

Table 4
Number and coverage of IBN in the communities

Province	Distirict	Total population where IBN was operated	No. of Olyset nets	No. of Normal nets	Total No. of bed net	No. of old net treated	Total No. of IBN	Person/IBN
Vientiane	Feuang	11134	0	3389	3389	1953	5342	2.08
	Xanakham	8970	0	3055	3055	909	3964	2.26
	Hinheub	7532	1102	779	1881	1062	2943	2.56
	Met	7977	1722	104	1826	642	2468	3.23
	others		35		35			
	Total	35613	2859	7327	10186	4566	14717	2.42
Borikhamxay	Thaphabat	5428	0	874	874	895	1769	3.07
	Bolikhan	2257	0	300	300	0	300	7.52
	Pakkading	6024	0	1329	1329	17	1346	4.48
	Khamkeut	23286	3596	2905	5433	166	5599	4.58
	Viangthong	1882	904		904	0	904	2.08
	Others		143		143			
	Total	38877	4643	5408	8983	1078	9918	3.92
Khammouane	Hinboon	2367	150	690	840	3	843	2.81
	Mahaxay	2276	0	548	548	88	636	3.58
	Nongbock	6739	660	676	1336	86	1422	4.74
	Xebangphay	16300	1097	2054	3151	1843	4994	3.26
	Xaibatong	9244	1310	988	2298	0	2298	4.02
	Boualapha	20926	4676	756	5432	0	5432	3.85
	Others		23	17	40			
	Total	57852	7916	5729	13645	2020	15625	3.70

Others: delivering to provincial staff or hospital.

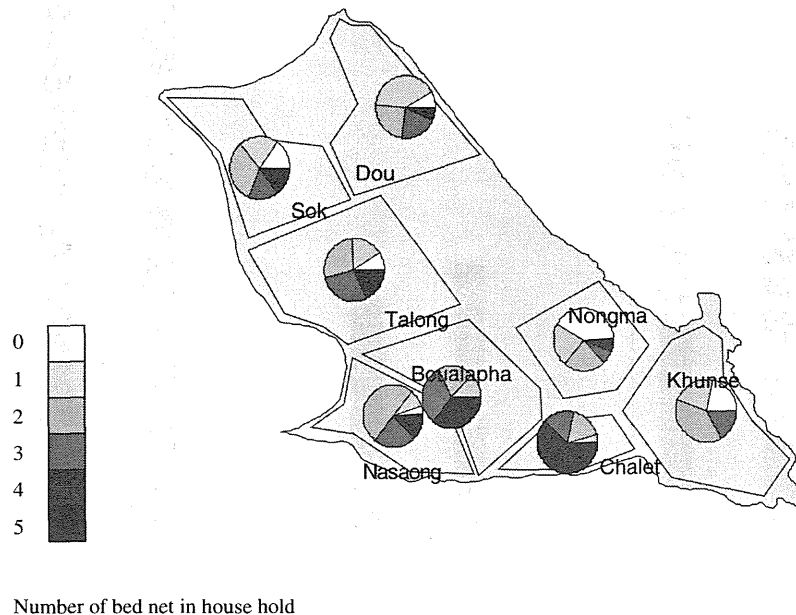


Fig. 2. Comparison of the number of bed nets in each household among sub-district in Boualapha district.

as model district to be located in highest endemic area. The coverage of IBN in the communities is shown in Table 4. The number of person per IBN (total population/number of IBN) was used to estimate coverage in the community. The national IBN program aims at 80% coverage. This was set as an indicator to evaluate the coverage. The average of person per net was under 3.7 in Vientiane and Khammouane Provinces. In the first year, the person per net ratio in Borikamxay Province appeared high due to a misunderstanding in the project plan. After the monitoring of the project in the first year, the remaining nets were delivered to the communities where the indicator of coverage was low. The indicator fell to 3.92 by the end of 2000 in Borikhamxay Province.

The person per IBN ratio is an indicator which shows the degree of coverage, however, the actual coverage cannot be determined without a survey of each household. The household survey was conducted

in Boualapha district, where IBN was used all villages, and almost 80% of population was covered. Three villages were randomly selected in each sub district of the survey. Fig. 2 shows the number of bed nets per household in each sub district. The capital of Boualapha district is located in Talong sub district. Sek, Dou, Nonama and Khunse are located in an area where it takes more than 24h to reach the center of district using any form transportation. In these rural areas neither, IBN nor normal bed net was found in a lot of households. Bed net was not used in all households, and especially poor family might be received any bed net. Whereas indicators showed a satisfactory level in the district unit, some area; especially rural area was not always able to benefit from the project. It is recommended that the supervision in rural communities, which are highest endemic of malaria, is necessary in next phase of the project.

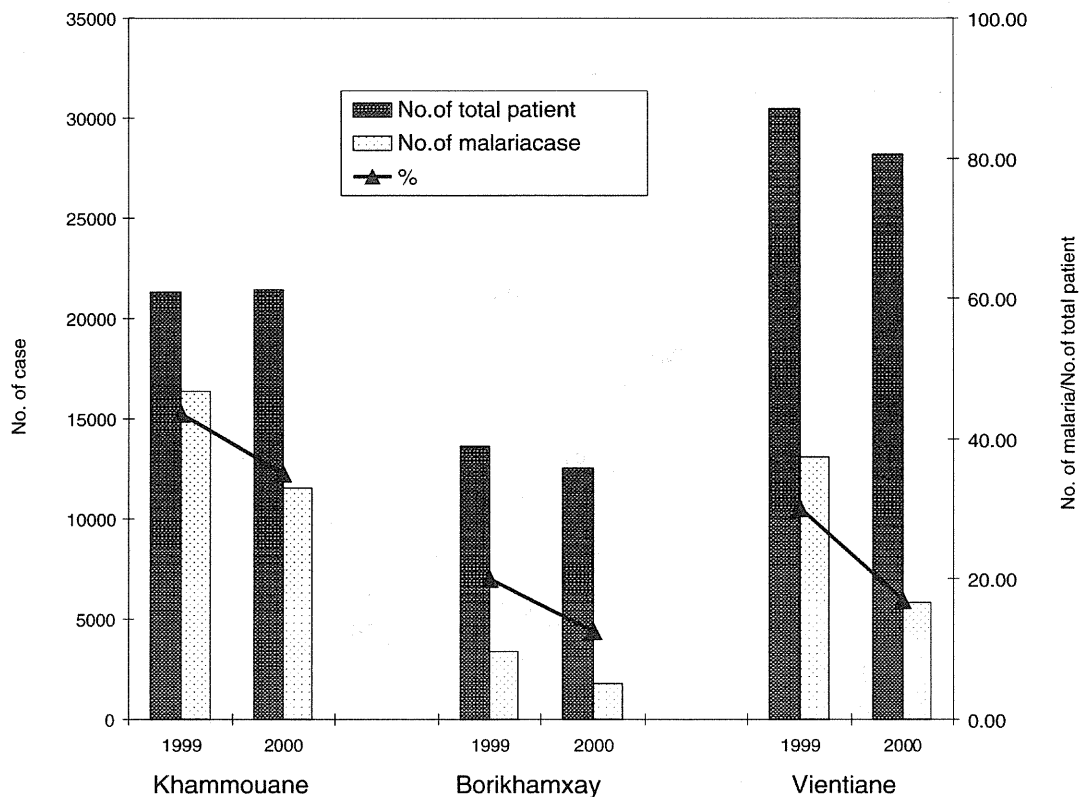


Fig. 3. Comparison of number of malaria patients between 1999 and 2000 in three provinces.

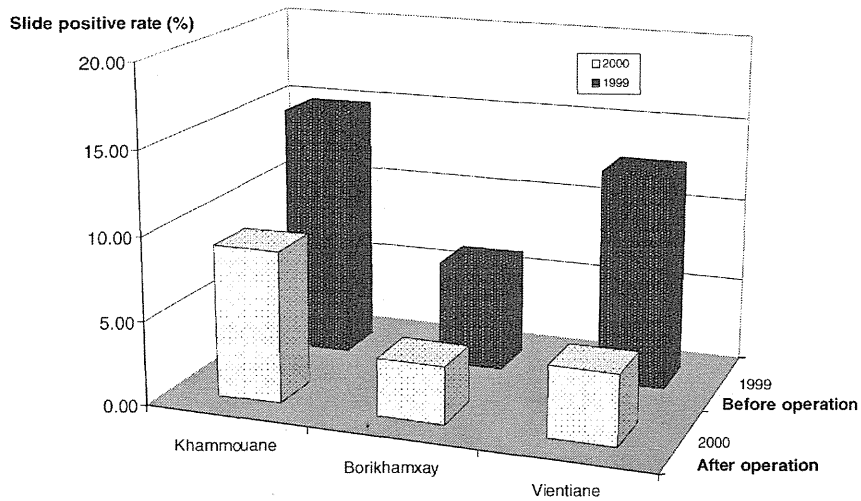


Fig. 4. Comparison of slide positive rate between 1999 and 2000 in the health facilities in three provinces.

2. Evaluation by passive case detection

The total number of malaria patients in all public health facilities in 2000 markedly decreased in all three provinces as compared with 1999 (shown in Fig. 3).

The rate of malaria patients in the total number of patients also decreased. It was assumed from these results that all malaria patients including those from the area where the inhabitants were not able to gain access health facilities had also decreased. Fig. 4 showed

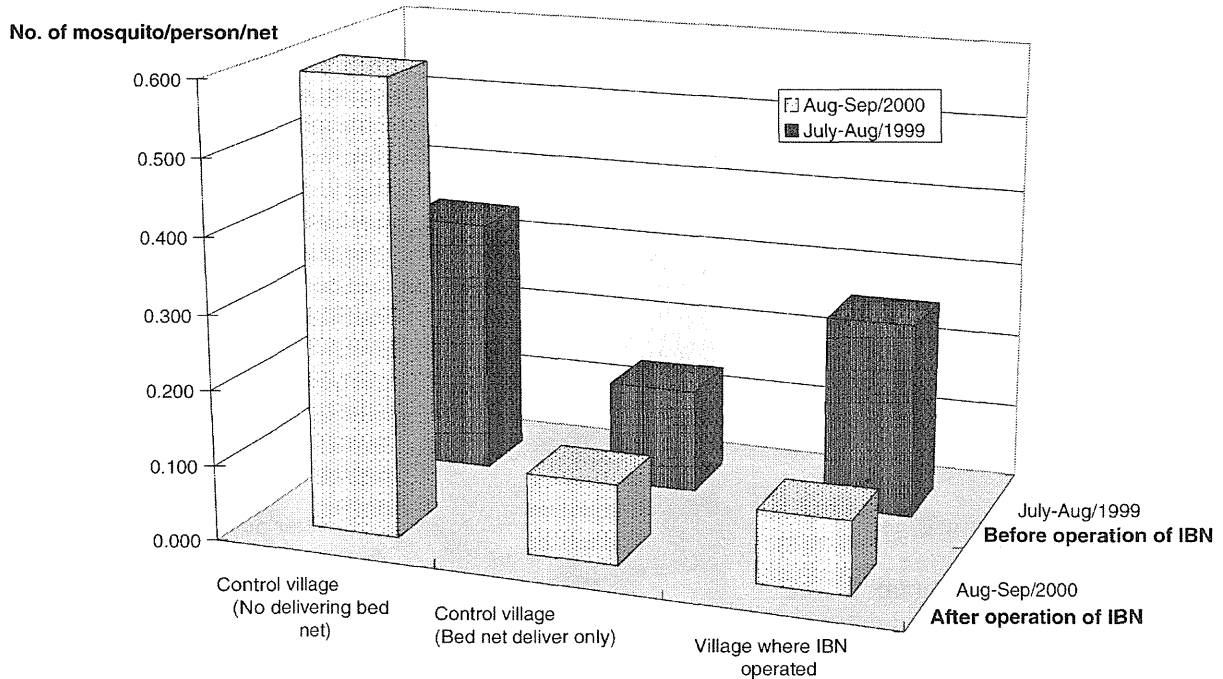


Fig. 5. Comparison of density of *A. dirus* before and after operation of IBN.

the reduction in malaria positive case in patients who presented with fever in all public health facilities in three provinces. Early treatment in the communities was conducted from 1993 to 1995 in Khammouane Province operating of drug revolving fund. After 1995, there was no expansion of this fund and no other activities related to early treatment in the area where IBN operated after 1999. Thus, IBN operation was claimed to be main factor in reducing the fall in the rate of cases in 2000.

