

## Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Serodiagnosis of Dengue Virus Infection

M. Nawa,<sup>1\*</sup> T. Takasaki,<sup>2</sup> M. Ito,<sup>2</sup> S. Inoue,<sup>3</sup> K. Morita,<sup>3</sup> and I. Kurane<sup>2</sup>

Department of Microbiology, Saitama Medical School 38, Moroyama, Saitama 350-0495, Japan<sup>1</sup>; Division of Arboviruses, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1, Toyama, Sinjuku, Tokyo 162-8640, Japan<sup>2</sup>; and Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8523, Japan<sup>3</sup>

Received 26 April 2005/Returned for modification 11 July 2005/Accepted 14 August 2005

**We determined the usefulness of an immunoglobulin A (IgA) antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of dengue virus infections. The results indicate that the presence of IgA and IgM in serum samples assures recent primary dengue virus infection even with a single serum sample.**

Dengue viruses cause dengue fever and dengue hemorrhagic fever. Dengue fever/dengue hemorrhagic fever is one of the most serious public health problems in tropical and subtropical areas in the world. Monitoring of dengue virus infections is an important component in assessing the risk to humans. Reverse transcriptase PCR and immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay (IgM-capture ELISA) have been carried out in laboratories (3, 7). In the present study, we assess the usefulness of the anti-dengue virus IgA antibody response in serological diagnosis of dengue virus infection.

In the present study, 94 serum samples from 62 dengue patients in Japan were tested. Sera were also collected from 32 healthy Japanese adults who had never been to areas of a dengue virus epidemic or areas to which dengue virus is endemic. Four prototype dengue virus strains and a Japanese encephalitis virus (JEV) strain, JaGAR01, were used for antigens. Preparation of viral antigens was carried out according to previously described methods (4). IgA-capture ELISA was carried out according to the previously described IgM-capture ELISA technique (2, 3, 4). Antibody titrations were carried out to determine the assay dilution in IgA-capture ELISA, using one (each) serum sample from a confirmed dengue patient and a healthy Japanese donor (data not shown). The result was quantified as a positive-to-negative (P/N) ratio: P/N ratio =  $A_{492}$  reading with the viral antigen/ $A_{492}$  reading with the uninfected control antigen. Specific absorbance stayed at the pla-

teau level at the dilution ranges from 1:50 to 1:400 and decreased gradually at serum dilutions higher than 1:400. Low levels of nonspecific reaction were detected with dengue virus-negative control serum at low dilutions. P/N ratios clearly differentiated the dengue virus-positive serum from the negative

TABLE 1. Comparison of the results obtained with IgA ELISA and IgM ELISA

IgA ELISA result	No. of samples (patients) with IgM ELISA result		Total no. of samples (patients)
	Positive	Negative	
Positive	23 (19)	0	23 (19)
Negative	50 (33)	21 (10)	71 (43)
Total	73 (52)	21 (10)	

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Saitama Medical School 38, Moroyama, Saitama 350-0495, Japan. Phone and fax: 81-49-276-1438. E-mail: mnawa@saitama-med.ac.jp.

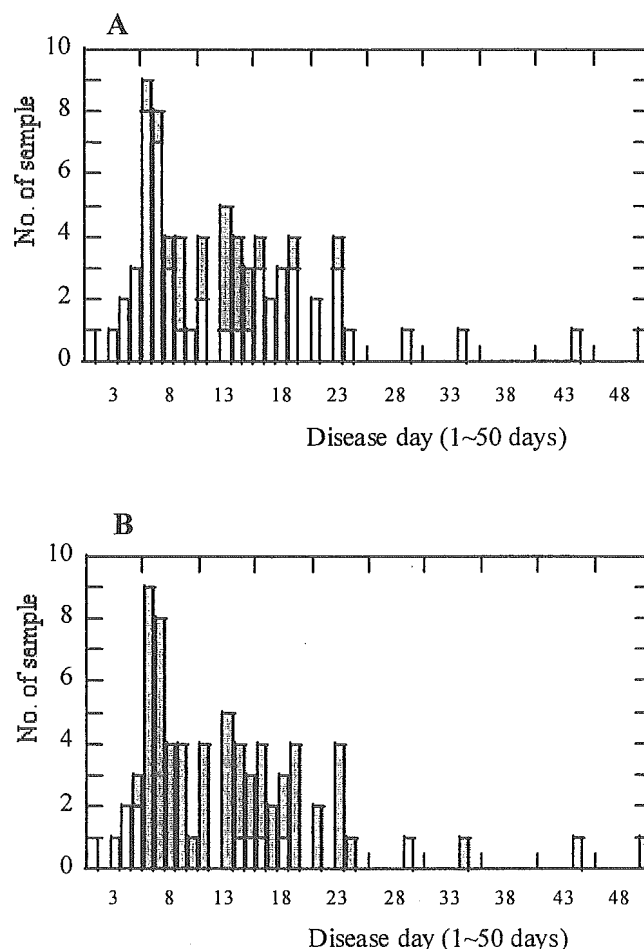


FIG. 1. Detection of dengue virus-specific IgA (A) and IgM (B) on specific disease days. Closed and open columns indicate positive and negative, respectively.

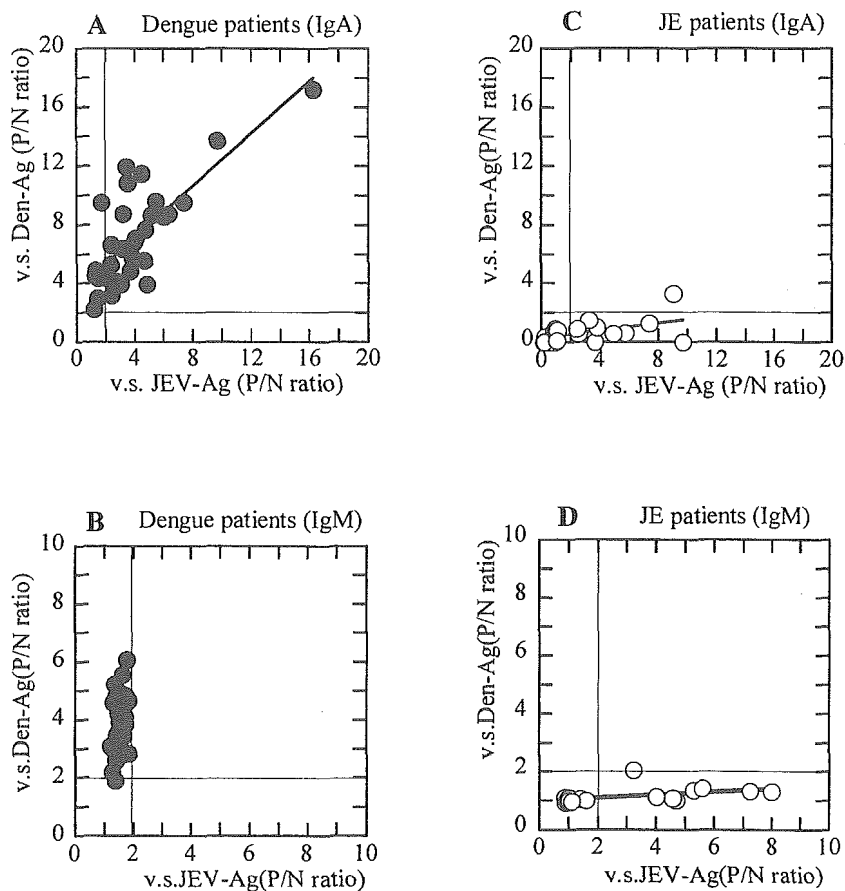


FIG. 2. Virus specificities of IgA and IgM antibodies among dengue and JE patients in Japan. Thirty-one serum samples (A and B) from 26 dengue patients and 22 (C and D) from 22 JE patients were subjected to IgA-capture ELISA (A and C) or IgM-capture ELISA (B and D). Results are presented as P/N ratios.

