

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23256001

研究課題名(和文)旧世界におけるリーシュマニア症の病態疫学

研究課題名(英文)Epidemiology and pathology of leishmaniasis in Old world.

研究代表者

松本 芳嗣 (Matsumoto, Yoshitsugu)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00173922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：旧世界、特にインド亜大陸、トルコ、東アジアにおける種々のリーシュマニア症について、病原原虫、媒介昆虫、患者、保虫宿主等からの多角的アプローチにより本症の病態疫学を解析した。これらの成果をもとに、内臓型リーシュマニア症に対する新規治療薬候補を得、皮膚型リーシュマニア症に対する検査用試薬の開発を行い、トルコおよびバングラデシュにおいては地理的およびヒトを含む保虫生物等と原虫の生態学的位置付けを考慮して実装可能なベクターコントロールを提唱した。

研究成果の概要(英文)：The comparative studies of leishmaniasis from different foci: visceral leishmaniasis, post kala-azar dermal leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis including the parasites, vector insects, patients, reservoir animals were attempted to understand the epidemiology and pathology of leishmaniasis in Old world. Based on these studies, a new therapeutic drug candidate for visceral leishmaniasis had been obtained and the diagnosis reagent for cutaneous leishmaniasis is under development. The sustainable and functioning vector control method concerning with the geographic matter, host-parasite interaction, and the vector behavior was proposed on endemic area of leishmaniasis in Turkey and Bangladesh.

研究分野：寄生虫学・免疫学

キーワード：リーシュマニア症 人獣共通感染症 原虫 媒介昆虫 保虫宿主

1. 研究開始当初の背景

これまでリーシュマニア症では病原種と病型には特異的な因果関係があると考えられてきた。たとえば、内臓型リーシュマニア症の病原種は全て *Leishmania donovani* complex (*L. donovani* s.l.) に属し、旧世界には *L. donovani*, *L. infantum*, および *L. archibaldi* が分布する。これら病原種は皮膚型、皮膚粘膜型を起こすことは無いと考えられてきた。先行研究により明らかにした新規感染症である「*Leishmania donovani* s.l.による皮膚型リーシュマニア症」は「旧世界における内臓型リーシュマニア症の病原体は *L. donovani* s.l.、皮膚型リーシュマニア症の病原体は *L. major* s.l.」と言う、これまでの定説に大きな変更を求める結果となった。

2. 研究の目的

本研究では、リーシュマニア症の定説である「病型と病原種の固有の関係」に修正を加え、真のリーシュマニア症伝播機構、発症機構を明らかにする。これまでの研究を更に発展させ、世界的視野での多角的比較研究により、人類の脅威となっているリーシュマニア症の伝播機構、発症機構を解明しようとする。すなわち、本研究は単に病原体の解析による病原性の解明にとどまらず宿主、保虫動物、媒介昆虫、さらに地理的、社会的要因を考慮し、多角的に病態疫学を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

旧世界におけるリーシュマニア症、特にインド亜大陸における *L. donovani* s.s.による anthroponotic 内臓型リーシュマニア症、スリランカにおける *L. donovani* s.l.による皮膚型リーシュマニア症、近年東アフリカにおいて流行をみた *L. donovani* s.l.による劇症内臓型リーシュマニア症、中央アジア、トルコ、中近東における *L. donovani* s.l.による zoonotic 内臓型リーシュマニア症、地中海沿岸、中央アジア、トルコ、中近東における *L. major* s.l. および *L. tropica* による皮膚型リーシュマニア症、東アフリカおよびインド亜大陸における PKDL、および(H)中央アジア、東アフリカにおける *L. turanica* など動物由来原虫によるリーシュマニア症を対比させ、(1)病原原虫、および(2)媒介昆虫(サンショウバエ)の分子レベルでの比較解析、(3)ヒトの免疫学的、遺伝学的背景、および(4)保虫動物の関与の程度を明らかにし、地理的およびヒトを含む関連生物の生態学的位置付けを考慮した多角的アプローチにより、リーシュマニア原虫がどうして多様な病態を示す、地域により異なる伝播経路をとるのかという点に焦点を当て、リーシュマニア症の

