

## 論文の内容の要旨

論文題目        Genetic and immunological characterization for malarial tolerance among Sumbanese in Indonesia

和訳             インドネシアのスンバ人におけるマラリア耐性の免疫および遺伝特性

指導教官        大塚 柳太郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名    清水 華

### 【緒言】

マラリアは、主に熱帯地域の開発途上国に蔓延する流行制圧の難しい感染症の一つで、年間罹患者数は 3～5 億人と見積もられている。マラリアの蔓延地域では、長いマラリアとの共生が寄生体と宿主との共進化をもたらし、人類は感染に対する適応を獲得するようになった。獲得免疫が罹患の防御に役割を担う一方、マラリアに抵抗性を持つ宿主側の遺伝形質の出現は淘汰を介した遺伝適応といえる。

マラリアの病態形成機構と宿主応答に関わる研究から、生体内の免疫防御機構について理解が進んできたが、蔓延地域に存在する不顕感染の耐性メカニズムについては未だ明らかになっていない。本研究では、恒常的にマラリアが存在するもののマラリアによる致死率の低いインドネシア・スンバ島の一村落において、不顕感染すなわち無症候性マラリアを検出しその特性を明らかにするとともに、発症を抑えて無症候を保つ生体内免疫防御因子の探索を試みた。また、マラリア抵抗性を示す遺伝形質についてマラリア不顕感染との関係を調べた。さらに、これらの遺伝形質の世代間継承に対し、家系分析に基づき、マラリア耐性獲得への寄与について考察を試みた。

## 【対象と方法】

インドネシア・スンバ島のクタ村に居住する、126 世帯の住人 689 人(全住民の 77.8%)を対象とした。2003 年 6 月から 10 月にかけて個体群特性を把握するため、家系調査を含むフィールド調査を行った。この間、7 月に 6 歳以下の小児および近親者 109 人を対象に手指穿刺法による採血、9 月前半に 18 歳以上の成人 210 人を対象に上腕静脈からの採血、及び空腹時血糖値とヘマトクリット検査、そして同月後半に 18 歳未満の小児 137 人を対象に上腕静脈からの採血を行った。

採血時に作成した薄層塗沫標本をギムザ液で染色し、原虫の成熟ステージおよび赤血球形態の観察に使用した。

凍結バフィコートから 347 人のゲノム DNA を抽出し、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) および三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) を PCR 法により検出した。続いて、マラリア原虫が検出された 44 検体について、定量的 PCR 法により *P. falciparum* と *P. vivax* それぞれについて各原虫の相対量を算出した。

凍結血清を用いて、ELISA 法により IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  を定量した。

全血を浸透、乾燥させた濾紙フィルターから、Formazan-Ring 法によりグルコース 6リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase: G6PD) の酵素活性を調べ、G6PD 欠損のスクリーニングを行った。血液より抽出した 410 人の DNA 産物から、東南アジア型卵形赤血球症 (Southeast Asian Ovalocytosis: SAO) の責任遺伝子である赤血球バンド 3 遺伝子の 27 塩基対欠損、また、ヒト癌抑制遺伝子 *p53* のコドン 72 多型のスクリーニングを行った。

## 【結果と考察】

347 人中 44 人の対象者から *P. falciparum* と *P. vivax* の 2 種類のマラリア原虫が検出され、その頻度は 12% であった。高熱、悪寒を伴うマラリア症状を呈さない住民から原虫が高頻度で検出されたことから、マラリア耐性の存在が示された。

マラリア感染者数の分布は集落ごとで異なり、また同一世帯で感染者が多かったことから、感染の偏りが認められた。

原虫が検出された対象者の空腹時血糖値及びヘマトクリット値はどれも正常範囲内で、マラリア感染による低血糖、貧血を呈していないことが示された。どの感染も無症候の不顕感染であることから、マラリア耐性の獲得が示唆された。

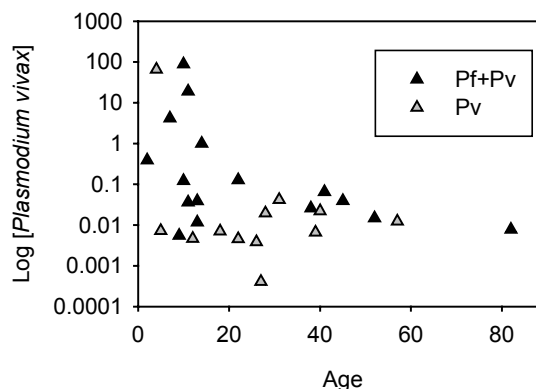


Figure 1. Correlation between concentration of *P. vivax* and age. \*\* $p < 0.01$ , Pf+Pv vs Pv