one at the dilution ranges in the assay. Based on these results, we decided to dilute the serum samples at 1:400 for IgA-capture ELISA in the present study. In order to determine the cutoff value in IgA-capture ELISA, 32 negative sera were assayed. Mean P/N ratios plus two standard deviations obtained at 1:400 dilutions of the sera were  $1.64 + 0.254$  and  $1.73 + 0.258$  for dengue virus-negative, anti-JEV HI antibody-negative (lower than 1:10) and dengue virus-negative, anti-JEV HI antibody-positive sera (higher than 1:10), respectively. Therefore, the cutoff value was defined as follows: mean P/N ratio + 2 standard deviations = 2.00 in IgA-capture ELISA.

Ninety-four serum samples from 62 dengue patients collected on various days were tested by IgA- and IgM-capture ELISA (Table 1). Twenty-three (from 19 cases) of the 94 samples were IgA positive, and the remaining 71 were IgA negative. Seventy-three (from 52 cases) of the 94 samples were IgM positive, and the remaining 21 were IgM negative. There was no sample which was IgA positive and IgM negative. The agreement of results between the IgA and IgM tests was 32% (23/73). To investigate the differences between IgA and IgM tests, we analyzed the kinetics of IgA and IgM responses.

Seventy-three serum samples with defined disease days were tested by IgA- and IgM-capture ELISA (Fig. 1A and B). Disease days were defined according to the report by Vaughn et al.

(6). Disease day 1 is the day of onset, which is usually characterized by fever. IgA was positive as early as disease day 6 and as late as disease day 23, and IgA responses were mostly positive on disease days 9 to 15 (Fig. 1A). On the other hand, IgM responses were mostly positive on disease days 5 to 50 (Fig. 1B). The results suggest that serum IgA antibody responses reflect dengue virus infection; however, IgA antibody remains positive for a short period of time compared to IgM antibody.

We next examined virus specificities of antibodies among patients. We previously reported that most of the dengue cases were primary dengue virus infection in Japan but demonstrated immune responses as secondary flavivirus infection because of immunity to JEV (2). We compared titers of IgA and IgM for dengue virus and JEV antigens in 31 serum samples from 26 dengue patients (Fig. 2A and B). Twenty-two serum samples from 22 Japanese encephalitis (JE) patients were also tested (Fig. 2C and D). Ten of the serum samples were kept at the Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, and 12 were kept at National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan. Serum IgA antibody in dengue patients was cross-reactive to dengue virus and JEV antigens, whereas IgM antibody was specific for dengue virus antigen (Fig. 2A and B). Titers of IgA and IgM for dengue virus

and JEV antigens were also compared in serum samples from JE patients. IgA and IgM for JEV antigen were detected but not IgA and IgM for dengue virus antigen (Fig. 2C and D).

There is no domestic dengue virus infection in Japan. Therefore, all the dengue patients are imported cases. On the other hand, most of the Japanese population possesses antibodies to JEV by vaccination or natural infection. Therefore, most dengue cases are also considered secondary flavivirus infection. The present data are different from the reports by the groups of Talarmin et al. (5) and Balmaseda et al. (1). The specificity and positive predictive value of their data are over 90% for dengue patients' sera, which were collected in French Guiana and Nicaragua, respectively. This may have been due to the difference in epidemiological status. French Guiana and Nicaragua are countries to which dengue virus is endemic, whereas Japan is not. Therefore, serum samples were probably from secondary dengue virus infections in those studies but from primary infections in our study. The results in the present study indicate that dengue virus infection elicits serum IgA antibodies as well as IgM in patients, but IgA persists for a shorter period of time. Thus, the presence of both IgA and IgM suggests an early phase of dengue virus infection, and assure dengue virus infection even with a single serum sample, when dengue patients are primary infections. However, it should be noted that the absence of IgA does not necessarily rule out dengue virus infection. The combination of IgM-capture ELISA and IgA-capture ELISA increases the assurance of

the serological diagnosis of dengue virus infection, especially when only a single serum sample is available.

This work was supported by a grant from the Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases program, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

#### REFERENCES

1. Balmaseda, A., M. G. Guzman, S. Hammond, G. Robledo, C. Flores, Y. Tellez, E. Videz, S. Saborio, L. Perez, E. Sandoval, Y. Rodriguez, and E. Harris. 2003. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:317-322.
2. Nawa, M., K. Yamada, T. Takasaki, T. Akatsuka, and I. Kurane. 2000. Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:774-777.
3. Nawa, M., T. Takasaki, K. Yamada, T. Akatsuka, and I. Kurane. 2001. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J. Virol. Methods* 92:65-70.
4. Nawa, M., T. Takasaki, K. Yamada, I. Kurane, and T. Akatsuka. 2003. Development of IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of dengue using beta-propiolactone-inactivated dengue viral antigens. *Dengue Bull. (WHO)* 27:95-99.
5. Talarmin, A., B. Labeau, J. Lelarge, and J. L. Sarthou. 1998. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J. Clin. Microbiol.* 36:1189-1192.
6. Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. L. Rothman, F. A. Ennis, and A. Nisalak. 1997. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J. Infect. Dis.* 176:322-330.
7. Yamada, K., M. Nawa, T. Takasaki, S. Yabe, and I. Kurane. 1999. Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn. J. Infect. Dis.* 52:150-155.

Original Article

## Detection of Japanese Encephalitis (JE) Virus-Specific IgM in Cerebrospinal Fluid and Serum Samples from JE Patients

Sumalee Chanama\*, Walailuk Sukprasert, Areerat Sa-ngasang, Atchareeya A-nuegonpipat, Somchai Sangkitporn, Ichiro Kurane<sup>1</sup> and Surapee Anantapreecha

National Institute of Health, Department of Medical Sciences,  
Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000, Thailand and

<sup>1</sup>Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

(Received April 25, 2005. Accepted August 15, 2005)

**SUMMARY:** Detection of Japanese encephalitis virus (JEV)-specific IgM by IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (IgM-capture ELISA) has been accepted as the standard for serological diagnosis. In the present study, we analyzed the time course of the positive rate of JEV-specific IgM in serum and cerebrospinal fluid (CSF) specimens from confirmed JE patients. Serum and CSF samples were obtained from 155 JE cases for diagnostic purposes at hospitals in Thailand from 2002 to 2004. The levels of specific IgM were assessed by IgM-capture ELISA in the 171 serum and 156 CSF samples. Anti-JEV IgM was detected in 26 of 44 serum samples collected on days 1-4 of the disease period, in 31 of 44 samples collected on days 5-8, in 23 of 26 samples collected on days 9-12, and in all the samples collected on day 13 or later. Specific IgM was detected in 60 of 66 CSF samples collected on days 1-4 of illness, and in all the CSF samples but one collected on day 7 or later. The results indicate that the detection of JEV-specific IgM in CSF by IgM-capture ELISA is a reliable laboratory diagnostic method for confirmation of JE throughout the disease period, while the detection of IgM in serum samples is a reliable method on day 9 or later.

