

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 5 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22406011

研究課題名(和文) 東南アジアの大陸部と島嶼部に分布する熱帯熱マラリア原虫の細胞学的・分子疫学的研究

研究課題名(英文) Molecular epidemiological and cytological studies on *Plasmodium falciparum* distributing in Southeast Asian continent or island areas

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)：

ミャンマー・ベトナムから得られた熱帯熱マラリア原虫野生株は容易に人工培養に適応するのに対し、インドネシアの野生株は全く人工培養に適応せず、培養初期に消失してしまう。これらの事実は、東南アジアの大陸部と島嶼部に分布する熱帯熱マラリア原虫が異なったタイプであることを示唆している。本研究では、熱帯熱マラリア原虫が2つの型に分類されるか否かにつき、細胞生物学的検討と遺伝子解析による比較を行った。

ベトナムとカンボジアから得られた熱帯熱マラリア原虫株は全て人工培養に適応した。ベトナムの1例は常に幼弱生殖母体が多数観察され、生殖母体形成誘導を試みた結果、培地中のグルコース量を減少することで生殖母体形成を誘導することが判明した。一方、インドネシアから得られた野生分離株は全て人工培養に適応せずに消失した。ベトナム野生株の1株とインドネシア人工培養非適応株を用いて、Pyrosequence法によるRoche Genome Sequencer FLX+ Systemを用いた遺伝子解析の比較を開始した。しかし、いまだ両者における大きな差異は見いだせていない。

研究成果の概要(英文)：

Our previous findings showed that wild isolates of *Plasmodium falciparum* collected from Myanmar and Vietnam were easily adapted to in vitro culture, whereas those collected from Indonesian islands failed to be adapted. These results may suggest that Indonesian wild isolates has a tendency not to easily adapt to in vitro culture, differing from those distributing in continental SEA. Therefore, this study was conducted for confirmation of these previous findings and for cytological and molecular epidemiological comparisons between wild isolates collected from continental SEA or from Indonesian islands.

All of 20 wild isolates collected from many Indonesian islands could not be adapted to in vitro culture again; all parasites disappeared within 7 days in culture. On the other hand, seven wild isolates collected from Vietnam and Cambodia were adapted to in vitro culture. Particularly, an isolate collected from Vietnam grew well, and it formed many young gametocytes. This isolates could be induced mass-production of gametocytes by decreasing glucose level in the culture medium. By using this isolate and an Indonesian isolate, comparison at molecular level was tried by the Roche Genome Sequencer FLX+ System (the Pyrosequence method), but any difference between them was not found yet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000

年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

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(3)熱帯熱マラリア原虫(4)東南アジア(5)分布領域(6)分子疫学調査(7)遺伝子解析(8)人工培養

### 1. 研究開始当初の背景

平成15-16年のミャンマー・ベトナムにおける野外調査で得られた熱帯熱マラリア原虫野生株を人工培養した結果、95%の高率で人工培養適応株が得られたのに対し、同時期にインドネシアのマルク州（ブル島・ハルマヘラ島）から得られた野生株では全く人工培養に適応せず、すべて培養期間初期に幼弱生殖母体に転換して消失し、人工培養適応株とならなかった。人工培養は、同一の培養条件下（同一人物のO型赤血球と同一の混合AB血清を使用）で培養しており、実験条件による差異とは考えられない。この現象は平成6~10年のインドネシア・アイルランガ大学チームがロンボク島・スンバウ島で得た野生株も全く人工培養に適応せずに消失しており、インドネシアに分布する野生株の特徴であることが考えられた。これらの事実は、熱帯熱マラリア原虫が2つのタイプに分けられ、東南アジア島嶼部に分布する熱帯熱マラリア原虫は大陸部に分布するタイプと大きく異なることを示唆している。そこで、本研究では、東南アジアに分布する熱帯熱マラリア原虫の細胞学的・分子疫学的調査を継続し、東南アジアの大陸部（カンボジア・ベトナム・ミャンマー）と島嶼部（インドネシア）に分布する熱帯熱マラリア原虫が2つのタイプに分類されるか否かにつき、人工培養適応性に関するさらなる細胞生物学的検討と遺伝子解析による差異についての検討を計画した。

