

ソロモン諸島、バヌアツ、タイの間では 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。全3地域において共通な msp1 ハプロタイプは少なかったが、ソロモン諸島の msp1 ハプロタイプはタイ、及び、バヌアツと共通するものがあり、分布様式から見るとソロモン諸島はタイからバヌアツにいたる分布の移行段階となった。msp1 ハプロタイプの多様度指数はソロモン ($h=0.78-0.80$) ではタイ ($h=0.89$) とバヌアツ ($0.43-0.68$) の中間となった。

ガダルカナルでは患者一人当たりの 5' recombinant type 数の平均値 (感染多重度) がタイよりも低かった。また、ガダルカナルの原虫集団内の msp1 ハプロタイプの数は6—8個で、タイよりも少なく (16個)、バヌアツと同程度 (6個) であった。

一方、msp1 内の多型ブロック/サイト間の連鎖不平衡は、得られた15カ所の多型サイトで見たと同様、ガダルカナルではタイと比較して強かった。

pfert 遺伝子の多型のシーケンス結果は、ガダルカナルではすべての原虫株がパプアニューギニア型のクロロキン耐性 (アミノ酸残基 72-76番において SVMNT) を示した。

D. 考察

本研究で用いた msp1 ハプロタイプの決定法は、異なる msp1 対立遺伝子の頻度分布、感染多重度、及び、遺伝子内組換え頻度の推定を可能にする。ソロモン諸

島、タイ、バヌアツの3つの地理的地域の比較から、ソロモン諸島ではタイよりも地域あたり、及び、感染者一人あたりのハプロタイプの数、及び、感染多重度が少ないことが明らかとなった。この結果はソロモン諸島における相対的に強い連鎖不平衡なっていることと一致する。

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。このことと本研究で得られた msp1 ハプロタイプの結果を総合すると、msp1 遺伝子の組換えは単にマラリア伝播度の強弱だけで決まるものではなく、集団内に存在する msp1 対立遺伝子の数、感染者一人あたりの msp1 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。

ソロモン諸島では msp1 ハプロタイプの頻度分布や数、多重感染の季節変動が認められなかった。スーダンのようなマラリア伝播の低い地域では季節変動が報告されているが、ソロモン諸島ではマラリア伝播が通年であるので、乾期にマラリア伝播は低下するとしても、それが msp1 ハプロタイプにおける明確な季節変動を反映しないのであろう。

P. falciparum 感染では感染を何度も繰り返すことによって徐々に防御免疫が獲得される。この過程において株特異的免疫が関与すると言われ、この免疫に抗原多型が関わる。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感染が比較的軽症である。ソロモンでは MSP-1 対立遺伝子の数が限られ、さらに異なる対立遺伝子型の多重感染も少ないことが本研究で明らかになった。従って、ソロモン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いることが示唆される。そのため同一の対立遺伝子の感染が重なり、このことがひいては株特異的免疫をうまく誘導しているという可能性を示唆する。

本研究はソロモン諸島における *pfert* 遺伝子の多型を初めて調べたものである。結果から 1995—96 年の時点においてソロモン諸島ガダルカナル島の熱帯熱マラリア原虫集団は 100%、抗マラリア薬のクロロキンに対して遺伝的耐性を有していることが明らかとなった。すでに、我々はバヌアツにおいても耐性が 100%であることを報告している。(Tanabe et al., 2004) 南西太平洋地域ではクロロキンが三日熱マラリアに対しては有効であることから現在も使用されている。その結果、この地域では *P. falciparum* 集団は絶えずクロロキン圧を受けている。*pfert* 遺伝子が単型に維持されて続けているのはこうしたクロロキン圧によるものと思える。

E. 結論

mssl ハプロタイプで見た *P. falciparum mssl* の対立遺伝子多様性はマラリア伝播強度には必ずしも依存せず、*mssl* における組換え頻度は伝播強度だけでなく、

地域に分布する MSP-1 対立遺伝子の数、及び、多重感染の度合いによっても決定されることを示す。

F. 研究発表

論文発表

1. Sakihama, N., Ohmae, H., Bakote, B., Kawabata, M., Hirayama, K. and Tanabe, K. (2006) Limited allelic diversity of *Plasmodium falciparum mssl* from populations in The Solomon Islands, a highly endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 31-40.

