

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590427

研究課題名（和文）実験的脳マラリアを用いた脳内血流環境の解析

研究課題名（英文）Imaging analysis of the brain in a primate model of cerebral malaria

研究代表者

川合 覚 (KAWAI SATORU)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70275733

研究成果の概要（和文）：実験用ニホンザル4頭にサルマラリア原虫（*Plasmodium coatneyi*）を静脈内接種し、感染経過にともなう脳MRI解析および造影灌流強調画像解析を行なった。その結果、いずれの感染個体においても微小出血や梗塞巣、浮腫等の器質変化を疑うMRI所見は認められなかった。また造影灌流強調画像解析では脳血液量（rCBV）、平均通過時間（MTT）および血流量（rCBF）を測定し、感染前と重度発症時の比較を試みた。その結果、前頭部、側頭部、後頭部および小脳において感染前と発症期との間に明確な違いは認められなかった。各感染個体は最終MRI撮像の直後に剖検し、脳の病理組織学的観察をおこなったところ、大脳および小脳血管内に多数の感染赤血球接着像（sequestration）が認められたが、神経細胞の変性や脳組織の器質的変化は認められなかった。これらの結果を総合すると、脳血管内で発生するsequestrationの形成は、脳マラリアにおける中枢神経症状の主要な要因であると思われるが、単純に脳内の虚血性変化や脳の血流障害を誘発するものではないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the clinical features of cerebral malaria, we performed magnetic resonance imaging (MRI) of the brain in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) infected with *Plasmodium coatneyi*, a primate model of severe human malaria with cerebral involvement. Although the monkey exhibited severe clinical signs, MR imaging did not reveal any significant changes during the course of infection. Histopathologic examination frequently revealed preferential sequestration of PRBCs in the cerebral and cerebellum capillaries, but neither parenchymal injury nor neuronal necrosis was found in the tissues. These results suggest that heterogeneous metabolic reduction and lack of abnormalities on MRI in the acute phase of CM may be due to any avoidance mechanisms from ischemia caused by sequestration. This may be one reason why more than half of CM patients have no neurological sequelae following recovery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：MRI、脳マラリア、*Plasmodium coatneyi*、マラリア疾患モデル、ニホンザル

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯地域を中心にいまだ猛威を奮っており、毎年約3億人の罹患者、約300万人の死者を出す最重要感染症のひとつである。ヒトのマラリアには熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、四日熱マラリア、卵形マラリアの4種類が存在しており、特に熱帯熱マラリアは脳マラリアを含む多くの重篤な併発症が発生し、いわゆる重症マラリアに至る症例も少なくない。脳マラリアに陥った症例では、著しい中枢神経症状を示したのち昏睡に至り、やがて致死的経過をとることも多く、熱帯熱マラリアによる死亡例の約80%が脳マラリアに起因すると報告されている。しかしながら、その発症機序については未だ不明な部分が多く残されている。

これまで研究代表者らは、サル・マラリア原虫の *P. coatneyi* をニホンザル (*Macaca fuscata*) に感染させる疾患モデルを用いて、重症マラリアの病態解析を多角的に行なってきた。その結果、マラリアの重症化は感染赤血球による血管内の sequestration 形成という病理現象だけでなく、炎症性サイトカインや細胞接着分子の過剰産生 (J Vet Med Sci, 2003, 65, 629)、アポトーシスに起因したT細胞の減少等、免疫機能の不均衡が深く関わっていることを明らかにした (Infect Immun, 2000, 68, 1183)。また近年は国内外初の試みとして、¹⁸F-フルオロデオキシグルコース・ポジトロン断層法 (FDG-PET) や磁気共鳴画像 (MRI) といった画像診断技術を応用し、感染前、軽度感染期、重度感染期の脳および全身の病態解析を行なってきた (Am J Trop Med Hyg, 2004, 71, 542, Am J Trop Med Hyg, 2006, 74, 353)。これらの研究成果は、ヒトの熱帯熱マラリアに類似した発症機序を有するサル・重症マラリア疾患モデルを用いてこそ得られた価値の高い情報とな