病態疫学を明らかにする。

4. 研究成果

(1)これまでの原虫分離用培養液に改良を加えることで、トルコ皮膚型リーシュマニア症患者、バングラデシュ内臓型リーシュマニア症患者、PKDL 患者、またモンゴルの大スナネズミよりそれぞれ 2 - 7 株の病原リーシュマニア原虫を分離し、原虫種の同定を行い、性状解析、抗原性解析を行った。なお、東アフリカについては安全管理上不安要素があったため、現地調査は実施せず、これまでの共同研究より得られた分離株を用い比較対象とした。

さらに、病態機序の解明のために、マウスを用いた内臓型リーシュマニア症の病態モデルを確立した。*L. donovani* D10 株原虫感染 BALB/c マウスが脾臓、肝臓における持続的な原虫の増殖、進行性の肝脾腫を示し、重篤な内臓型リーシュマニア症の病態を再現するマウスモデルになると考えられた。さらに、感染 BALB/c マウス末梢血からの PCR 法による原虫遺伝子の検出及び培養法による原虫の分離を試みたところ、感染 4 週目には原虫遺伝子が検出され、8 週目には生原虫が分離された。これらの結果は PCR 法の末梢血を試料とした早期簡易診断法の可能性を示すとともに、感染時の原虫血症の実験的証明といえる。

L. donovani 感染において、明瞭な病態の違いを示す BALB/c、C57BL/6、および C3H マウスにおける原虫抗原特異的 Th1 反応及び Th2 反応について、感染マウス由来脾細胞を原虫粗抗原で刺激した際の IFN- γ 及び IL-4 産生量を測定して評価したところ、*L. donovani* 感染に対して感受性を示した BALB/c マウスでは最も低い IFN- γ 産生、最も高い IL-4 産生を示し、Th2 型の免疫反応が誘導されたと考えられ、また自然治癒を示した C57BL/6 及び抵抗性を示した C3H マウスでは Th1 型の免疫反応が誘導されたことが考えられた。以上のことから、*L. donovani* 感染に対する感受性に Th2 反応、抵抗性に Th1 反応が関与していることが明らかになった。

(2) ヒト内臓型リーシュマニア症およびイヌリーシュマニア症が蔓延しているトルコ西部において媒介昆虫調査を行い *Phlebotomus tobbi* の生態学的優先度を確認した。さらに、この地域に生息する 5 種 *Phlebotomus* 属サンショウバエに対する長期残留型蚊帳の効果をも WHO 基準に基づき試験し、その有用性を示唆した。

媒介昆虫種の明らかになっていないバングラデシュにおける媒介昆虫調査では、*P. argentipes* の生態学的優先度を確認し、*P. argentipes* が媒介種として推測された。さら

に、内臓型リーシュマニア症対策におけるベクターコントロールの一助となることを目的とし、長期残効型蚊帳、Olyset® Net および Olyset® Plus のサシチョウバエに対する効力を WHO standard cone test により試験した。バングラデシュ国内で内臓型リーシュマニア症が高度に蔓延する地域 (Mymensingh district) よりサシチョウバエ (91.3% *Phlebotomus argentipes*) を採集し、Olyset® Net および Olyset® Plus にそれぞれ 3 分間暴露させた後の Mortality rate を 5 分後より 24 時間後まで経時的に記録した。Olyset® Plus 試験群のサシチョウバエの Mortality rate は 5 時間後に 100% に達した。Olyset® Net 試験群の 24 時間後の Mortality rate は 86.4% であった。さらに、6 か月使用後の両蚊帳についても同様の試験を行った結果、24 時間後の Mortality rate は Olyset® Net、Olyset® Plus それぞれ 94.5%、99.0% であった。Olyset® Net および Olyset® Plus はバングラデシュにおける内臓型リーシュマニア症の罹患率を減少させるのに有用と考えられた。

(3) ヒトの血清疫学的解析のひとつの成果として、内臓型リーシュマニア症患者における血清 B-cell activating factor (BAFF) 濃度の増加を明らかにした。BAFF は B 細胞の維持・分化に重要な因子であるが、自己免疫疾患など B 細胞の異常を伴う疾患において過剰産生されることが知られている。バングラデシュの内臓型リーシュマニア症患者、およびバングラデシュ健常人の血清における IgG 濃度は、 45.6 ± 26.5 mg/ml (平均 \pm 標準偏差、以下同様)、 10.8 ± 1.73 mg/ml、であり、内臓型リーシュマニア症患者が健常人に比べて有意に高く、*L. donovani* 感染マウスと同様、高 IgG 血症が起きていることが示された。また、内臓型リーシュマニア症患者の血清あるいは血漿における BAFF 濃度は健常人に比べて有意に高い値を示した。内臓型リーシュマニア症患者における BAFF 濃度の増加率 (患者と健常人の測定値の平均値を比較) は、1.96 倍であり、BAFF の過剰産生が病態の悪化を引き起こすことが知られている自己免疫疾患などにおける過去の報告に匹敵するほどであった。本研究により、内臓型リーシュマニア症患者における血中 BAFF の亢進を明らかにした。