2. Dachlan, Y. P., Yotopranoto, S., Susanto, B. V., Santoso, S. H. B., Widodo, A. S., Kusmartisnawati, Sutanto, A., Gerudug, I. K. K., Takagi, M., Tsuda, Y., Tanabe, K., Kawamoto, F., Yoshinaga, K., Kanbara, H. (2005) Malaria endemic patterns on Lombok and Sumbawa islands, Indonesia. *Trop. Med. Health*, 33: 105-113.

3. T. Mita, A. Kaneko, I. Hwaihawanje, T. Tsykahara, N. Takahashi, H. Osawa, K. Tanabe, T. Kobayakawa, and A. Bjorkman. (2006) Rapid selection of *dhfr* mutant allele in *P. falciparum* isolates after the introduction of sulfadoxine/pyrimethamine in combination with 4-aminoquinolines in Papua New Guinea. *Inf. Gen. Evol.* (in press)

学会発表

1. 田辺和裕、先濱直子、I. Rooth, A. Farnert,

A. Bjorkman、平山謙二、熱帯熱マラリア原虫表面抗原における単塩基多型の安定性、第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2005.11.5

2. K. Tanabe, N. Sakihama, H. Ohmae, A. Kaneko, Evolution of antigen polymorphisms of malaria parasites in isolated populations、第7回日本進化学会、2005.8.28

3. 田辺和裕、先濱直子、金子明、熱帯熱マラリア原虫集団に見られる遺伝的可変性、第74回日本寄生虫学会大会、

2005.4.8

4. 先濱直子、大前比呂思、田辺和裕、ソロモン諸島における熱帯熱マラリア原虫の抗原多型、第74回日本寄生虫学会大会、2005.4.8

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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
薬剤治療をどのようにマラリアコントロールに結びつけるか

分担研究者 神原廣二 長崎大学熱帯医学研究所

概要：

マラリア対策は人対策及び媒介蚊対策に分けられる。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コントロールのステップとして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は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。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。

A.研究目的

マラリアコントロール対策は大きく分けて2つの方法が採られている。人対策およ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。サハラ以南のアフリカ諸国では乳幼児のマラリア死亡を下げることにより主眼が置かれているが、マラリアコントロールに結びつくものではない。東南アジア諸国でもマラリア流行度は国により大きく異なり、またそれに立ち向

かう社会経済状況も大きく異なる。従ってマラリアコントロール対策はひとつの均質化したものと考えすることは出来ず、地域の状況に応じた対策が講じられるべきであり、私の場合はインドネシア政府と共同で行った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活動を基礎として、コントロール方法の有るべき姿を考察してゆくしかない。ここでまず気付くことは、両島におけるマラリア流行は、ほとんどの島民が

マラリアフリーな状況にある中で、限局して存在することである。媒介蚊の分布も大きな意味を持つが、最も重要なファクターは流行地は保健所などの医療施設から遠く、交通の便が悪く、医療機関への行程はほとんど徒歩によるため、住民が医療の恩恵を受けるのが非常に困難な状況に置かれていることである。このような状況下での我々の試みの評価から、患者減少のためにいかに治療活動を拡大してゆくかを検討する。

B. 研究方法

- 1) 患者検出治療のため編成した巡回チームの活動と効果判定
- 2) 媒介蚊対策（薬剤浸漬蚊帳配布）の活動と効果判定
- 3) 薬剤耐性の広がりや新しい薬剤導入の可能性研究

C. 研究結果

- 1) 巡回チームの編成メンバーが若手看護師中心であり、マラリア診断治療の経験のないことより、免疫クロマトグラフィー法を用いた診断キットを導入した。巡回チームでさえ連日の訪問の困難な山間森林部に流行地をもつ Meninting 地区では、確定診断と治療薬全服用量の投与が一度に行える点、このキット導入は非常に有効に働いた。問題はその経費である。1人の診断に700~800円も要する費用を政府が賄い切れるとは考えられない。幸いある程度の患者発生を認める地域の流行期（乾期）、症状からマラリアと推定

される患者の60%強が、実際にマラリアに罹っていることから、推定治療を完全治療としても、40%の間違いに抑えられるのだが、これをどのように考えてゆくかが今後の問題となる。巡回チームによって明らかになったことは、Meninting 地域の大部分のマラリアが森林丘陵部に存在し、これまで流行中心と考えられていた海岸地域のマラリアはすでに低レベルにあることである。巡回チームによる診断治療はすぐ効果を示し、マラリア流行を抑え込むが、ある程度まで抑え込んだところで、それ以上の患者減少に繋がらない。そのため突然のマラリア流行が起きることになる。しかし編成チームはこの流行を迅速に把握し対処できる点でも主要な役割を果たす。海岸地域のマラリアは次の項で述べるように蚊対策が有効に働くため、患者検出治療との併用で患者発生ゼロのレベルまでコントロール効果を出すことが可能である。