っている。

2. 研究の目的

近年はコンピューター断層撮影検査 (CT)、シングルフォトン・エミッション CT (SPECT) 検査、磁気共鳴画像検査 (MRI) といった非侵襲的な方法により少数の脳マラリア臨床例の病態解析が行われているが、いずれも発症時所見のみ、もしくは治療後所見との比較であり、感染前からの時系列的な病態解析や、生体時検査の結果に直結する病理所見との相互関係については明らかになっていない。そこで当該研究ではサル・重症マラリア疾患モデルを用いて、同一個体に対する経時的な脳・MRI 検査を実施し、感染前から脳マラリア発症に至るまでの連続的な病態変化を観察するとともに、生体時の MRI 検査結果と脳マラリア発症時の病理組織学的所見との関係を明らかにすることを目的とした。本研究では脳・MRI 検査に造影還流強調画像の解析を取り入れることで、脳血液量 (rCBV)、平均通過時間 (MTT)、血流量 (rCBF) を算出し、各感染時期の脳内血流環境と発症の関係、および病理組織変化との関係を明らかにした。

3. 研究の方法

●供試動物：ニホンザル (2~3歳齢、約3kg)、4頭 (♂1頭、♀3頭) を用いた。

●*P. coatneyi* 感染試験および経過観察：*P. coatneyi* CDC株 感染赤血球・約 1×10^9 /mlに調整した凍結血液を、融解後ただちに上腕静脈より接種した。感染試験にはいずれの個体にも同一ロットの保存感染血液を接種した。感染後は連日経過観察をおこない、感染7日後以降は耳介穿刺法により血液塗抹標本作製し、赤血球感染率を算出した。

●脳マラリアの判定：

これまでの研究から、*P. coatneyi* 感染ニホンザルでは感染8～9日後に末梢血液中に原虫が出現し、感染12～14日後に重度感染状態に陥ることが明らかとなっているが、感染動物の臨床症状判定は、観察者が直接目視する方法ではサル警戒心をあおることになり、正確性に欠ける。そこで当該研究では、発症当日の1日前より、リアルタイムのビデオモニターによる観察を行い、対象動物の飼育室とは別の部屋で臨床症状の判定を実施した。この方法を用いると、感染動物の沈うつ状態、不穏行動、軽度の震戦等の軽微な神経症状を捕らえることができるため、早期の脳マラリア判定が可能である。

4. 研究成果

(1) ニホンザルを用いた脳MRI・造影灌流強調画像撮像条件の検討：カニクイザルによる脳MRIの撮像条件をもとに、ニホンザルを用いた脳MRI・造影灌流強調画像の撮像条件について検討し、本研究で用いる適正撮像条件を設定した。

(2) サルマラリア感染個体による脳MRI解析および造影灌流強調画像解析：ニホンザル4頭にサルマラリア原虫(*Plasmodium coatneyi*)を静脈内接種し、感染経過にともなう脳MRI解析および造影灌流強調画像解析を行なった。その結果、重度発症期であっても微小出血や梗塞巣、浮腫等の器質変化を疑うMRI所見は認められなかった。また造影灌流強調画像解析では脳血液量(rCBV)、平均通過時間(MTT)および血流量(rCBF)を測定し、感染前と重度発症時の比較を試みた。その結果、脳のいずれの部位においても感染前と発症期との間に明確な違いは認められなかった。

(3) 病理組織学的観察：各感染個体の最終MRI撮像の直後に剖検し、脳の病理組織学的観察をおこなったところ、大脳および小脳血

管内に多数の感染赤血球接着像(sequestration)が認められたが、神経細胞の変性や脳組織の器質変化は観察されなかった。

(4) 結論：脳血管内におけるsequestrationの形成は脳マラリアの特徴的病理現象であり、この現象は本研究におけるいずれの感染個体でも高頻度に認められた。その一方で、発症時の脳MRI所見および血流環境には、著しい変化は認められなかった。これらの結果を総合すると、脳血管内で発生するsequestrationの形成は、脳マラリアにおける中枢神経症状の主要な要因であると思われるが、単純に脳内の虚血性変化や脳の血流障害を誘発するものではないことが明らかとなった。また、sequestrationが起因となる脳組織の器質的障害は、脳マラリアの発症初期においては、誘発されることが少ないと示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

【雑誌論文】(計11件)

1) Clues to Evolution of the SERA Multigene Family in 18 *Plasmodium* Species. PloS ONE, 2011, 6, e17775, 1-12. Arisue N., Kawai S., Hirai M., Palacpac NMQ., Mozhi Jia M., Kaneko A, Tanabe K., Horii. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0017775> (査読有り)