3. Mosquito biting behavior in the pilot area

It has been reported the delivery of untreated bed nets could also protect against malaria (Clarke et al., 2001), but nevertheless, that IBN operation has not influenced the reduction of morbidity, caused by malaria, when coverage of IBN was low. Thus, a survey was conducted to evaluate the direct efficacy of IBN against malaria vector mosquitoes since the

direct efficacy of IBN can be proved by studying the variation of malaria vector mosquitoes.

Three villages in Bourapha district, one of most serious malaria endemic areas, were selected for the survey. From July to August 1999, when IBN operated, and August–September 2000 (1 year after IBN operation), *Anopheles dirus* suspected main vector in this area, was collected by human bait in three villages (Toma et al., 2003). Olyset net was used in Napoung village. At least one Olyset net was delivered to total 60 households. As a control, the new untreated bed net was delivered to Koutboun village. In this village, at least one untreated bed net was used in 40 households. As the other control, no bed net was delivered in Thapachone village. In these villages, no other vector control activities were conducted. Fig. 5 shows the mosquito density calculated by number of mosquitoes per hour per person. The decrease of mosquito density was found in the village where IBN scheme was operated, however, the density did not decrease in the other two control villages. All *A. dirus*, were dissected

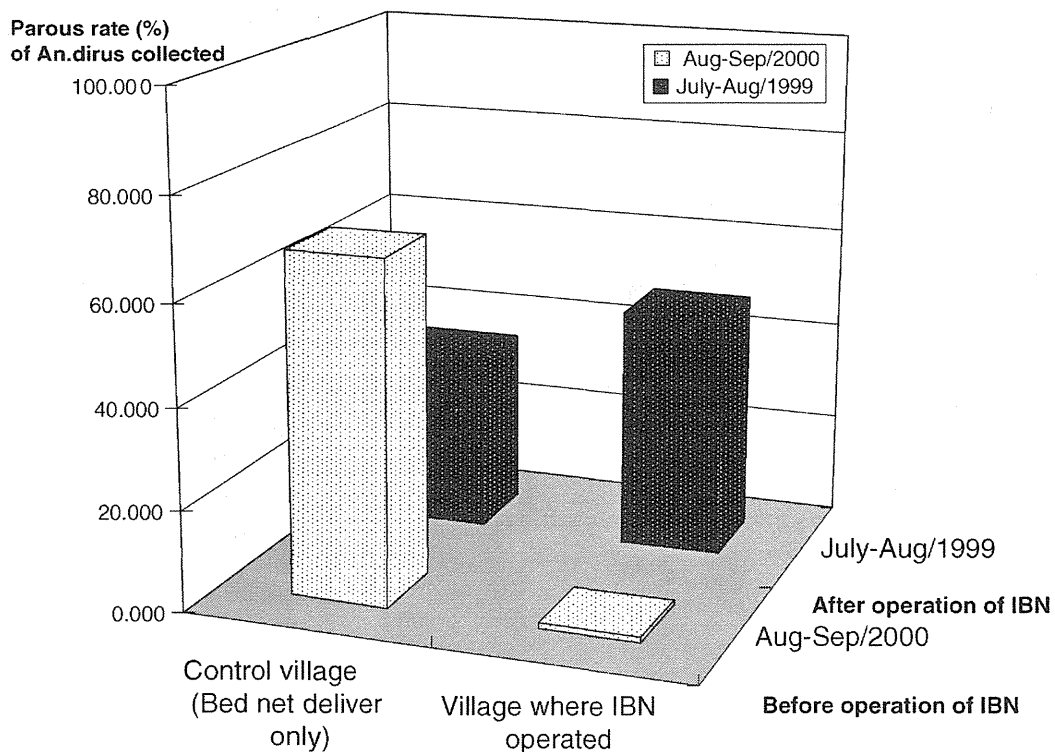


Fig. 6. Comparison of the parous rate of *A. dirus* before and after operation of IBN program.

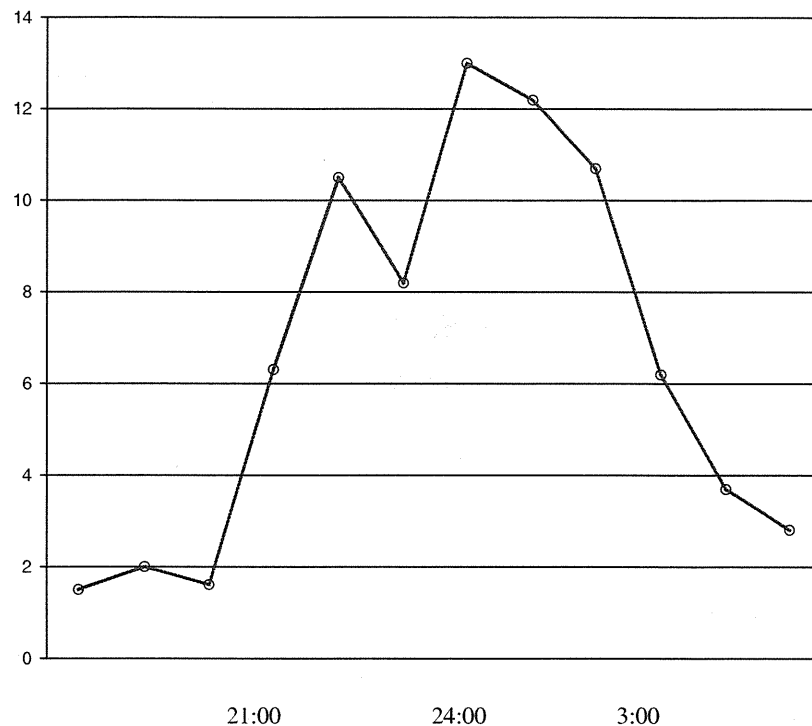
Mean of number of collected *An. dirus*Fig. 7. Mean of number of *A. dirus* which were collected by human bait collection in Boualapha district.

Table 5
Percentage of collection for major Anopheline mosquitoes in three villages, Boualapha district, in August 1999

Species	Human bait	Animal bait
(Celia)		
<i>A. aconitus</i>	5.3	0.9
<i>A. dirus</i>	27.5	0.6
<i>A. kochi</i>	4.5	11
<i>A. maculatus</i>	1.6	0.3
<i>A. minimus A</i>	11.8	1.4
<i>A. nivipes</i>	25.3	36.6
<i>A. philippinensis</i>	2.7	4.6
<i>A. sawadwongporni</i>	1.6	0.3
<i>A. tessellatus</i>	1.1	0.6
<i>A. vagus</i>	1.1	3.3
Anopheles		
<i>A. barbirostris g.</i>	3.2	1.5
<i>A. peditaeniatus</i>	0.8	1.8
<i>A. sinensis</i>	12	36.3

to exam the parity of mosquito. The parous rate decreased to almost 0% in the village where IBN was operated (Fig. 6), however, in the other control villages the parous rate of *A. dirus* was not very different between 1999 and 2000. This indicated that the operation of IBN provided protection against most mosquito bites.

The biting behavior of *A. dirus* was studied to make clear the reason why IBN is an effective to controlling the malaria vector in this area. Table 5 shows a comparison of the proportion of Anopheline mosquitoes which were collected by human bait and by animal bait in the three villages in 1999. A large number of *A. dirus* were collected by human bait; however, only a few *A. dirus* were found in animal bait collection. Thus, *A. dirus* showed the behavior of anthrophilic mosquito in this area. Fig. 7 shows other biting behavior of vector mosquito in this same area, and the number of *A. dirus* in each hour collected by human bait in the Thapachone village in 2000. The majority of mosquito bit human in around midnight; from 21:00

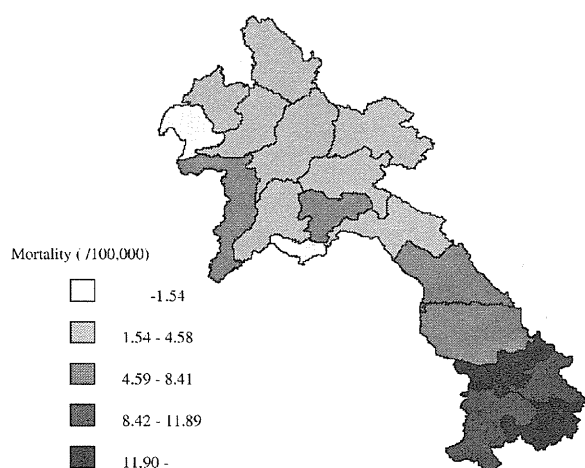


Fig. 8. Malaria mortality among provinces in Lao PDR (2000) by Ministry of Health, Lao PDR.

to 03:00 h. These biting behaviors assist the transmission of malaria to humans. On the other hand, when control vector was considered, these biting behaviors were also advantageous to prevent malaria infection using by IBN.

A. dirus is found in the central and southern provinces in Lao PDR (Vythilingam et al., 2001; Vythilingam et al., 2003). Ministry of Health, Lao PDR reported a high malaria mortality in central to southern province (Fig. 8). It explained generally that human behavior and the poor economic situation of

the minority group, named “Lao thung” influence high mortality in southern provinces. However, the result of our study suspects other factors in this area. The area of distribution of *A. dirus* corresponded to the high endemic area of malaria in Lao PDR. Thus, it is expected that the expansion of the IBN program in the southern provinces may lead to the success of malaria control in future years. However, it is known that the mosquitoes are able to change their baiting behavior. It is recommended therefore that monitoring of mosquito behavior is an important measure to controlling malaria in Lao PDR (Table 6).