- 2) Meninting 地域森林丘陵の流行は *Anopheles balabacensis* によるもので、その生態学的性質から薬剤浸漬蚊帳（屋内薬剤残留噴霧を含めて）は無効であろうとの結果を得た。現実に患者検出治療に蚊帳配布を併用したにもかかわらず、低流行を消滅させることができなかつたし、一部村落では突発流行を見た。海岸沿いでは Meninting 地域は *An. sundaicus*、Utan 地域は *An.*

subpictus が主要媒介者であることが示された。その性質からどちらも薬剤浸漬蚊帳が効果的である。問題はヒトよりウシを吸血源として好むため、蚊帳などの効果はヒトからの吸血を防ぐ点では大きいですが、媒介蚊の全体数を減少させることはできない。ヒトが蚊帳の使用を止めたりすれば、すぐ前に変わらぬ吸血を受けるようになる。

- 3) Meninting 地域ではクロロキン耐性遺伝子変異の分析から、Utan 地域では巡回チームによるクロロキン治療患者の追跡調査からどちらの地域においてもクロロキン耐性が高率に広がっていることが確かめられた。ただし、ほとんど効果を示さず治療後も原虫血症が増加するような抵抗度 R-III レベルの耐性はみとめられていない。この両地域に現在インドネシアで普及の進められているアルテスネート・アモディアキン併用療法を導入し、その治療効果を判定した。判定方法は WHO による 28 日間の追跡調査によった。Utan 地域での治療後追跡調査では、1 週間以内にほとんどすべての患者から原虫は消失する。ただし成熟ガメトサイトに対しては効果は弱い。目立った副作用も認められなかった。広い導入によりコントロール効果をあげることも期待できる。

D. 考察

現在一般的認識として、マラリア対策は薬剤浸漬蚊帳の配布が中心となっているような印象があるが、やはりマラリア対策の基本は患者治療にある。この治療がより広く、より多くの患者に適用できるようにすることがマラリア対策にとっては最も重要である。問題は薬剤は管理された状況で使用されなければ、むしろ有害な影響を及ぼす点にある。私達は車で入り込めない森林丘陵地帯のマラリア患者治療を効果的に行う方法として、巡回チームの編成と、マラリア診断キットの導入を試みた。不便でも人口の集中する海岸地帯では、この活動は喜んで受入れられ、蚊帳の効果と相俟って高い効果を示し、患者ゼロも可能である。ところが人口の疎らな森林丘陵地帯では、チームの受入れに時間がかかる。強い拒否反応が続く村落さえある。最終的に活動は受入れられ、歓迎されるようになったのだが、蚊帳の効果が望めないこと、チームの負担が大きいこと、診断キットの高価なことなど克服すべき問題は山積みである。しかし経済活動が拡大した現在、この地域の住民も低地に下り、さまざまな仕事に従事する。Meninting 地域では観光業等への雇用が多い。先に述べたように海岸地帯でも媒介蚊の全体数は減らすことができないので、これらの人々はいつでも感染源となり得るのである。森林丘陵地の治療活動の拡大、徹底のためには、いかなる方法が適当なのか。より効果的薬剤としてアルテスネート・アモディアキン併用は推進されるべきであろう。しかしこの併用療法にも一度の服用量が大人で 8錠という面倒な問題がある。

巡回チームの管理以外に住民がマラリアを理解し、コントロール活動に協力するようになる教育活動がどのように取り入れられるのかが次の課題として控えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoes P. Dachlan, Subagyo Yotopranoto, Bariah V. Sutanto, Sri H. B. Santoso, Anni S. Widodo, Kusmartisnawati, Agus Sutanto, I. K. Komang Gerudug, Masahiro Takagi, Yoshio Tsuda, Kazuyuki Tanabe, Fumihiko Kawamoto, Kazumi Yoshinaga and Hiroji Kanbara: Review: Malaria endemic patterns on Lombok and Sumbawa islands, Indonesia. *Tropical Medicine and Health* 33

