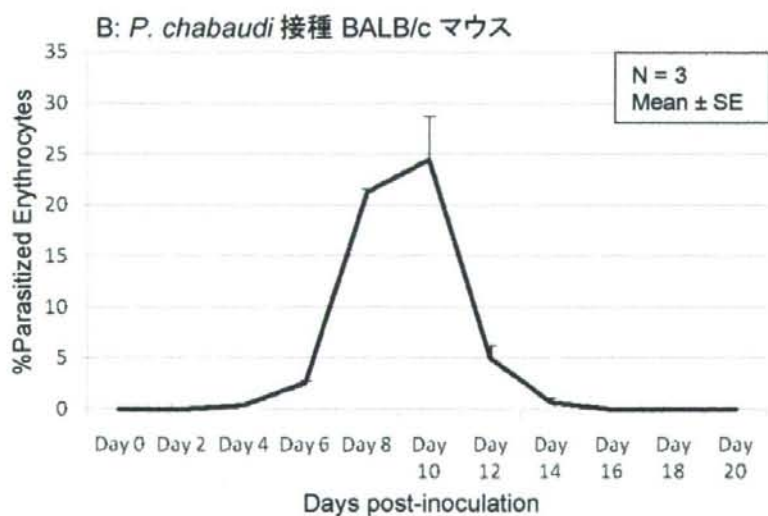
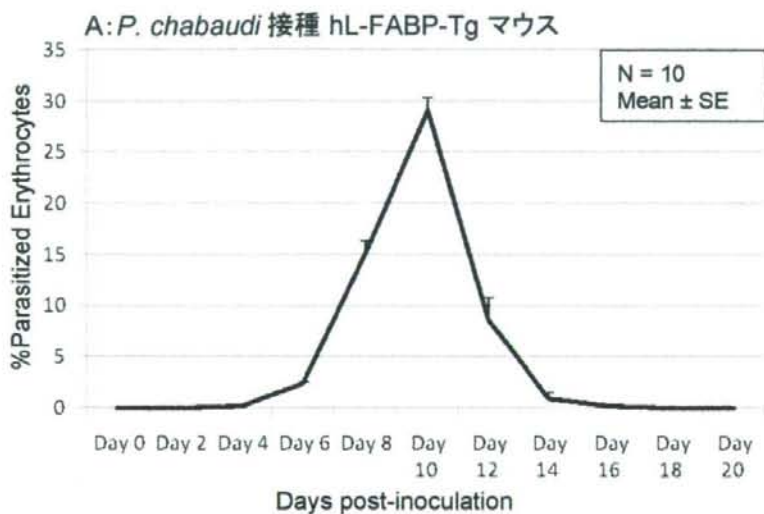