Acknowledgements

We would like to thank all members in anti-malaria team in Lao PDR, Japan Overseas Cooperation Volunteers (JOCV) and Japan International Cooperation Agency (JICA) Lao Office to conduct Malaria control project supported by Japanese Grant Aid. The preparation of manuscript was carried out by the Asian Center of International Parasite Control (ACIPAC), which is cooperative project between Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University; CDC, Ministry of Health, Thailand and JICA.

References

Clarke, S.E., Bough, C., Brown, R.C., Pender, M., Walraven, G.E., Lindsay, S.W., 2001. Do untreated bednets protect against malaria? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 457–462.

Kobayashi, J., Vannachone, B., Sato, Y., Sinjo, M., Nambanya, S., Manivang, K., Inthakone, S., 1998. Current status of malaria infection in a southeastern province of Lao PDR. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 29, 236–241.

Pholsena, K., 1992. The malaria situation and anti-malaria program in Laos. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 23 (Suppl. 4), 39–42.

Singhasivanon, P., 1999. Mekong malaria. Malaria, multi-drug resistance and economic development in the greater Mekong sub region of Southeast Asia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 30, 1–101.

Toma, T., Miyagi, I., Okazawa, T., Kobayashi, J., Saita, S., Tuzuki, A., Keomanila, H., Nambanya, S., Phompida, S., Uza, M., Takakura, M., 2003. Entomological surveys of malaria in Khammouane Province, Lao PDR, in 1999 and

Table 6
Number of bed nets supported by project and number of bed nets delivered by confirmation in report

	No. of bed nets supported	No. bed nets delivered	Rate of delivering bed nets
Vientiane			
Olyset net	3500	2859	81.7
Normal net	8000	7327	91.6
Borikhamxay			
Olyset net	6000	4643	77.4
Normal net	4800	5408	112.7
Khammouane			
Olyset net	10500	7916	75.4
Normal net	7200	5729	79.6
Total	40000	32391	81.0

2000. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 33, 532–546.
- Vythilingam, I., Keokenchan, K., Phommakot, S., Nambanya, S., Inthakone, S., 2001. Preliminary studies of *Anopheles* mosquitoes in eight provinces in Lao PDR. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 32, 83–87.
- Vythilingam, I., Phetsouvanh, R., Keokenchanh, K., Yengmala, V., Vanisaveth, V., Phompida, S., Hakim, S.L., 2003. The prevalence of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) mosquitoes in Sekong Province, Lao PDR in relation to malaria transmission. *Trop. Med. Int. Health* 8, 525–535.

薬学研究解説

マラリア治療薬の開発研究 —人類史全般に亘って脅威を与えてきた疾病との戦いの最前線—

竹内 勤 慶應義塾大学医学部

マラリアは人類を最も多く殺してきている疾病といわれ、人類史にも多くの足跡を残している。アフリカの風土病である鎌形赤血球症は、マラリア原虫に対する抵抗性があるためだけに、今日まで淘汰されずに残ってきているし、古代ローマをイスラム勢力の侵略から守ったのは、ローマ近隣の湖沼地帯に生息するハマダラカとそれが媒介するマラリアであったといわれている。外国のみならず、日本においても、三日熱マラリアが本土に過去存在していた。源氏物語で、光源氏が紫の上と出会うきっかけになった「わらわ病み」とは、この三日熱マラリアであると言われているし、「おこり」も三日熱マラリアのことである。現代の日本においても、マラリア原虫自身は駆逐されているが、媒介蚊は存在し、罹患者の移入などにより、媒介蚊が再びマラリア原虫に感染する可能性も残っている。となりの韓国でも一旦なくなった三日熱マラリアが1990年代後半より急激な増加経過をたどり、原因は今でも不明とされているが、38度線のいわゆる Demilitarized Zone に当初発生した事から、北側から季節風に乗って媒介蚊が飛来したためではないかと推測する向きもある。

現時点においてもマラリアは人類に脅威を与え続けており、人類はマラリアと闘わなければならない運命にもある。マラリアは百余カ国において、年間1～5億人が罹患し、100～200万人の死亡者を出していると推定されている¹⁾。正確な疫学データが出ないのは、マラリア、特に死亡率の高い熱帯熱マラリアの主要な発生地域がアフリカのサハラ砂漠以南の諸国であり、正確な診断がなされないまま亡くなったり、統計的なシステムが完備していないことにもよる。サハラ砂漠以南にお

ける死亡例の大多数は5才以下の乳幼児である事も、マラリアの特徴の一つである。更に、マラリアの発生には気候異常、森林破壊、都市化、内戦による難民発生等種々の要因が関与している。このような種々の要因がマラリアの制圧を極めて困難なものにしている。

他方、我々日本人は直接のマラリアの脅威にさらされていない。わずかに輸入感染症として年間100例を超えるくらい報告されるだけである。しかし、日本人は非流行地に居住しているだけに免疫がなく、途上国で感染した場合、重症化する可能性があることも認識されるべきである。また一方、日本政府は近年HIV/AIDS、マラリア、結核をはじめ、感染症/寄生虫症に対する世界レベルの取り組みを促進してきている。特にGlobal Fund to Fight HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria (GFATM)は最近感染症/寄生虫症対策実施に大きな役割を果たしているが、これも当初サミットにおける日本の発議によってできたものである。更に加えて、それよりも以前から人材育成を中心として学校保健の枠組みをこのような疾患制圧に適用しようという、いわゆる橋本イニシアティブも機能している。日本に住んでいる我々もこのような事実をより明確に認識するべきである。

この様に、人類の歴史は、ある意味でマラリアとの戦いの歴史である。この戦いには上述のように多様な因子が関係している。しかし、マラリアとの戦いの歴史がマラリア治療薬の開発の歴史である事も間違いはない。以下、マラリアに対する薬物の現状と今後の課題を概説するが、マラリア薬の作用機序の考察には、マラリア原虫の生活環とその作用対象を見極める必要があるため、まずマ

◆略歴◆ 竹内 勤：慶應義塾大学医学部・熱帯医学寄生虫学教室・教授

1970年慶應義塾大学医学部卒業。寄生虫学教室（松林久吉教授）に入室し、トキソプラズマなど寄生性原虫類の研究を開始。1973年から1977年までLaboratory of Parasitic Diseases, NIAID, NIH, USAに留学。赤痢アメーバを中心とする原虫の研究に従事。1978年12月に慶應義塾大学医学部専任講師（寄生虫学）、1987年から現職。現在、日本熱帯医学会理事長、Expert Advisory Panel (WHO)のメンバー等を兼ねる。

ラリア原虫の生活環について述べる。

1. マラリア原虫の生活環

人寄生マラリアには、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫および四日熱マラリア原虫の4種類があり、形態、発育、病原性などに関しての違いがある。この中で、熱帯熱マラリア原虫による感染が、感染者数、薬物耐性、重症マラリアを引き起こす点などから、もっとも重要である。

マラリア原虫は、ハマダラカ属の蚊の唾液腺にスポロゾイト^(注1)として集積し、これが吸血時に人体内に入り、血流にのって肝に達し、肝細胞内に入った後に、赤血球外発育と呼ばれる単純多数分裂を行う。約1週間で多数の成熟したメロゾイト^(注2)となり、肝細胞を破って再び血流に放出される(赤血球外発育期)。この期間が潜伏期である。赤血球外増殖に通常向かうスポロゾイトのなかには肝細胞内でヒブノゾイト(休眠体)と呼ばれる非活動型になるものもあり、これが三日熱などの再発(relapse)の原因となる。

一方、熱帯熱マラリア等ではこのヒブノゾイトが存在せず、従って治療後の再発症は赤血球内発育型(メロゾイト)の残存による。これを再燃(recrudescence)と呼んで区別している。メロゾイトは赤血球に侵入した後、トロフォゾイト^(注3)となり、数日で分裂体であるシizont^(注4)に成熟して、無性的な単純多数分裂を行い、新たなメロゾイトを放出する。この周期は、マラリアの発熱発作に一致する(赤血球内発育期)。メロゾイトの中には、雌雄のガメトサイト(生殖母体)となるものもあり、これがハマダラカに吸血時に吸い上げられ、雌ハマダラカの中腸で雌雄のガメト(生殖体)に変態し、受精してオーキネート^(注5)

からオーシスト^(注6)と成熟し、オーシストが破裂して、内部に形成された多数のスポロゾイトが中腸壁から放出され、唾液腺に集結して、新たなヒトへの感染を引き起こす。

2. これまでの抗マラリア薬とその現状

人類とマラリアとの戦いにおいて、治療薬として、最初に世に出たのはキニーネ(図1)である。キニーネは、アンデスに自生するキナの樹皮に含まれるアルカロイドである。キナの樹皮そのものは、熱病の治療のための生薬として、新大陸の発見とともに、欧州へと伝えられている。ヴィクトル・ユゴーの「レ・ミゼラブル」には、死の床にあるファンチーヌに、修道女がキナの樹皮の煎じたものを与えるシーンが描かれている。キニーネはこの樹皮の抽出物を精製して作られていた。第二次大戦中の東南アジアにおいて、キナの生育地を米国と日本が争った話は有名な話である。キニーネの主たる作用は、シizontに対しての選択的殺原虫効果であり、その機序はヘモソイン^(注7)の生成阻害であると言われている。この薬物はクロロキンの登場後は、長い間その存在意義が薄れていたが、後に述べるように、薬物耐性マラリアの登場とともに、マラリアの化学療法における、最後の防衛線的な性格付けがなされるようになり、その存在意義が再認識された。しかし再度、耐性原虫の出現等、種々の理由で使用が制限されつつある。

キニーネに次いで登場したのが、クロロキン(図1)である。クロロキンは、マラリアの特効薬キニーネの基源植物である、キナの生育地を日本軍に抑えられた米国によって、合成薬でキニーネに対抗すべく開発された抗マラリア薬である。基本構造は、キニーネと同じキノリン骨格であり、キニーネの6位のメトキシ基を取り去り、7位に塩素を導入している。又、4位のヒドロキシ環状アミン構造を、分岐鎖のジアミン構造に変換している。この薬物も殺シizont薬であり、ヘモソインの生成阻害が主たる機序であると言われている^{2,3)}。クロロキンの有効性は、クロロキン登場当初は極めて高く、長い間、マラリアの確定診断後の第一選択薬剤として、世界各国で広く使用されてきた。しかし1970年代前後より、クロロキンに対して薬物耐性を示す熱帯熱マラリアが広範に広がり、その有効性が薄れた。それとともに、マラリアが再興感染症となり、感染症問題における制圧すべき世界的な重要課題となった。薬物耐性マラリアには、クロロキンにのみ耐性を示すクロ

