

## Abstract

*Var* genes are multicopy family gene and encode the antigenic protein, *Plasmodium falciparum* infected-erythrocytes membrane protein-1 (PfEMP-1). Here we identified expressed *var* gene transcripts and their cytoadherent characteristics. Random cloning and sequencing analysis of DBL-alpha domain of *var* gene transcripts expressed in matured parasites revealed that approximately half of all cDNA clones were derived from a single gene, *var-1/ItG*. Immunofluorescence assay (IFA) showed that approximately 40% of ItG parasites expressed PfEMP-1 encoded by *var-1/ItG-1* (PfEMP-1/ItG-1). Parasitized RBCs (PRBCs) selected for binding to C32 cells (ItG/C32), where the PfEMP-1/ItG-1-positive PRBC population increased to 78%, showed an increased cytoadhesion to C32 cells (241 PRBCs per 300 C32 cells) compared to originally cultured PRBCs (9 PRBCs per 300 C32 cells). To evaluate the contribution of PfEMP-1/ItG-1 in C32 adherence, PfEMP-1/ItG-1-enriched fraction (ItG/8A) was prepared by limiting dilution. In ItG/8A fraction, 83 % of the PRBCs were PfEMP-1/ItG-1 positive and only *var-1/ItG* was detected in the sequence analysis. PRBCs in ItG/8A fraction also showed higher cytoadhesion to C32 cells (153 PRBCs bound per 300 C32 cells). These results demonstrated that PfEMP-1/ItG-1 is expressed on ItG parasite-infected RBCs and contributes to the cytoadherent phenotype of ItG parasites to C32 cells.

## 1. Introduction

Human malaria is a significant infectious disease caused by four protozoan species of the genus *Plasmodium*. Among them, *Plasmodium falciparum* is responsible for the severe malaria, including cerebral malaria. Sequestration is thought to be central pathological feature in the severe malaria due to adhesion of parasitized-red blood cells (PRBCs) to endothelium of host tissue [12].

Sequestration is mainly mediated by *P. falciparum*-infected erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1) encoded by the large multigene family, *var* [2,25,27]. The cytoadherent characteristics of PfEMP-1 is determined by the expression of *var* genes and by the binding ability to several receptors on the surface of endothelial cells, including CD36 [18], intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) [6], vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) [17], thrombospondin (TSP) [20], P-selectin [4], and CD31 [4]. In placental malaria, chondroitin sulfate A (CSA) plays a major role in the cytoadherence [9]. The binding domain of PfEMP-1 for these host cell surface molecules have been investigated, revealing that Duffy binding-like (DBL)-1 domain was a binding region for heparan sulfate [1], gamma type DBL was for CSA [7], DBL-beta-C2 tandem was for ICAM-1 [26], and cystein-rich interdomain region-1 alpha (CIDR1-alpha) was for CD36 [3], respectively. Although it had been studied on the interaction of PfEMP-1 with their single receptor molecules, the studies on the binding properties of PRBCs in the presence of multiple receptors was a little.

*P. falciparum* ItG parasites, which derived from Brazilian isolate, *P. falciparum* It (Ituxi084), are cytoadherent population selected with its cytoadherence to an amelanotic melanoma line cells, C32 cells [30]. C32 cells had been used as *in vitro* models for sequestration because of the expression of various surface molecules in similar composition to endothelial cells [24]. Therefore, it is expectative that the binding properties of ItG parasites could reflect that of PRBCs in patients in the presence of multiple cellular receptors for PRBCs.

In this study, the expression pattern of *var* gene transcripts in mature ItG parasites selected with high cytoadherent ability to C32 cells were examined. In addition, the cytoadherent characteristics of the major PfEMP-1 of ItG parasites were determined.

## 2. Materials and methods

### *Parasites and cells*

*P. falciparum* ItG parasites were maintained in culture with daily change of medium as described by Trager and Jensen [28] with human group O RBC. ICAM-1-transfected CHO cells (CHO/ICAM-1) was obtained from American Type Cell Collection (Cell No. CRL-2093, Virginia, USA), and CD36-transfected chinese hamster ovary (CHO) cells (CHO/CD36) was kindly gifted from Dr Minami T (Yokohama City University, Japan). These cells and C32 melanoma cells were maintained in RPMI 1640 (Invitrogen, Tokyo, Japan) supplemented with

10 % fetal bovine serum (FBS). Nontransfected CHO-K1 cells were obtained from RIKEN Cell Bank (Cell No. RCB0285, Ibaragi-ken, Japan) and cultured in HamF12 Nutrient Medium (SIGMA, Tokyo, Japan) supplemented with 10 % FBS and 0.02 M L-gultamine.

*RT-PCR, cloning and sequencing analysis of var gene expressed in ItG parasites*

Trophozoite- and schizont- stage parasites collected by magnetic cell sorter (MACS, Milteny Biotec Gmbt, Gladbach, Germany) [13] was ruptured with 0.2 % sodium chloride solution and followed by the standard acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method. Using RNA PCR kit (AMV) ver 1.1 (TaKaRa, Tokyo, Japan), 1  $\mu$ g total RNA was reverse-transcribed and DBL-alpha domain of *var* gene was amplified. Oligonucleotide primers were based on the sequence alignment described by Su X et al. [2]: *prvar-2*; 5'-CCA (A/T)C(G/T) (G/T)A(A/G) (A/G)AA TTG (A/T)GG-3', *prvar-3F*; 5'-CCA T(A/T)(C/T) AGA CGA TTA CAT (C/G)TA TG-3'. Reverse-Transcribing condition was : 10 min at 30°C and 1 hr at 42°C followed by 5 min at 99°C. The cDNA was treated for 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 30 sec at 94°C, 20 sec at 40°C, and 1min at 65°C. Amplified cDNA was ligated to pCR2.1 (Invitrogen) or pBluescript KS (+) plasmid vectors (Stratagene, La Jolla, CA). Randomly selected cDNA clones were sequenced by BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan). FASTA research was performed on DDBJ web site (DNA Data Bank of Japan, National Institute of Genetics, Japan).

*Immunofluorescence assay with antiserum specific for predominant PfEMP-1*

An oligopeptide based on the amino acid sequence specific for predominant *var* transcript was synthesized. Five BALB/c male mice (Nihon CLEA, Tokyo, Japan) were immunized with 20  $\mu$ g of KLH-conjugated peptide (SIGMA GENOSYS, Japan, Tokyo) mixed with Freund's complete adjuvant (DIFCO LABORATORIES, Detroit, MI) and boosted with incomplete adjuvant. Immunofluorescence assay (IFA) was performed with 10  $\mu$ l of PRBC. PRBCs were fixed with 1 % paraformaldehyde (PFA) (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan) for 10 to 15 min at 4°C and incubated with the antiserum at a dilution of 1:100 in PBS(-) for 1 hr at 4°C and washed for three times with PBS wash. PRBCs were incubated with FITC-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG and IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) at a dilution of 1:50 for 1 hr at 4°C and were stained with 0.1  $\mu$ g /ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 to 10 min at 4°C. PRBCs were suspended in 2.3 % 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane (DABCO) in PBS (-) to inhibit from discoloring and were observed with microscopy. Expression rate of the predominant *var* gene was calculated as the proportion of FITC-positive PRBCs in 100 PRBCs with more than two DAPI-positive nuclei.

*Selection of PRBC with C32 cells and cytoadherence assay*

Selection on C32 cells and cytoadhesion assay of ItG parasites were performed following the methods described by Marsh K et al. [10] with a little modification. Five milliliter of trophozoite-rich PRBCs suspension having at least 3% parasitemia at 2.5% hematocrit were co-incubated with  $5 \times 10^5$  C32 cells per 25 cm<sup>2</sup> culture flask at 37°C for 90 min with agitation at 15 min interval. After co-incubation, unbound PRBCs or normal RBCs were removed by washing with culture medium. Bound parasites were maintained by re-infecting to new normal human erythrocytes at 5% hematocrit. This procedure was repeated eight times. To measure the binding ability to C32 cells and CD36, 500  $\mu$ l of parasites suspension were also added to  $2 \times 10^4$  C32 or CD36/CHO cells seeded onto coverslips. The coverslips were washed by PBS, fixed with methanol, and stained with Giemsa's solution. The cytoadherence was evaluated by the number of bound PRBC per 300 target cells.

