

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23256002

研究課題名(和文) 中南米型リ - シュマニア症の病態生理と分子伝播疫学

研究課題名(英文) Molecular epidemiology and pathobiology of New World leishmaniases

研究代表者

橋口 義久 (HASHIGUCHI, YOSHIHISA)

高知大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：10037385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：リーシュマニア症は吸血昆虫媒介性の原虫感染症である。世界の98カ国で約1,200万人が感染し、3億6千万人が感染の危険に曝されている。本研究では患者、媒介者、保虫動物の3要素について分子生物学的・免疫学的・疫学的手法を駆使して調査研究を行なった。主な成果は(1) Leishmania原虫と患者病型との関係解析、(2) 媒介サシチョウバエ工種の同定と決定、(3) 各種動物感染の有無、(4) 迅速診断、治療法の検討・開発、(5) 対策法の検討等である

研究成果の概要(英文)：Leishmaniasis is one of the protozoan infectious diseases transmitted by blood-sucking insects, sandflies. The disease is widely distributed, affecting at least 12 million people in 98 countries of the world. In this study, three disease factors (patients, vector sandflies, and reservoir animals) were investigated by employing molecular biological, immunological and epidemiological methods. Main results obtained are as follows: (1) relation between Leishmania spp. and disease forms, (2) determination of vector species, (3) search for different mammals infected with Leishmania, (4) development of rapid diagnosis and treatment, (5) search for control measures at each endemic area.

研究分野：医歯薬学

キーワード：国際交流研究 伝播疫学 エクアドル：ペルー：アルゼンチン 分子生物学 リーシュマニア症 病態生理 Leishmania原虫感染 媒介サシチョウバエ

1. 研究開始当初の背景

本研究課題は 1986 年以來の科研費による一連の継続研究である。そのため、ここでは研究開始前(1986 年当時)の状況と当該研究期間の 2 つに分けて説明する。

(1) 初期研究開始時(1986 年)の状況: 研究代表者(橋口)は 1982 年に JICA(現国際協力機構)医療協力専門家として 2 年間エクアドル国に滞在し、リーシュマニア症(以下「リ症」と略す)の研究を開始した。研究初期の調査対象国における「リ症」についての情報は極めて貧弱であり、症例報告が散見されるにすぎなかった。したがって、本症対策上重要な媒介昆虫や保虫動物に関する知見、あるいは病原原虫種や疫学的情報は皆無であった。しかし、1986 年以來の本研究課題の継続によって対象国及び周辺国の「リ症」の医学・生物学はかなり解明された。

(2) 当該研究課題開始時の状況

これまでの継続研究によって多くの知見が蓄積された。しかし、本症の対策上重要な、各流行地における病原 *Leishmania* 原虫や媒介サシチョウバエ、あるいは保虫動物等「リ症」の伝播機構に関わる情報は未だに不十分であった。そのため、本研究では最新の分子生物学的手法を駆使し、各流行地(国)における患者検索、媒介サシチョウバエ種の決定、保虫動物検索を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、中南米型「リ症」の伝播疫学や病態生理を比較検討し、その医学・生物学の解明及び疾病対策に役立てることであり、その主な研究目的は以下の 4 項目である。

(1) 分子生物学的手法を駆使して、中南米型「リ症」の *Leishmania* 原虫種、媒介サシチョウバエ種、保虫動物種等の各流行地での役割を明らかにし、「リ症」の伝播疫学的特性を明らかにする。

(2) 中南米型「リ症」患者に適した分子診断法を開発し、そのフィールド(病気の流行地)への応用を図る。これにより、流行の実態や流行地の分子疫学的特性を明らかにする。