2) Imaging analysis of the brain in a primate model of cerebral malaria. Acta Tropica, 2010, 114, 152-156. Kawai S. and Sugiyama M. (査読有り)

3) Lineage-specific positive selection at the merozoite surface protein 1 (msp1) locus of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. BMC Evol. Biol., 2010, 10: 52. Sawai H., Otani H., Arisue N., Palacpac N., Martins LO., Pathirana S., Handunnetti S., Kawai S., Kishino H., Horii T., Tanabe K. (査読有り)

4) Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method as a diagnostic tool of zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infection. J. Clin. Microbiol., 2010, 48: 2509-2514. Iseki H., Kawai S., Takahashi N., Hirai M., Tanabe K., Yokoyama N., Igarashi I.

(査読有り)

5) Cross-reactivity in rapid diagnostic tests between human malaria and zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infections. Parasitol. Int., 2009, 58: 300-302. Kawai S., Hirai M., Haruki K., Tanabe K., Chigusa Y.

(査読有り)

6) Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. Mol. Phylogenet. Evol., 2008, 47(1):45-53. Nishimoto Y., Arisue N., Kawai S., Escalante AA., Horii T., Tanabe K., Hashimoto T.

(査読有り)

7) Male fertility of malaria parasites is determined by GCS1, a plant-type reproduction factor. Curr. Biol., 2008, 18, 607-613. Hirai M., Arai M., Mori T., Kawai S., Kita K., Kuroiwa T., Matsuoka H. (査読有り)

8) サルマラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi*) 感染における診断の問題点と新規検査方法の開発. 日本臨床寄生虫学会誌. 2010, 20: 81-83. 川合 覚, 井関 博, 高橋延之, 五十嵐郁男, 春木宏介, 千種雄一 (査読無し)

9) 川合 覚 : 人獣共通感染性・サルマラリアの現状と診断の問題点、日本獣医畜産新報、2010、63 : 210-211 (査読無し)

10) 川合 覚 : 人獣共通感染性・サルマラリアに関する最近の知見、モダンメディア、2010、56 : 139-145 (査読無し)

11) 川合 覚 : マラリアのワクチン開発の現状、日本医事新報、2008、4414 : 89 (査読無し)

[学会発表] (計 37 件)

海外学会およびシンポジウム :

1) Tachibana S-I, Kawai S., Goto N, Nakamura S, Arisue N, Katakai, Honma H, Palacpac N, Sawai H, Tougan T, Kita K, Yasutomi Y, Horii T, Yasunaga T, Tanabe K. Genome sequencing of a *P. vivax*-related monkey malaria parasite *P. cynomolgi* The 10th Awaji international forum on infection and immunity. 2010, September 7-10, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan

2) Kawai S. Detection of zoonotic simian malaria parasites by molecular diagnostic tools. The first international symposium on human and monkey malaria in Vietnam. The eco-epidemiology of sylvatic and zoonotic malaria. 2010, September 18, The RIHN Conference Hall, Kyoto, Japan

3) Kawai S., Iseki H, Takahashi N, Hirai M, Tanabe K, Yokoyama N, Igarashi I. A novel molecular diagnostic tool for zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infection. 2010, Augst 16-20, ICOPA XII, Melbourne, Australia.

4) 川合 覚 : マラリアの足音が聞こえる～わが国をとりまく環境と最近の話題～、「公開シンポジウム 感染症の国際疫学研究—日本を取りまく感染症の現状—」、2009年12月 藤沢市

5) Kawai S. FDG-PET and MRI of the brain in a primate model of severe human malaria. Sweden-Japan joint seminar. “Malaria research: Diversity and Control” 2008, June. Stockholm, Sweden.

6) Kawai S., Saito N, Katakai Y, Ono F, Nakamura S-I, Yasutomi Y, Kano S. MRI of the brain in a primate model of severe human malaria. 42th Japan U.S. joint meeting and reseach coordination meeting of endemic countries and non-endemic countries on inportant tropical parasitic disease. 2008, January. Davis, CA, USA..