#### *Limiting dilution for isolation of PRBC*

To fractionate PRBC population presenting the predominant *var* gene, ItG parasites were limiting-diluted. Ring stage PRBCs were negatively separated from crude culture with MACS and diluted at the rate of 0.3 PRBC per well and cultured in a 96-well plate. Wells were stained with Giemsa's solution to detect PRBCs. From the PRBC-positive well, PRBCs were transferred into 6-well plate and cultured. Each parasite-positive wells were examined for the expression of a dominant PfEMP-1 by IFA.

### **3. Results**

#### *Var gene transcripts in P. falciparum ItG parasites*

A total of 23 cDNA clones were randomly selected, sequenced, and aligned. They were classified into one major group and four minor groups (Table 1). The major group was designated as *var-1/ItG*, in which 13 clones were included. The other four groups, *var-2/ItG* to *var-5/ItG*, included a few cDNA clones. The nucleotide sequences of these clones within each group were almost same except for several mutations. Since the positions of mutations within the groups were random, they were considered as PCR errors. Amino acid sequences of representative clones within each group were aligned in Fig. 1. FASTA research on the DBL-alpha domain of *var-1/ItG* to *var-5/ItG* showed that *var-1/ItG* and *var-3/ItG* were identical to that of A4tresVAR (accession no. AF193424) and ItG *var* (accession no. U31083), respectively.

#### *Expression of PfEMP-1 encoded by the major var gene*

In order to determine the ratio of the PRBC positive for the major PfEMP-1 encoded by *var-1/ItG* (PfEMP-1/ItG-1), antiserum against PfEMP-1/ItG-1 were generated. Five BALB/c mice were immunized with KLH-conjugated synthetic peptide based on the amino acid sequence

specific for DBL-alpha domain of PfEMP-1/ItG-1 (Fig.1). *P. falciparum* ItG parasites was examined by IFA using the antiserum. The signal was detected at the PRBCs surface and more intensively in the parasitophorous vacuole membrane in  $53.5 \pm 1.1$  % of *P. falciparum* ItG parasites before any selection (data not shown).

#### *The cytoadherent phenotype and expression of var-1/ItG*

PfEMP-1/ItG-1 expression was examined in the *P. falciparum* ItG parasites selected by panning PRBCs on C32 cells eight times (ItG/C32). While 9 bound PRBCs per 300 C32 cells were observed in *P. falciparum* ItG parasites before panning, 241 bound PRBCs per 300 C32 cells were counted in ItG/C32 parasites (Fig.2). IFA showed that 88 % of ItG/C32 parasites were positive for PfEMP-1/ItG-1, which was 1.6 times higher than that of ItG parasites before selection (53.5 %).

In order to isolate PRBC presenting PfEMP-1/ItG-1, *P. falciparum* ItG parasites were limiting-diluted, fractionated PfEMP-1/ItG-1-positive or negative PRBCs populations and tested to the cytoadhesion assay. In the 24 examined wells, 6 wells were parasite-positive, and IFA was examined 12 of them, resulting that PRBCs in 1 of 12 wells, subline ItG/8A, was PfEMP-1/ItG-1-positive and 4 of them wells were negative parasites. Both parasites were examined the binding ability to C32 cells. In PfEMP-1/ItG-1-positive fraction (ItG/8A), which included 83 % of PfEMP-1/ItG-1-positive PRBCs, 153 PRBCs attached per 300 C32 cells (Fig.3) and 68 PRBCs per 300 CD36/CHO (Fig.4), respectively. On the other hand, one of PfEMP-1/ItG-1-negative fraction (ItG/7B), of which 3.5 % of PRBCs were PfEMP-1/ItG-1-positive, 6 PRBCs attached per 300 C32 cells and 13 PRBCs bound per CD36/CHO.

To ensure PfEMP-1/ItG-1 expression of ItG/8A parasites, the *var* gene usage of ItG/8A was analyzed by RT-PCR-cloning of DBL-alpha domain. All of total 24 cDNA clones were identical to that of *var-1/ItG*, except for a few PCR errors.

#### 4. Discussion

Cytoadherence of mature PRBCs to vascular endothelium of several organs, which is called as sequestration, plays a major role in the pathology of severe malaria. It is important to understand how the PRBCs interact with their host receptors. We studied here the expression pattern of PfEMP-1 encoding *var* genes in ItG parasites and demonstrated that the predominant PfEMP-1, PfEMP-1/ItG-, was functionally selected and contributed to C32 cytoadherence of ItG parasites.

*Var* is a multicopy gene of approximately 50 to 100 copies per haploid. While many different *var* genes are transcribed at the ring stage, one or two of them will be transcribed at mature stage, which defines the cytoadherent phenotype [8,23]. In this study, *var* transcripts corresponding to 5 *var* genes were isolated from ItG parasites at the mature stage. That may result from many reasons, such as ring-stage parasite contamination [23], co-existence of PRBC

expressing another cytoadherent PfEMP-1, and co-expression of PfEMP-1/ItG-1 and other PfEMP-1 [15]. However, no contamination in the *var* transcript profile of ItG/8A (table 1) and others (data not shown), isolated from matured PRBC with the same procedures, denies the first possibility. ItG parasites should have many C32 adherent *var* genes other than Var-1/ItG, and some ItG parasite may express those genes by chance. Alternatively, as shown in recently study by R. Noviyanti et al. [15], multiple *var* gene transcripts may be expressed in a single matured PRBC selected to C32 cells. However, these *var* genes should be expressed after C32 selection. Single var-1/ItG expression in ItG/C32 (data not shown) and ItG/8A, which was positively selected for PfEMP-1/ItG-1 expression by limiting dilution (Table 1), also denies the second and third possibilities, respectively. A *var* gene is registered in NCBI data base (accession no. U31083) which has the same DBL-alpha sequence as our var-3/ItG clone (Fig. 1). It is possible that the registered *var* gene is identical to var-3/ItG and is one of cytoadherent var genes. However, at least in our system, var-3/ItG expression was not positively selected by C32 cytoadherence (Tab. 1). It was reported that expression of *var* genes was switched at the rate of 2.4% per generation [20, 21]. We considered that multiple *var* gene detection in ItG parasites may be due to the co-existence of PRBCs with the randomly switched *var* gene expression. These results indicated that var-1/ItG was functionally cytoadherent transcripts in our ItG parasites.

Since most laboratory *P. falciparum* strains and field isolates bound to CD36 [14, 16, 21], we also examined the binding ability of PfEMP-1/ItG-1-positive and PfEMP-1/ItG-1-negative population to CD36. In our cytoadhesion assay, the binding ability of ItG/8A to CD36 alone increased 2.6 times as much as that of ItG parasites (Fig.5). However, the binding ability of ItG/8A to C32 cells increased 16.6 times as compared with that of ItG parasites (Fig.4).

FASTA research indicated that the nucleotide sequence of DBL-alpha domain of var-1/ItG was identical to that of A4tresVAR. A4tres was derived from A4 clone, which was isolated from IT 4/25/5 by selection on ICAM-1 [25] and bind to both CD36 and ICAM-1. ICAM-1 on C32 cells may also affects PfEMP-1/ItG-1 selection as well as CD36 molecule. In this study, only DBL-alpha domain region was isolated. Full length cDNA, especially, DBL-beta-C2 tandem region, which was responsive for ICAM-1 binding, should be cloned. It was reported that co-expression of ICAM-1 with CD36 on the surface of host cells contributed to increase the cytoadherent ability of PRBCs [11]. PfEMP-1/ItG-1 may also need co-expression of ICAM-1 and CD36 on host cells in order to increase the binding ability to C32 cells.

