

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19406012

研究課題名（和文） 新型熱帯熱マラリア原虫の分子疫学的研究と生殖母体の培養の試み

研究課題名（英文） Molecular epidemiological study on the variant type of *Plasmodium falciparum* and trial for in vitro culture of gametocytes

研究代表者

川本 文彦 (KAWAMOTO FUMIHIKO)

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号：40115556

研究成果の概要（和文）：平成 17-18 年度のマラリア疫学調査において、非常に細い生殖母体を有する熱帯熱マラリア原虫をカンボジアおよびインドネシアの患者から見出した。18S リボソーム RNA 遺伝子を解析した結果、かつてベトナムから見出された新型変異株と同じであった。そこで、本研究では分子疫学的調査を継続し、奇妙な生殖母体が新型変異株の特性であるかにつき、リボソーム RNA 遺伝子解析による分子疫学的検討を目的とした。もう一つの目的は、熱帯熱マラリア原虫（あるいは三日熱マラリア原虫）の生殖母体を有する血液を村落の現場で培養し、人工培養下でスポロゾイトを形成する試みであった。

2007 年 4 月よりインドネシア・ベトナム・カンボジア・タイにおいて疫学的調査を行ない、2007 年にはカンボジアで 2 例の新型熱帯熱マラリア患者が検出されたが、生殖母体は検出されなかった。1 例の三日熱マラリア患者には生殖母体が観察され、培養を試みたが発育は認められなかった。2008 年にはインドネシアで生殖母体を有した 2 例の従来型熱帯熱マラリア患者が見出され、培養を試みたものの不成功に終わった。また、カンボジアで三日熱マラリア患者の 1 名に生殖母体が観察され、培養を試みたが不成功に終わった。2009 年度は 1 例の新型熱帯熱マラリア患者も見いだせなかった。従来型と新型変異株の生殖母体の形態が異なるのか否かについては未だ明らかになっていない。

研究成果の概要（英文）： During epidemiological study on malaria from 2005 to 2006, *Plasmodium falciparum* (Pf) with very thin morphology of gametocytes was found in 4 patients in Cambodia and Indonesia. Analysis of 18S ribosomal RNA gene indicated that they are belonging to the variant type of Pf detected from Vietnam, and they had the same sequence variation at the target region for molecular diagnosis. Therefore, in this study, we continued similar epidemiological study on the variant Pf whether the strange shape of gametocytes belongs to the variant Pf or not by analyzing the 18S ribosomal RNA gene. In addition, our study had another aim; a trial to cultivate in vitro from gametocytes to sporozoites in the variant or ordinary Pf (also gametocytes of *Plasmodium vivax*; Pv) at the field.

We surveyed malaria in Indonesia, Cambodia, Vietnam and Thailand from April 2007. In 2007, we found 2 patients infected with the variant Pf in Cambodia, but these bloods did not contain gametocytes. In addition, we detected 1 patient infected with Pv gametocytes, but trial of in vitro culture was failed. In 2008, we found 2 patients infected with gametocytes of the ordinary Pf, and tried in vitro culture of gametocytes. Furthermore, we detected 1 patient infected with Pv gametocytes in Cambodia. However, all these trials of in vitro culture were also failed. In 2009, no patient infected with the variant Pf was found in Indonesia and Vietnam. Therefore, it is still not clear whether morphology of gametocytes is different or not between the ordinary Pf and the variant Pf.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：医歯薬学A・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：(1)国際研究者交流(2)インドネシア：ベトナム・カンボジア・タイ (3) 熱帯熱マラリア(4) 新型原虫 (5) 分子疫学調査 (6) ヒトマラリア原虫 (7) 遺伝子解析 (8) 生殖母体培養

1. 研究開始当初の背景

平成 17-18 年度の疫学調査の過程で、奇妙な生殖母体を有する熱帯熱マラリア原虫がカンボジアおよびインドネシアの 4 名の患者から見出された。生殖母体が非常に細く、通常の半分程度の細さであった。遺伝子診断法に用いている 18S リボゾーム RNA 遺伝子のターゲット部分を解析した結果、いずれも同じ部位に一塩基の同一変異が認められ、研究代表者がかつてベトナムから見出していたものと同じであった。ベトナムの標本はリング形のみ感染者であったため、形態との類似性を見落としていたものと考えられた。これらの結果は、同様の変異を有する熱帯熱マラリア原虫が広く東南アジアに分布していることを示唆している。そこで、本研究では、東南アジアにおいてさらに分子疫学的調査を継続し、この奇妙な生殖母体を有する原虫が新型ヒト熱帯熱マラリア原虫であるか否かにつき、リボゾーム RNA 遺伝子の完全解析および数種の遺伝子の解析による分子疫学的検討を行うことを目的とした。

また、本研究のもう一つの大きな課題は、熱帯熱マラリア原虫（あるいは三日熱マラリア原虫）の生殖母体を多数保有する患者血液を村落の現場で培養して、人工培養下でスポロゾイトを形成する試みである。ヒトマラリア原虫の生殖母体の形成は現在の人工培養法では極めて難しいため、ヒトマラリア原虫の生殖母体を用いたスポロゾイト形成誘導は未だ試みられていない。三日熱マラリア原