一般講演 :

7) 平井 誠、新井明治、川合 覚、松岡裕之 : ネズミマラリア原虫オオシストスポロゾイト形成に必須なプロテアーゼ、第 77 回日本寄生虫学会、2008年4月、長崎市

8) 川合 覚、片貝祐子、小野文子、中村紳一郎、明里宏文、田邊和裕 : ニホンザル (*Macaca fuscata*) における *Plasmodium cynomolgi* B株の感染感受性、第 77 回日本寄生虫学会、2008年4月、長崎市

9) 小道由香、中瀬由佳里、犀川優、佐伯真希、益山 新樹、野島 正朋、川合 覚、片岡洋行、三谷 公里栄、金 惠淑、綿矢有佑 : 新規抗マラリア薬の開発 —抗マラリア活性を有する新規環状過酸化化合物の体内動態—、第 77 回日本寄生虫学会、2008年4月、長崎市

- 10) 川合 覚：マラリア迅速診断キットにおける*Plasmodium knowlesi*の交差反応性
第7回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、
2008年10月、松山市
- 11) 有末 伸子、N. M. Q. Palacpac、川合 覚
、平井 誠、田邊 和祐、堀井 俊宏：マラリア原虫SERA遺伝子ファミリーの分子進化、第7回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2008年10月、松山市
- 12) 松本雅弘、小道由香、中瀬由佳里、益山 新樹、野島 正朋、川合 覚、片岡 洋行、金 惠淑、綿矢有佑：新規抗マラリア薬の開発—環状過酸化物の抗マラリア活性と体内動態—、日本薬学会第129年会、2009年3月、京都市
- 13) 川合 覚：市販マラリア診断キットにおける*Plasmodium knowlesi*の交差反応性、第78回日本寄生虫学会、2009年3月、東京都
- 14) 橘真一郎、川合 覚、後藤直久、中村昇太、片貝祐子、澤井裕美、東岸任弘、北 潔、保富康宏、堀井俊宏、安永照雄、田邊和祐：アジアマカクマラリア原虫*Plasmodium cynomolgi*のゲノム解読、第78回日本寄生虫学会、2009年3月、東京都
- 15) 有末 伸子、N. M. Q. Palacpac、川合 覚、平井 誠、田邊 和祐、堀井 俊宏：マラリア原虫SERA遺伝子ファミリーの分子進化、第78回日本寄生虫学会、2009年3月、東京都
- 16) 金 惠淑、小道由香、平本晃子、川合 覚、平岡 修、益山 新樹、野島 正朋、綿矢有佑：マラリア治療薬開発の現在、第78回日本寄生虫学会、2009年3月、東京都
- 17) 見市文香、モハンマドアブユースフ、津久井久美子、川合 覚、野崎智義：ミトコンドリア関連オルガネラの新規機能—赤痢アメーバ原虫マイトソームに存在する活性硫酸合成経路—、第78回日本寄生虫学会、2009年3月、東京都
- 18) 高橋延之、井関 博、川合 覚、横山直明、五十嵐郁男：LAMPによる*Plasmodium cynomolgi*遺伝子検出法の開発、第147回日本獣医学会学術集会、2009年4月、宇都宮市
- 19) 川合 覚、井関 博、高橋延之、五十嵐郁男、春木宏介、千種雄一：サルマラリア原虫(*Plasmodium knowlesi*)感染における診断の問題点と新規検査方法の開発、第20回日本臨床寄生虫学会、2009年6月、大阪市
- 20) 井関 博、川合 覚、高橋延之、五十嵐郁男：人獣共通サルマラリア原虫・*Plasmodium knowlesi*に対する遺伝子簡易検出法の開発、第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月、鳥取市
- 21) 川合 覚、春木宏介、千種雄一：人獣共通感染性・サルマラリア原虫に対する市販マラリア診断キットの反応性、第69回日本寄生虫学会東日本大会、2009年10月、東京
- 22) 井関 博、川合 覚、高橋延之、平井 誠、千種雄一、五十嵐郁男：LAMPによる*Plasmodium knowlesi* 遺伝子・迅速検出法の開発、第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2009年10月、大阪市
- 23) 高橋延之、井関 博、川合 覚、横山直明、五十嵐郁男：LAMPによる*Plasmodium cynomolgi* 遺伝子・迅速検出法の開発、第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2009年10月、大阪市
- 24) 平井 誠、川合 覚、森 稔幸、新井明治、松岡裕之：マラリア原虫受精決定因子PbGCS1の機能解析、第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2009年10月、大阪市
- 25) 松本雅弘、岡田和朗、脇本達也、笹岡健二、森田将之、小山貴彦、益山新樹、野島正明、川合 覚、平岡 修、平本一幸、平本晃子、佐藤 聡、金 惠淑、綿矢有佑：新規抗マラリア薬の開発研究—環状過酸化化合物の抗マラリア活性と体内動態—、第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2009年10月、大阪市
- 26) 川合 覚、井関 博、高橋延之、五十嵐郁男、千種雄一：人獣共通感染性・サルマラリアの現状と診断の問題点、第9回人と動物の共通感染症研究学術集会、2009年11月、東京都
- 27) 川合 覚、井関 博、高橋延之、平井 誠、千種雄一、五十嵐郁男：LAMPによる*Plasmodium knowlesi*迅速診断法の開発、第50回日本熱帯医学会大会、2009年10月、宜野湾市
- 28) 橘真一郎、川合 覚、後藤直久、中村昇太、