The current study showed that a dominant *var* gene expressed in *P. falciparum* ItG parasites appeared to adhere to C32 cells, and suggested that it might not be dependent on only CD36 but also other receptors. ICAM-1 is one candidate because it was expressed on the surface of C32 cells [24]. ICAM-1 plays an important role in sequestration of PRBC in brain capillary vascular [14, 28] and in placenta [5, 22], therefore, the binding ability of PfEMP-1/ItG-1 to ICAM-1 should be examined.

## Acknowledgment

This work was partly supported by the grants from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan () and by the Program for Promotion of Basic Research Activities for Innovative Bioscience (PROBRAIN).

## References

1. Barragan A, Fernandez V, Chen Q, Euler AV, Wahlgren M, Spillmann D, 2000, The Duffy-binding-like domain 1 of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. *Blood* 95, 3594-3599
2. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ, 1995, Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP-1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82,77-87.
3. Baruch DI, Ma XC, Siggh HB, Bi X, Pasloske B, Howard RJ, 1997, Identification of a region of PfEMP-1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: Conserved function with variant sequence. *Blood* 90, 3766-375.
4. Baruch DJ, Rogerson SJ, Cooke BM, 2002, Asexual blood stage of malaria antigens: cytoadherence. *Chem. Immunolo. Basel, Karger.* 80, 144-162.
5. Beeson JG, Brown GV, Molyneux ME, Mhango C, Dzinjalama F, Rogerson SJ, 1999, *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J Infect Dis* 180, 464-472
6. Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K, 1989, Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341, 57-59.
7. Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R, Pouvelle B, Oishi S, Fujii N, Fusai T, Parzy D, Miller LH, Gysin J, Scherf A, 1999, *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: A receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12743-12748.
8. Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Datta S, Hagblom P, Wahlgren M, 1998, Development selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 394, 392-395
9. Fried M, Duffy PE, 1996, Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 272, 1502-1504
10. Marsh K, Marsh VM, Brown J, Whittle HC, Greenwood BM, 1988, *Plasmodium falciparum*: the behaviour of clinical isolates in an *in vitro* model of infected red blood cell sequestration. *Exp Parasitol* 65, 202-208
11. McCormick CJ, Craig A, Roberts D, Newbold CI, Berendt A, 1997, Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. *J Clin Invest* 100, 2521-2529
12. Miller LH, 1969, Distribution of mature trophozoites and schizonts of *Plasmodium*

- falciparum* in the organs of *Aotus trivigatus* the night monkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 860-865
13. Nalbandian RM, Sammons DW, Manley M, Xie L, Sterling CR, Egen NB, Gingras BA, 1995, A molecular-based magnet test for malaria. *Am J Clin Pathol* 103, 57-64
  14. Newbold C, Warn P, Berendt A, Craig A, Snow B, Msobo M, Peshu N, Marsh K, 1997, Receptor-specific adhesion and clinical disease I *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 57, 389-398
  15. Noviyanti R, Brown GV, Wickham ME, Duffy MF, Cowman AF, Reeder JC, 2001, Multiple *var* gene transcripts are expressed in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for adhesion. *Mol Biochem Parasitol* 114, 227-237.
  16. Ockenhouse CF, Ho M, Tandon NN, Van Seventer GA, and Shaw S, White NJ, Amieson GA, Chulay JD and Webster HK, 1991, Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: Differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *J. Infe. Dis.* 164, 163-169
  17. Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR, 1992, Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: Roles for Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 176, 1183-1189.
  18. Oquendo P, Hunddt E, Lawler J, Seed B, 1989, CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58, 95-101.
  19. Robert DD, Sherwood JA, Spitalnik SL, Panton LJ, Howard RJ, Dixit VM, Frazier WA, Miller LH, 1985, Thrombospondin binds *falciparum* malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* 318, 64-66.
  20. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K, Newbold CI, 1992, Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 357, 689-692
  21. Rogerson SJ, Tembenu R, Dobano C, Plitt S, Taylor TE, 1999, Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 467-472
  22. Sartelet H, Garraud O, Rogier C, Milko-sartelet I, Kaboret Y, Michel G, Roussillon C, Huerre M, Gaillard D, 2000, Hyperexpression of ICAM-1 and CD36 in placentas infected with *Plasmodium falciparum*: a possible role of these molecules in sequestration of infected red blood cells in placentas. *Histopathology* 36, 62-68
  23. Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, Gysin J, Lanzer M, 1998, Antigenic variation in malaria: *in situ* switching, relaxed and mutually exclusive transcription of *var* genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 17, 5418-5426.
  24. Smith H, Nelson J, Gahmberg CG, Crandall I, Sherman I, 1992, *Plasmodium falciparum*: Cytoadherence of malaria-infected erythrocytes to human brain capillary and umbilical vein endothelial cells-A comparative study of adhesive ligands. *Exp Parasitol* 75, 269-280.
  25. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R,



- Newbold CI, Miller LH, 1995, Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var gene correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82, 101-110.
26. Smith JD, Craig AG, Kriek N, Hudson-Taylor D, Kyes S, Fagen T, Pinches R, Baruch DI, Newbold CI, Miller LH, 2000, Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: A parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 1766-1771.
27. Su X, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TS, 1995, The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigen variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82, 89-100.
28. Trager W, Jensen JB, 1976, human malaria parasites in continuous culture. *Science* 103, 673-675
29. Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B, 1994, An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 145, 1057-69
30. Udeinya IJ, Graves PM, Carter R, Aikawa M, Miller LH, 1983, *Plasmodium falciparum*: Effect of time in continuous culture on binding to human endothelial cells and amelanotic melanoma cells. *Exp Parasitol* 56, 207-214.

### Figure legends

Fig.1 Alignment of amino acid sequences of var cDNA clones derived from ItG strain

The positions and sequences of the primers used for RT-PCR analysis are indicated in lowercase letters. Box shows amino acid sequence specific for var-1/ItG. Dashed lines represent gaps.

Fig.2 Selection of *P. falciparum* ItG parasites to C32 cells

*P. falciparum* ItG parasites were selected for cytoadherence to C32 cells and the expression of the PfEMP-1 encoded by a predominant var gene (PfEMP-1/ItG-1) was detected by IFA using anti-PfEMP-1/ItG antiserum and pre-serum as described in Materials and Methods. The cytoadherent ability of PRBCs after selection is shown as the number of PRBCs per 300 C32 cells. Lower panel shows the percentage of PfEMP-1/ItG-1-positive PRBCs in ItG or ItG/C32.  $-P < 0.05$  compared to ItG parasites before selection.

Fig.3 PfEMP-1/ItG-1 expression and the C32 cells cytoadherence

To enrich PfEMP-1/ItG-1 expressing PRBCs, ItG parasites were fractionated by limiting dilution. IFA was performed and PfEMP-1/ItG-1-positive and -negative PRBC populations, ItG/8A and ItG/7B, respectively were picked up. The percentage of PfEMP-1/ItG-1-positive

PRBCs in each population is shown under the graph. The cytoadherent ability of each population to C32 cells, which was described as the number of bound PRBCs per 300 C32 cells, was tested.  $-P < 0.05$  compared to ItG.