### INTRODUCTION

Japanese encephalitis virus (JEV) is the most common cause of viral encephalitis in Southeast Asia. JEV is a member of the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, and is transmitted to humans through a pig-Culex mosquito-pig cycle. Humans are an incidental host. The clinical features are manifested as a febrile headache syndrome, aseptic meningitis, or encephalitis (1,2).

JEV can not usually be isolated from clinical specimens because of the low levels of viremia and the rapid development of neutralizing antibodies (3). The detection of JEV-specific IgM by IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (IgM-capture ELISA) has been accepted as the standard for serological diagnosis. This assay distinguishes between JE and dengue virus, which are serologically cross-reactive (4). Presence of JEV-specific IgM in cerebrospinal fluid (CSF) is considered to be a sign of JEV infection of the central nervous system. Serum samples are also used for detection of specific IgM, because serum can be obtained from patients more easily than CSF. In the present study, we analyzed the time course of the detection of JEV-specific IgM in serum and CSF specimens from confirmed JE patients.

### MATERIALS AND METHODS

**Patients:** Patients with fever ( $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ) and showing at least two of six symptoms – headache, changes of consciousness, convulsions, abnormal movements, neck rigidity and pres-

ence of Kernig's sign – were clinically diagnosed with viral encephalitis if no bacteriological causative agent was found.

**Specimens:** Serum and CSF specimens were obtained for diagnostic purposes from 1,453 patients with clinically suspected viral encephalitis in hospitals in Thailand from 2002 to 2004. These specimens were sent to the Arbovirus Section, National Institute of Health, Thailand for serological tests. Of these 1,453 patients, 155 patients were confirmed to have JE based on the serological tests, in which positivity for the disease was taken as an anti-JE IgM titer of 40 units or more in a CSF specimen collected at any time point of illness. In the present study, disease day 1 was defined as the day of the onset of symptoms.

**IgM-capture ELISA:** All the specimens were examined for anti-JEV IgM by IgM-capture ELISA as reported by Innis et al. using mouse brain-derived, acetone-extracted JE antigen and a tetravalent of dengue antigen (5). Briefly, 96-well microtiter plates (Nunc Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with rabbit anti-human IgM antibody (ICN/Cappel; ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA). Fifty microliters of serum diluted at 1:100 in PBS or CSF diluted at 1:10 in PBS was added to the wells and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The plates were then washed 6 times with PBS plus 0.05% Tween 20, and 50  $\mu\text{l}$  of either JE antigen or tetravalent dengue antigen diluted in PBS containing 20% acetone-extracted normal human serum prepared as described by Burke et al. (6) was added to the wells. The dengue antigen was a mixture of 16 hemagglutination units each of dengue serotypes 1-3 and 8 hemagglutination units of dengue serotype 4 in 50  $\mu\text{l}$ . The JE antigen was diluted to 50 hemagglutination units in 50  $\mu\text{l}$ . After 2 h of incubation at room temperature, the plate was washed as described above and 25  $\mu\text{l}$  of optimal diluted HRP-conjugated anti-flavivirus IgG, prepared from pooled convalescent sera of patients with dengue hemorrhagic fever with secondary antibody responses

\*Corresponding author: Mailing address: National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 88/7, Tivanond Road, Muang, Nonthaburi 11000, Thailand. Tel: +66 29510000 ext. 99220, Fax: +66 25915449, E-mail: sn111139@dmsc.moph.go.th

as previously described (7), was added. After 1 h of incubation at 37°C, 100  $\mu$ l of o-phenylene diamine (OPD) substrate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo., USA) was added to develop the color. The reaction was stopped by the addition 50  $\mu$ l of 4M sulfuric acid. On all test plates, 1:100 dilutions of negative control (NC), weak positive control (WPC), and strong positive control (SPC) serum samples were run simultaneously with duplicate test samples. The plate was read for absorbance at 490 nm by an ELISA reader (Elx800; Bio-Tex Instruments, Inc., Winooski, Vt., USA). The ELISA titer was calculated by this formula: units =  $100 \times (A_{490} \text{ test sample} - A_{490} \text{ NC}) / (A_{490} \text{ WPC} - A_{490} \text{ NC})$ . The cutoff point for IgM was 40 units and corresponded to a mean test absorbance of 0.175 (4,5,8). A ratio of anti-JE IgM to anti-dengue IgM higher than 1.0 was defined as JEV infection. It was necessary to measure the level of antibodies against both viruses because dengue and JEV co-circulate in Thailand.

**Statistical analysis:** The correlation between IgM titers in CSF and serum from the same patients was analyzed. The correlation was considered to be significant when the *P* value was less than 0.05.

## RESULTS

One-hundred and seventy-one serum samples and 156 CSF samples were obtained from 155 patients with confirmed JE. Figures 1 and 2 show the numbers of JEV IgM-positive or -negative serum and CSF samples according to the day of disease. Anti-JEV IgM was detected in 26 of 44 serum samples collected on days 1-4 of disease, in 31 of 44 samples collected on days 5-8, in 23 of 26 samples collected on days 9-12, and in all the samples collected on day 13 or later (Figure 1). Specific IgM was detected in 60 of 66 CSF samples collected on days 1-4, and in all the CSF samples but one collected on day 7 or later (Figure 2). The percentages of anti-JEV IgM-positive samples were higher in CSF samples (diluted at 1:10) than in serum samples (diluted at 1:100) on disease days 1-12 (Figures 1 and 2). Anti-JEV IgM was detected in all the CSF and serum samples collected on day 13 or later.

The levels of anti-JEV IgM were compared in pairs of serum and CSF samples collected from the same patients on the same day (Figure 3). There was a significant correlation between the IgM titers in CSF and those in serum samples ( $R^2 = 0.575$ ,  $P < 0.001$ ).

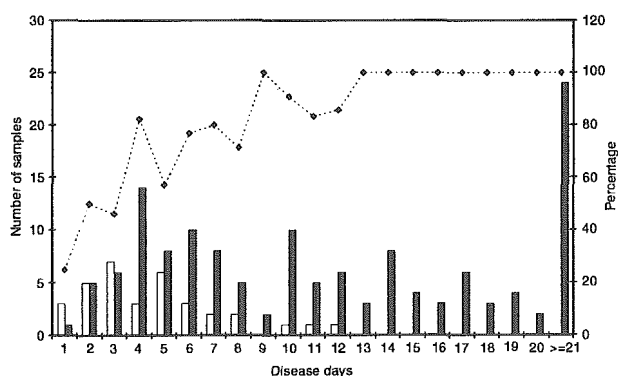


Fig. 1. Detection of anti-JEV IgM and percentage of positive samples in serum specimens according to the day of disease. Open bar, negative; black bar, positive; diamond and dotted line, percentage of positive samples.