マラリア感染率は10-19歳で高く、また各マラリア原虫を定量した結果、低年齢で原虫量が多かった(Figure 1)。このことは子供の方が感染率が高いことに加え、マラリアに対する後天的免疫が獲得されていない可能性が示唆され、そのために原虫が生存しやすいと考えられた。

マラリア原虫が検出された対象者のうち、*P. falciparum*と*P. vivax*の双方を同時に保持している者が36.4%存在した。そして、2種類の原虫を保持している対象者の原虫量は、*P. vivax*だけを保持している対象者の原虫量に比べて有意に多かった。どちらの場合も無症候であることから、*P. falciparum*と*P. vivax*を同時に保持していることが*P. vivax*だけを保持している場合よりも、原虫が生存しやすく、特異な防御免疫をもたらしている可能性が示唆された。

原虫保持者が無症候を呈する要因を検証するため、血清中のIL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ を定量した結果、IL-6、IL-10がコントロール群に比べ有意に高値で(Figure 2)、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ は血清中濃度に差異が認められなかった。また、*P. falciparum*と*P. vivax*のどちらの原虫量も、抑制性サイトカインIL-10と正の相関を示した(Figure 3)。一方、TNF- $\alpha$ は*P. vivax*の相対量と正の相関を示し

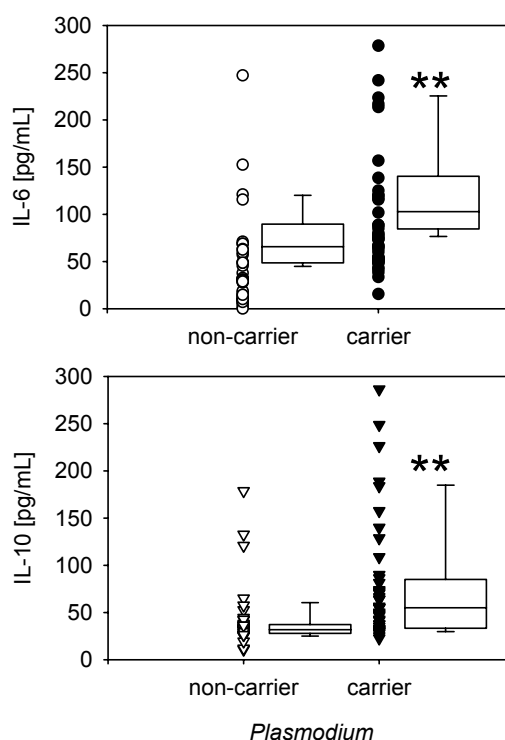


Figure 2. IL-6 and IL-10 in non-carriers and carriers of *Plasmodium* parasitemia. \*\* $p < 0.01$  vs non-carriers.

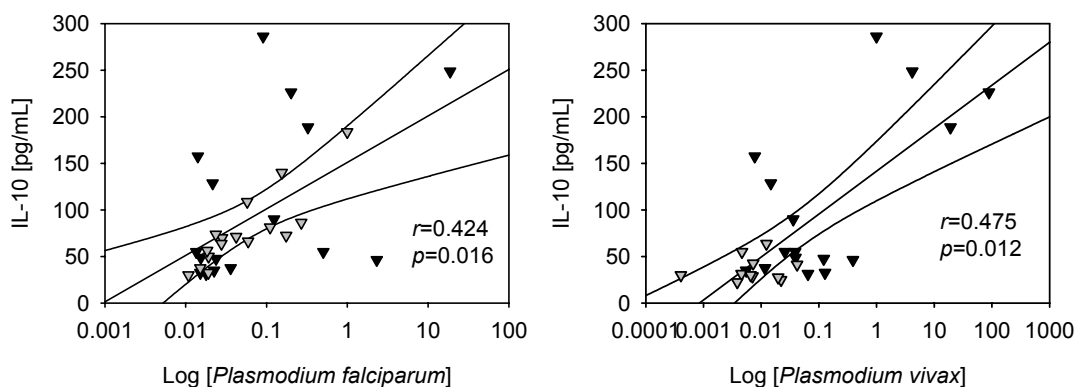


Figure 3. Correlations between IL-10 and concentration of *P. falciparum* or *P. vivax*.