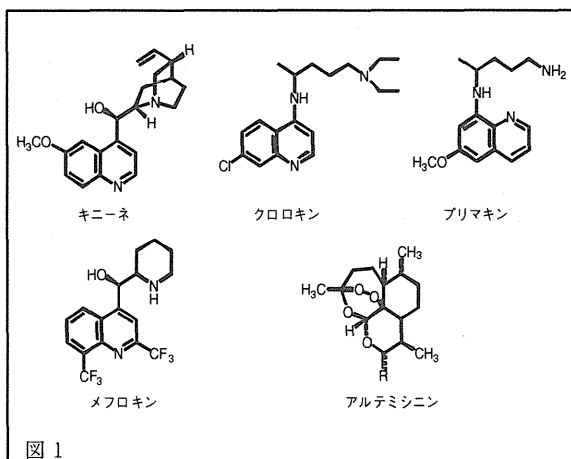


図1

ロキソニン耐性マラリアと、その他のマラリア薬にも耐性を示す多剤耐性マラリアが存在するが、薬物耐性マラリアが最も高頻度に分布する東南アジア(タイ/ミャンマー、及びタイ/カンボジア国境)では、多剤耐性マラリアが、全熱帯熱マラリアの50%以上を占めるようになっていられるとされている。薬物耐性株の伝播が、クロロキンの治療薬としての有効性を著しく減じており、そのことが、最重要課題の一つとして、マラリア制圧を世界的に取り上げなければならぬ状況を生みだしている原因の一つと言える。

プリマキン(図1)は、クロロキンの側鎖構造について、7位塩素を6位メトキシ基に戻し、キニーネに近い形にした上で、4位の分岐ジアミンを8位に移しており、分岐構造も単純なものとし、アルキル基の末端に1級アミンを配する形を取っている。毒性が非常に高いため、その使用は極めて限られたものであるが、キニーネやクロロキンなどとは異なり、休眠期の原虫に対して殺原虫効果を示す利点があり、殺シズント薬の投与後、完治或いは再燃の防止のために、現在でも用いられている。

メフロキン(図1)も、キニーネ、クロロキン、プリマキンに続いて、キノリン構造を基本骨格とした抗マラリア剤であり、クロロキン、プリマキンの開発情報を取り入れた化合物設計となっている。メフロキンはキノリンの2位と8位にトリフルオロメチル基を導入し、更に、4位にヒドロキシ環状アミン構造を導入している。キニーネの構造を単純化し、トリフルオロメチル基で動態特性を向上させた設計であると言える。この薬物も、作用は殺シズントであり、クロロキン耐性マラリアの流行地において使用されたり、動態特性の良さや安全性から予防薬として、旅行者などに利用されている。近年、マラリアの薬剤耐性は、クロロキン耐性から、多剤耐性へと移行しており、既にメフロキンに対して耐性を示す株も広がっている。

アルテミシニン(図1)は、漢方生薬として、発熱に対して用いられていた、キク科ヨモギ属の青蒿(和名クソニンジン)の抽出物から、単離同定された化合物で、エンドパーオキサイドブリッジ構造を有する特異的な化合物である。この薬物の作用は、殺シズント作用であり、機序は、不明な点が多く、ヘム・ヘモゾイン変換に作用すると言われている。その点で、キニーネ、クロロキン、メフロキンと類似しているが、耐性株が殆ど出現しないという利点を有している。最大の欠点は再燃を起こすことであり、その為、アルテミシ

ニン治療の後に、メフロキンなどを投与して再燃の予防処置を行わなければならない。

以上述べたように、現在使用されている抗マラリア薬には、それぞれが欠点を有しており、これらの欠点を克服する必要がある、その為の研究が、現在、日本でも厚生労働省のプロジェクトなどで進められている。その内容を以下に簡単に紹介する。

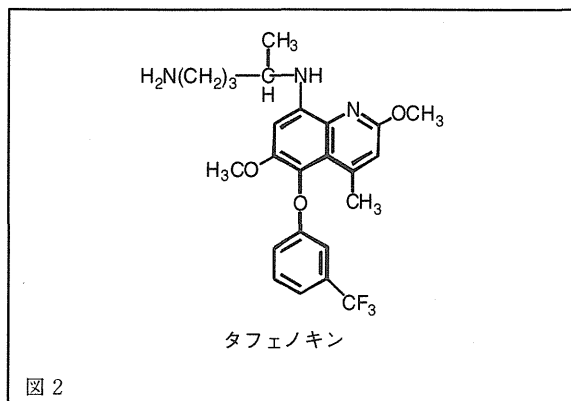
3. マラリア・ワクチンの開発

マラリアは宿主の血球中に生息するため、宿主の免疫機構から逃れるための種々の手段を有していると考えられる。この為、原始的な手技でのワクチンの開発は、過去何度となく失敗を重ねてきた。近年になってわが国でも、大阪大学の堀井俊宏教授等の研究により、マラリア原虫にとってアキレス腱ともなるタンパク(SERA)が見出され、それに対するワクチンが開発されている⁷⁾。ワクチン治療は、数回の接種で長期間病原体に対する抵抗性が維持される利点があり、これが実用化されれば、マラリアの制圧には有力な武器となろう。但し、広汎に予防に使用すると、ワクチンに対して抵抗を示す株をセレクションすることになりかねないので、その使用方法と、適切な化学療法剤との組合せが必要になろう。

4. 新規の抗マラリア薬の開発

歴史的に見て、マラリア感染において、最も生命を脅かす急性期を凌ぐ為には、殺シズント薬の有効性は誰もが認めるところであろう。現在、耐性株の伝播によって、その有効性が減じている殺シズント薬を開発することは急務である。その様な背景で、各種の化合物についての抗マラリア作用のスクリーニングが、北里研究所の大村智所長のグループ等によって為されている。

又、蚊による吸血→ヒトへの感染→蚊による吸血→蚊への原虫の移行・有性生殖→蚊による吸血→ヒトへの感染のルートを断ち切るためには、ヒトに移行した原虫が再び蚊に移行しないようにすることがマラリアの流行を阻止する上で有効であり、この意味で生殖母体や休眠体に対して殺原虫効果を示す薬物の開発も重要である。ウォルター・リード陸軍病院で開発されたタフェノキン(図2)は、まもなく上市されるが、生殖母体や休眠体にも有効と言われており、これからの薬物として期待されている⁸⁾。



5. 薬物耐性の解除薬の開発

薬物の耐性の問題さえなければ、クロロキン、メフロキンはマラリア制圧には有用な薬である。この薬物耐性の発現には、ABCトランスポーターが関与していると言われている。当研究室と北里大学の長瀬 博教授の生命薬化学研究室では、薬物排出トランスポーターを阻害し、原虫の薬物耐性を解除する薬物の研究を行ってきており、

ジベンズスベリルピペラジン骨格の化合物がその作用に優れることを見出している⁹⁾。この研究過程で、グルタチオンの動向が、クロロキンの作用発現と原虫の薬物耐性の発現と解除の両方に大きな影響を与えることを見出している。マラリア原虫の薬物耐性を解除し、クロロキンなどの抗マラリア薬の効果を向上させることは、マラリア制圧に有意義なことであると考えられる。

以上、マラリア薬の開発研究史について、簡単に述べたが、マラリア制圧への道は遠く険しいものと認識している。又、世界が狭くなりつつある現在、日本にとってもマラリアは他国の問題以上の重みとなってきている。学術的にも、寄生体の薬物耐性獲得機構、酸化ストレスからの回避機構、宿主免疫システムからの回避機構など、興味深いテーマも多々存在するので、多くの優秀な科学者がマラリアの研究に携わり、一日も早いマラリア制圧の道が開かれることを期待して筆を置きたい。

- 注1) スポロゾイト：感染型原虫のこと。蚊の吸血時に唾液腺よりヒトの血液中にはいる。スポロゾイトは短時間のうちに肝臓に到達し、肝実質細胞に侵入する。
- 注2) メロゾイト：肝細胞内で赤血球外発育を行う結果形成される。一個のスポロゾイトは数千から数万のメロゾイトを形成する。メロゾイトは肝細胞を破壊して、赤血球内に直ちに侵入する。
- 注3, 4) トロフォゾイト、シゾン：赤血球に侵入した虫体はリング期に続いてトロフォゾイト期、シゾン期と呼ばれる特有の形態変化を示しながら発育する。最終的に10-30個のメロゾイトを形成する。
- 注5) オーキネート：ハマダラ蚊の体内で患者から吸い込まれたマラリア原虫の雄性生殖体と雌性生殖体が接合したものがオーキネートであり、運動性を獲得した虫体である。
- 注6) オーシスト：オーキネートが中腸の漿膜下に移動して、分裂を開始し、オーシストを形成する。10-14日ほどで、オーシストの中に多数のスポロゾイトが形成される。
- 注7) ヘモゾイン：マラリア原虫は宿主の赤血球内でヘモグロビンをフードバキュオールで分解し、アミノ酸の供給源として利用する。この時、遊離するヘムが原虫にとって極めて有毒であるため、重合させてヘモゾインとして無毒化する。ヘモゾインはヘム鉄とポルフィリン環側鎖のプロピオン酸が次々に結合したポリマー構造をとっている。

参考文献

- 1) A WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control 1993-2000. Implementation Series 839; World Health Organization: Geneva, 1993, pp1-58
- 2) Krogstad DJ.; Schlesinger PH.; Gluzman IY. J Cell Biol. 1985, 101, 2302-2309.
- 3) 大友弘士、狩野繁之; 医学のあゆみ 1999, 191, 109-113.
- 4) Arora R. B.; Madan B. R. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1956, 107, 215-222.
- 5) Heim MU.; Mezger J.; Scheurlen C.; Twardzik L.; Wilmanns W. Dtsch MedWochenschr., 1988, 113, 941-944.
- 6) Hoppe H. C.; van Schalkwyk D. A.; Wiehart U. I.; Meredith S. A.; Egan J.; Weber B. W. Antimicrob. Agents Chemother. 2004, 48, 2370-2378.
- 7) Aoki S.; Li J.; Itagaki S.; Okech B. A.; Egwang T. G.; Matsuoka H.; Palacpac N. M.; Mitamura T.; Horii T. J. Biol. Chem. 2002, 277, 47533-47540.
- 8) Ponsa N.; Sattabongkot J.; Kittayapong P.; Eikarat N.; Coleman R. E. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2003, 69, 542-547.
- 9) Osa Y.; Kobayashi S.; Sato Y.; Suzuki Y.; Takino K.; Takeuchi T.; Miyata Y.; Sakaguchi M.; Takayanagi H. J. Med. Chem. 2003; 46, 1948-1956.