図2: *P. chabaudi* 接種 hL-FABP-Tg マウスにおける尿中 hL-FABP 排泄量

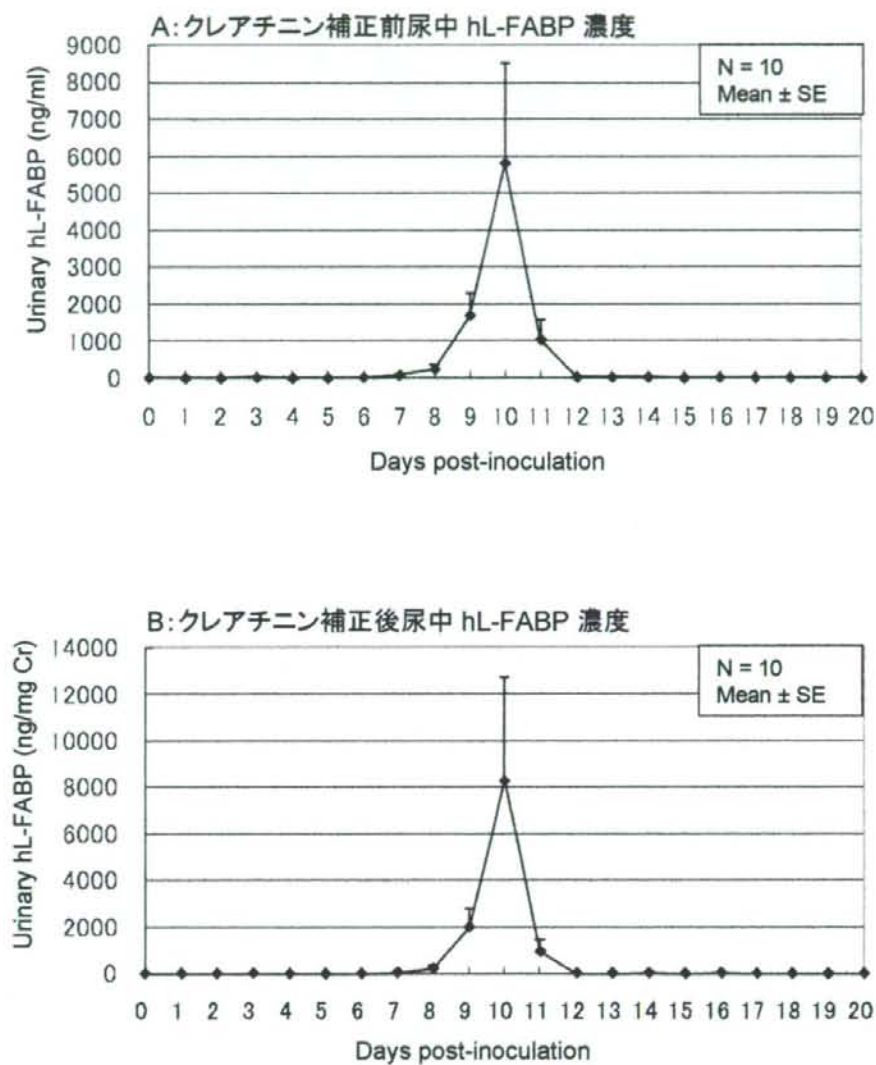
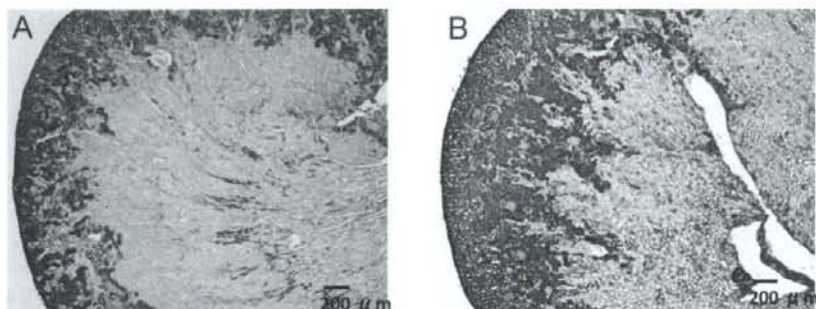


図3: *P. chabaudi* 接種 hL-FABP-Tg マウスおよび 非接種hL-FABP-Tg マウス
における免疫組織化学染色像



A: *P. chabaudi* 非接種 hL-FABP Tgマウス腎、B: *P. chabaudi* 接種 20日目の
hL-FABP-Tgマウス腎。 *P. chabaudi* 感染 hL-FABP-Tgマウスにおいて、近位尿細
管腎皮質から髄質外層部位までhL-FABP陽性領域の拡大が観察された。

図4: *P. berghei* 接種 hL-FABP-Tg マウスクロキン非治療群における
 (A)末梢血感染赤血球の増加、および (B)尿中 hL-FABP 排泄量の増加