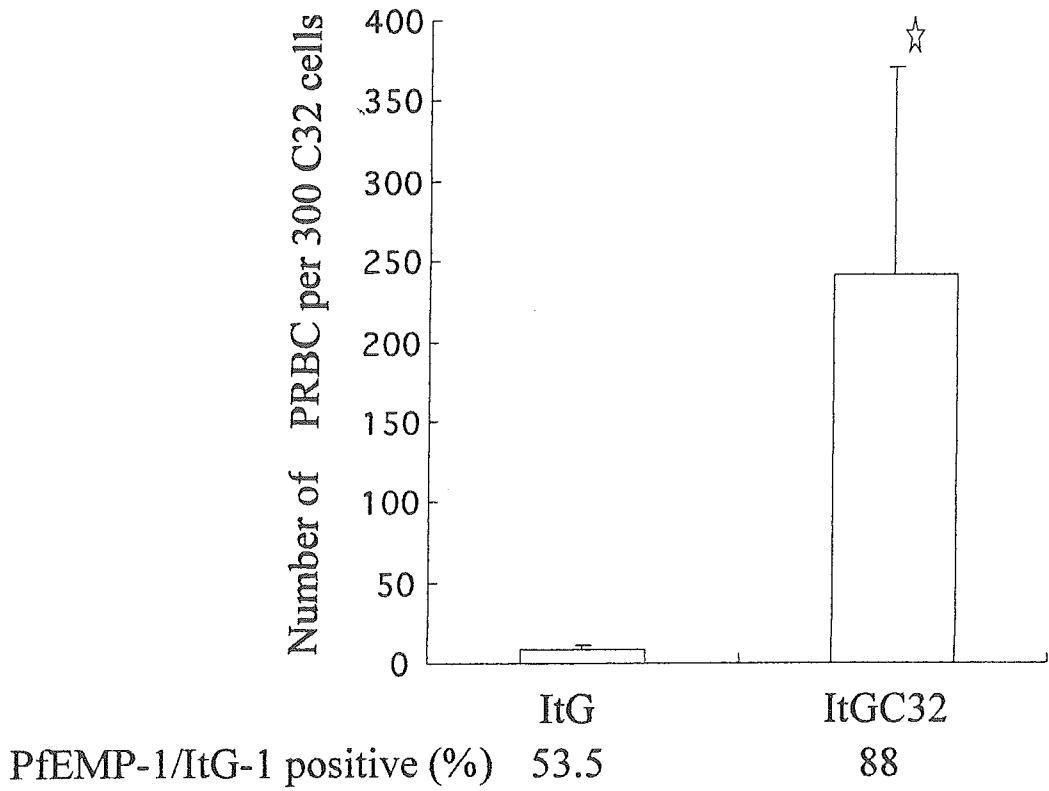
Fig.4 Binding ability of PfEMP-1/ItG-1 to CD36

The binding ability of ItG/8A and ItG/7B to human CD36, which was described as the number of bound PRBCs per 300 CD36/CHO, was tested.  $-P < 0.05$  compared to ItG.

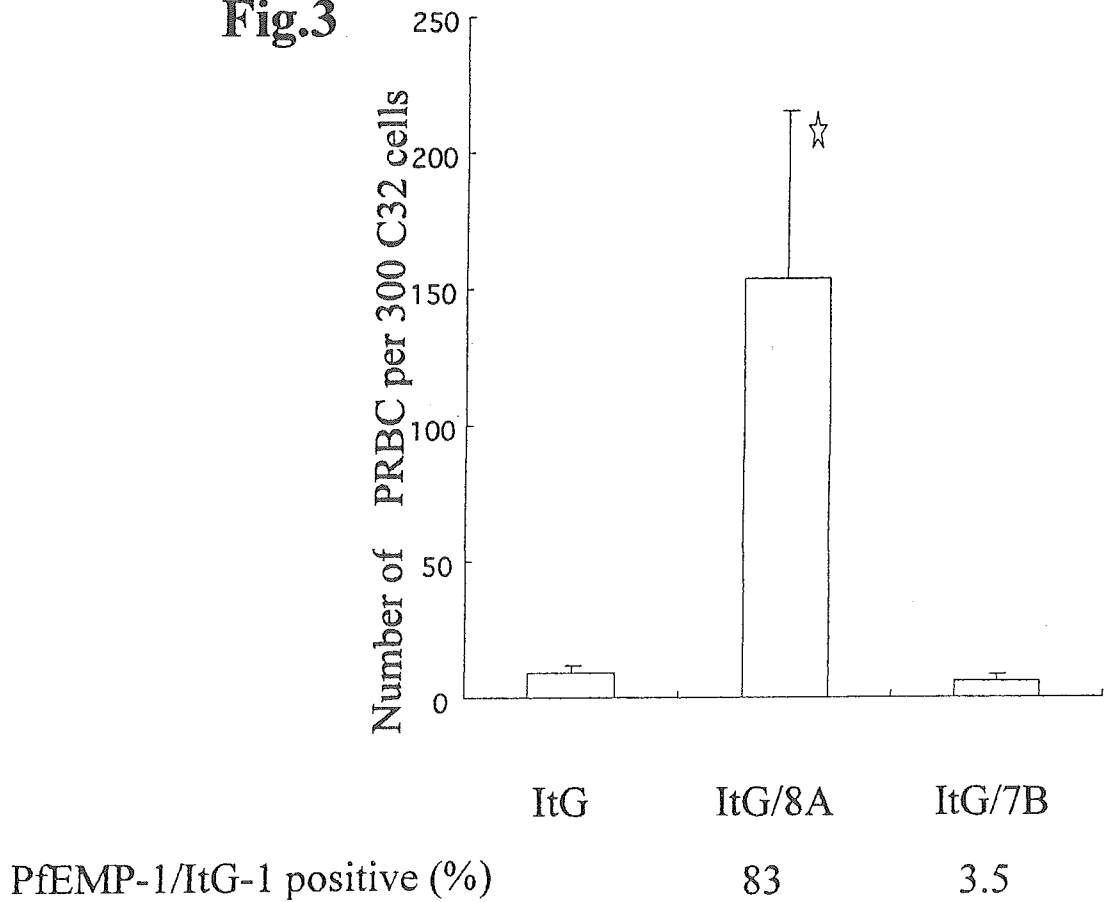
**Fig.1**

	10	20	30	40	50
<i>var-1/ItG</i>	pyrrlhvCDRNLEQIDPA-KITTT--HNLLVDVLLAAKHEGESIIDNYPS				
<i>var-2/ItG</i>	pyrrlhvCDRNLEEIYP-DKITNT--NLLVDVLLAAKYEGESIRNEYDQ				
<i>var-3/ItG</i>	pyrrlhvCSHNLESIQTNNYDSSKAKHNLLAEVCYAAKFEGESIVKNYEQ				
<i>var-4/ItG</i>	pyrrlhvCDQHLSHMNAGKTNTTD---NLLLEVCLAAKYEGESLVEKHKE				
<i>var-5/ItG</i>	pyrrlhvCVRNLENISALDKINKDT---LLADVCLAALHEGQSITQDYPK				
	60	70	80	90	100
<i>var-1/ItG</i>	DHHNKE-----GICTALARSFADIGDIIRGKDLYRGNKQEKD---KLQD				
<i>var-2/ItG</i>	KKDDYKL-----GLCTALARSFADIGDIIRGKDLYRRDSRTD----KLEE				
<i>var-3/ItG</i>	LGHHTTE-----GICTALARSFADIGDIIRGKDLYLGNPQESARRKQLED				
<i>var-4/ItG</i>	FKKTHNSN----ICTILARSFADIGDIIRGKDLYRGGGRGRK---QLEE				
<i>var-5/ItG</i>	YQAQYASSVSPSQICTMLARSFADIGDIIRGKDLYRGNGKD----KLEE				
	110	120	130	140	150
<i>var-1/ItG</i>	QLKKYFKELHNNLES-----EAKNYND <sup>130</sup> DDTK-KFFK <sup>140</sup> LREDWWNANRLD				
<i>var-2/ItG</i>	NLKVIFGNIYKELTATSGKN-VALRDRYQK <sup>130</sup> DGP-DYYQLREDWWEVNRQQ				
<i>var-3/ItG</i>	NLRKIFEKIYKELTSSRNGKTNGAEERYKDGSG-NYYKLREDWWNANRLD				
<i>var-4/ItG</i>	NLQKIFGNIYNELT-TSGKNVDKAKERYKGDADNNYFQLREDWWDANRHT				
<i>var-5/ItG</i>	NLKRIFFQIHKEVTSTSGKNKDALKTRYQNDTD-NYFQLREDWWNANRKM				
	160	170	180	190	200
<i>var-1/ItG</i>	IWKAIICTAPGTAQYFRNACGGEHTMTYGCRCVNG-EPPTNFDYI <sup>160</sup> pqfl <sup>170</sup> rw				
<i>var-2/ItG</i>	VWNAITCKAEQNDKYFREKNSNGNTCTVNKCKCATG-DVLTNFDYV <sup>160</sup> pqfl <sup>170</sup> rw				
<i>var-3/ItG</i>	IWKAMICKAPGNAQYFRNTCSNGEKPTGEKCQCIDG-TVPTNLDYV <sup>160</sup> pqfl <sup>170</sup> rw				
<i>var-4/ItG</i>	VWEAITCKAEQNNKYFRDACSTG-TPTHEKRCRCVNRADVPTYFDYV <sup>160</sup> pqfl <sup>170</sup> rw				
<i>var-5/ItG</i>	VWYAITCGAGQIGKYFRNACSNNTTETDKKCRCAIG-TVPTYFDYV <sup>160</sup> pqfl <sup>170</sup> rw				