特集 ワクチン開発と感染、免疫——新規ワクチンの開発と展望②

マラリア原虫のアキレス腱を標的とするSE36マラリアワクチンの開発

Development of SE36 Malaria Vaccine Targeting at Achilles Heel Antigen of *Plasmodium falciparum*

堀井俊宏 松本芳嗣 太田伸生

Toshihiro Horii, Yoshitsugu Matsumoto, Nobuo Ohta

世界人口の4割がマラリア流行地域に居住し、年間に100万～300万人が熱帯熱マラリアの犠牲となっている。マラリアワクチンの開発に期待が寄せられているが、防衛的に働く抗体の標的となる抗原が不明であった。筆者らは、熱帯熱マラリア原虫のSERA (serine repeat antigen) N末端ドメインが“アキレス腱”とも言うべき抗体標的の抗原であることを発見した。これをもとに開発したSE36マラリアワクチンについて述べる。

key words

マラリア, *Plasmodium falciparum*, SERA, ワクチン, 臨床試験, 寄生虫

1 堀井俊宏 大阪大学微生物病研究所 感染症研究部門 分子原虫学分野 E-mail: horii@biken.osaka-u.ac.jp
1953年9月生まれ、大阪府出身。1976年大阪大学理学部(生物学科)卒業、1978年大阪大学大学院理学研究科(生理学専攻)修士課程修了、1980年大阪大学理学部助手、1981年理学博士、1984～1986年ダートマス大学医学部 Research Associate, Research Assistant Professor, 1991年大阪大学微生物病研究所助教授を経て、1999年より教授。専門分野は感染症学、マラリア原虫の分子生物学、寄生虫学、ワクチン学。

松本芳嗣 東京大学大学院農学生命科学研究科

太田伸生 名古屋市立大学大学院医学研究科

はじめに

マラリアはハマダラカによって媒介される寄生虫病である。ヒトには、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum*、三日熱マラリア原虫 *P. vivax*、四日熱マラリア原虫 *P. malariae* および卵形マラリア原虫 *P. ovale* の4種が感染する。なかでも致死性の高い熱帯熱マラリア原虫は熱帯・亜熱帯地域を中心に流行し、年間に5億人の患者と100万～300万人の犠牲者を出している。流行地域においては労働力も奪われ、マラリアによる経済的損失は計り知れない。一方、我が国でも海外渡航者や来日外国人によって国内に持ち込まれる輸入マラリアが後を絶たず、熱帯熱マラリアによる死亡例が散発している。近年、薬剤耐性マラリア原虫が蔓延し、また地球温暖化による流行地域の拡大の懸念から、抜本的な対策としてマラリアワクチンの開発に期待が寄せられている。しかしながら、これまで世界的に多大な研究努力が費やされてきたにもかかわらず、いまだに実用化の目処は立っていない。

I. SERA とは

効果的なマラリアワクチンを開発するには、防御抗体を誘導することができるワクチン候補抗原を見だし、その抗原に対する免疫応答がマラリア原虫細胞に及ぼす影響を詳細に解析するとともに、マラリアの持つ免疫回避機構についても詳しく知る必要がある。筆者らがワクチン候補抗原として研究しているのは熱帯熱マラリア原虫のSERAと

呼ばれるタンパク質である。

マラリア原虫は赤血球の中で増殖を繰り返し、発熱や貧血、昏睡というマラリアの臨床症状はこのときに現れる(図1)。SERAは分裂体期のマラリア原虫感染赤血球の寄生胞(parasitophorous vacuole)においては120kDaのほぼ全長で存在するが、分裂体が壊裂しメロゾイトを放出する際に47kDa, 50kDa, 6kDa, 18kDaの断片に切断される¹⁾(図2)。様々な増殖ステージのマラリア原虫に対してSERAの各ドメインに対する抗体を用いたウエスタンブロットおよび間接蛍光抗体法によってプロセッシングを受けた各ドメインの局在を調べた結果、N末端のP47とC末端のP18がジスルフィド結合(S-S結合)によって65kDaの複合体を形成し、メロゾイト表面に存在することが明らかとなった。一方、中央部のP50はメロゾイトには存在せず、マラリア原虫感染赤血球が壊裂しメロゾイトを放出した後に培養液中に浮遊する²⁾。SERAは感染赤血球が壊裂しメロゾイトを放出する直前にプロセッシングを受けるため、感染赤血球の壊裂メカニズムに関与すると考えられるが、その具体的な機能は依然として不明である。

熱帯熱マラリア原虫のゲノムDNAはアデニンとチミンの含量が80%を超えており、コドンの使用頻度に強い偏りがある。したがって、SERA遺伝子のcDNAは大腸菌やバキュロウイルスの系で発現が弱いため、筆者らは、大腸菌型のコドンを用いてSERAのアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に合成した。これによって大量の組換えタンパク質を生産することが可能となったのである。そして、マウスお

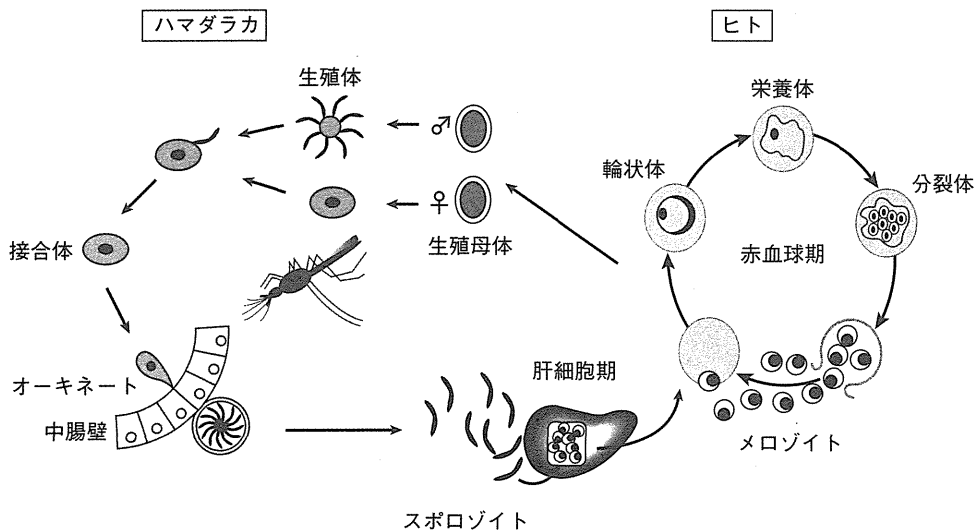


図1. 熱帯熱マラリア原虫の生活環

感染したハマダラカの唾液腺からヒトに侵入したスポロゾイトは、血流に乗り肝細胞に感染をする(肝細胞期)、増員増殖の後メロゾイトに細胞型を変化させ、赤血球に感染する(赤血球期)、赤血球期を繰り返し、原虫数が増加する。発熱や脳性マラリアの症状はこのときに現れる。スポロゾイトや肝細胞期のマラリア原虫が少数でも残存すれば、赤血球期に至りマラリアを発症する。一方、赤血球期の原虫数を80%程度減少させれば十分なワクチン効果が期待される。

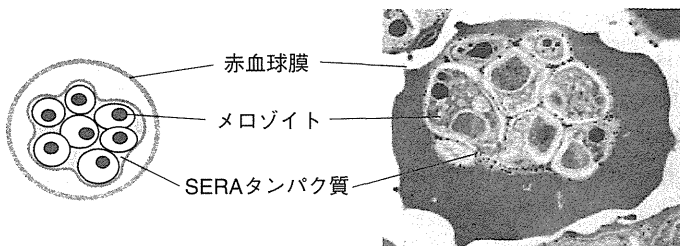
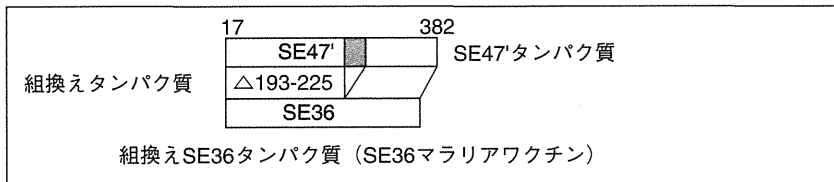
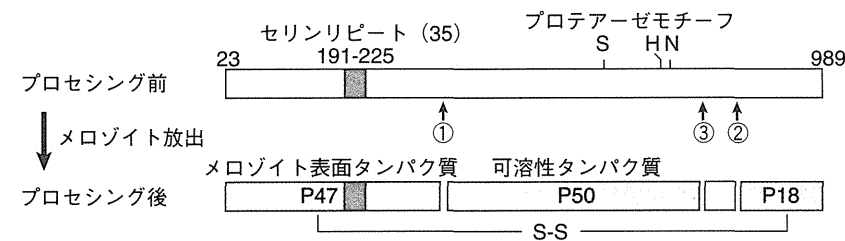


図2. 熱帯熱マラリアSERAのプロセッシング断片とSE36タンパク質の構造

SERAタンパク質(N末端ドメインにセリン残基の繰り返し配列を持つ)は赤血球期の分裂前に多量に生産され、寄生胞に多量に蓄積される。感染赤血球が壊裂する直前にプロテアーゼによる分解を、矢印①、②、③の順番で受け、断片のP47とP18はメロゾイト表面に結合するが、P50は外部に放出される。SE36タンパク質はSE47'タンパク質からセリン残基の繰り返し配列を除去したものである。下図は抗SERA抗体を用いた免疫電子顕微鏡写真である。SERAがメロゾイト周辺の寄生胞に存在することが金コロイドの分布から示される(愛媛大学医学部、鳥居本美教授の撮影)。

よびラットから調製したSERAタンパク質のN末端17~382アミノ酸残基の領域(SE47'タンパク質)に対する抗血清は試験管内においてマラリア原虫の増殖を阻害した³⁾。

阻害効果のメカニズム(エフェクター機構)を解析するた

め、抗SE47'抗血清よりSE47'タンパク質特異的なIgG(immunoglobulin G)分子をアフィニティ精製し、培養マラリア原虫の増殖阻害効果を測定した。その結果、アフィニティ精製したSE47'タンパク質特異的なIgG分子によって、