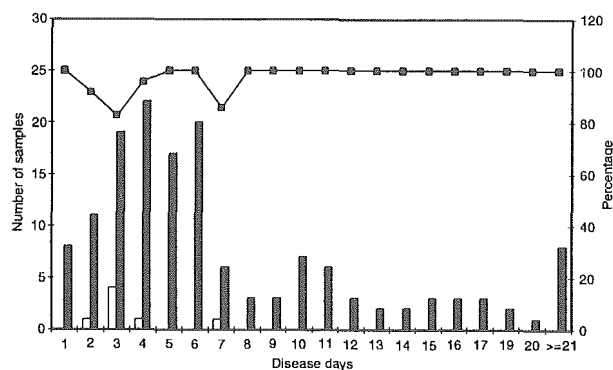


Fig. 2. Detection of anti-JEV IgM and percentage of positive samples in CSF specimens according to the day of disease. Open bar, negative; black bar, positive; rectangle and solid line, percentage of positive samples.

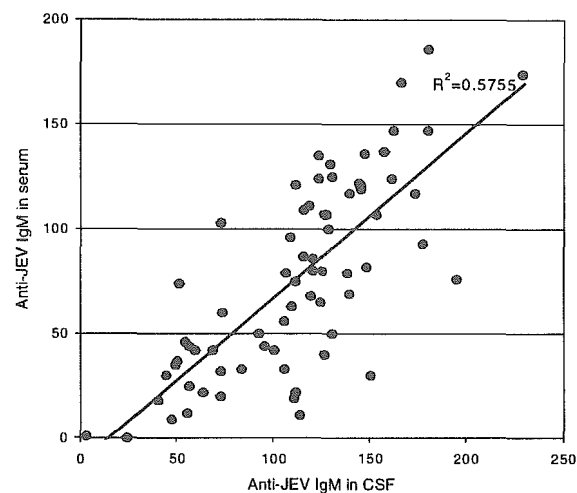


Fig. 3. The correlation between anti-JEV IgM in serum and that in CSF specimens. Each dot represents a pair of serum and CSF samples collected from the same patient on the same day.

## DISCUSSION

From 1993 to 1998, between 500 and 700 cases of viral encephalitis were reported each year in Thailand, and about 34 cases per year were confirmed by serological diagnosis (9). In the present study, we analyzed anti-JEV IgM levels in both serum and CSF using specimens from 155 JE cases that were obtained for diagnostic purposes at hospitals throughout Thailand from 2002 to 2004. These cases constituted approximately 10% of the patients who were clinically diagnosed with viral encephalitis. The levels of JEV-specific IgM were assessed by IgM-capture ELISA in the 171 serum and 156 CSF samples.

The anti-JEV IgM positive-rate was higher in CSF samples than in serum samples until day 13 of the disease period, with day 1 defined as the day of onset of symptoms. Specific IgM was detected in 60 of 66 CSF samples collected on days 1-4, and in all the CSF samples but one collected on day 7 or later. Thus, in most of the JE cases, specific IgM was detectable in CSF as early as day 1. On the other hand, in most cases, specific IgM was not detected in serum samples until day 9 or later. Therefore, for confirming JE, an assay for IgM in CSF is likely to be more effective than an assay for IgM in serum samples in the early days (days 1-8) of the illness.

Detectable levels of anti-JEV IgM were present in all the CSF samples on disease day 8 or later. This result is in good agreement with a report by Burke et al. in which specific IgM was detectable in all the CSF samples on day 7 (10).

The results indicate that the detection of specific IgM in CSF by IgM-capture ELISA is a reliable laboratory diagnostic method for confirmation of JE throughout the disease period, while the detection of IgM in serum samples is a reliable method for the later part of the disease period.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Pornsiri Boonpradit and Ms. Sirirat Naemkhunthot for retrieval of data, and Mr. Nirandorn Punyosri for his laboratory assistance. We are grateful to Dr. Pathom Sawanpanyalert for his advice.

This work was supported by the grants from Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand and the Japan Health Sciences Foundation.

#### REFERENCES

1. Monath, T. P. and Heinz, F. X. (1996): Flaviviruses. p. 961-1034. *In* Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M., Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
2. Solomon, T. (1997): Viral encephalitis in Southeast Asia. *Neurol. Infect. Epidemiol.*, 2, 191-199.
3. Buescher, E. L. and Scherer, W. F. (1959): Immunological studies of Japanese encephalitis virus in man. I. Antibody responses following overt infection of man. *J. Immunol.*, 83, 582-593.
4. Solomon, T., Thao, L. T. T., Dung, N. M., Kneen, R., Hung, N. T., Nisalak, A., Vaughn, D. W., Farrar, J., Hien, T. T., White, N. J. and Cardoso, M. J. (1998): Rapid diagnosis of Japanese encephalitis by using an immunoglobulin M dot enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2030-2034.
5. Innis, B. L., Nisalak, A., Nimmanitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V. V., Suntayakorn, S., Puttisri, P. and Hoke, C. H. (1989): An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infection where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40, 418-427.
6. Burke, D. S., Nisalak, A. and Ussery, M. A. (1982): Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 16, 1034-1042.
7. Bundo, K. and Igarashi, A. (1985): Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J. Virol. Methods*, 11, 15-22.
8. Strickman, D., Sithiprasana, R., Kittayapong, P. and Innis, B. L. (2000): Distribution of dengue and Japanese encephalitis among children in rural and suburban Thai villages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63, 27-35.
9. Buranathai, C., Sa-ngasang, A., Nuang-plee, S., Punyosri, N., Anantapreecha, S. and Warachit, P. (2000): Laboratory surveillance on Japanese encephalitis in Thailand, 1993-1998. *J. Health. Sci.*, 9, 342-348 (in Thai).
10. Burke, D. S., Nisalak, A., Ussery, M. A., Laorakpongse, T. and Chantavibul, S. (1985): Kinetics of IgM and IgG responses to Japanese encephalitis virus in human serum and cerebrospinal fluid. *J. Infect. Dis.*, 151, 1093-1099.

研究成果の刊行に関する一覧表（業績）

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Anantapreecha, S., Chanama, S., A-nuegoonpipat, A., Naemkhunthot, S., Sa-ngasang, A., Sawanpanyalert, P., and <u>Kurane, I.</u>	Serological and virological features of dengue fever and dengue hemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002.	Epidemiology and Infection.	133	503-507	2005
Mawa, M., Takasaki, T., Ito, M., Inoue, S., Morita, K. and <u>Kurane, I.</u>	Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus.	Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology	12	1235-1237	2005
Sumalee, C., Sukprasert, W., Sa-ngasang, A., A-nuegoonpipat, A., Sangkitporn, S., <u>Kurane, I.</u> and Anantapreecha, S.	Detection of Japanese Encephalitis (JE) Virus-Specific IgM in Cerebrospinal Fluid and Serum Samples from JE Patients.	Japanese Journal of Infectious Diseases	58	294-296	2005
Tajima, S., Nukui, Y., Ito, M., Takasaki, T. and <u>Kurane, I.</u>	Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are	Virus Research	116	38-44	2006

	dispensable for replication of dengue type 1 virus in vitro.				
Nukui, Y., Tajima, S., Kotaki, A., Ito, M., Takasaki, T., Koike, K. and <u>Kurane, I.</u>	Novel dengue virus type 1 from travelers to Yap state, Micronesia.	Emerging Infectious Diseases	12 (2)	343-346	2006



## プロジェクト 3 : 原虫

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書  
アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部  
分担研究者 大前 比呂思 国立感染症研究所 寄生動物部

**研究要旨** 日本の国内では、1961年以降、マラリア原虫の生活環の存在は証明されていない。それ以後は輸入マラリアが問題となり、報告例は増加傾向をにあったが2000年をピークに減少に転じている。また、過去には国内2次感染が疑われた例もあるが、ハマダラカが媒介した感染拡大の事例の報告はない。その一方で、ハマダラカの生息が確認されており、マラリア原虫が侵入した場合、問題となる可能性を否定することはできない。