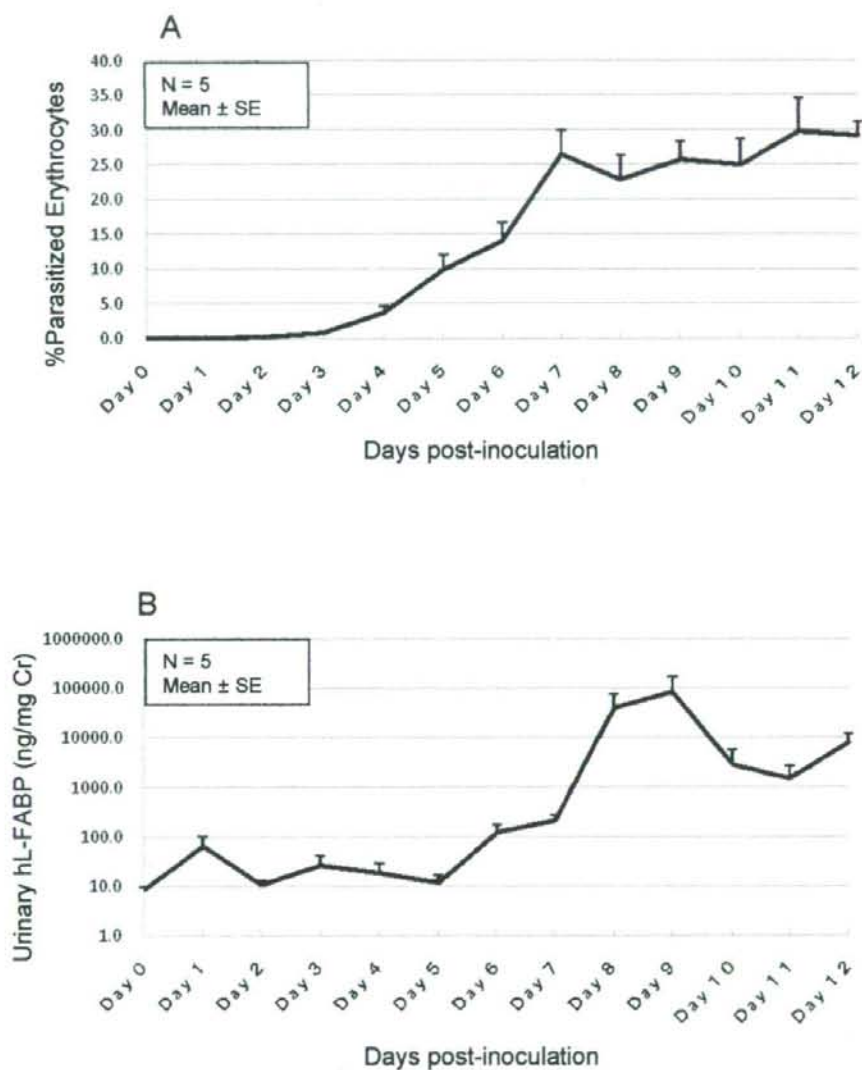
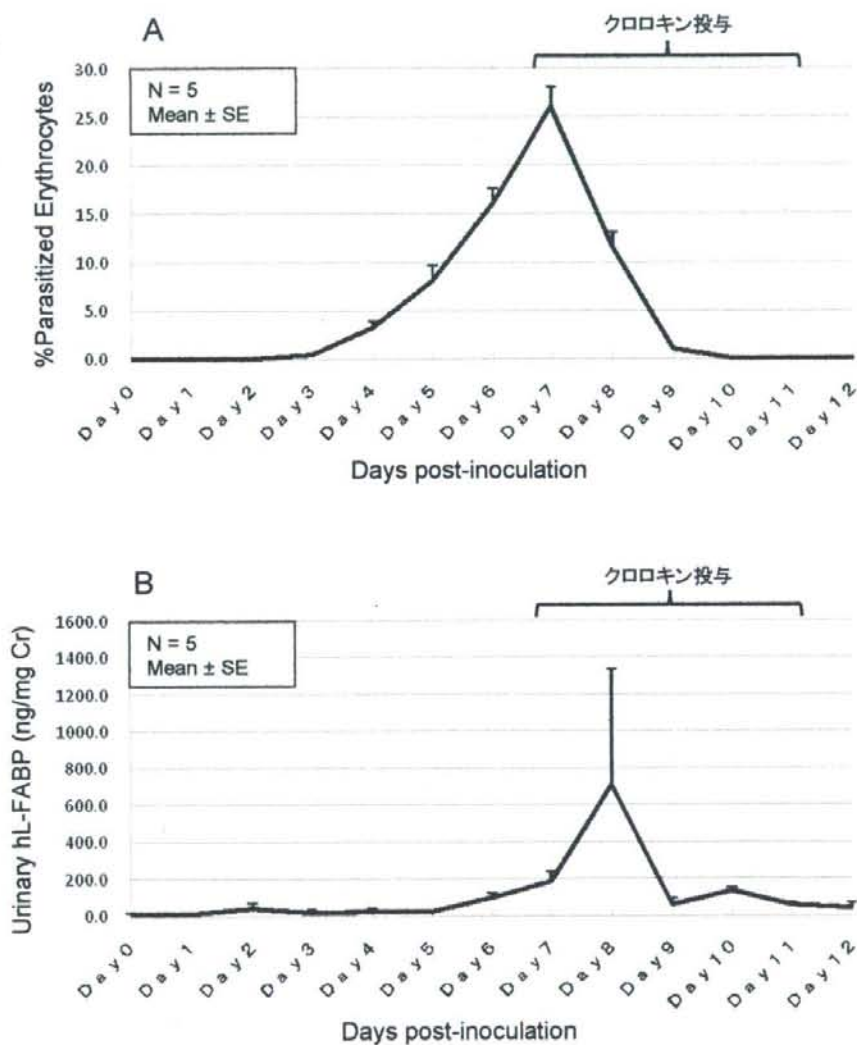