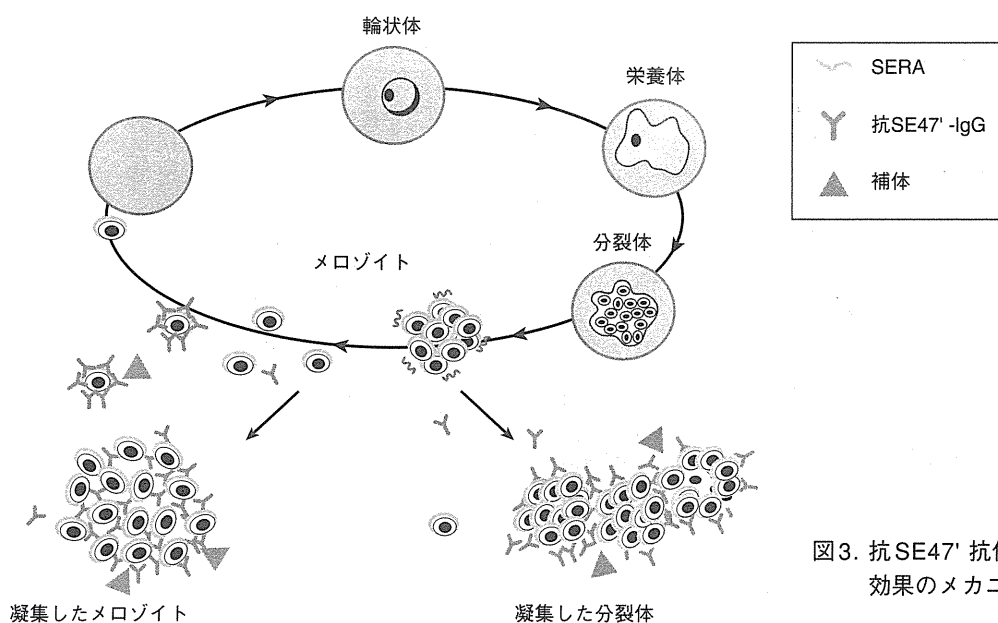


図3. 抗SE47'抗体によるマラリア原虫増殖阻害効果のメカニズム (エフェクター機構)

きわめて強い増殖阻害が観察された。顕微鏡観察により、抗SE47'-IgGは分裂体およびメロゾイトを強力にagglutination(凝集)させることが明らかとなった⁴⁾(図3)。さらに、モルモットの補体を加えたところ、SE47'タンパク質特異的なIgG分子のみの場合に比べて、より強力な阻害効果が観察され、メロゾイト放出直前の成熟した分裂体は補体の古典的経路によって殺滅されることが示された⁵⁾(図3)。

II. 熱帯熱マラリア原虫の“アキレス腱”としてのSERAのN末端ドメイン

もし、一度のマラリア感染によって防御免疫が容易に獲得できるのであれば、マラリアは世界的な問題ともならず、また、ワクチン開発も容易であろう。しかしながら、流行地域住民は幼児期に幾度も感染を繰り返し、ようやく重症化を免れるまでの免疫を獲得する。幼児期を過ぎてはなお多くの住民はマラリア原虫を体内に宿し、また、成人しても発症することがまれではない。一度の感染で防御免疫を獲得できる麻疹や天然痘との大きな違いは、マラリア原虫が真核生物であり、多数の遺伝子がヒトの免疫防御を回避する方向に寄生適応してきたことである。マラリア原虫の寄生適応戦略の最も重要な機構は、多重族遺伝子群や遺伝子多型によって防御免疫の標的となる抗原分子を変化させることである⁶⁾。さらに、マラリア原虫がヒトの免疫を攪乱するために多数のdecoy(おとり)抗原を放出することもまた重要な寄生適応戦略と考えられている。

感染を繰り返し、マラリア免疫を獲得した人の血清には防御抗体が含まれていることは、古くから知られていたがその標的抗原は不明であった。ワクチン開発には、このマラ

リア原虫の“アキレス腱”とも言うべき標的抗原を解明しなければならない。そのために、SERAのN末端ドメインに対する抗体価について疫学調査を行った。アフリカ中央部に位置するウガンダのマラリア高度流行地域に住む児童を、マラリア感染により発熱を示すグループと発熱していないグループに分けたところ、抗SE47'-IgG3抗体を持つ児童はまったく発熱をしていなかった。また、児童の血中マラリア原虫率と抗SE47'-IgG3抗体価を調べた結果、抗SE47'-IgG3抗体価と血中のマラリア原虫率には、はっきりとした負の相関関係が認められた^{7), 8)}。ここでは、SE47'を改変したSE36タンパク質を用いた、南太平洋のソロモン諸島での疫学調査(名古屋市立大学、太田伸生教授との共同研究)について紹介する。図4Aはソロモン諸島のマラリア高度流行地域に居住する人、約100名を対象として血中のマラリア原虫数と抗SE36抗体価の関係を見たものである。原虫数が多いグループでは、SE36-IgG3抗体価の高い人の割合が顕著に低下していることがわかる。マラリア初感染においても、ヒトの免疫は多数のマラリア抗原に対して迅速に反応するが、それによってマラリア原虫が殺滅されるということはまれと考えられる。図4Bには図4Aの各グループからそれぞれ4人の抗血清を用いてウエスタンブロット法によりマラリア原虫細胞粗抽出液に対する抗体反応を見たものである。それぞれの人の血中の原虫率とは無関係にきわめて多数のマラリア抗原に反応する抗体を保有していることがわかる。抗SE36-IgG3抗体価が高いソロモン諸島住民の血清を集め、これがマラリア原虫の増殖を阻害するかどうかを試験管内で調べた(図5A)。培養液中に加える血清の量に従って原虫の増殖阻害が見られる。このプール血清を前もってSE36タ

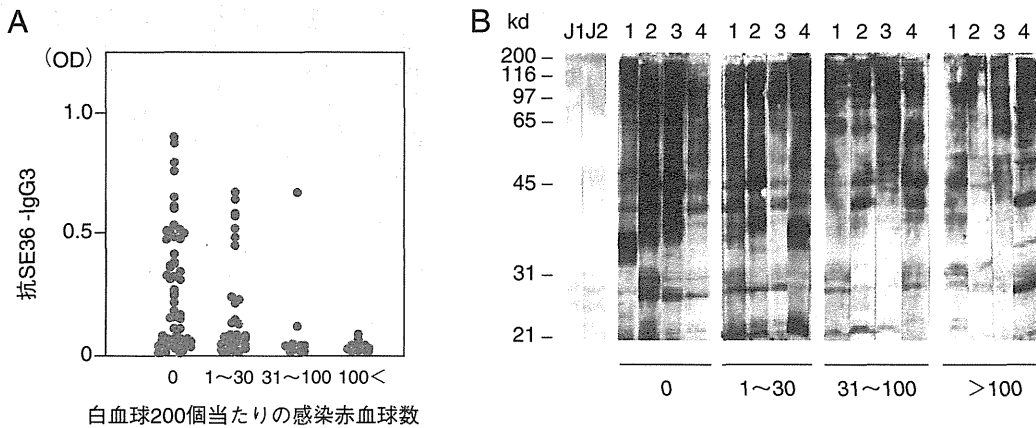


図4. ソロモン諸島住民における血中の原虫率と原虫抗原に対する抗体応答

A: ソロモン諸島のマラリア高度流行地域に居住する人, 約100名を対象として血中のマラリア原虫数と抗SE36抗体価の関係を見たもの。

B: Aの各グループからそれぞれ4人の抗血清を用いてウエスタンブロット法によりマラリア原虫細胞粗抽出液に対する抗体反応を見たもの。J1およびJ2はマラリア感染歴のない日本人血清である。

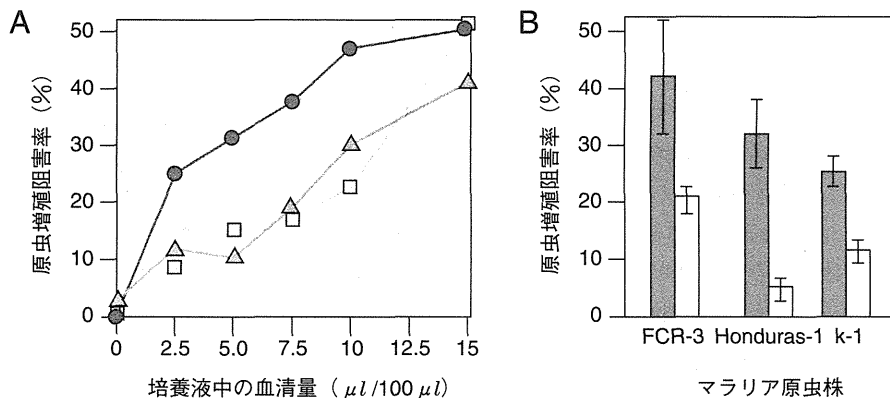


図5. ソロモン諸島住民血清によるマラリア原虫の増殖阻害

A: SE36-IgG3抗体価が高いソロモン諸島住民の血清を集め(プール血清, $n=10$), マラリア原虫の培養液に加えた(青). 血清量の増加に伴い原虫増殖が阻害される. この血清をSE36タンパク質と反応させ(抗体の中和)後にマラリア原虫の培養液に加えると増殖の阻害効果が減少し(ピンク), SE36-IgG3抗体価が低いソロモン諸島住民のプール血清($n=10$)が示す増殖阻害効果(黄)と同等となった。

B: SE36-IgG3抗体価が高いソロモン諸島住民のプール血清を用いて($7.5 \mu\text{l}/100 \mu\text{l}$), SERA遺伝子の代表的な3つの対立遺伝子を持つマラリア原虫株において増殖阻害(青)とSE36タンパク質による中和実験(黄色)を行った。

ンパク質と反応させ特異的な抗体を中和したところ, 原虫の増殖阻害は低下し対照として用いた抗SE36抗体価の低いソロモン人血清による阻害と同等となった. これらの結果は血中の抗SE36抗体が原虫増殖阻害に直接関与していることを示す。

マラリア原虫が宿主免疫監視から回避する寄生適応戦略においては, 標的抗原遺伝子の遺伝子多型や遺伝子ファミリーが重要な機能を持つが, SERAにおいても遺伝子多型が観察される. SERAには3つの代表的な対立遺伝子が存在するが⁹⁾, これらについてソロモン人血清を用いた増殖阻害-中和実験を行ったところ, すべての原虫株で抗SE36抗体に依存する増殖阻害が観察された(図5B). 一方, SERA

(SERA5)はSERA遺伝子ファミリーに属する遺伝子であり, 選択的な遺伝子発現調節による抗原性変換を行う可能性がある. SERAファミリー遺伝子の発現解析を行ったところ, すべてのSERAファミリー遺伝子は個々のマラリア原虫細胞において発現しており, 免疫回避のための抗原性変換は生じないことが示された⁸⁾.