これまで我が国では、12種類のハマダラカが報告されているが、今年度は、かつて熱帯熱マラリアの浸淫地であった八重山地域と、浸淫地からの国際便が多く発着する成田空港を対象として生息調査を行った。八重山地域では、主にコガタハマダラカとオオツルハマダラカが採集された。成田空港の周辺にも、既にハマダラカの生息は確認されており、設置トラップによる調査では、6-9月に成虫が採集された。また、2001-2005年の航空機内調査においては、アメリカ合衆国からの2便でのみ、ハマダラカが採集された。病原体検査においては、採集されたいずれの蚊からもマラリア原虫は検出されなかった。

我が国のマラリア防疫体制の強化には、ヒトの移動が多いアジア各国におけるマラリア浸淫状況を的確に把握することが必要で、本研究班の目的もアジア諸国におけるマラリアの疫学的情報の把握と、情報共有のためのネットワーク作りにある。今年度の各国からの報告や調査によると、東南アジア各国のマラリアの疫学的状況が変化し、**morbidity, mortality** が改善していることが確認された。国によって状況は異なるが、相対的に重症で致死率の高い熱帯熱マラリアから、症状が軽い慢性的な三日熱マラリアに流行の中心が移っていく傾向が見られている。医療機関を受診した患者のデータを基にした既存のマラリア流行の監視システムや疫学的指標では、この劇的な変化に対応しているとはいえない状況にある。今後は、問題とされる地域で積極的な疫学的調査を進める一方、分子生物学的手法を利用した新しいマラリアの疫学指標の開発や監視システムを構築することが望まれる。一方、1999年4月-2004年12月の我が国への輸入マラリアの報告症例、約600例を解析したところ、全体では、熱帯熱マラリアが最も多く、次いで三日熱マラリアとなった。しかし、推定感染地域別にみると、感染者の増加しているアフリカでは、約70%が熱帯熱マラリアであったのに対し、感染者の減少しているアジアでは逆に約70%が三日熱マラリアだった。この結果は、上記の東南アジアにおけるマラリアの疫学的状況の変化を反映していると思われる。韓国は、我が国との間で相互に最もヒトの往来があり、防疫を考えるうえでも重要であるが、1979年に一度終息した三日熱マラリアが、1993年ごろより再びDMZを越えて侵入し、国内でマラリア感染環が維持されるに至っている。当該研究では韓国におけるマラリア侵入機構の数理モデルを構築し、DMZ近傍のパジュ、ヨンチョン地域を対象とした感染拡大をシミュレーションし、とられた対策の有用性についても併せて検証した。

## A. 研究目的

本研究は、アジアで流行しているマラリア等の原虫疾患の我が国への侵入監視の強化を目的としている。我が国においては、明らかに土着と思われるマラリアの例は、1961年以降報告されていない。その後は、輸入マラリアが問題となり、国内2次感染が疑われた例もあるが、ハマダラカが媒介した感染拡大の事例の報告はない。しかしながら、未だ国内には、マラリア原虫を媒介するハマダラカの生息が多数確認されており、マラリアが侵入した場合、再興感染症として問題になる可能性を否定することはできない。

本研究の目的を達成するには、まず、我が国における輸入マラリア患者の実態やマラリア媒介蚊の生息状況を調査することが必要になる。また、想定される様々な条件の中で、防疫の在り方を積極的に考えると、現在の世界のマラリア浸淫地の状況についても、できるだけ目的にあった情報を収集したい。特に我が国と人的・物的交流が深いアジア・太平洋地域でのマラリアの現状については、正確な情報を得ることが必要になる。そして、そのような情報交換を進める為には、アジア各国の感染症研究施設間の結びつきを日常的に強化しなければならない。

## B. 研究方法

上記のような目的を達成する為には、主たる研究のフィールドが国内か国外かで、研究組織は大きく2つに分けて考え

た。国外を主たるフィールドとする研究組織においては、関係するアジア・太平洋地域各国の研究機関や国際機関と連携して、情報収集に当たる必要がある。継続性を考えると、これは単に我が国の情報収集を目的とするものではなく、双方向に有意義な情報交換を目指すべきものであり、共有する問題を抽出し意識を共有すべく、初年度は東京で国際会議を開いた。

また、国内における防疫体制の強化という観点からは、主たる空港や港湾におけるマラリア媒介蚊の監視体制を施設内や飛行機・船舶内だけではなく、施設周辺地域を含めて考えねばならない。また、ハマダラカの生息状況については、もちろん国内の広い範囲で調査されるのが望ましいが、制度的に長期にわたって実施できる調査システムの構築を考えると、ある程度優先順位をつけて実施していくことになる。輸入マラリアの解析については、かつて何度か行われているが、今回は、実際に感染地と推定される浸淫地の状況とも関連させながら、分子生物学的手法を用いた分析も加えることを目指した。

さらに、これらの収集・検証された情報を基に、マラリアの侵入・伝播と拡大に関する数理モデルの作成に努めた。数理モデルを実際のマラリア対策の進捗にあわせて修正していくことができれば、対策の成果を検証し、今後その費用対効果を考えるうえでも、たいへん意義があ

る。

このような一連の研究の流れから考えて、実際の研究課題・研究組織については、以下のように考えた。

- 1) アジア・太平洋関係各国のマラリア・原虫症研究機関とのネットワーク強化と情報収集・共有する問題の抽出を目指す研究
  - ① アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況と疫学的指標の変化に関する研究（分担研究者：大前比呂思）
  - ② マラリアの分子進化速度や薬剤耐性に関する分子生物学的研究（分担研究者：田辺和裕）
  - ③ マラリア対策における治療的介入の意義と今後の課題に関する研究（分担研究者：神原廣二）
  - ④ マラリア原虫の薬剤耐性モニタリングに関する研究（分担研究者：朝日博子、泉山信司）
  - ⑤ 熱帯熱マラリア表面蛋白の網羅的検索とワクチン開発に関する研究（分担研究者：坪井敬文、川本文彦）
  - ⑥ G6PD欠損症の疫学と簡易な診断法の開発、普及に関する研究（分担研究者：川本文彦）

以上の研究は、下記の海外研究協力者の研究とも密接に関連して行われた。

- a) Epidemiology and control of malaria in a newly developed region in Cambodia (Socheat D & Sinuon M,

Cambodia)

- b) Establishment of new monitoring tools of malaria (Prachumsri JS Thailand)
  - c) Application of geographic information system(GIS) for malaria control (Espino F. et al, Philippines)
  - d) Strengthening malaria surveillance system in central Java, Indonesia (Wibisono H. et al, Indonesia)
- 2) 国内におけるマラリア防疫体制の強化を目指す研究
    - ① 国内におけるマラリア媒介蚊の生息状況に関する研究（分担研究者：津田良夫）
    - ② 国内における輸入マラリア患者に関する研究（分担研究者：木村幹夫、中野由美子）
- 3) マラリアの侵入と伝播、対策に関する数理モデルの構築を目指す研究（分担研究者：石川洋文）

### C. 研究結果

- 1) アジア・太平洋関係各国のマラリア・原虫症研究機関とのネットワーク強化と情報収集・共有する問題の抽出を目指す研究
    - ① アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況と疫学的指標の変化に関する研究（分担研究者：大前比呂思）
- 2006年1月31日に、本研究班の主催す