(3) 中南米型「リ症」に適した効果的かつ簡便な化学療法や免疫療法を検索・開発する。

(4) 中南米型「リ症」の医学生物学的特性や病態生理を明らかにし、中南米地域で見られる亜属レベルでの原虫種の分布の違いについて考察する。

3. 研究の方法

これまでの継続研究によって蓄積あるいは開発した分子生物学的成果や手法をベースにして、特に南米エクアドルを中心に研究し、

周辺のペルーやアルゼンチンの「リ症」についても共同研究者と共にさらに掘り下げた調査研究を継続実施する。

主な調査研究項目と研究方法

(1) 分子生物学的手法による患者、媒介サシチョウバエ、保虫動物からの *Leishmania* 原虫の分離及び分子生物学的解析・同定

(2) 分子生物学的手法による媒介サシチョウバエの分類・吸血源解析

(3) rK39 Kit による保虫動物調査と役割解析及び内臓「リ症」以外の病型での反応解析

(4) 「リ症」患者からの FTA カード採取検体の分子疫学的解析

(5) Glucantime を基剤として独自に開発したローションによる皮膚型「リ症」治療効果の評価

主な調査対象国における重点的調査項目

(1) エクアドル: アマゾン低地とアンデス高地における分子疫学調査及び *L. (V.) naiffi* 及び *L. (V.) lainsoni* による「リ症」の実態調査

(2) ペルー: 北部アンデス地域(La Libertad)での分子疫学調査(患者・媒介者・保虫動物)と FTA カード検体の解析による広域分子疫学調査及び hybrid 原虫種の実態調査

(3) アルゼンチン: 東北部(Corrientes, Oran)地域での分子疫学調査、特に病原虫の決定(FTA カード、rK39 Kit の内臓型以外の病型 - 粘膜皮膚・汎発性皮膚等への応用)

4. 研究成果

「リ症」の伝播疫学ならびに病態生理について比較研究するため、南米エクアドル及びペルーやアルゼンチンの流行地における疫学調査に加え、患者、媒介サシチョウバエ、保虫動物等から検体を採取して種々の分子生物学的手法により解析した。本研究課題スタート時、エクアドル国「リ症」の実態は全く不明であったが、これまでの学際的な調査研究によって各地における同症の浸淫状況、病原虫、媒介者、患者の病型その他多くの病態生理的事項が判明し、同国「リ症」の全体像が明らかになりつつある。これらの研究成果に対し、申請者は同国厚生省から熱帯医学賞を授与された。また、周辺諸国のペルーやアルゼンチンでは当該国厚生省や大学医学部研究者の協力を得て各地の流行地において患者からの原虫分離、媒介サシチョウバエ、保虫動物などの調査を実施し「リ症」流行の実態を調査解析した。本研究期間内に得られた研究成果は 31 編の原著論文あるいは総説として学術誌に公表され、調査実施国のエク

アドル、ペルー、アルゼンチンその他周辺諸国での厚生行政に反映されている。また、実施国のテレビ、新聞、週刊誌等の取材に積極的に協力し、研究成果の社会的貢献に努めた。

成果の主なトピックス

(1) エクアドルにおけるヒト吸血性サシチョウバエの全土的調査を実施し、29種の分布や原虫感染状況を明らかにした。

(2) エクアドルアンデス地域における「リ症」患者及び媒介サシチョウバエの垂直分布を明らかにした。

(3) エクアドルでは未発表の「リ症」病原虫として *Leishmania* 属 *L.(V.) naiffi* 及び *L.(V.) lainsoni* の分布を明らかにした。同時に前者の媒介者が *Lutzomyia tortura* であることを決定したが、後者については継続調査中である。

(4) 病型は単純・難治性皮膚型、粘膜、汎発性及び播種性皮膚型が分布。内臓型は分布していないことを指摘。

(5) 患者組織の免疫組織学的、電顕病理学的解析、動物実験などを実施、多くの新知見を得た。

(6) Glucantime を基剤としたローションを皮膚型の局所療法として独自に開発し、その有効性を評価した。本剤を同国厚生省に推奨し、現在各地の保健所や病院で使用されている。