マラリアに対する防御免疫の獲得には長い時間を要することが知られている. ソロモン諸島の住民における抗SE36-IgG3抗体価の陽性率を年齢別に比較してみたところ, 10歳以下の年齢層では抗体保有者が10%以下であり, 成人を見ても50%に満たない(図6). 疫学調査を実施した地域は高度マラリア流行地域であり, 住民はほぼ例外なく乳幼児の

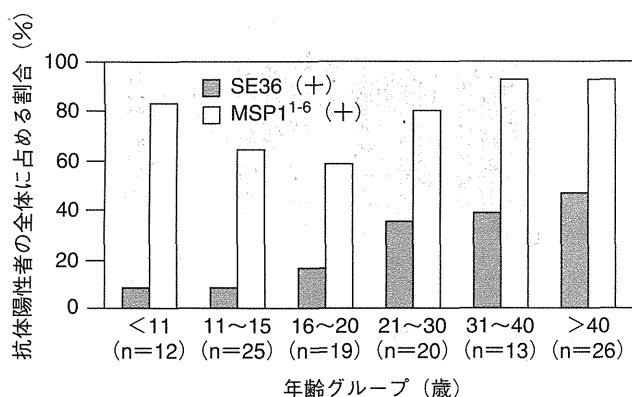


図6. ソロモン諸島住民における抗SE36-IgG3 陽性率の加齢依存性

ソロモン諸島住民を年齢グループに分け、採取した血清の抗体陽性率を表した。対照に用いたのは代表的なマラリアワクチン候補抗原であるMSP1タンパク質のN末端領域である。対照とした抗原に対しては低年齢層からきわめて抗体陽性率が高いのに対して、SE36に対してはきわめて低いことがわかる。

時期からマラリア感染にさらされている。代表的なワクチン候補抗原であるMSP1のN末端領域に対応するMSP1¹⁻⁶タンパク質に対する抗体陽性率は年齢にかかわらずきわめて高い割合であることから、住民の大半がマラリア原虫抗原に応答していることがわかる(図6)。これらの結果から、自然にマラリア感染を繰り返しても抗SE36抗体陽性がきわめて生じにくいことがわかる。SERAが分裂期の感染赤血球内においてMSP1タンパク質の数倍発現し最も多量に蓄積する抗原分子であることから考えると、ヒト免疫系のSERAに対する応答が抑制されている背景には未知のメカニズムが潜んでいる可能性がある。

以上の結果は、マラリア免疫を獲得した人の血清成分の中で抗SE36抗体がマラリア原虫の増殖阻害に最も大きく寄与するものであることを示していると同時に、自然感染では抗体応答がきわめて低いという観察は、SERA抗原のN末端ドメインがマラリア原虫の“アキレス腱”とも言うべき標的抗原であることを強く示唆する。

III. SE36 マラリアワクチン治験製剤

これまで研究を進めてきた組換えSE47タンパク質は疎水性が高く、量産化が困難であったため、筆者らは疎水的に振る舞うセリン残基の繰り返し配列を除去したSE36タンパク質を構築し、(財) 阪大微生物病研究会と協力して、組換えSERAタンパク質を厳正な品質管理のもとに高純度に精製した。このタンパク質に対する免疫応答について試験するため、ヒトと同じ免疫系を持つチンパンジーに対して免疫試験を行った。その結果、きわめて高い抗体価の上昇が確認



図7. SE36 マラリアワクチン治験製剤

(財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所においてGMP (good manufacturing practice) 条件を遵守して生産されたSE36 マラリアワクチン臨床治験製剤である。

され、副作用も顕れなかった。図7は、GMP (good manufacturing practice, 製造管理および品質管理規則) 条件を遵守して生産されたSE36マラリアワクチン臨床治験製剤である。1本のバイアルには、水酸化アルミニウム (1mg) に吸着させたSE36タンパク質 (50 μ g) が、凍結乾燥した状態で封入されている。本製剤の前臨床試験 (GLP条件) を平成15年度に行った。試験項目は①ラット/イス単回投与毒性試験、②ラット反復投与毒性試験、③ウサギ局所刺激性試験、④遺伝毒性 (復帰突然変異, マウスリンフォーマ) 試験、⑤安全性薬理試験 (ラット呼吸器系, ラット腎機能) である。その結果、問題となる所見は認められなかった。

GMP条件下で大量に生産されたSE36治験製剤のワクチン効果を確認するため、リスザルを用いた感染実験を行った (東京大学大学院, 松本芳嗣助教授との共同研究)。宿主特異性が高い熱帯熱マラリア原虫にとってリスザルは数少ない感染動物モデルである。SE36マラリアワクチンを蒸留水で懸濁し、3頭のリスザルに2週間の間隔で2回皮下投与した。残念ながら1頭のサルは抗体価の上昇が低かったため、追加免疫を施した。マラリア原虫感染赤血球を静脈注射によって感染させたところ、図8Aに示したように対照群に比べて、ワクチン群では原虫率 (全赤血球に対する感染赤血球の割合) が低く抑制されていることがわかる。熱帯熱マラリア原虫は48時間周期で同期的に増殖をするが、原虫率が脈を打った変動をするのは、感染赤血球の中でも栄養体と分裂体は血管の上皮細胞に付着し、末梢血に現れるのは輪状体のみであるからである。本実験では大量の感染赤血球を導入したため感染後数日でマラリア原虫が観察されるが、感染後3日目ですべて対照群と高い抗体価が誘導されたワクチン群の2頭で原虫率に違いが認められる。この結果はワクチンによって誘導された抗体が原虫増殖抑制に直接関わっていることを示唆する。もう1つ重要な観察は、SE36ワクチンによって誘導された抗体応答が原虫の感染によ

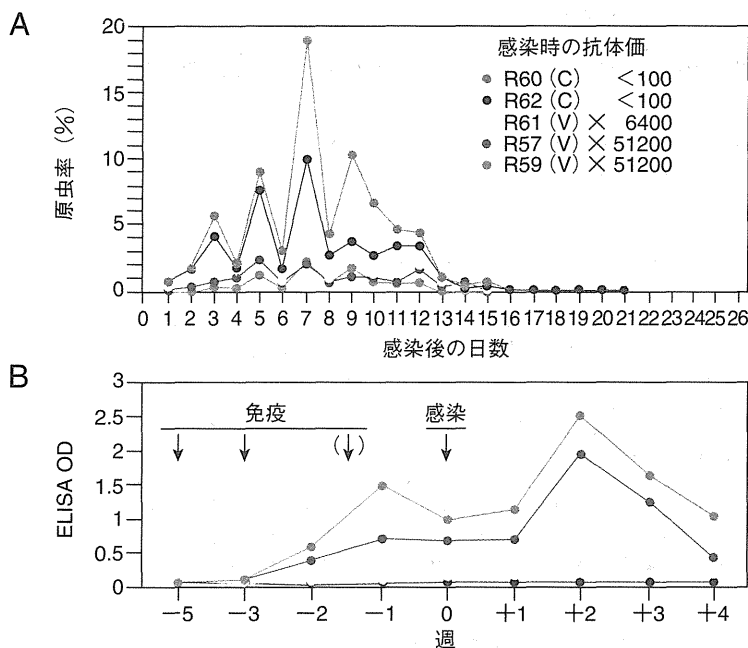


図8. SE36 治験製剤によるリスザルを用いたワクチン試験

A: マラリア原虫感染後の原虫率の推移。マラリア原虫感染赤血球を静脈注射によって感染5頭のリスザルに感染させた。ワクチン群(V)で高い抗体価を示した2頭(R57, R59)では原虫率(全赤血球に対する感染赤血球の割合)が対照群(C)に比べて低く抑制されている。ヒト熱帯熱マラリア原虫の感染に対してリスザルは自然治癒する。

B: 免疫前から感染経過の抗体価の推移。一5週に初回免疫を行い、一3週に追加免疫を施した。R61のリスザルは抗体価の上昇が低かったため、さらに1回の追加免疫を施した。十2週目においてSE36ワクチンによって誘導された抗体応答が原虫の感染によって増強(ブースト)されている。対照群(C)においてはマラリア感染終了後においても抗SE36抗体価の上昇は見られない。

て増強(ブースト)されていることである(図8B)。これは感染したマラリア原虫によって提示されるSERAタンパク質によって増強されたものであり、流行地域においてSE36ワクチンを接種した人では感染を受けることによってワクチン効果が増強されることを示唆するものである。

IV. 臨床試験を目指すSE36マラリアワクチン

これまで世界で開発が進められてきたマラリアワクチン抗原タンパク質とSE36タンパク質との違いは、SERAが数少ないマラリア原虫の“アキレス腱”の1つであり、また、遺伝子操作によって生産したワクチン抗原、SE36タンパク質そのものに対する抗体が流行地において直接発症予防に働いていることである。したがって、SE36タンパク質のワクチン効果は大いに期待される場所であるが、一方、ワクチン効果はワクチン接種対象者のマラリア経験によって大きく影響を受ける可能性がある。マラリア感染を繰り返す高度マラリア流行地域の住民においてすら、抗SE36抗体保有者は50%にも満たないことから、流行地域ではSE36ワクチンがかなりなマラリア発症抑制効果を与えるであろうと

期待できる。一方、日本人のようにマラリア感染経験がない場合に、マラリア発症をどのレベルまで抑止できるかについての確実な予測はできない。例えばSE36ワクチン免疫によって日本人の血中原虫率を1%以内に抑えることができたとしても、発熱などの初期症状をどの程度軽減できるかについては不明である。しかしながら、マラリア感染経験がない人の場合でもSE36ワクチンによって血中原虫率をある程度抑制すれば、マラリア重症化による死亡を予防するものと期待している。

平成16年度に予定している第I相臨床試験を目指して、試作ワクチンの量産体制が(財)阪大微生物病研究会において確立された。第I相臨床試験において安全性と免疫原性が確認されれば、ウガンダ、および東南アジア地域において感作された人を対照とした第I相臨床試験を行い、続いて第II相臨床試験において効果試験を行う予定である。本プロジェクトにはWHO-TDR(世界保健機関熱帯病研究特別プロジェクト)も重大な感心を寄せており、臨床開発を共同で推進する予定である。

文献

- 1) Li J, et al: Mol Biochem Parasitol (2002) 120: 177-186
- 2) Li J, et al: Parasitol Int (2002) 51: 343-352
- 3) Sugiyama T, et al: Vaccine (1996) 14: 1069-1076
- 4) Pang XL, et al: Infect Immun (1999) 67: 1821-1827
- 5) Pang XL, et al: Vaccine (1998) 16: 1299-1305
- 6) 堀井俊宏: 蛋白質核酸酵素 (2001) 46: 2154-2162
- 7) Okech BA, et al: Am J Trop Med Hyg (2001) 65: 912-917
- 8) Aoki S, et al: J Biol Chem (2002) 277: 47533-47540
- 9) Morimatsu K, et al: Mol Biochem Parasitol (1997) 86: 249-254

Diving Ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) LarvaeNOBUKO TUNO,¹ KAORI MIKI,² NOBORU MINAKAWA,³ ANDREW GITHEKO,⁴ GUIYUN YAN,³
AND MASAHIRO TAKAGI¹

J. Med. Entomol. 41(4): 810-812 (2004)

ABSTRACT *Anopheles gambiae* Giles larvae usually live near the surface of shallow and temporary aquatic habitats. How deep the larvae can dive and how long they can submerge may be related to feeding efficiency and predator avoidance. This study examined diving behavior of *An. gambiae* larvae in the laboratory. We recorded diving depths and larval mortality of second and fourth instars in clean water and muddy water by using deep water (32-cm) and shallow water (20-cm) columns. In deep water columns with clean water, we found that 2% of second instars and 6% of fourth instars died from diving, whereas 3% of second instars and 11% of fourth instars died in muddy water. The fourth instars dived deeper in muddy water than in clean water. The mortality rates of the fourth instars subjected to diving stimulations were significantly higher than those in the shallow water columns. Therefore, larval diving behavior may offer the benefits of predator avoidance and food acquisition but also incur energetic costs and increased mortality.