る国際会議が東京で開かれ、そこで、WPRO, 韓国,カンボジア,フィリピン,タイ,インドネシアの参加者から、各国におけるマラリア感染状況について説明があった。東南アジアの国々では、従来、マラリアが大きな公衆衛生学的な問題であったが、近年のマラリア対策の進捗によって、感染者数が減少するのみならず、morbidity, mortality とも、劇的に減少しつつある(図1,2)。また、それに伴って、致死率の高い熱帯熱マラリアではなく、相対的に三日熱マラリアが増加していることも共通していた(図1,3,4)。一方、韓国においては、1979年以降、一度終息していた三日熱マラリアが、1993年頃に休戦ラインを超えて北朝鮮から侵入し、最近是国内でマラリア感染環が定着するに至っている。また、感染者数も2003年までは、減少傾向を示していたが、2004年には、再び増加に転じた(図5)。しかも、休戦ライン近郊の軍人だけではなく、一般の人々の間でも感染者が増加している。高緯度地域であっても、三日熱マラリアが一度侵入して定着すると、その対策を進めるのが困難であることを再認識させられる結果となった。

さらに、ソロモン諸島国においては、実際に調査を行い、疫学的な指標を比較検討した。ソロモン諸島国は、1990年代、Annual Incidence が年間400/1000を超えるマラリアの高度浸淫地として知られたが、対策の成功によって、1997年以降は Annual Incidence が年間200/1000以

下にまで改善した。病院や診療所を受診した有症状者を中心とした Passive Case Detection(PCD)によると、現在もほぼその水準を維持しているが、患者の中で熱帯熱マラリアの比率が80%近くを占めている。しかし、今回、対象地を選び、Active Case Detection(ACD)として行った横断的一斉調査では、30%以上のマラリア感染率を示し、1996年の調査と同様な高い感染率を示した。また、三日熱マラリアが感染者の60%以上を占め、1990年代の熱帯熱マラリアの比率とは逆転していた。従来、PCDとACDによって検出される熱帯熱・三日熱マラリアの比率には、大きな差異は認められなかったが、今年度の調査ではACDによって検出される三日熱マラリアの比率が高くなり、大きな差異が見られた(表1)。

## ② マラリアの分子進化速度や薬剤耐性に関する分子生物学的研究(分担研究者:田辺和裕)

熱帯熱マラリア原虫のメロゾイト表面タンパク質-1(MSP-1)の遺伝子多様性は有性生殖減数分裂時における対立遺伝子間の組換えによって生じる。マラリア浸淫地であるソロモン諸島国ガダルカナル島におけるMSP-1遺伝子(msp1)の遺伝子多様性と組換え頻度を調べ、流行度のより低いタイ及びバヌアツと比較した。msp1の5' recombinant type(5'側可変領域における組換え型)、3' sequence type(3'側保存領域のシーケンスタイプ)

及び *msp1* ハプロタイプ（両者の組み合わせ）について調べた。ソロモン諸島、バヌアツ、タイの間では、5' recombinant type 及び、*msp1* ハプロタイプの分布には明らかな地域差が認められた。地域に分布する対立遺伝子の数、異なる対立遺伝子の多重感染率、及び、一人当りの対立遺伝子の数はタイが最高で、ソロモン、バヌアツの順となった。また、クロロキン耐性遺伝子 (*pfcr*t) の多型についても調べて比較した。いずれの地域も 100%耐性型を示したが、耐性遺伝子の型は、タイでは東南アジア型、ソロモンとバヌアツではパプアニューギニア型であった。

③ マラリア対策における治療的介入の意義と今後の課題に関する研究（分担研究者：神原廣二）

マラリア対策は大きく分けて、人対策及び媒介蚊対策である。採り得る方法は、各国の流行状況，社会経済状況によって同一ではないが、薬剤浸漬蚊帳の使用に続く次のコントロールのステップで、治療的介入の持つ意味は重要である。インドネシア、バリ島東部に位置するロンボク，スンバワ島でのマラリアコントロールの経験でも、保健所内に巡回訪問チームを組織し、僻地のマラリア浸淫地の住民に対する迅速診断と早期治療を徹底させることによって、感染者数は劇的に減少した。2003年には、住民から採取された血液塗抹標本のマラリア要請率は、15-30%を示したが、積極的に治療プログ

ラムを進めた結果、2004年には陽性率は5%以下に減少し、以後もその水準を保っている（図6）。その際、顕微鏡的確定診断ができなくても、早期治療に移ることができるマラリア迅速診断キット (ICT Pf/Pv, NOW®MALARIA, Binax, USA) は、たいへん有用であった。ところで、現在、世界的にアルテスネートと他剤との併用療法が、新たなマラリア治療法として、注目を集めている。今年度のインドネシアにおける調査で、その有用性を検討したところ、治療後、速やかなマラリアの輪状体・生殖母体の消失が認められた（図7）。

④ マラリア原虫の薬剤耐性モニタリングに関する研究（分担研究者：朝日博子、泉山信司）

熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性の状況について、容易に情報が収集できる方法の開発を目して、信頼性の高い *in vitro* 試験法を無血清培地を用いて標準化した。クロロキンとアルテミシニンを用いて、熱帯熱マラリア原虫の増殖抑制効果および分裂体形成抑制効果を評価し、従来使用されているヒト血清添加培地と比較したところ、同等の結果を得た（表2）。また、マラリア原虫増殖測定のために、Flow cytometry 及び原虫の lactate dehydrogenase を測定する方法を適用し、従来使用されているギムザ染色後検鏡する方法と比較した。その結果、3法とも同等に増殖を測定でき、薬剤による増

殖抑制効果を同等に評価する事ができた。

⑤ 熱帯熱マラリア表面蛋白の網羅的検索とワクチン開発に関する研究 (分担研究者：坪井敬文、川本文彦)

熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補として研究が進められている抗原は現在までわずかに4種類にすぎず、そのうちの3種類は組換えタンパク質の発現すら困難で、組換えタンパク質を用いた基礎研究はほとんど進んでいない。一方、2002年に公開された熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報からは、200種類ものタンパク質が媒介蚊ステージで発育する生殖母体に特異的に発現し、その中には新たな伝搬阻止ワクチン候補が含まれていると予想されている。それら新規の伝搬阻止ワクチン候補抗原をゲノムワイドに探索するシステムの開発が求められている。

本年度は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、熱帯熱マラリア原虫遺伝子の組換えタンパク質をコドンの改変無く発現することに成功した。生殖母体特異タンパク質をモデルに、80種の組換えタンパク質を網羅的に発現することに成功し、発現成功率は80%以上であった。これらの組換えタンパク質と患者血清を用いることにより、新規マラリアワクチン抗原タンパク質のスクリーニングがゲノムワイドに可能と考えられた。

また、やはりワクチン候補抗原として知られるスポロゾイト表面抗原について、

遺伝子による免疫学的解析を行った。ヴェトナム、インドネシア、ミャンマーから得られたサンプルを用いて検討した結果、熱帯熱マラリア原虫のスポロゾイト表面抗原CS遺伝子のT細胞エピトープ (Th2RおよびTh3R) は特定の型が分布していることが判明し、アフリカに分布する原虫に見られるような激しい遺伝子変異は認められなかった。