図5: *P. berghei* 接種 hL-FABP-Tg マウスクロロキン治療群における
 (A) 末梢血感染赤血球の治療による減少、および
 (B) 尿中 hL-FABP 排泄量の治療による減少



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

邦人の海外渡航においてリスクの回避のために、東南アジアのマラリア感染地域の
対策と三日熱マラリアの再発・再燃に対する疫学的背景検討に関する研究

研究分担者 小林 潤（国立国際医療センター・国際協力局・医師）
研究協力者 Pratap Singhasivanon（タイ国マヒドン大学・熱帯医学部・学部長）
Youthanavanh Vonghachack（ラオス国立大学・医学部・講師）

研究要旨 東南アジア地域の熱帯熱マラリアの感染が未だ流行している、貧困僻地でのマラリア対策の現状を調査した。この結果、現在までの成果が容易にこれらの地域へのスケールアップにつながるとはいえず、邦人の渡航において継続的な注意が必要であることがわかった。また新たに問題となっている三日熱マラリアの感染については、再発・再燃が常に問題となるが、この背景においては不適切な投薬が関連していると推定された。このため、これに関しては更なる研究の必要性と、邦人が受診する機会の多い現地医療機関や国内の医療機関での治療体制を整える必要も高いといえる。

A. 研究目的

現在、ACT；Artesunate Combination Therapyによる早期治療を戦略の一つにしたマラリア対策の世界的試行によって、東南アジア地域、中南米地域では制圧に成功している。

このようななかで、東南アジアにおける残されたマラリアの流行地域は貧困・僻地に限定されつつある。一方、邦人の海外渡航のスタイルは多岐にわたっており、アジア地域の貧困・僻地やアフリカ地域への渡航が増えている。このため邦人のマラリア感染防御のためアジア貧困・僻地での有効なマラリア対策について検証する。

またアジア地域における熱帯熱マラリアの制圧の成功によって、三日熱マラリアが新たな問題となっている。三日熱マラリア対策には再発・再燃を常に考慮

する必要があるが、その疫学的背景は明らかになっていない。本研究では三日熱マラリアの疫学的背景を明らかにして、邦人感染のリスクを軽減することを目的とする。

B. 研究方法

1) アジア貧困僻地におけるマラリア対策の現状と問題点を明らかにするために、ラオス・カンボジアにおいて保健政策策定者・マラリア対策策定者とともに貧困僻地の行政機関従事者・医療機関従事者・ヘルスボランティアにインタビューを実施した。さらにラオスにおいてはマラリア対策政策と貧困削減戦略とを比較検討を行った。

2) 三日熱マラリアの再発・再燃に関する疫学調査においては、2007年5月より2008年10月の間、タイ国、ラーチャブリ