(4) 保虫動物の関与の程度を明らかにする目的で、ヒト皮膚型および内臓型リーシュマニア症が蔓延しているトルコの Adana 地域において、92 頭のイヌを対象にリーシュマニア原虫分離または LAMP 法による感染率の推定を行った結果、感染率は 17.4% であり、この地域においてイヌが重要な保虫宿主であることを示唆した。

モンゴルにおける現地調査では、リーシュマニア原虫の主な宿主として考えられて

いる *Rhombomys opimus* を捕獲し原虫保有率を調査した。耳介部試料の培養では 15.3% の原虫検出率、原虫粗抗原に対する ELISA 法および LSUrRNA 遺伝子を標的とした PCR 法では共に 53.8% の陽性を示したことから、モンゴル西部で *R. opimus* におけるリーシュマニア原虫保有率は高いことが示唆された。

さらに本研究課題で確立された内臓型リーシュマニア症病態マウスモデルを用い、海藻由来新規治療薬の探索を行った。褐藻類ヒバマタ目ホンダワラ科アズマネジモク (*Sargassum yamadae*) より単離したキノンテルペノイド 10 種について in vitro における原虫増殖抑制効果を評価した結果、10 種のうち 6 種が 10 μ g/ml の濃度で 50% 以上の増殖抑制効果を示した。100% の増殖抑制効果を示したキノンテルペノイドについて、本マウスモデルを用いて in vivo 原虫増殖抑制効果を検討した。対照として既知の治療薬である AmBisome (200 μ g/head) を用いた。感染 7 週後に重篤な VL を発症していることを確認後、30 日間の腹腔内投与 (始めの 14 日間: 1 mg/head、残りの 16 日間: 2 mg/head) を行ったところ、治療終了翌日には双方の治療群の脾臓、肝臓において LDU および培養法何れの方法でも感染原虫は観察されなかった。尚、このキノンテルペノイドを sargaquinoidic acid と命名し、抗リーシュマニア症治療薬として特許を取得した。また、本マウスモデルが VL 治療薬の in vivo 評価に有用であることが示された。本研究で得られた成果は、現在世界規模で人類の脅威となっているリーシュマニア症の真の発症機構の解明の一助となり、リーシュマニア症の治療、診断、予防、および本症の新規流行予知にも有益な情報を提供できるものと考えられる。

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 23 件)

Goto Y, Omachi S, Sanjoba C, Matsumoto Y. Elevation of serum B-cell activating factor levels during visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg、査読有、2014、91:912-914.

DOI: 10.4269/ajtmh.14-0260.

松本芳嗣、後藤康之、三條場千寿: 犬のリーシュマニア症、日本獣医師会雑誌、査読無、2013、66:5-7.

Ishigami ST, Goto Y, Inoue N, Kawazu SI, Matsumoto Y, Imahara Y, Tarumi M, Nakai H, Fusetani N, Nakao Y. Cristaxenicin A, an antiprotozoal xenicane diterpenoid from

the deep sea gorgonian *Acanthoprimnoa cristata*. J Org Chem, 査読有、2012、77:10962-10966.
DOI: 10.1021/jo302109g.

Sanjoba C. Studies on Phlebotomine sand flies in Japan. Proc Res Grp Pestology, 査読無、2012、9:129-140.

Chajbullinova A, Votypka J, Sadlova J, Kvapilova K, Seblova V, Kreisinger J, Jirku M, Sanjoba C., Gantuya S, Matsumoto Y., Volf P. The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. Parasit Vectors, 査読有、2012、5:219.
DOI: 10.1186/1756-3305-5-219.

Gomes R, Teixeira C, Oliveira F, Lawyer PG, Elnaiem DE, Meneses C, Goto Y., Bhatia A, Howard RF, Reed SG, Valenzuela JG, Kamhawi S. KSAC, a Defined *Leishmania* Antigen, plus Adjuvant Protects against the Virulence of *L. major* Transmitted by Its Natural Vector *Phlebotomus duboscqi*. PLoS Negl Trop Dis、査読有、2012、6:e1610.
DOI: 10.1371/journal.pntd.0001610.