⑥ G6PD欠損症の疫学と簡易な診断法の開発、普及に関する研究 (分担研究者：川本文彦)

現在、アフリカにおけるG6PD欠損症の分布は、マラリアの流行地域の地理的相関から、マラリアの自然淘汰により有利な形質として選択された結果とされている。しかし、これまでの我々の東南アジアにおける疫学調査では、G6PD異常症とマラリア感染の間には相関が見られなかった。

G6PD異常症患者は、抗マラリア薬であるプリマキンなどの酸化性薬剤の投与、感染症罹患、ソラマメなど特定の食品摂取などの誘因により暴露された際に、急激な溶血性貧血発作を来すことがあるが、従来、臨床的には無症状で経過することが多かった。今後、相対的に三日熱マラリアが増加し、プリマキンの使用が拡大するに伴って、G6PD異常症が顕在化する可能性は高い。そこで、熱帯のフィールドでも利用しやすい簡便なG6PD異常症の検出法を開発すると共に、各々の国

で基本となる人類遺伝学的なデータを収集してきた。

G6PD 異常症の診断には今日までに多くの方法が発表され、生成 NADPH を蛍光分光光度計で測定する方法、蛍光スポット法、ホルマザン基質の MTT と発色試薬の PMS を使ったホルマザン発色法（藤井らによるリング法、廣野らの迅速法）などが知られている。しかし、いずれの方法も、熱帯地方のフィールドで実際に応用するには種々の問題を抱えている。そこで、WST-8 と 1-methoxy PMS の組み合わせにより、G6PD 活性（NADPH）の定量的測定が可能であることを利用し、簡易測定法を開発し、2003 年に特許を取得した。実際にこの方法を用いて、東南アジアにおいて調査を行ったところ、いずれの国でも、5~10%程度の異常症が検出された（図 8）。各々の国で有意となる型は、地域性や民族構成・歴史を反映したものとなり、特にマレーシアやインドネシアでは、多くの型が見いだされた。

## 2) 国内におけるマラリア防疫体制の強化を目指す研究

### ① 国内におけるマラリア媒介蚊の生息状況に関する研究（分担研究者：津田良夫）

我国には合計 12 種類のハマダラカが生息している。これらの中で生息密度や人吸血嗜好性、人マラリアの媒介能力などを考慮すると、コガタハマダラカ、オオハマハマダラカ、シナハマダラカ、オオ

ツルハマダラカ、チョウセンハマダラカの 5 種が重要なマラリア媒介蚊であるといえる（表 3）。特にコガタハマダラカは 1960 年代まで八重山諸島で流行していた熱帯熱マラリアの主要媒介蚊であり、現在も石垣島のほぼ全域に分布しており、発生源に近い集落では成虫の飛来が確認されている。

今年度、石垣島および西表島で実施した現地調査によって、コガタハマダラカ、オオハマハマダラカ、シナハマダラカ、オオツルハマダラカの生息が確認された。今回は、ハマダラカの発生している水域のおおよその分布の記載を目指したが、石垣島と西表島の溪流では、広い範囲でコガタハマダラカが、石垣島の一部では、オオツルハマダラカが採集された。

また、実際のマラリア侵入経路として考えられる空港については、まず、現在最もマラリア浸淫地からの国際便が多い成田空港を対象とした。成田空港の周辺にも、既にハマダラカの生息が確認されており、平成 16, 17 年度の調査では、設置トラップで、成虫が 6-9 月に採集されている。一方、機内調査で確認されたハマダラカは、アメリカ合衆国からの便での 2 便にとどまり、病原体検査においてもマラリア原虫は検出されなかった（表 4）。

### ② 国内における輸入マラリア患者に関する研究（分担研究者：木村幹夫、中野由美子）



いわゆる「感染症法」の下での発生動向調査、1999年4月－2004年12月のマラリア報告症例の解析を行なった。マラリアの報告症例は約600例みられ、年度別では2000年をピークとし、2003年：76例、2004年：67例と、少なくなる傾向を示している。型別では、熱帯熱マラリアが最も多く、次いで三日熱マラリアであったが、卵形マラリア、四日熱マラリアは少数例にとどまった(図9)。

地域別にみると、推定感染地域でアフリカが最も多く、アジア、オセアニアがそれに次いだ。アフリカでの感染では約70%が熱帯熱マラリアであったのに対し、アジアでの感染では逆に約70%が三日熱マラリアであった。また、地域毎の渡航者数当りでのマラリア罹患率をみると、オセアニアでの罹患率が最も高く、アフリカがそれに次いだ。アジアでの罹患率は非常に低く、オセアニアの約200分の1、アフリカの約100分の1であった。アジアでの感染者数は、総じて減少していたが、多少地域差が見られ、東南アジアを推定感染地とする例に比して、インドを中心とした南アジアを推定感染地とする例はあまり減少していない(図9)。

また、国内への薬剤耐性マラリアの輸入例の実態を分子生物学的手法を用いて経時的に明らかにする為に、感染研に保存されている1984-1998年のマラリア患者薄層標本を用いて基礎実験を行った。ダイレクトシーケンスにより、クロロキン耐性遺伝子 *pfcr*t K76T 変異の検出を

試みた結果、原虫密度が0.1%以上あり、変異遺伝子が野生型遺伝子に比べて20%以上混合感染してれば検出が可能であることが分かった。

3) マラリアの侵入と伝播、対策に関する数理モデルの構築を目指す研究(分担研究者：石川洋文)

韓国は、我が国との間で相互に最もヒトの往来が多く、防疫のうえでも重要だが、1979年に一度終息した三日熱マラリアが、再び1993年ごろより北朝鮮との休戦ラインを越えて侵入し、マラリア感染環が維持されるに至っている。今年度は、韓国におけるマラリア侵入機構の数理モデル構成を行い、パジュ、ヨンチョン地域を対象としてその感染流行拡大状況をシュミレーションした。また、韓国における2000年代以後のマラリア流行低減の推移をマラリア対策成果を検討する観点から上記数理モデルを用いて解析を行なった。また、個々のコントロール要因についてマラリア流行低減への寄与、及びコントロールが行なわれなかった場合についての流行拡大予測を行なった。

さらに、本邦へのマラリア侵入感染拡大の危険性に関する研究として、かつて熱帯熱マラリアの侵襲地であり、現在マラリア媒介蚊の存在が確認されている石垣島をターゲットにして過去の流行状況に関する資料収集、分析を進めた。

D. 考察

今年度の調査で、近年、多くのアジア・太平洋地域の国々で、マラリア対策が成功し、マラリアによる morbidity, mortality が改善していることが確認された。我が国における輸入マラリアの解析においても、感染地がアジアと推定される例は減少し、アフリカと推定される例が増加しているのは、上記のようなアジアのマラリア浸淫地の現状を反映しているものと思われる。

一般的にマラリア対策が進むと、典型的な症状を示す熱帯熱マラリア感染者が減少し、症状の乏しい三日熱マラリア感染者が、相対的に増加するが、その傾向は、多かれ少なかれ、現在殆どのアジア・太平洋地域のマラリア浸淫地でみることができる。従来、マラリア感染の疫学的指標や対策の効果を評価する為には、発熱などの症状を示し病院や診療所を受診した患者からの情報を基にした Passive Case Detection(PCD)のデータが利用されることが多かった。症状を示すことが多い熱帯熱マラリアが、感染の主体である時期には、この PCD のデータと、対象地を選んだ一斉検査による疫学的指標：Active Case Detection(ACD)による年間罹患率や感染率の間に、大きな違いはみられなかった。しかし、マラリア対策の進捗によって、熱帯熱マラリアから三日熱マラリアへ、有症状者から無・軽症状者へと感染の主体が移るに伴って、PCD と ACD の結果が乖離することが、今年度のソロモン諸島における調査でも指摘さ