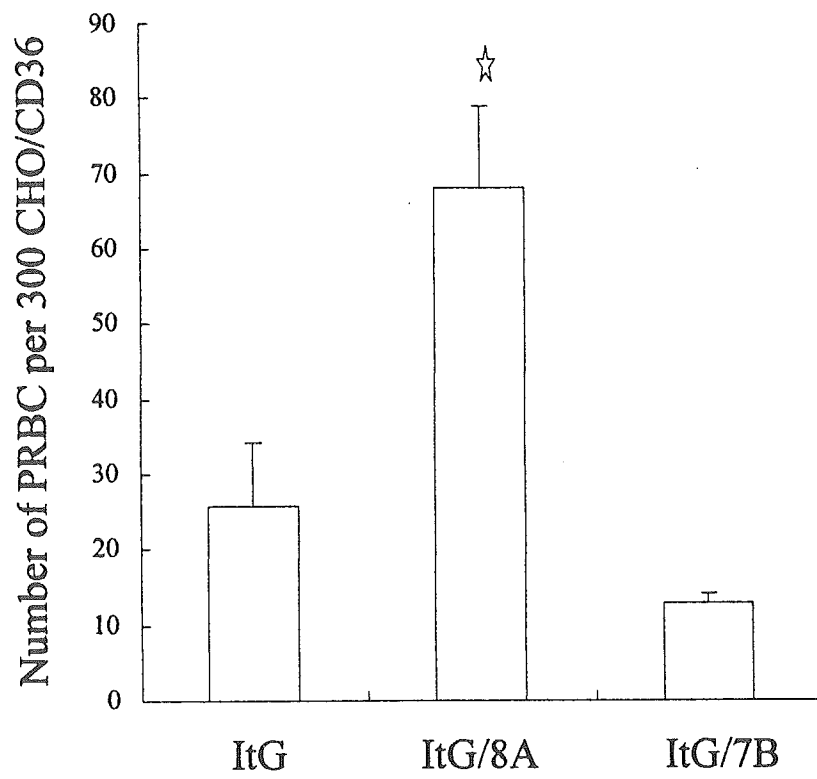
**Fig.2**



**Fig.3**



**Fig. 4**



**Table 1** *var* cDNA clones expressed in *P. falciparum* ItG,

Gene	number of cDNA clone		
	ItG (23) <sup>†</sup>	ItG/8A (23) <sup>†</sup>	ItG/7B (26) <sup>†</sup>
<i>var-1</i> /ItG	13	24	1
<i>var-2</i> /ItG	4	0	2
<i>var-3</i> /ItG	3	0	1
<i>var-4</i> /ItG	2	0	0
<i>var-5</i> /ItG	1	0	1
<i>var-8</i> /ItG	0	0	21

<sup>†</sup>value of total number of sequenced cDNA was shown in bracket.

## 沙漠緑地化に伴う新たな感染症の流行

松本芳嗣\*・三條場千寿\*

### New Epidemics of Parasitic Diseases Attendant on Irrigation Projects

MATSUMOTO Yoshitsugu\* and SANJOBA Chizu\*

#### 1. はじめに

沙漠，半沙漠が地球の地表面の広大な部分を占め，その拡大が人類への大きな脅威となっている。これら不毛の土地を人為的に緑化し，食物生産を可能にする試みが世界的規模で行われている。ところが人類に恩恵をもたらすべき水，緑は同時に病原微生物およびその媒介者を含む多くの他の生物の生存にも有利となり，望まれざる新たな感染症の流行を来すことになる。トルコの南東アナトリア地方，中国新疆ウイグル自治区，および中央アジア諸国では，国際的援助により，大規模な灌漑事業が行われている。我が国からも政府，民間の様々なレベルで資金，技術援助が行われている。ところが沙漠の緑化が進むに従い，昆虫媒介性感染症であるマラリアおよびリーシュマニア症，水系感染症であるアメーバ症，腸管内寄生虫症の急激な増加が多くの開発地域において問題となり，早急な対策が迫られている（表1）。我々はこ

れまでアジア各地で沙漠緑化に伴うマラリアおよびリーシュマニア症など寄生虫病の再興および新たな流行に関する現地調査を行ってきた（Matsumoto, 1999）。そこで本論では，これら寄生虫病の新たな流行という緑化計画の負の側面に焦点を当て，主としてトルコ南東アナトリア地方における現状と問題点を概説し，沙漠の緑化計画に携わる多くの方々に一考を促したい。

#### 2. トルコ南東アナトリア地方開発計画に伴う新たな寄生虫感染症の流行

##### 1) トルコ南東アナトリア地方開発計画

トルコ政府が世界銀行等の国際的援助を得て1981年より進めている「トルコ南東アナトリア地方開発計画」（Southeastern Anatolia Project; GAP）はシリアおよびイラクと国境を接する南東アナトリア地域における大規模な灌漑事業である（図1）。この地域，すなわちチグリス，ユーフラテス両河の上流域は有史前，上メソポタ

表1. 沙漠緑化計画に伴い特に問題となっている主要な寄生虫感染症。

疾患名		病原体	無脊椎動物宿主 (Vectorあるいは中間宿主)
Falciparum malaria	熱帯熱マラリア	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Anopheles</i> spp.
Vivax malaria	三日熱マラリア	<i>P. vivax</i>	(ハマダラカ)
Visceral leishmaniasis (Kala azar)	内臓型リーシュマニア症	<i>Leishmania donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus</i> spp., Sand fly (サンショウバエ)
Cutaneous leishmaniasis	皮膚型リーシュマニア症	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	
Bilharziasis	ビルハルツ住血吸虫症	<i>Schistosoma haematobium</i>	淡水貝
Schistosomiasis mansoni	マンソン住血吸虫症	<i>S. mansoni</i>	
Onchocerciasis (River blindness)	オンコセルカ症	<i>Onchocerca volvulus</i>	Blackflies (ブユ)

\* 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻

\* Graduate School of Agricultural and Life Science, University of Tokyo. 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