後藤康之：リーシュマニア症に対するワクチン開発の展望、獣医寄生虫学雑誌、査読無、2012、11:1-7.

Goto Y., Bhatia A, Raman VS, Liang H, Mohamath R, Picone AF, Vidal SE, Vedvick TS, Howard RF, Reed SG. KSAC, the First Defined Polyprotein Vaccine Candidate for Visceral Leishmaniasis. Clin Vaccine Immunol, 査読有、2011、18:1118-1124.DOI: 10.1128/CVI.05024-11.

Sanjoba C., Ozbek Y, Asada M, Osada Y, Gantuya S, Matsumoto Y. Recent collections of *Sergentomyia squamirostris* (Newstead) (Diptera: Psychodidae) in Japan, with descriptions and illustrations. Med Entomol Zool, 査読有、2011、62:71-77.

Ozbek Y, Sanjoba C., Alten B, Asada M, Depaquit J, Matsumoto Y., Demir S, Siyambalagoda RRMLR, Rajapakse RPVJ, Matsumoto Y. Distribution and Ecological Aspects of Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species in Sri Lanka. Journal of Vector Ecology, 査読有、2011、36:S77-S86.
DOI:10.1111/j.1948-7134.2011.00115.

〔学会発表〕(計 70 件)

大間知 聡子。内臓型リーシュマニア症における血中 B-cell activating factor (BAFF)

濃度の増加。第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21 日、杏林大学、三鷹市。

Goto Y. In silico identification of novel vaccine candidates against *Leishmania major*. 18th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. October 2, 2014, Technische Universitat Dresden, Dresden, Germany.

Reed SG. Rational Design of Vaccines for Canine and Human Visceral Leishmaniasis. 13th International Congress of Parasitology (ICOPA). August 13, 2014, Camino Real Polanco, Mexico City, Mexico.

Sun J. Peroxiredoxin as one major antigen of IgE antibody during *Leishmania major* infection. 第 74 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2014 年 9 月 27 日、自治医科大学、下野市。

長田康孝。実験的内臓型リーシュマニア症における治療後の再感染抵抗性。第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 28 日、愛媛大学、松山市。

大間知聡子。実験的内臓型リーシュマニア症における血中 IgG の異常亢進。第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 28 日、愛媛大学、松山市。

孫家梅、イゴリーハタンバター、Yusuf Ozbek、長田康孝、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。Anti-*Leishmania* IgE antibodies: a bio-maker for characterization of cutaneous leishmaniasis. 第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 28 日、愛媛大学、松山市。

Osada Y. Susceptibility and resistance correlates with differential expansion of helper T cell subsets in experimental murine visceral leishmaniasis. Worldleish5. May 17, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.

Matsumoto Y. The infection site of *Leishmania major* parasites influences the performance of Leish-111f intranasal immunization. Worldleish5. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.

Goto Y. Tandem repeat proteins for serological diagnosis of visceral leishmaniasis. Worldleish5. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.

Ozbek Y, Sanjoba C. Kala Azar in South Asia - current status and challenges

ahead: vector surveillance studies in Bangladesh; hints and hopes. Worldleish5. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.

Goto Y. In silico identification of vaccine antigens for leishmaniasis. Worldleish5. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.

三條場千寿. バングラデシュにおけるサシチョウバエに対する長期残効型蚊帳の効力試験。第 65 回日本衛生動物学会東日本支部大会、2013 年 10 月 25 日、川口総合文化センター、川口市。

二橋望. 薬剤標的としてのトリパノソーマ科原虫ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II。第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜、横浜市。

長田康孝. 海藻類 *Sargassum yamadae* より単離したキノテルペノイドの抗リーシュマニア症活性。第 82 回日本寄生虫学会大会、2013 年 3 月 31 日、東京医科歯科大学、東京。

磯村開. 尾根部および足蹠部へのリーシュマニア接種時の所属リンパ節における原虫貪食細胞数の違い。第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 28 日、東京大学、東京。

長田康孝. マウス実験的内臓型リーシュマニア症における Th1、Th2 の感受性、抵抗性への関与。第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 28 日、東京大学、東京。

Sanjoba C. Sand fly fauna and their ecological features in Southern Mongolia. The 18th international conference of E-SOVE. October 8, 2012, The Corum, Montpellier, France.