れた。PCD だけでは、実際のマラリア感染状況が把握できない可能性も大きく、今後は ACD も含めたモニタリングの手法と体制の確立が重要と思われた。

マラリアの疫学的指標を考える場合、ウイルスや細菌の血清型のように、臨床症状の違いや分子生物学的裏づけのある指標があれば、非常に有用である。しかし、現在までのところ、世界的に標準化され利用できるような、マラリア感染の血清疫学的な指標は見つかっていない。

ソロモン諸島におけるマラリアの伝播はタイ、及び、バヌアツよりも強く、地域によってはアフリカの高度流行地に匹敵する。しかし、ソロモン諸島の原虫集団内の msp1 ハプロタイプの数はタイよりも少なく、バヌアツと同程度で、msp1 内の連鎖不平衡は、タイよりも強かった。この結果は、msp1 の組換えは単にマラリア伝播度の強弱で決まるものではなく、集団内に存在する MSP-1 対立遺伝子の数、及び、感染多重度にも依存することを示す。また、ソロモン諸島では他のマラリア流行地域に比べ、マラリア伝播が強いにもかかわらず臨床症状が比較的軽いと報告されている。ソロモン諸島のマラリア原虫集団では、組換えによる新規対立遺伝子の発生頻度が限られており、そのため同一の対立遺伝子の感染が重って、株特異的免疫をうまく誘導しているのかもしれない。

これらのことより、地域のマラリア原虫集団内の MSP-1 対立遺伝子の検索は、

分子疫学的指標として利用できる可能性もあるが、感染者の臨床症状や免疫獲得といった面で、まだ、様々な検討課題が残っている。また、今年度、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用い、熱帯熱マラリア原虫遺伝子の組換えタンパク質を網羅的に発現することができるようになった。このことは、ワクチン候補抗原と同様、血清疫学的に重要と思われるタンパク質のスクリーニングも容易になったことを意味し、今後のマラリア浸淫地における持続的調査が期待される。

ところで、1990年代からマラリア対策が大きく進んだ要因として、薬剤浸漬蚊帳の使用と並んで、アルテスネート等の新しい抗マラリア薬の使用をあげる報告が多い。今後のマラリア対策でも、治療的介入に果たす役割は大きいと思われ、インドネシアにおける調査では、迅速診断と早期治療を徹底させることにより、マラリア感染者数が劇的に減少することが確認された。次のマラリア対策では、患者検出と治療の活動が、いかに僻地にまで及ぶかが大きな鍵となると思われた。また、治療的介入に際しては、地域毎に現在使用されている抗マラリア剤の薬剤耐性と安全性を適格に判断しなければならない。

熱帯熱マラリアの薬剤耐性に関しては、従来から遺伝子レベルの解析と *in vitro*, *in vivo* 試験の結果が、一致しないことが指摘されてきた。また、マラリア感染や抗マラリア薬の暴露を受けていないヒト

の血清を必要とすることなども、マラリア浸淫地で WHO の標準的 *in vitro* 試験の普及を妨げる一因となってきた。今後、ヒト血清無添加培養系による *in vitro* 試験が、フィールドで検討され標準化されることによって、薬剤耐性 *in vitro* 試験の意義が再評価される可能性がある。

三日熱マラリアの根治療法には、プリマキンが不可欠である。今後、相対的に三日熱マラリアが増加し、その使用が拡大するに伴い、G6PD 異常症が顕在化する可能性は、従来 of 報告より高くなると思われる。現在、G6PD 欠損症については、熱帯のフィールドでも応用できるような方法が、ほぼ確立されているが、今後、さらにその標準化と普及をはかっていくことが大切であろう。

我が国へのマラリア原虫の侵入経路として、現時点では、空港が考えやすいが、成田空港の構内や周辺地域で、ハマダラカの生息が確認されている。我が国では、いわゆる空港マラリアの例は、最近報告されていないが、実際にマラリア原虫が侵入した場合、感染が 2 次的拡大を起こす潜在的可能性を否定することはできない。今後は、制度的な監視体制の整備が望まれる。

1990 年代、DMZ を越えて侵入した三日熱マラリアが、再び韓国に定着したことは、高緯度地方における三日熱マラリアの再興という観点から、我が国の対策にも様々な示唆を与えてくれる。ヨーロッパ各国の空港周辺で、いわゆる空港マ

ラリアとして報告される熱帯熱マラリアは、ヨーロッパ各国との間で直行便を持つアフリカの都市型マラリアに起因するものと推測される。我が国との間に直行便がある東南アジア・太平洋諸国の都市で、都市型の熱帯熱マラリアが問題となっているところは殆どない。ただし、インドでは、都市においても三日熱マラリアに感染する例が報告されており、今後、経済発展著しいインドと我が国の間で、人的・物的交流が盛んになった場合、三日熱マラリアが空港マラリアとして問題になる可能性があるかもしれない。

三日熱マラリアは、肝臓休眠体のステージを有し、再発のパターンが複雑なので、感染拡大の数理モデル化は、熱帯熱マラリアより難しいと言われている。今年度は、かつてソロモン諸島における観察から開発した三日熱マラリア伝播モデルに基づき、再発パターンも考慮して、朝鮮半島DMZ近傍を対象とした伝播数理モデル群を構成した。今後は、この数理モデルに修正を加えると共に、我が国への侵入と感染拡大に関して、様々な場合を想定して検討していく必要がある。また、熱帯熱マラリアの伝播・対策に関する数理モデルについても、我が国でかつて行われた八重山地域のマラリア対策の事例やクロロキン耐性株がマラリア流行拡大に果たす役割を、数理モデル化で評価できれば、今後の各国のマラリア対策に大きく寄与すると思われる。

## E. 結論

アジア・太平洋諸国の多くでは、マラリア対策が進み、罹患率・死亡率とも減少しているところが多い。また、それに伴ってマラリア感染の主体が、典型的な症状を示す熱帯熱マラリアから、症状が乏しく経過の長い三日熱マラリアに移っている。この劇的な変化は、既存の疫学的指標やモニタリング制度だけでは、なかなか正確に捉えがたく、今後、新しい疫学的指標やモニタリング手法の開発が望まれる。マラリア対策の次のステップでは、治療的介入の果たす役割が増すと考えられるが、安全で有効な薬剤使用の為に、簡便な薬剤耐性試験や G6PD 欠損症の検出法が、標準化されることが望ましい。

我が国へのマラリア輸入例は、上記のような状況を反映し、最近アフリカからの例が増え、アジアからの例は減少している。アジア・太平洋諸国からの輸入例は、三日熱マラリアが 70%以上をしめているが、国や地域によっては、都市周辺での感染が疑われる例もある。また、1990年代から続く韓国の三日熱マラリアの再興は、一度侵入して生活環を形成すると、高緯度地域であっても、なかなか三日熱マラリア対策が難しいことを示している。我が国においても、ベクターと原虫の監視体制を 制度化して継続していくことが必要である。

## F. 健康危険情報

特になし