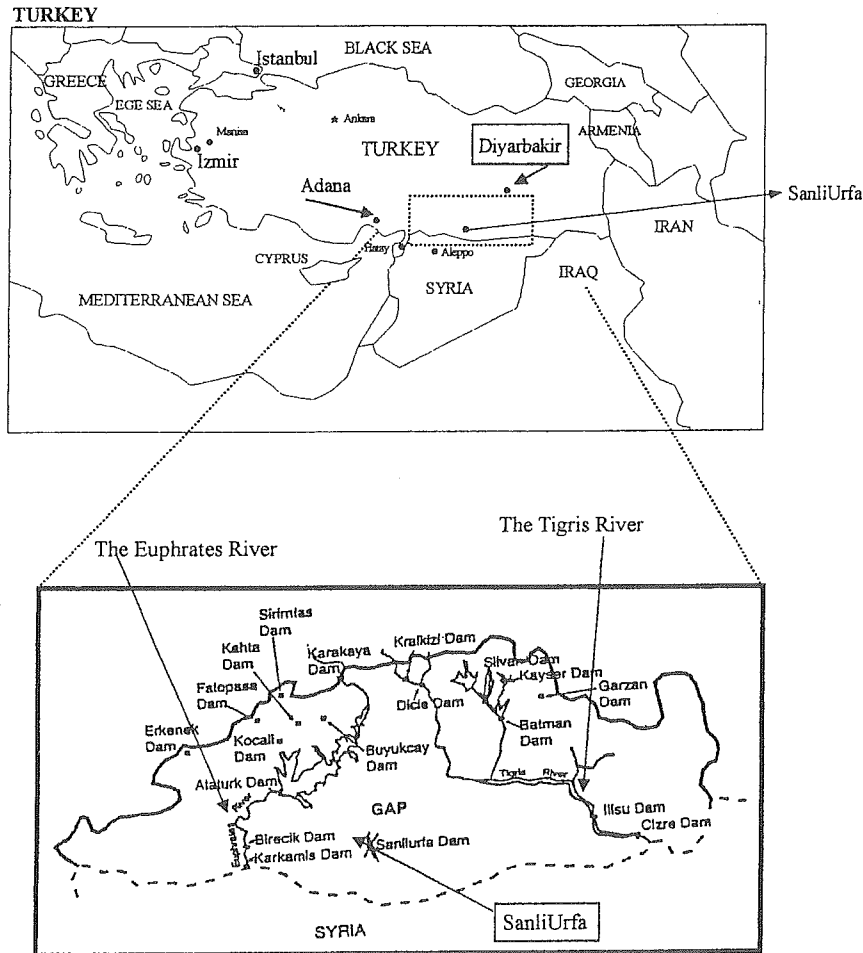


図1. 南東アナトリア地方開発計画 (GAP). トルコの Adiyaman, Batman, Diyarbakir, Gaziantep, Killis, Mardin, Siirt, Urfa および Sirtak 県にまたがる南東アナトリア地域, すなわちチグリス, ユーフラテス両河上流域に22のダムと19の水力発電所を建設する大規模な総合開発計画.

ミア文明が栄えた地域であり, 当時は緑豊かな土地であったことが考古学的検証により明らかにされている. ところが GAP 開始時のこの地域は乾燥が進み, 農業には適さない土地となっていた. GAPは22のダムと19の水力発電所をチグリス, ユーフラテス両河の上流域に建設することにより, 灌漑による農業開発を行うだけでなく, 豊富な電力と水を用いてこの地域の工業化, 経済発展を目指す大規模な総合開発計画である (図2). 最近発表された予測によると, 2010年のプロジェクト完了時にはチグリス・ユーフラテス流域の約75,000平方キロメートルが灌漑されるとの見通しが示されている (Olcay Unver, 1998). この大規模な灌漑計画の進行にともない, 動植物の生態系の変化および降雨量の増加など環境の大きな変化が灌漑地のみならず広く南東アナトリア地方で顕著となりつつある. また, 著しい経済発展が見込まれ, 本プロジェクト完成時には350万人の新たな

雇用と900~1,000万人に達する人口の増加が見込まれている. このように緑化は成功裏に進んでいる一方, この地域におけるマラリア, リーシュマニア症, および様々な寄生虫疾患の著しい増加が注目されるようになってきた.

## 2) 寄生虫感染症の現状

### (1) マラリア

病原体であるマラリア原虫 (図3) はハマダラ蚊の吸血によってヒトに感染する (表1). 近年, 抗マラリア剤耐性原虫や殺虫剤抵抗性媒介蚊の出現のため, これまである程度コントロールに成功していた地域においても患者数が増加する. 所謂マラリアの再興 (reemerging) が世界的に問題となっている. マラリアの感染者は, 亜熱帯や熱帯地域, 特にアフリカ, 南アメリカ, 東南アジア等を中心として年間約3~5億人, 死亡者は年間150



～300万人であると推定されている (World Health Organization, 1995)。ヒトマラリアは熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、四日熱マラリア、および卵型マラリアの4種であるが、この中で、熱帯熱マラリアは熱帯に分布し、脳性マラリアなど重篤な合併症を起こしやすく死亡率も高い。一方三日熱マラリアは致死性が低いため、熱帯熱マラリアとの比較上良性マラリアとも呼ばれる。しかし三日熱マラリアでも48時間周期の高熱(間歇熱)および低ヘモグロビン血症を来すことに変わりはなく、更に、根治療法を行わない限り再発することが多い。このため浸淫地域においては、発熱、貧血、倦怠感などによる就業時間の減少を来し、地域経済に及ぼす影響も大きい。三日熱マラリアは分布域も広く、温帯さらに一部寒帯に属する地域にも発生が見られる。1950年代初頭までその発生が見られた日本の土着マラリア(オコリ、あるいはワラワヤミ)もほとんどが三日熱マラリアであった。

古文書および伝承によるとトルコの地中海沿岸地域はマラリアの流行による多くの都市の衰退があったとされ、紀元前から三日熱マラリアの浸淫地域であったと考えられている。トルコの地中海沿岸東端すなわちアナトリア半島の付け根に位置するチュクロバ地方は、古来より豊かな農業地域であった。21世紀になると政府の記録としてトルコのマラリア症例がチュクロバ地方に集中していたことが分かる。1950年代国家的規模のマラリア撲滅計画(Malaria eradication programme)が施行され、DDTを中心とする殺虫剤散布の効果で媒介蚊の減少を来し、マラリア患者数は大きく減少した。ところが1960年代になり、マラリア・コントロール計画が縮小されたのに伴い、再び患者数は増加を始めた。チュクロバ地方では1977年に年間102,000例が報告されている。しかし、マラリア患者の多くが隣接する南東部及び東部アナトリア地方より、綿花の収穫などのため移動して来る季節農業労働者であった。当時南東アナトリア地方は乾燥化が進み媒介蚊の繁殖に適さず、この地でマラリア原虫が流行することは無かった。トルコ政府は再びチュクロバ地方におけるマラリア・コントロールに力を入れ、この地方におけるマラリア患者は減少に転じた。ところが1981年開始されたGAPの進行に伴い、今度はチュクロバ地方で働く季節労働者の本来の居住地であるGAP地域において、季節労働者以外のこの地に居住する人々におけるマラリアの流行が問題となってきた。1998年に保健省に報告されている36,842例のマラリアのうち90%がGAP地方からのものである。GAP地方のウルファ県で6,787例、ディヤバクル県で12,181例、バット

マン県で10,413例が報告されている。南東アナトリア地方におけるマラリアの新たな流行(emerging)はGAPにより、この地方のダム建設、灌漑が進むに伴い顕著となった現象である。すなわち、近接地域における降水量の増加など、気候も変化し、媒介蚊(トルコにおいては*Anopheles sacharovi* および*A. superpictus*)の繁殖が容易となり、感染者の帰郷によりこの地で新たな感染環が確立されたためと考えられる。局地的にはウルファ県の特に高度浸淫地域であるシベレック郡で見られる如く、人口70,000人に対し、1996年1,792人、1997年1,802人、1998年4,629人の患者を記録するなど著しい増加を示している地域もある。シベレック郡はGAP以前、降水量が少なく、固い岩盤の露出する植生の乏しい荒漠地であったという。ところがGAPの進行に伴い降水量が増え、現在では水溜り、小川が見られるようになり、実際我々はこの地域で*Anopheles*の幼虫(ボウフラ)を確認している(図4)。多くの場合、感染症の爆発的な流行はそれまでその感染症がなかった地域において起こる。多少とも病原体の伝播が常時起きている地域(浸淫地域)では一定の割合でそれまで感染を受けたことにより免疫を獲得している。すなわちその感染症に対し抵抗性を示す住民が存在する。このため爆発的な流行には至らない。ところが、新たに病原体の侵入を受けた地域では、住民のほとんどがその病原体に対する免疫を持たないため病原体の伝播は容易となり、爆発的な流行を来すことになる。

シベレック郡の住民の約半数はクルド系住民である。ここにもう一つの問題がある。クルド系住民の居住する地域はGAPによる灌漑地の北に位置し、降雨量は増加したものの土壌は薄く岩盤が露出し多くは依然農業には適さない土地のままである。クルド系住民は羊の飼育等を主とする零細な畜産業を営んでいる者が多く、依然季節労働者として西部のアダナ県に出稼ぎに行く者が多い。すなわちGAP計画の直接の恩恵に浴することがない一方、気候変動およびマラリアの急激な増加等の間接的な影響に曝されていると言える。