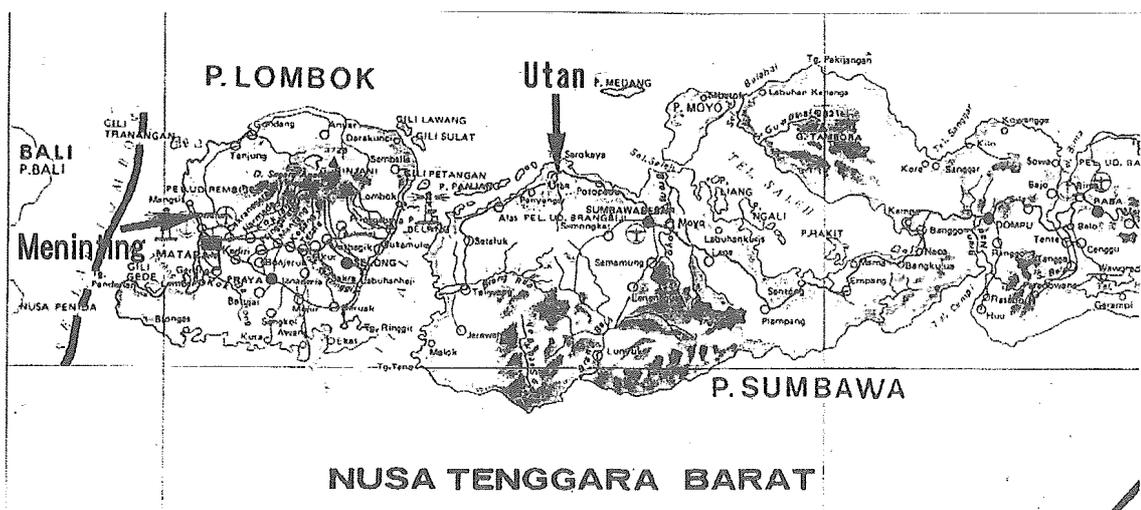
(2): 105-113, 2005.

2. 学会発表

神原廣二, 吉永一未, 高木正洋, 前川芳秀, I. K. Gerudug, Aan Suryanatha, Iskandar Yam, Yoes P. Dachlan: The most basic and important malaria control method is the case detection and treatment. 第74回日本寄生虫学会大会, 米子, 2005年4月8日-4月9日.

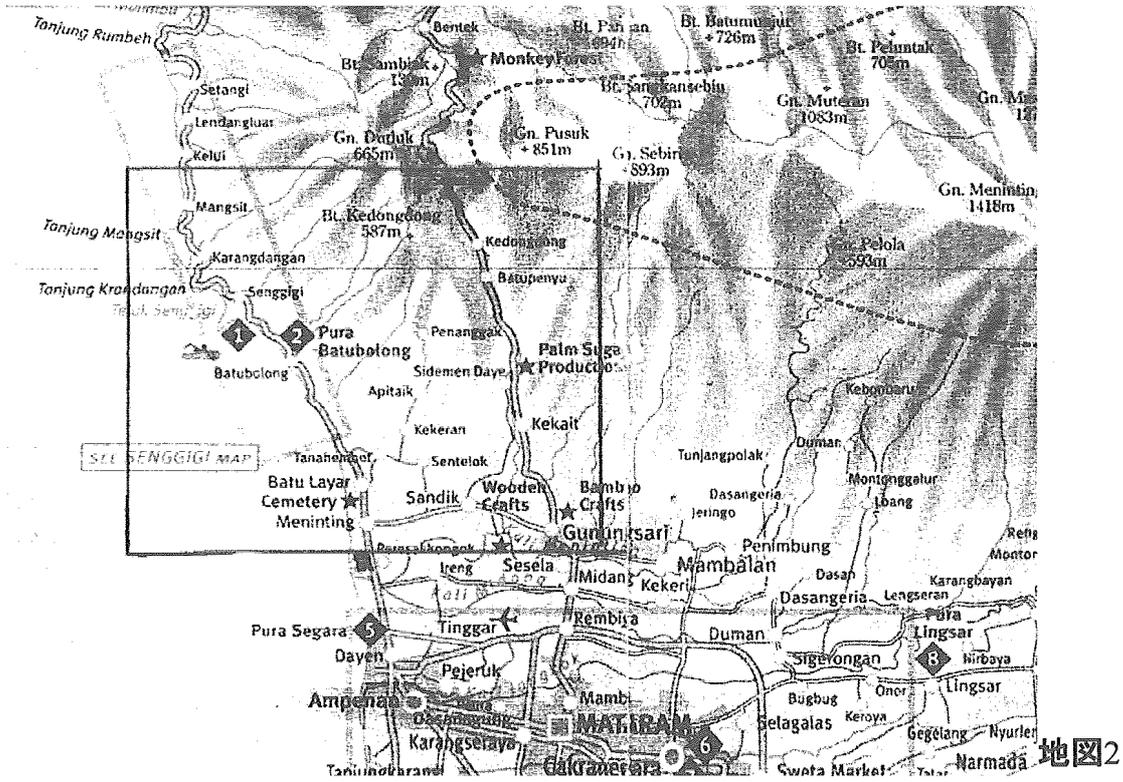
神原廣二, Dachlan Yoes P., Basuki Sukmawati, Iskandar Y., Zeinudin K.: インドネシア, スンバワ島ウータンにおけるアルテスネート・アモディアキン併用療法. 第46回日本熱帯医学会大会, 京都, 2005年10月14日-15日.