(7) PCR による患者・媒介者検出法を確立し、本法は感受性・特異性ととも高いことを実証した。

(8) アルゼンチン「リ症」の病原虫は *L.(Viannia) braziliensis* が主体であるが、ほかに *L.(V.) guyanensis* と *L.(V.) panamensis* の分布も確認された。また媒介サシチョウバエとしては *Lutzomyia whitmanni* が、保虫宿主としてはイヌが重要であることを指摘した。内臓「リ症」の浸淫状況を明らかにした。

(9) ペルーの「リ症」流行地で患者からの原虫分離・媒介サシチョウバエ・保虫宿主の実態調査を実施した。同国では *L.(V.) braziliensis* と *L.(V.) peruviana* の hybrid がかなり広範に分布していることを明らかにした。

(10) 以上のほか、患者、媒介者、保虫動物などから採取した検体を用いて、種々の実験的研究を実施し、多くの成果を発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計31件)

Marco, J.D, Barroso, P.A, (8名略) Korenaga, M, Nasser, J.R, Hashiguchi, Y, Ruybal, P.R. : Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: describing parasite diversity in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 30, 2015, 308-317.(査読有)
doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.031

Kato, H, Gomez, E.L, (2名略) Uezato, H, Mimori, T, Iwata, H, Hashiguchi, Y.: Ayadalin, a novel RGD peptide with dual antihemostatic activities from the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis. *Biochimie*, 112, 2015, 49-56. (査読有)
doi.org/10.1016/j.biochi.2015.02.011

Ozulu, C.O, Caceres, A.G, Katakura, K, Hashiguchi, Y, Kato, H.: DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis endemic areas of Peru. *Acta Tropica*, 145, 2015, 45-51. (査読有)
doi: 10.1016/j.actatropica.2015.02.003

Olalla, H.R, Velez, L.N, Kato, H, Hashiguchi, K, Caceres, A.G, Gomez, E.L, (3名略) Hashiguchi, Y.: An analysis of reported cases of leishmaniasis in the southern Ecuadorian Amazon region, 1986-2012. *Acta Tropica*, 146, 2015, 119-126. (査読有)
doi:10.1016/j.actatropica.2015.03.015

Barroso, P.A, (10名略) Hashiguchi, Y, Korenaga, M, Basombrio, A.A, Marco, J.D.: Genetic, clinical and epidemiological characterization of canine leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in northern Argentina. *Acta Tropica*, 2015, in press. (査読有)

Barroso, P.A, Marco, J.D, (6名略) Mimori, T, (2名略) Korenaga, M, Hashiguchi, Y, Basombrio, M.A.: Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: possible reservoirs and vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2015, in press. (査読有)

橋口義久：赤道直下の国・南米エクアドルから - 海外レポート - . 高知県医師会雑誌、20、2015、32-44。(査読有)

Gomez, E.A.L, Kato, H, Hashiguchi, Y.: Man-biting sand fly species and the natural infection with *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Tropica*, 140, 2014, 41-49. (査読有)
doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.003

Gomez, E.A.L, Kato, H, Mimori, T, Hashiguchi, Y.: Distribution of *Lutzomyia ayacuchensis*, the vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis, at different altitudes on the Andean slope of Ecuador. *Acta Tropica*, 137, 2014, 118-122. (査読有)
doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.006

Hashiguchi, K, Velez, L.N, Kato, H, (2名略) Gomez, E.A.L, (2名略) Calvopina, M.H, Caceres, A.G, Hashiguchi, Y.: Sand fly fauna (Diptera, Pcyhodidae, Phlebotominae) in different leishmaniasis-endemic areas of Ecuador, surveyed using a newly named mini-Shannon trap. *Tropical Medicine and Health*, 42, 2014, 163-170. (査読有)
doi.org/10.2149/tmh.2014-20

Locatelli, F.M, Cajal, J.P, Barroso, P.A, (3名略) Kato, H, Nasser, J.R, Hashiguchi, Y, Korenaga, M, Marco, J.D.: The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina. *Acta Tropica*, 131, 2014, 16-21. (査読有)
doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.015