片貝祐子、澤井裕美、東岸任弘、北 潔、保富康宏、堀井俊宏、安永照雄、田邊和祐：次世代シーケンサーによるサルマラリア原虫 *Plasmodium cynomolgi* のゲノム解読、第 8 回感染症沖縄フォーラム、2010 年 1 月、那覇市

29) 橋真一郎、川合 覚、後藤直久、中村昇太、片貝祐子、澤井裕美、東岸任弘、北 潔、保富康宏、堀井俊宏、安永照雄、田邊和祐：次世代シーケンサーによる新規マラリア原虫ゲノムの解読、第 4 回日本ゲノム微生物学会年会、2010 年 3 月、福岡市

30) 橋真一郎、川合 覚、後藤直久、中村昇太、片貝祐子、澤井裕美、東岸任弘、北 潔、保富康宏、堀井俊宏、安永照雄、田邊和祐：次世代シーケンサーによる三日熱マラリア原虫近縁サルマラリア原虫 *P. cynomolgi* のゲノム解読、第 79 回日本寄生虫学会、2010 年 5 月 20～21 日、旭川市

31) 川合 覚、片貝祐子、保富康宏、田邊和祐：マカク属サル種間にみられるサル・マラリア感染感受性の比較、第 79 回日本寄生虫学会、2010 年 5 月 20～21 日、旭川市

32) 松本雅弘、岡田和朗、脇本達也、笹岡健二、森田将之、小山貴彦、鎌井一気、益山新樹、野島正明、川合 覚、片岡洋行、金 惠淑、綿矢有佑：新規抗マラリア薬の開発研究-環状過酸化化合物の抗マラリア活性と体内動態-、第 79 回日本寄生虫学会、2010 年 5 月 20～21 日、旭川市

33) 平田晴之、川合覚、前田真理、陳内理生、藤澤幸平、片貝祐子、彦坂健児、田邊和祐、保富康宏、石原智明：ニホンザル (*Macaca fuscata*) から検出された新型ピロプラズマ原虫の進化系統解析、第 150 回日本獣医学会、2010 年 9 月 16 日～18 日、帯広市

34) 高橋延之、川合 覚、井関 博、横山直明、五十嵐郁男：LAMP による *Plasmodium cynomolgi* 遺伝子検出法の開発、第 56 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会、北日本支部合同大会、2010 年 10 月 2 日、3 日、札幌市

35) 橋真一郎、川合 覚、後藤直久、中村昇太、有末伸子、片貝祐子、本間一、Palacpac Nirianne、澤井裕美、東岸任弘、北 潔、保富康宏、堀井俊宏、安永照雄、田邊和祐：次世代シーケンサーを利用したサルマラリア原虫 *Plasmodium cynomolgi* の新規ゲノム構築と

比較ゲノム解析、第 9 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2010 年 10 月 8 日、9 日、長崎市

36) 有末伸子、Nirianne M. Q. Palacpac、川合 覚、平井 誠、田邊和祐、堀井俊宏：マラリア原虫 SERA 遺伝子ファミリーの系統特異的な進化、第 9 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2010 年 10 月 8 日、9 日、長崎市

37) 高橋延之、川合 覚、井関 博、横山直明、五十嵐郁男：LAMP による *Plasmodium cynomolgi* 遺伝子検出法の開発、第 51 回日本熱帯医学会大会、2010 年 12 月 3 日、4 日、仙台市、仙台国際センター

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川合 覚 (KAWAI SATORU)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70275733

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

保富康宏 (YASUTOMI YASUHIRO)

独立行政法人医薬基盤研究所筑波霊長類
科学研究センター・センター長

研究者番号：90281724