## (2) リーシュマニア症

リーシュマニア症はマラリア原虫と同様単細胞の真核微生物であるリーシュマニア原虫(*Leishmania* spp.)を病原体とし(図5)、吸血性のサシチョウバエ(旧大陸では*Phlebotomus* spp.)により媒介される重要な人獣共通感染症の一つである。熱帯から温帯にかけて世界の広範な地域に分布し、全世界で3億5千万人が常時感染の危機に曝され、1,200万人の患者がいると言われている(World Health Organization, 1995)。病原原虫種により、皮膚型

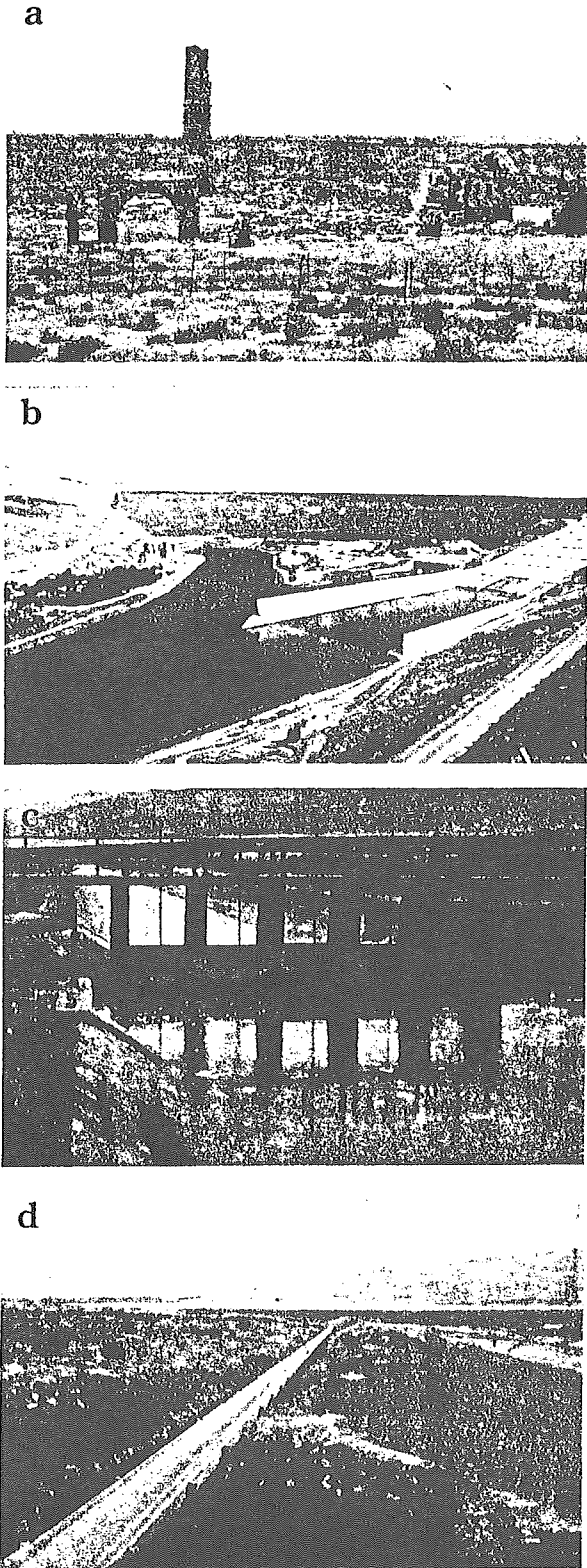


図2. GAP 地域諸景.

- a. 乾燥化が進んだサンリフルファ市郊外.
- b. 1992年に完成したGAPの中核をなすアタチュルクダム、200億トンの容量をもつ.
- c. 灌漑用水路.
- d. 灌漑が進んだハラソ大地.

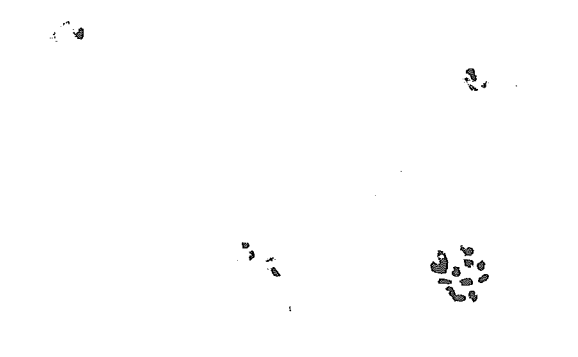


図3. 赤血球内寄生マラリア原虫.



図4. 降水量の増加により出現した水たまり. マラリアを媒介するアノフェレスの幼虫が確認された.



図5. リーシュマニア原虫有鞭毛型(プロマステゴート).

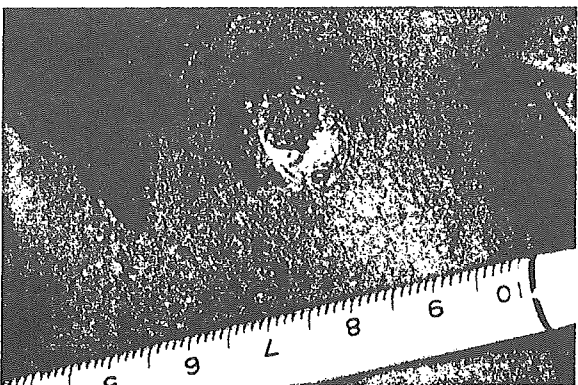


図6. サンリフルファ市の少年で見られた典型的皮膚型リーシュマニア性潰瘍.

(cutaneous leishmaniasis), 皮膚粘膜型 (mucocutaneous leishmaniasis), 内臓型 (visceral leishmaniasis) など多彩な病態を呈し, 特に内臓型リーシュマニア症の場合適切な治療が行われない限り致死的である。また, 本症は人獣共通感染症として知られ, 同じ病原体がヒト以外の動物 (保虫宿主あるいは reservoir host) にも感染する。ヒトのリーシュマニア症の病原種の自然保虫宿主 (reservoir host) としてはイヌ科動物 (イヌ, キツネ, ジャッカール等) および様々なげっ歯類 (ハムスター, スナネズミ等) が重要である。すなわちヒトと動物, さらにサシチョウバエの間でリーシュマニア原虫の生活環が営まれている。

トルコでは古来より GAP 地域の都市部において, Oriental sore (東洋瘡腫) あるいは Aleppo button として知られる皮膚型リーシュマニア症の浸淫が知られていた (図6)。この地域の病原体は *L. tropica* である。一方, 地中海沿岸では *L. infantum* を病原体とする内臓型リーシュマニア症 (Kala-Azar) が散発的に報告されている。1950年代のマラリア撲滅計画の一環として行われた殺虫剤の噴霧によりマラリア媒介蚊のみならず本症を媒介するサシチョウバエも減少し, 一時本症も減少を示した。ところがマラリアと同じく, 1981年より開始された GAPの進行に伴い著しい増加を来した。現在トルコにおける皮膚型リーシュマニア症はその多くがチュクロバ地方あるいは GAP 地域に集中しており 1983~1996年の間, ウルファ県では 16,019例, アダナで 5,573例が報告されている。リーシュマニア症の増加はウルファ県の首都である人口約 45万人のシャンリウルファ市で最も顕著であり, 1990年 552例であったものが 1993年 2,980例, 1994年 2,780例を記録し, 早急に対策を行う必要がある (図7)。ところが, 本症のトルコにおける

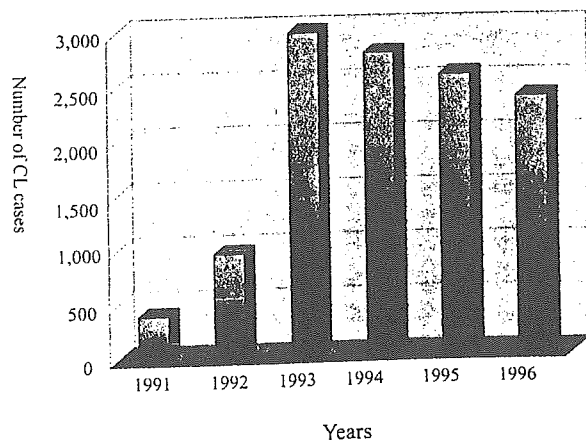


図7. ウルファ県における皮膚型リーシュマニア症例の増加。

伝播に関しては不明な点が多く残されている。これまでにトルコ国内で17種の *Phlebotomus* 属サシチョウバエが同定されているにもかかわらず, 媒介種の確定には至っていない。トルコにおける内臓型リーシュマニア症の保虫宿主としてイヌが重要であることが明らかにされているが, 皮膚型リーシュマニア症の保虫宿主の有無は未だ不明であり, 都市部すなわち人口密集地に患者が多いことから保虫宿主が介在せず, ヒトとサシチョウバエの間で主として伝播サイクルが回っているとも考えられる。