Ozulu, C.O, Gomez, E.A, Caceres, A.G, Sakurai, T, Martini, R.L, Uezato, H, Mimori, T, Katakura, K, Hashiguchi, Y, Kato, H.: Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Tropica*, 132, 2014, 1-6. (査読有)
doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.016

橋口義久：忘れてはいけない熱帯感染症・

輸入感染症 リーシュマニア症 . アステラス製薬「感染症」, 44, 2014, 67-79. (査読無)

Calvopiña, M, Romero, D.A, Kato, H, Hashiguchi, Y.: Leishmaniasis cutanea esporotricoides (pian bois) causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* en el Ecuador. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 32, 2014, 465-466. (査読有)
doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.007

Kato, H, Caceres, A.G, Gomez, E.A.L, Mimori, T, Uezato, H, Hashiguchi, Y.: Genetic divergence in populations of *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis in Ecuador and Peru. *Acta Tropica*, 141, 2014, 79-87. (査読有)
doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.004

Alam, M.Z, (4名略) Kato, H, Schonian, G, Uezato, H, Hashiguchi, Y, Katakura, K.: Population genetics of *Leishmania (Leishmania) major* DNA isolated from cutaneous leishmaniasis patients in Pakistan based on multilocus microsatellite typing. *Parasites & Vectors*, 7, 2014, 332 (査読有)
<http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/332>

Calvopina, M, Romero, D.A, Kato, H, Hashiguchi, Y.: Leishmaniasis recidiva cutis. In: *Images in Clinical Medicine*. *Tropical Medicine and Health*, 42, 2013, 93-94. (査読有)
doi.org/10.2149/tmh.2013-07

Calvopina, M, Martinez, L, Hashiguchi, Y.: Cutaneous leishmaniasis "Chiclero ulcer" in subtropical Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 2013, 195-196. (査読有)
Doi.10.4269/ajtmh.12-0690

Guevara, A, (5名略) Kato, H, Calvopina, M, Hashiguchi, Y.: Seroepidemiological study of Chagas Disease in the Southern Amazon Region of Ecuador. *Tropical Medicine and Health*, 41, 2013, 21-25. (査読有)
doi: 10.2149/tmh.2012-31

Kato, H, Jochim, R. C, Gomez, E.A, Uezato, H, Mimori, T, Korenaga, M, (3名略) Hashiguchi, Y.: Analysis of salivary gland transcripts of the sand

- fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis. Infection, Genetics and Evolution, 13, 2013, 56-66. (査読有)
doi:10.1016/j.meegid.2012.08.024
- 21 Yamamoto, K, Caceres, A.G, Gomez, E.A, Mimori, T, Iwata, H, Korenaga M. (2名略) Hashiguchi, Y, Kato, H.: Genetic diversity of mitochondrial cytochrome *b* gene in *Lutzomyia* spp, with special reference to *Lu. Peruensis*, a main vector of *Leishmania (Viannia) peruviana* in Peruvian Andes. Acta Tropica, 126, 2013, 156-163. (査読有)
doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.02.007
- 22 Kato, H, Calvopina, M, Criollo, H, Hashiguchi, Y.: First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. Acta Tropica, 128, 2013, 710-713. (査読有)
doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.001
- 23 Calvopina, M, (3名略) Hashiguchi, Y.: Prevalencia y formas clinicas de las leishmaniasis en el Noroccidente de la Provincia de Pichincha, Ecuador. Revista de la Facultad de Ciencias Medicas, 37, 2012, 31-38. (査読有)
- 24 Marco, J.D, (11名略) Hashiguchi, Y.: Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina. BMC Infectious Diseases, 191, 2012, 1-8 (査読有)
doi:10.1186/1471-2334-12-191
- 25 Ishimaru, Y. (6名略) Hashiguchi, Y, Kato, H.: Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. Journal of Experimental Biology, 19, 2012, 3597-3602. (査読有)
<http://jeb.biologists.org/content/215/20/3597.full>
- 26 Islam, Z. (3名略) Hashiguchi, Y, Kimura, E.: ELISA with recombinant rKRP42 antigens using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 87, 2012, 658-662. (査読有)
- doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0168
- 27 橋口義久: リーシュマニア症の現状と対策 新大陸とくにエクアドルを中心に .有害生物、9, 2012, 97 - 128. (査読有)
- 28 Fujita, M, Kato, H, (3名略) Mimori, T, (2名略) Korenaga, M, (2名略) Hashiguchi, Y.: Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic. Acta Tropica, 121, 2012, 93-98. (査読有)
doi:10.1016/j.actatropica.2011.10.004
- 29 Córdova, O, Vargas, F, Hashiguchi, Y, Kato, H, Gómez, E.A.: Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y flebotominos en áreas de transmisión en una región del Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 28, 2011, 446-453. (査読有)
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342011000300007&script=sci_abstract
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n3/a07v28n3.pdf>
- 30 Barrio, A, (3名略) Basombrío, M.A, Korenaga, M, Hashiguchi, Y.: (2名略) Marco, J.D.: *Leishmania infantum* and Human Visceral Leishmaniasis, Argentina. Emerging Infectious Disease, 2012, 18, 354-355. (査読有)
doi: 10.3291/eid1802.110924
- 31 Kato, H, (2名略) Korenaga, M, Hashiguchi, Y.: *Leishmania* species identification using FTA card sampling directly from patients' cutaneous lesions in the state of Lara, Venezuela. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105, 2011, 561-567. (査読有)
doi:10.1016/j.trstmh.2011.05.009
- [学会発表](計21件)
Gomez, E.A, Kato, H, Hashiguchi, Y. (招待): Man-biting sandflies and their natural infection with the *Leishmania* parasites in Ecuador. 第3回ラテンアメリカ感染症分子疫学・進化・遺伝学会. 2014年6月23日 - 27日, カトリカ大学講堂、キト、エクアドル
- 橋口義久(招待): 寄生虫感染が栄養に与える影響 - 日本の寄生虫撲滅経験から - . 国際食物栄養学会 2013年11月19 - 22日、厚生省コンベンションセンター、キト、エクアドル

〔図書〕(計2件)

橋口義久、医学評論社、バイオセーフティ
ーの事典(バイオメディカルサイエンス研
究会編) みみずく舎、改訂版、2012年、
141-142.

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋口 義久(HASHIGUCHI, Yoshihisa)
高知大学・その他の部局・名誉教授
研究者番号：10037385

(2)研究分担者

是永 正敬(KORENAGA, Masataka)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：00128274
(H20-H21：連携研究者)

上里 博(UEZATO, Hiroshi)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号：10137721
(H20-H21：連携研究者)

三森 龍之(MIMORI, Tatsuyuki)
熊本大学・医学部・教授
研究者番号：00117384
(H20-H21：連携研究者)

(3)連携研究者

伊藤 誠(ITO, Makoto)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：90137117
(H20-H21：連携研究者)

加藤 大智(KATO, Hirotomo)
北海道大学・獣医学部・准教授
研究者番号：00346579
(H19:研究分担者)
(H20-H21：連携研究者)

(4)主な海外共同(協力)研究者

エドワルド ゴメス(Eduardo Gomez)
エクアドル国カトリカ大学医学部教授

レニン ベレス(Lenin Velez)
エクアドル国カトリカ大学医学部教授

ロベルト スッド(Roberto Sud)
エクアドル国厚生 Zoonosis 部研究員

ルイジ マルチーニ(Luigi Martini)
エクアドル国熱帯医学研究所研究員

マヌエルカルボピニャ(Manuel Calvopina)
エクアドル国中央大学医学生物学研究セン
ター研究員

フランクリンバルガス(Franklin Vargas)

ペルー国トルヒーヨ大学保健学部教授

アブラハム カセレス(Abraham Caceres)
ペルー国厚生省保健研究所部長

デイエゴ マルコ(Marco Diego)
アルゼンチン国サルタ大学研究員

パオラ アンドレア(Paola Andrea)
アルゼンチン国サルタ大学研究員