インドネシアの野生株は全て生殖母体に転換して消失することから、生殖母体転換制御遺伝子が活性化されていることが容易に想像される。そこで、本研究のもう一つの大きな課題として、熱帯熱マラリア原虫の無性世代から有性世代の生殖母体転換を制御している遺伝子の解析を目的とし、転換制御遺伝子が存在すると考えられるテロメア部の比較検討を行うことを目的とした。Solexa DNA Technology を用いて、大陸部に存在す

る熱帯熱マラリア原虫野生株とインドネシアの島嶼部に存在する野生株との比較検討により、この難しい課題に対する解決策が探れるものと期待された。なお、現地での診断はG6PD欠損症の迅速診断も平行して行い、三日熱マラリア感染者が検出された場合、プリマキンを安全に投与できるよう配慮した。

### 2. 研究の目的

インドネシアの野生株は全て生殖母体に転換して消失することから、生殖母体転換制御遺伝子が活性化されていることが容易に想像される。そこで、本研究のもう一つの大きな課題として、熱帯熱マラリア原虫の無性世代から有性世代の生殖母体転換を制御している遺伝子の解析を目的とし、転換制御遺伝子が存在すると考えられるテロメア部の比較検討を行うことを目的とした。Solexa DNA Technology を用いて、大陸部に存在する熱帯熱マラリア原虫野生株とインドネシアの島嶼部に存在する野生株との比較検討により、この難しい課題に対する解決策が探れるものと期待された。なお、現地での診断はG6PD欠損症の迅速診断も平行して行い、三日熱マラリア感染者が検出された場合、プリマキンを安全に投与できるよう配慮した。

### 3. 研究の方法

疫学調査はインドネシア、ベトナム、カンボジアで行い、村落での迅速診断法により熱帯熱マラリア患者が検出された場合には静脈血を採血した。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保有者で多数寄生が見られた患者の場合も採血し、人工培地に保存した。人工培地はRPMI-1640+ヒトAB血清天下培地を用い、密閉ののち毎日、一度よく振とうし、冷蔵庫内に静置した。採血から5-7日以内にスラバヤの研究室に持ち帰り、通常のキャンドルジャー培養法で培養を行った。

ベトナムから得られた人工培養適応株は毎日の培地交換時に多数の幼弱生殖母体が観察され、かつ活発に増殖することから大陸部の熱帯熱マラリア原虫の典型例と考えられ、生殖母体形成が誘導できるのではないかと思われた。そこで、培地中のグルコース量を減少すれば生殖母体に転換するのではないかと考えられたのでグルコース量を減少させて、生殖母体形成の誘導の有無を観察した。

人工培養適応株と非適応株の代表的な株を選んで、Pyrosequence 法による Roche Genome Sequencer FLX+ System による遺伝子解析を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) インドネシアでは、フローレス島のマウメレ近郊、ラランツカ近郊、エンデ近郊、更にスラウェシ島（北ミナハサ州）のマナド近郊、トモホン近郊、トンダノ近郊、さらにバンカ島から 20 例の熱帯熱マラリア原虫野生株を得て、人工培養を行った結果、従来の野生株と同じく、全て、5-7 日前後に幼弱生殖母体に転換し、人工培養適応株にはならなかった。

(2) 一方、カンボジアから得た 5 例は全て人工培養に適応し、人工培養適応株として分離できた。しかし、生殖母体形成能は非常に弱く、遺伝子解析に使用することは難しいと考えられた。

(3) ベトナムの入院患者 2 名から得た熱帯熱マラリア原虫野生株は、人工培養に適応し、その内の 1 株は培地中に常に多数の幼弱生殖母体が観察された。この株は無性生殖のほかには有性生殖世代の形成能が高いと考えられたことから本株を用いて生殖母体形成誘導を試みた。培地中のグルコース量を減少させた培地で 2 週間培養した結果、ステージ 4~5 の生殖母体が多数形成され、グルコース量の減少により生殖母体誘導が起きることが示された。