Map of the project areas

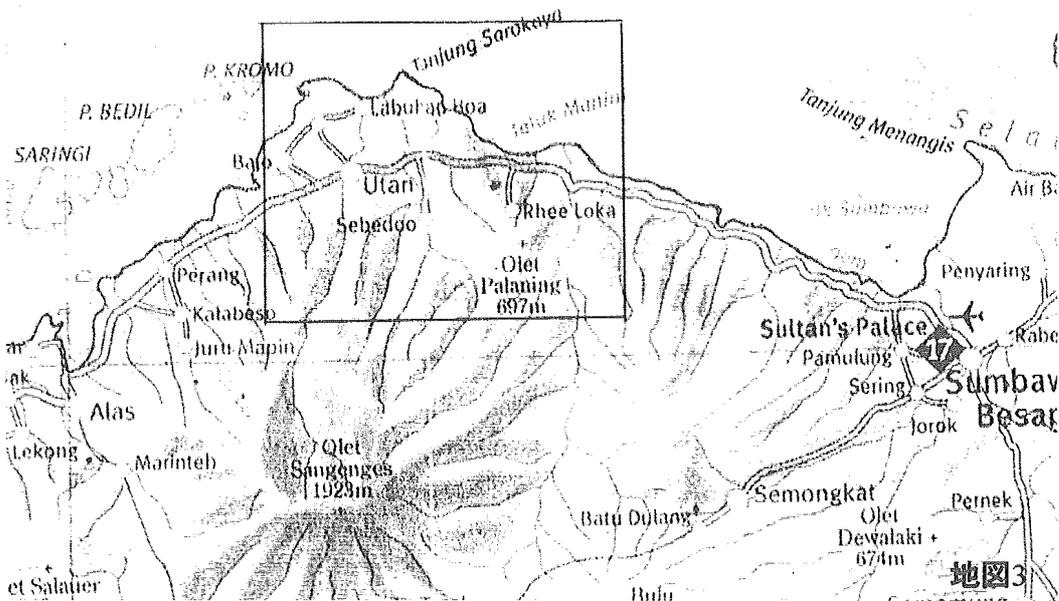


地図1

Map of Meninting area



Map of Utan area



Number of malaria cases detected in