リーシュマニア症では強力な感染免疫が成立することが知られている。一度リーシュマニア原虫に感染し耐過すると免疫を獲得し, その後の感染に対し強い抵抗を示し, 発症しないかあるいは軽症で済む。種痘が行われる遙か以前から leishmanization と呼ばれる方法, すなわち皮膚型リーシュマニア症の患者の皮膚病変の一部 (潰瘍に形成された痂皮) をこどもの上腕部に接種し, 小さな病変を人為的に起こすことにより, その後の感染に対し抵抗性を付与する方法が中央アジアから中近東一帯にかけ行われていたことが民間伝承あるいは古文書から知られている。現在でも中央アジアのウズベキスタンでは無菌施設で調整された原虫を用いた生ワクチンが用いられている。従って皮膚型リーシュマニア症の浸淫地域では, 患者はそれまでに感染を受けたことが無いため未だ免疫を獲得していない者, すなわち小児に多い。ところがこれら浸淫地域に非汚染地域から非免疫者が多数流入した場合は小児に限らず感染者数が著しく増加, すなわち流行を来すことになる。GAPが進行するに従い, 農業開発に著しい成果が認められてきた。当然, それに伴う急激な人口増加が起こっているが, 多くはリーシュマニア症の非汚染地域である東部山岳地域からの人口流入である。古くからリーシュマニア症が浸淫し, 一定の患者の発生は見られるものの爆発的な流行が起きなかったシャンリウルファ市において, 最近, 患者が急増している一要因となっている。サシチョウバエの繁殖に好適な場所が広がれば流行地域は更に拡大することになる。

### (3) 腸管内寄生虫

腸管内寄生虫に関しては, トルコでは赤痢アメーバ陽性例の届け出義務がある。それによると, GAP 地域においてディヤバクル県で 1994年 1,761例, 1995年 3,425例, ウルファ県で 1994年 511例, 1995年 395例の報告がある。その他に寄生虫についても保健省へ届け出されているが, それによると蠕虫類では蛔虫 (*Ascaris lumbricoides*), 鉤虫, 蟯虫 (*Enterobius vermicularis*), 無鉤条虫 (*Taenia saginata*), 小型条虫 (*Hymenolepis nana*), 鞭虫 (*Trichuris trichuria*), 糞線虫 (*Strongyloides stercoralis*) が, 原虫では

ランブル鞭毛虫 (*Giardia lamblia*) の報告がある。しかし、その数値が全体像を反映しているとは考えられず、氷山の一角を示しているに過ぎない。例えば1989年に行われたシャンリウルフア市のある小学校での調査によると、実に87.5%の児童が何らかの寄生虫に感染している。GAPの進行に伴いシャンリウルフア市への流入人口は著しく増加しており、市街部の面積も拡大している。流入人口の多くは旧市街地の外に無秩序に住宅を建設しており住環境の整備(上下水、学校、病院)の立ち遅れが様々な寄生虫感染症の蔓延に火を注いでいる。

### 3) トルコにおける寄生虫対策の現状と問題点

トルコは古くからマラリアの浸淫地域であったため1920年代から国家的規模でのマラリア対策が実施されている。トルコ政府中央保健省のマラリア・コントロール局 (Department of Malaria Control) は全国に現在でも2,300人のマラリア・ワーカーを擁するマラリア・コントロールのための組織であり、国連、およびEU等から資金および技術援助を受けている。総予算(保健省の年間予算の約2%に相当するとのことである)の約80%は人件費に充てられており、他は車両費、殺虫剤の購入等に使用されている。マラリア・ワーカーは顕微鏡による検査、車両の運転、殺虫剤の噴霧、治療薬の配布等の役割にあたる。マラリアの診断、治療は無料で行われる。ギムザ染色厚層塗抹標本の鏡検でマラリア原虫が陽性であればマラリア・ワーカーを通じ治療薬(クロロキンおよびプリマキン)が手渡される。治療薬が配布された患者はその後定期的にマラリア・コントロール・ステーションを訪れフォローアップ検査が義務付けられている。マラリア・コントロール・ステーションではマラリアの診断、治療に加え、媒介蚊の繁殖巣の検出と、殺虫剤の噴霧が大きな仕事であり、多くのマラリア・ワーカーがこの任に当たっている。アダナにはここが過去最大のマラリア浸淫地域であったこともあり1927年にマラリア研究所が設立され、以来マラリア・コントロールにかかわる教育及び研究を行ってきた。教育に関しては検査技師の養成、殺虫剤の噴霧を行うマラリア・ワーカーの指導、治療に係わる臨床医の研修を中央保健省マラリア・コントロール局の指示、要請により開催している。従って、マラリア対策に関しては既に国家レベルでの対策(予算、組織)が講ぜられ一定のプロトコルが出来上がっている。1950年代に確立したこのプロトコルは当時最先端のものであり、驚くほど精密にシステム化されている。しかし、その後このシステムの改善が計られた形跡は無く、現時点ではGAP地域におけるマラリア

患者の急増という新たな問題に充分対応出来ているとは言えない。ここで問題となるのは、その時々技術の再評価、新技術の導入を行う機構が無いことである。最近、GAP地方のマラリア・コントロール・センターとして機能することを目的に、ディヤバクルに熱帯病研究所が保健省により建設された。マラリア浸淫地域の分散化と東南部への拡がり、浸淫地域の環境、社会的事情の変化を考えると地域に密着した機構が必要である。これはその地域に適した殺虫剤、噴霧法の選択、住民への啓蒙、診断の精度、迅速性の向上ならびに、地域医療機関との連携を考える上にも重要である。ところがこの任に当たる研究者、技術者が不足している。GAP地域はトルコにおいても未だ辺境である。むしろ辺境であるが故にそれから脱却するためのGAPである。エーゲ海沿岸の西部地域とは経済的にも文化的にも落差が著しく、高等教育を受けた人間の多くはGAP地域を含む東部地域への就職を嫌う。近年トルコ政府はGAP地域に次々と大学を新設しているが民間と比べはるかに高待遇の教授ポストも空席が多いのが現状である。

マラリア・コントロール計画はマラリア感染のリスクがある世界中のほとんどの発展途上国で実施、あるいは何らかの対応がなされている。これは単にマラリアの脅威のためだけではなく、UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) 等国連の主導の影響もあり国際協力あるいは開発援助計画の中で外すことのできないメニューとなっているためである。ところがマラリア、結核、AIDS等限られた感染症を除くと、他の感染症コントロール計画は外部資金あるいは技術援助が得難いことを反映して極めて貧弱であると言わざるを得ない。トルコにおいても同様でリーシュマニア症コントロールに関する全国的規模のプロジェクトは無く、地方ごとにその対応は異なり、格差も大きい。ウルファ県はリーシュマニア症の急激な増加を受け、シャンリウルフア市の一つの保健所にリーシュマニア症ステーションを設けマラリア・ワーカーでもある臨床検査技師がその診断(皮膚生検材料のギムザ塗抹標本の検査)に当たっている。本症であることが診断されれば無料で治療(グルカンタイムの局所注射)が施される。リーシュマニア症はサシチョウバエにより媒介される人獣共通感染症であるが、GAP地方では未だ媒介昆虫種、保虫宿主の有無すら不明である。患者の治療だけでは根本的対策とは言えず基本的疫学調査に基づく、媒介昆虫、保虫宿主のコントロール等、根本的、特異的対応が必要である。さらに環境変化、生態系の変化、人口増加、密集化等が本症増加の要因であり、