(4) 上記の株は遺伝子解析に最適な株と考えられたのでこの株を人工培養適応株として選び、さらに人工培養非適応株としてインドネシア由来の 1 株と共に、Pyrosequence 法による Roche Genome Sequencer FLX+ System による遺伝子解析を開始した。しかし、ベトナムの 1 例を見出すのに時間を要したことから、未だ良い結果は得られていないが、今後も継続して両者の差異を明らかにしていきたい。

東南アジア諸国では ACT（アルテスネート混合療法）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的調査を行い、適応株と非適応株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 6 件）

(1) I. S. Tantular, S. Pusarawati, L. Khin, T. Kanbe, M. Kimura, Y. Kido, F. Kawamoto. Preservation of wild isolates of human malaria parasites in wet ice and adaptation efficacy to in vitro culture. Trop. Med. Health, 査読有, 40, 37-45, 2012 DOI: 10.2149/tmh.2012-07o.

(2) Y. Takagi, H. Hattori, H. Adachi, S. Takakura, T. Horii, A. Chindamporn, H. Kitai, R. Tanaka, T. Yaguchi, H. Fukano, F. Kawamoto, K. Shimozato, T. Kanbe. Genotypes of *Candida albicans* involved in development of candidiasis and their distribution in oral cavity of non-candidiasis individuals. Med. Mycol. J., 査読有, 52, 315-324, 2011 <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjmm/-chan/ja/>

(3) K. Shimizu, H. Hattori, H. Adachi, R. Ohshima, T. Horii, R. Tanaka, T. Yaguchi, M. Akiyama, F. Kawamoto, T. Kanbe. Microsatellite-based genotyping of *Candida albicans* isolated from patients with superficial candidiasis. Med Mycol J. 査読有, 52, 129-138, 2011 <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjmm/-chan/ja/>

(4) 赤澤洋平、馬場 淳、伊藤有香子、斉田謙、平林香奈枝、三澤 由佳、石田岳史、服部幸夫、藤井寿一、川本文彦、松岡裕之。溶血発作で発症したグルコース 6 リン酸脱水素酵素異常症の早産児の 1 例。日本未熟児新生児学会雑誌、査読有、23、108-112、2011 <http://plaza.umin.ac.jp/jspn/>

(5) P. Orjuela-Sánchez, N. D. Karunaweera, M. Da Silva-Nunes, N. S. da Silva, K. K. Scopel, R. M. Goncalves, C. Amaratunga, J. M. Sa, D. Sochet, R. M. Fairhurst, Thava-kodirasah, G. L. Galapathy, F. Kawamoto, M. U. Ferreira. Single nucleotide polymorphism, linkage disequilibrium and

geographic structure in the malaria parasite *Plasmodium vivax*. BMC Genetics 査読有 2010, 11:65  
DOI: 10.1186/1471-2156-11-65.

(6) I. S. Tantular, H. Matsuoka, Y. Kasa hara, S Pularawati, T. Kanbe, J. S. Tuda, Y. Kido, Y.P. Dachlan, F. Kawamoto. Incidence and mutation analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in eastern Indonesian populations. Acta Medica Okayama, 査読有, 64, 367-373, 2010 <http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/amo/>

[学会発表] (計 4 件)

(1) I. S. Tantular & F. Kawamoto, Molecular epidemiology on malaria and G6PD deficiency in SEA. ICOPA XII, Rio de Janeiro, Brazil, 2012.9

(2) F. Kawamoto, Molecular epidemiology of malaria and G6PD deficiency in SEA. International Symposium on emerging and re-emerging infectious diseases, Manado, Indonesia, 2011.11.

(3) 川本文彦、「東南アジアにおけるマラリアの分子疫学的研究」に至った長い道のり、日本熱帯医学会・学会賞受賞講演、2010年12月3日、仙台

(4) F. Kawamoto, Population structure of *Plasmodium vivax*. The second Int. Meeting on Plasmodium vivax, Shanghai, China, 2010.4.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/rpp/>

## 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

### (3) 連携研究者

木村 政継 (KIMURA MASATSUGU)  
大阪市立大学大学院・医学研究科・准教授  
研究者番号：60195378

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