Meninting area by dusun in 2002

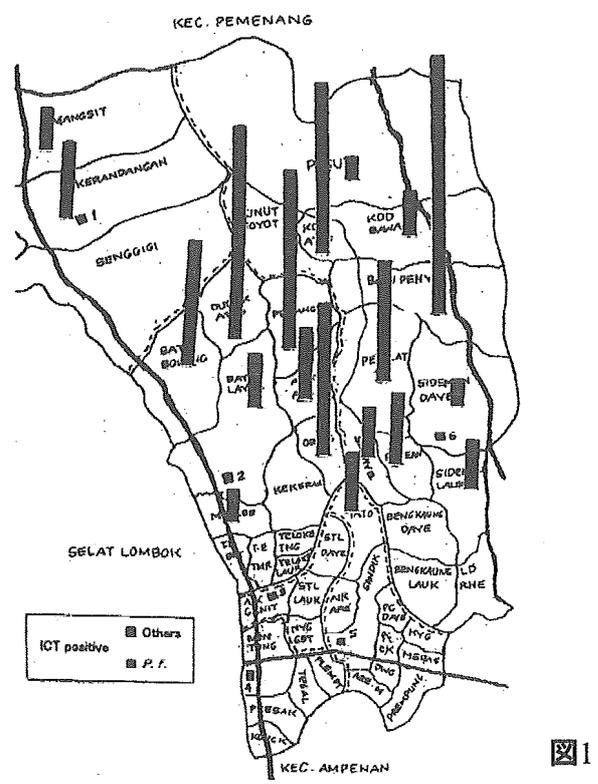
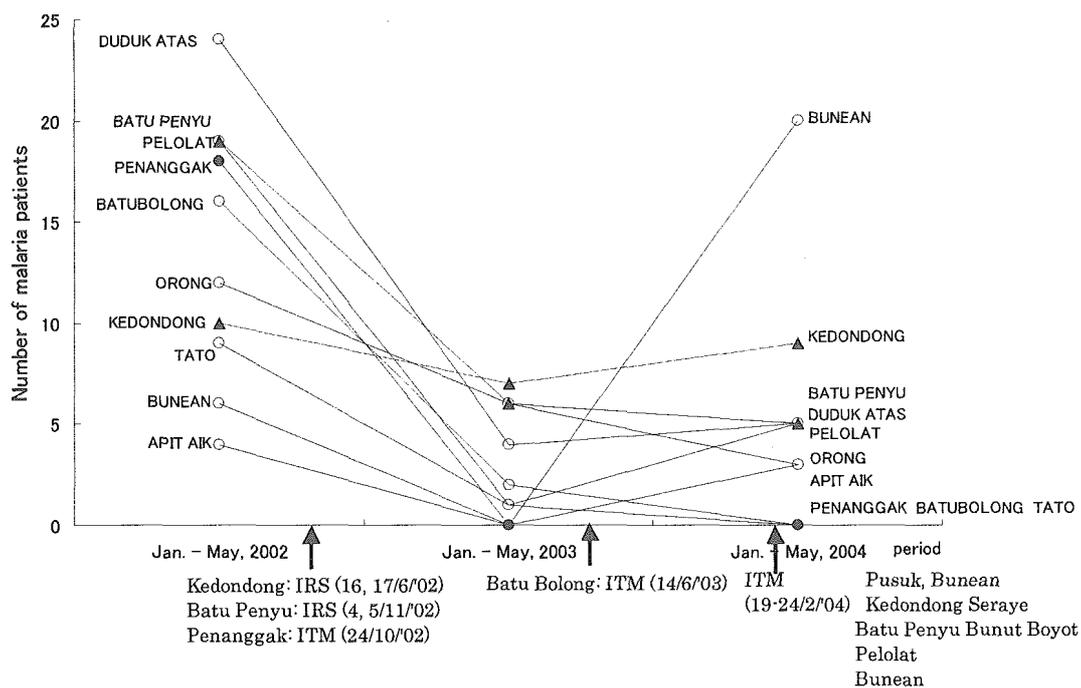
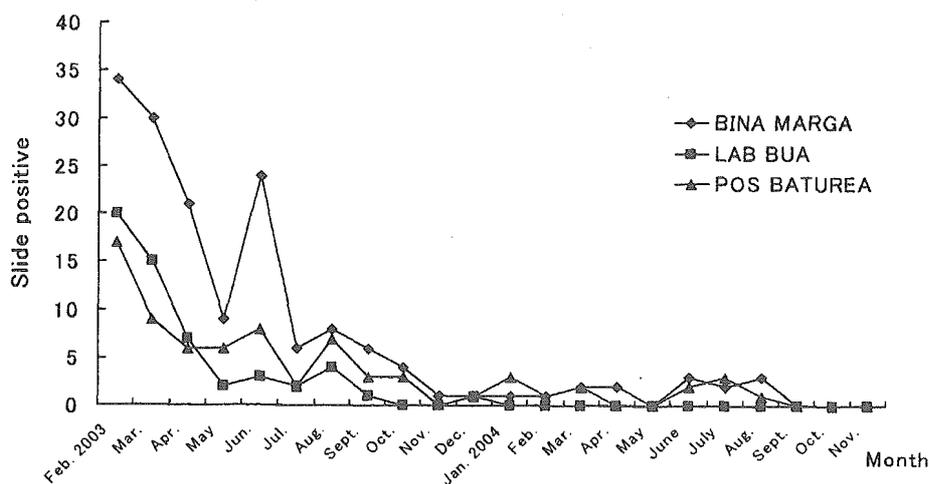