虫に至っては無性世代の人工培養法すら確立されていない。この点を解決するには患者血液に頼る他ないが、輸入マラリア感染者に頼ることは事実上不可能であり、また、生殖母体が誘導されるまで治療をせずに放置するのは倫理的な問題を起こしうる。従って、最も簡易で有効な方法は、疫学調査で見いだされた熱帯熱マラリア原虫（および三日熱マラリア原虫）の感染者の内、生殖母体を多数保有している患者の血液を用いて培養することである。

この研究過程でヒト熱帯熱マラリア原虫あるいは三日熱マラリア原虫のスポロゾイトが形成されれば、その間の様々な遺伝情報が得られる。また、今後のワクチン開発、オーシストやスポロゾイトの遺伝子解析、スポロゾイトのハマダラ蚊唾液腺との相互作用、あるいはスポロゾイトの宿主肝細胞との相互作用に關与する遺伝子群を解析するためのツールが出来上がり、この分野の研究が飛躍的に進歩するのは明らかであり、多大な貢献が可能となる。

2. 研究の目的

東南アジアにおいてさらにマラリアの分子疫学的調査を継続し、奇妙な生殖母体を有する熱帯熱マラリア原虫が新型ヒト熱帯熱マラリア原虫であるか否かにつき、リボゾーム RNA 遺伝子の完全解析による分子疫学的検討を行う。また、生殖母体を保有したマラリア患者が検出された場合には、人工培養を試みてオーシスト或いはスポロゾイトに発育

した場合には、種々の遺伝子解析を行い、発育過程を詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

疫学調査はインドネシア、ベトナム、カンボジア、タイで行い、村落での迅速診断により熱帯熱マラリア患者が検出された場合には血液を採血し、遺伝子診断法で新型か否かを解析した。また、熱帯熱マラリア原虫のみならず、三日熱マラリア原虫の生殖母体を多数保有していた患者が検出できた場合も、村落の現場で人工培養を試みた。人工培養はRPMI-1640 + 仔牛血清添加培地を用いた。室温で静置し、5 - 6 日後に研究施設に持ち帰り、形態を観察して発育状況を調べた。

4. 研究成果

2007 年にはカンボジアで 2 例の新型熱帯熱マラリア患者が検出されたが、残念ながら生殖母体は検出されなかった。1 例の三日熱マラリア患者には生殖母体が観察され、培養を試みたが、発育は認められなかった。2008 年にはインドネシアで生殖母体を有した 2 例の従来型熱帯熱マラリア患者が見出され、培養を試みたものの不成功に終わった。また、カンボジアで三日熱マラリア患者の 1 名に生殖母体が観察され、培養を試みたものの、これも不成功に終わった。2009 年度は 1 例の新型熱帯熱マラリア原虫も見いだせず、生殖母体保有患者も検出できなかった。

東南アジア諸国では ACT (アルテスネート混合治療法) が導入されて以降、マラリア患者が激減しており、そのため新型熱帯熱マラリア患者の検出が困難となってきたが、今後も継続して分子疫学調査を行い、新型原虫と従来型の比較検討を行いたい。

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 4 件)

(1) H. Hattori, F. Kawamoto, T. Kanbe, 他 3 名, Improvement of the repetitive sequence (RPS)-based identification and genotyping of *Candida albicans* using ALT-specific primers, Jpn. J. Infect. Dis., 査読有, 62, 2009, 215-219

(2) N. D. Karunaweera, F. Kawamoto 他 6 名, Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*, Gene, 査読有, 410, 2008, 105-112

(3) K. Ikuta, F. Kawamoto, 他 4 名, A case of

imported tertian malaria occurred despite prophylaxis by mefloquine in East Timor, J. BTHA, 査読有, 10, 2007, 50-51

(4) H. Matsuoka, F. Kawamoto, T. Kanbe, M. Arai, 他 5 名, Seven different glucose-6-phosphate dehydrogenase variants including a new variant distributed in Lam Dong Province in Southern Vietnam, Acta Med. Okayama, 査読有, 61, 2007, 213-219

[学会発表] (計 4 件)

(1) F. Kawamoto, Molecular epidemiology on malaria and G6PD deficiency in SEA. National Cong. PETRI XV, Special lecture, Surabaya, Indonesia, 2009.6

(2) F. Kawamoto, Rapid diagnosis of G6PD deficiency. Symposium on Neonate mutation, Special lecture, Ho Chi Minh, Vietnam, 2008.10.

(3) F. Kawamoto, Field surveys for malaria and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in eastern Indonesia, 日本寄生虫学会, 長崎, 2008.4.

(4) 川本文彦, 東南アジアにおけるマラリアと G6PD 欠損症の分子疫学的研究, 第 48 回日本熱帯医学会総会特別講演, 別府, 2007.10.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/ISR/DSEM/dih/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 文彦 (KAWAMOTO FUMIHIKO)
大分大学・全学研究推進機構・教授
研究者番号：40115556

(2) 研究分担者

神戸 俊夫 (KANBE TOSHIO)
名古屋大学大学院・医学系研究科・講師
研究者番号：50093018

大塚 靖 (OTSUKA YASUSHI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00244161

(3) 連携研究者

新井 明治 (ARAI MEIJI)
香川大・医学部・准教授
研究者番号：30294432