KEY WORDS *Anopheles gambiae*, larval ecology, diving behavior, mosquito

MOST HABITATS OF *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles arabiensis* Patton are small, temporary, sunlit, turbid pools of water, whereas *Anopheles funestus* Giles is often found in permanent water bodies (Gillies and De Meillon 1968, Minakawa et al. 1999, Gimnig et al. 2001). *An. gambiae* larvae generally live near the surface of aquatic habitats, but they dive and remain at the bottom for some time if some mechanical disturbance takes place. While at the bottom, they often adopt a C-shaped posture, resembling dead insect carcasses. They also can move along the bottom, turning over particle after particle (N.T., unpublished data). These observations suggest that the diving ability of anopheline larvae (i.e., depths and duration of diving) may be related to predator avoidance and feeding.

Romoser and Lucas (1999) studied mosquito pupal diving behavior. They showed that diving behavior varied dramatically among mosquito genera: *Culex pipiens* L. and *Anopheles stephensi* Liston make short-duration, shallow dives, whereas *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Aedes triseriatus* (Say) make longer duration dives, typically to a depth at which they become neutrally or negatively buoyant. They suggested that pupal diving behavior helps avoid predation and the mechanical shock of a direct hit by a raindrop and prevents them from being washed away from their container habitats by overflowing water. In

this article, we report a study on the diving ability of *An. gambiae* larvae and the effects of water condition and larval age on larval diving ability.

Materials and Methods

This study was conducted using *An. gambiae* larvae from a laboratory colony maintained in the Vector Biology Control and Research Center, Kenya Medical Research Institute, Kisumu, western Kenya. This strain was derived from wild mosquitoes collected in the vicinity of the Institute. All experiments were conducted in 500-ml graduated cylinders (34 cm height, 5 cm in inner diameter at room temperature [$26 \pm 2^\circ\text{C}$]).

The diving ability of the second and fourth instars was examined under two water conditions to determine the effect of turbidity on larval diving behavior under two different water depths. Two water conditions were dechlorinated tap water (hereafter referred to as "clean water"), and mixture of local black cotton soil with dechlorinated water (hereafter referred to as "muddy water"). The muddy water had ≈ 2 -3-mm thick sediment at the bottom of the muddy water column and the turbidity was 170-400 Formazin turbidity units. In the deep water columns, individual larva was discharged into the 500-ml graduated cylinder with 32-cm-deep water from a plastic cup by using a pipette with 0.5 ml of water. In most cases, the discharging acts provoke a dive. When they did not dive, we discharged another 0.5 ml of water with a pipette at the surface and repeated until they started to dive (three stimulations were sufficient). Caution was taken not to touch the larvae and to maintain

¹ Department of Vector Ecology and Environment, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki, University, Nagasaki 852-8523, Japan.

² Suemasa 34, Tatsuno, Tatsuno City, Hyogo 679-4125, Japan.

³ Department of Biological Science, State University of New York, Buffalo, NY 14260.

⁴ Kenya Medical Research Institute, P.O. Box 1578, Kisumu, Kenya.

Table 1. Mortality of the second and fourth instars of *An. gambiae* s.s. larvae in clean and muddy water column

Water depth (cm)	Age of larvae	Clean water			Muddy water		
		No. larvae tested	No. larvae reached to the bottom	No. larvae died	No. larvae tested	No. larvae reached to the bottom	No. larvae died
32	Second instar	100	10	2	100	9	3
	Fourth instar	100	16	6	100	21	11
20	Second instar	100	7	0	100	20	0
	Fourth instar	100	34	0	100	49	0

similar stimulation intensity for all larvae. The depth each larva reached and whether it returned to the surface were recorded. Those individuals that did not return to the surface immediately also were observed for survivorship within 6 h. In total, we measured the diving depths and mortalities for 100 second and 100 fourth instars in each of the two water conditions (clean and muddy water); thus, a total 400 larvae were used. In the shallow water columns, second and fourth instars were individually placed in the same 500-ml graduated cylinders that were filled with 20-cm-deep clean or muddy water. Their survivorship was examined within 6 h. A total of 400 mosquito larvae were used in the shallow water column group.

Fisher's exact test was used to test the difference in larval mortality between the deep water and shallow water columns and between second and fourth instars under clean and muddy water conditions. The effects of water conditions and larval age on diving depth were analyzed using the two-way analysis of variance (ANOVA) and two-tailed *t*-tests.

Results

We observed both active and passive dives. An active dive involved twisting the body in a zig-zag manner, whereas a passive dive resembled a free-fall, in which the body was held straight and the larva sank to the bottom. Usually, the larvae actively swam downward (active diving) to break the adhesion with water surface and then changed to passive mode; however, passive and active modes were both observed at every depth. Some larvae attempted to ascend to the surface, but they were unable to sustain their activities and began to sink and eventually drowned. In the clean water columns (32-cm depth), among the 100 second instars tested, 10 (10%) reached to the bottom of the water column and two (2%) died (Table 1). The proportion of the second instars that reached the bottom

and mortality rates in the clean water columns were similar to those in the muddy water columns (9% reached the bottom, 3% mortality rate). For the fourth instars, 16% reached to the bottom and 6% died in the clean water columns, similar to those in the muddy water columns (21% reached the bottom and 11% died in the muddy water columns, Table 1; Fisher's exact test, $P = 0.31$). In the shallow water group, higher proportion of mosquito larvae dived to the bottom of the 20-cm water column for both clean water and muddy water, but no mortality was observed (Table 1). Diving stress increased larval mortality in fourth instars in the 32-cm depth water columns, compared with the 20-cm depth water columns (Fisher's exact test: clean water, $P = 0.03$; muddy water, $P < 0.001$).

Table 2 shows the average diving depths after the drowned individuals were excluded from the analyses. ANOVA revealed that water turbidity and larval age significantly affected the diving depth (larval age: $F = 7.990$; $df = 1, 374$; $P < 0.01$ and turbidity: $F = 9.465$; $df = 1, 374$; $P < 0.01$). The fourth instars dived significantly deeper (mean \pm SD, 16.90 ± 7.80) in the muddy water columns than in the clean water columns (12.83 ± 8.25) ($P = 0.001$; Table 2). However, the diving depth of the second instars was similar between muddy and clean water columns ($P = 0.404$). The water turbidity affected the diving depth of second and fourth instars differently. In clean water column, the diving depth of second and fourth instars was similar ($P = 0.530$), whereas in muddy water the fourth instars dived deeper than the second instars ($P < 0.001$).

Discussion

This study has demonstrated that the fourth instars of *An. gambiae* dived significantly deeper in muddy water columns than in clean water columns. The mortality rates of fourth instars in 32-cm depth water columns were significantly higher than those in shal-

Table 2. Diving depth of survivors of second and fourth instars of *An. gambiae* in clean and muddy water column

Age		Water turbidity		Comparison	<i>t</i> -Test		
		Clean	Muddy		<i>t</i>	df	<i>P</i>
Second instar	Mean	12.10	13.03	Second (muddy vs. clean)	-0.837	193	0.404
	SD	7.78	7.77				
	<i>N</i>	98	97	Fourth (muddy vs. clean)	-3.427	181	0.001
Fourth instar	Mean	12.83	16.90	Clean (second vs. fourth)	-0.629	190	0.530
	SD	8.25	7.80				
	<i>N</i>	94	89	Muddy (second vs. fourth)	-3.870	184	0.001

P, Bonferroni adjusted probability; *t*, pooled-variance *t*-test statistics.

lower depth (20-cm) water columns, regardless of water turbidity. The vertical movement of larvae and pupae is affected by buoyancy. The relative buoyancy density of anopheline larvae is >1.0 , but <1 for pupae because pupae contain space for wing and proboscis development and considerable air is trapped inside the pupae (Romoser 1975, Clements 1999). Thus, mosquito larvae can sink passively to the bottom of the water column after detaching themselves from the water surface, whereas pupae consume considerable energy to dive (Lucas and Romoser 2001). In our study, we observed that *An. gambiae* larvae moved actively to detach from the water surface and then often passively sank. Unlike pupa, mosquito larvae do not have specific organs to stock air. As a consequence, a larva diving deeper will consume more energy to swim back to the water surface. Mosquito larvae would drown if they did not have the energy or ability to swim back to the air-water interface.

Gimnig et al. (2001) reported that water bodies inhabited by both of *An. gambiae* and *An. arabiensis* were shallower (mean depth 9.7 cm) than those that did not contain *An. gambiae* complex larvae (mean depth 22.9 cm). Water depth of larval habitats generally correlates with other biotic or abiotic factors such as habitat persistence, temperature, algae content, and predator presence (Minakawa et al. 1999). In this study, we demonstrated that water depth directly affected the mortality rate of *An. gambiae* when larvae were forced to submerge. It is not known whether female anophelines can detect habitat depth and thereby avoid laying eggs in deep habitats, because water depth may be correlated with many variables that directly or indirectly affect female oviposition behavior. Fourth instars dived deeper in muddy water than in clean water, whereas the second instars did not show such a difference. Perhaps *An. gambiae* larvae are adapted to reach to the muddy bottom where they could avoid predation or acquire food. Such adapta-

tion might be more apparent for older larvae but not for younger ones. Therefore, larval diving behavior may not only offer the benefits of predator avoidance and food acquisition but also incur energy expenditure and increasing mortality.

Acknowledgments

We thank S. Juma and T. Otieno for technical assistance. We are grateful to Edward D. Walker and two anonymous reviewers for constructive criticism on the manuscript. This work is supported by National Institutes of Health grant R01 (AI) 50243 and KAKENHI15770012.

References Cited

- Clements, A. N. 1999. The biology of mosquitoes, vol. 2 sensory reception and behaviour. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Gillies, M. T., and B. De Meillon. 1968. The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). Publ. South Afr. Instit. Med. Res. No. 54.
- Gimnig, J. E., M. Ombok, L. Kamau, and W. A. Hawley. 2001. Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in western Kenya. J. Med. Entomol. 38: 282-288.
- Minakawa, N., C. M. Mutero, J. I. Githure, J. C. Beier, and G. Yan. 1999. Spatial distribution and habitat characterization of anopheline mosquito larvae in western Kenya. Am. J. Trop. Hyg. 61: 1010-1016.
- Romoser, W. S. 1975. Buoyancy and ventilation in *Aedes aegypti* (L.) pupae (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 12: 547-550.
- Romoser, W. S., and E. A. Lucas. 1999. Buoyancy and diving behavior in mosquito pupae. J. Am. Mosquito Contr. Assoc. 15: 194-199.
- Lucas, E. A., and Romoser, W. S. 2001. The energetic costs of diving in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* pupae. J. Am. Mosquito Contr. Assoc. 17: 56-60.

Received 12 August 2003; accepted 11 May 2004.