Sanjoba C. Efficacy of Long-Lasting Insecticidal Net against Sand Flies. Third International Conference on Neglected Tropical Diseases, Bangladesh and Scientific Meeting on Kala-azar and PKDL. Sep 2, 2012, Filaria and General Hospital, Savar, Bangladesh.

Goto Y. Antigen Discovery for Serological Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Third International Conference on Neglected Tropical Diseases, Bangladesh and Scientific Meeting on Kala-azar and PKDL. Sep 2, 2012, Filaria and General Hospital, Savar, Bangladesh.

〔図書〕(計 5 件)

後藤康之：第 4 章「感染症に対する自然免疫」。『獣医免疫学』（監修：池田輝雄、小川健司、松本安喜）、緑書房、2015、58-67。

Goto Y, Reed SG. Section 5, 25.2 Current approaches to the development of a vaccine against leishmaniasis. "Immunity to Parasitic Infections" (edited by Tracey Lamb), Wiley-Blackwell、2012、431-440.

後藤康之：§4 疾患各論、Q20「人獣共通感染症における AKI について教えて下さい」。『急性腎不全・AKI 診療 Q&A』（野入英世編）中外医学社、2012、114-116。

Matsumoto Y, Sanjoba C, Asada M, Osada Y, Matsumoto Y. Polymorphism of Leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* s.l. in Asia. "Kala Azar in South Asia - current status and challenges ahead" (ed. by Jha TK, and Noiri E. Editors). Springer verlag. 2011、10:101-110.

Noiri E, Hamasaki Y, Negishi K, Sugaya T, Doi K, Fujita T, Osada Y, Matsumoto Y and Jamil KM. The Potential of Urinary Tests in the Management of Kala-Azar. "Kala Azar in South Asia - current status and challenges ahead" (ed. by Jha TK, and Noiri E. Editors). Springer verlag. 2011、8:69-90.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：皮膚型リーシュマニア症の検査用薬又はキット、及び皮膚型リーシュマニア症の検査方法
発明者：松本芳嗣、後藤康之、三條場千寿、孫家梅、長田康孝

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：特願 2014-179912

出願年月日：平成 26 年 9 月 4 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 5 件)

名称：抗リーシュマニア化合物及び抗リーシュマニア薬

発明者：木村純二、堀江将平、丸島春美、松本芳嗣、三條場千寿、長田康孝

権利者：学校法人青山学院

種類：特許

番号：特許第 5044050 号

出願年月日：平成 23 年 10 月 13 日

取得年月日：平成 24 年 7 月 20 日
国内外の別： 国内

名称：抗リーシュマニア化合物及び抗リーシュマニア薬
発明者：木村純二、堀江将平、丸島春美、松本芳嗣、三條場千寿、長田康孝
権利者：学校法人青山学院
種類：特許
番号：特許第 5044051 号
出願年月日：平成 23 年 10 月 13 日
取得年月日：平成 24 年 7 月 20 日
国内外の別： 国内

名称：抗リーシュマニア薬
発明者：木村純二、堀江将平、丸島春美、松本芳嗣、三條場千寿、長田康孝
権利者：学校法人青山学院
種類：特許
番号：特許第 5044052 号
出願年月日：平成 23 年 10 月 13 日
取得年月日：平成 24 年 7 月 20 日
国内外の別： 国内

名称：抗リーシュマニア薬
発明者：木村純二、堀江将平、丸島春美、松本芳嗣、三條場千寿、長田康孝
権利者：学校法人青山学院
種類：特許
番号：特許第 5044053 号
出願年月日：平成 23 年 10 月 13 日
取得年月日：平成 24 年 7 月 20 日
国内外の別： 国内

名称：抗リーシュマニア化合物及び抗リーシュマニア薬
発明者：木村純二、堀江将平、丸島春美、松本芳嗣、三條場千寿、長田康孝
権利者：学校法人青山学院
種類：特許
番号：特許第 10-1232552 号
出願年月日：平成 23 年 10 月 13 日
取得年月日：平成 24 年 11 月 28 日
国内外の別： 国外（韓国）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本芳嗣 (MATSUMOTO Yoshitsugu)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：00173922

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

松本安喜 (MATSUMOTO, Yasunobu)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90251420

三條場千寿 (SANJOBA, Chizu)
東京大学・農学生命科学研究科・助教
研究者番号：70549667

後藤康之 (GOTO, Yasuyuki)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：50553434