た。これらのことから、マラリアの発症を抑えて無症候にする要因物質のひとつがIL-10である可能性が示唆された。

次に、無症候性マラリアに抵抗性遺伝子が関与しているかを検討した。マラリアに抵抗性を示すことが知られている赤血球症のうち、G6PD欠損の頻度は7%であった。G6PD欠損者のヘマトクリ

ット値は正常の範囲内で、貧血を呈するケースは観察されなかった。また、鏡検の結果、卵形赤血球の形態も確認され、PCR 法により SAO が 14% の頻度でみつかった。どちらの赤血球症もマラリア原虫保持者においても検出されたが、末梢血中に検出された原虫量はこれらの赤血球症を持たない対象者に比べ低いことが明らかになった (Figure 4)。

また、対象者における遺伝的適応の世代間継承に関して検討を試みた。G6PD 欠損と SAO の 2 種類の赤血球症を同時に保有する者は 0.7% であった。G6PD 欠損と SAO の頻度には村内の 11 のクラン(血縁集団)間で有意な差異が認められた。ヒト癌抑制遺伝子 *p53* のコドン 72 多型のスクリーニングの結果から、Pro 対立遺伝子のホモ接合体でマラリア原虫量が少なく、また、親子間の遺伝形質分析により胎生期に Pro 対立遺伝子の母系遺伝型が選択されている可能性が示唆された。しかし、これがマラリアを介した淘汰圧によるものなのかについては、斬新な知見であるものの、統計的な有意差はなく今後更なる検証が必要である。

#### 【結論】

本研究において、インドネシアのスンバ人において無症候のマラリア不顕感染が高頻度で存在することが明らかになった。無症候性マラリアは、低血糖、貧血を呈することはなく、低年齢で原虫保持量が多いことがわかった。また、2 種類のマラリア原虫を同時に保持する割合が 36.4% と高く、2 種類の原虫を保持する者と 1 種類の原虫を保持する者では、原虫に対する防御免疫が異なることが示唆された。無症候を維持するために、抑制性サイトカイン IL-10 がその役割を担っている可能性も示唆された。さらに、マラリア抵抗性をもつ G6PD 欠損や SAO は、マラリアの不顕感染の有無には影響しないが、原虫保持量が少なく不顕感染への寄与が示された。

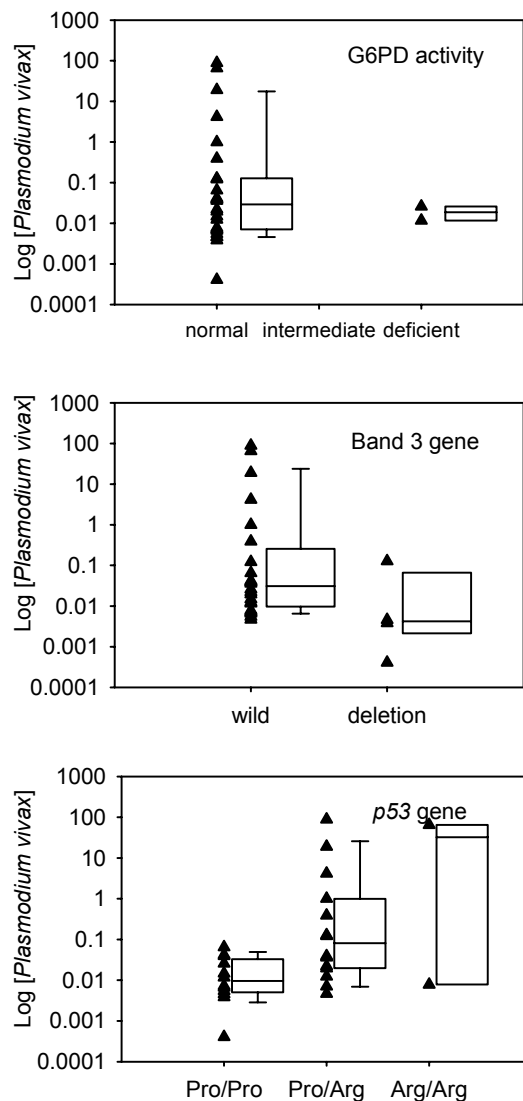


Figure 4. *P. vivax* concentration of subjects classified by G6PD activity, SAO, and *p53* genotype.