表1	<i>Anopheles sundaicus</i> <i>An. subpictus</i>	<i>Anopheles balabacensis</i>
Breeding place	Lagoons (Batulayar) Fish-ponds (Utan) In Batulayar <i>An. sundaicus</i> > <i>An. subpictus</i> In Utan <i>An. subpictus</i> > <i>An. sundaicus</i>	Small water pools along small streams or small springs in forested hilly areas. Many subvillages in Batulayar Only seseng area in Utan
Biting behaviors	<i>An. subpictus</i> Zoophilic > Anthorophilic Exophilic ≐ Endophilic <i>An. sundaicus</i> Zoophilic ≐ Anthorophilic Exophilic ≐ Endophilic Through the night?	Anthropophilic Exophilic Active time 18:00 - 22:00
Density	Sometimes high Specially <i>An. subpictus</i>	Always low
Detection of sporozoites	<i>An. sundaicus</i> +	<i>An. Balabacensis</i> +
Control method		
Impregnated bed-nets	Effective	Unknown but probably ineffective
Indoor spray	Effective	Unknown but probably ineffective
Larval control by insecticide or by environmental change	Possible	Impossible
New method	?	?
Early detection and treatment	Possible Effect is dependent on coverage	Possible Effect is dependent on coverage
Mass treatment	Effective coverage? drug selection?	Effective coverage? drug selection?



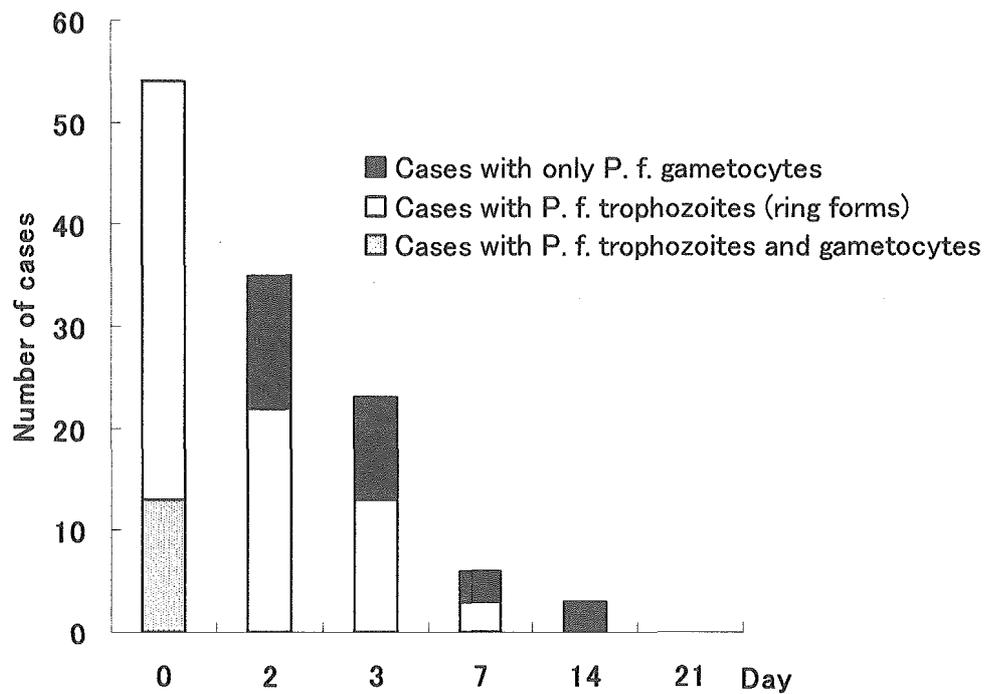
Change of number of malaria patients detected by the case detection team between the corresponding periods of 2002, 2003 and 2004 at hilly forested areas

ITM, insecticide treated mosquito-nets; IRS, indoor residual spray.



Parasite positive rate of suspected cases by subvillage and month in 2003 and 2004

Parasitaemia after treatment with Artesunate-Amodiaquine combination in Utan, Sumbawa



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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
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 国立感染症研究所 主任研究官
研究協力者 泉山信司 国立感染症研究所 主任研究官

要旨： マラリア原虫の薬剤耐性の動向についての情報を蒐集する事を目して、初段階としてフィールドで利用出来る簡便で、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。いくつかの典型的な抗マラリア剤を用いて、熱帯熱マラリア原虫の増殖抑制効果および Schizont 形成抑制効果の評価し、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。

マラリア原虫増殖測定のために、Flow cytometry および原虫の lactate dehydrogenase を測定する方法を適用し、従来使用されている Giemsa 染色後検鏡する方法と比較した。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。

A. 研究目的

マラリア流行においては、その感染者数の把握とともに薬剤耐性株の侵淫度モニタリングおよび薬剤耐性の特性解析は最も重要な課題となる。それらは疫学データとして重要であるばかりでなく、流行地域および日本国内における戦略的マラリア対策に不可欠である。

フィールドにおけるマラリア患者に対する抗マラリア剤の治療効果は原虫の薬剤感受性だけでなく、患者体内における薬剤の代謝、排泄や免疫状態に多大な影響を受ける。このようなすべての要素

を含めて、薬剤効果を評価するのが *in vivo* 試験である。一方、マラリア原虫自体の薬剤耐性を検出するのが *in vitro* 試験法である。In vivo、*in vitro* 試験や遺伝子レベルでの分析結果が一致しない事はしばしば報告されているが、その原因は未だ充分には解明されていない。

こうした背景から、本研究は、①マラリア原虫の薬剤耐性の動向について情報を蒐集する事を目的として、フィールドで利用出来る簡便で、信頼性の高い、*in vitro* 試験法および効果の評価法を確立し、②*in vitro* で得られた薬剤耐性の

特性と遺伝子変化との関連を調べるものである。加えて③疫学的に有用な新規のマーカー分子、遺伝子を探索する事も併せて行う。まず第一段階として無血清培地を用いた薬剤耐性試験法の標準化および薬剤効果の評価法について検討した。

B. 研究方法

増殖因子添加無血清培地 (GFSRPMI) を用いた熱帯熱マラリア原虫培養法を用いて、実験室内で継代維持している熱帯熱マラリア原虫 (Pf) 株 (FCR3/FMG(Gambia), THAI-K, SOLOMON-K) のいくつかの典型的な抗マラリア剤 (Chloroquine [CQ], Quinine, Artemesinin, Quinacrine 等) に対する感受性を、ヒト血清添加培地(HSRPMI)を用いた場合と比較した。この比較は薬剤の存在下で Pf を数日間培養した後、すなわち complete development させて次の赤血球に侵入した後に、感染率 (parasitemia) の増加を測定する方法と、培養開始後 28 時間後に schizonts 数を測定する二つの方法で評価した。

マラリア原虫増殖評価法については、従来用いられている Giemsa 染色標本の検鏡による評価法の欠点を補う方法として先に開発した SYBR green I を使用した Flow cytometry (FMC) およびマラリア原虫の lactate dehydrogenase (pLDH) 測定法を応用して比較した。

C. 研究結果

Asynclonized culture を用いて薬剤の存在下で 1-4 日間培養した後、その増殖カーブからそれぞれ対数プロビット分析で 50%増殖抑制濃度(GIC50)を算出した。また sorbitol を用いて synclonized ring form としての culture を用いて、同様に対数プロビット分析で 50% schizont 形成抑制濃度(EC50)を算出した。その結果、Pf と薬剤のいずれの組み合わせにおいても HSRPMI および GFSRPMI を用いて得られた GIC50 および EC50 はよく一致した。その結果の一部について Table 1 および 2 に示した。また GFSRPMI は HSRPMI と比較してより高い Pf 増殖を誘導するが、50%抑制率で評価すれば結果に大きな影響を及ぼさない。

マラリア原虫増殖測定のために応用した FCM および pLDH 測定法はいずれも迅速に実行でき、測定結果は Giemsa 染色後検鏡する方法と同等の結果を得る事ができた。さらに結果は客観的数値として得られる事、保存しておいて後日測定する事も可能である事等の利点もある。これら 3 方法によって得た測定値の相互関連を示した。その結果の一部について Figure 1 に示した。

D. 考察

WHO in vitro micro test kit では、感染者から採取した全血を 10 倍に希釈する事により、5%の血清が添加される事を利用して試験を実施する。しかし患者の血清中にはマラリア原虫に対する抗体やプリ

ン合成前駆体量の変化等、マラリア原虫の発育増殖を大きく左右する因子が多い事から、可能な限りその影響を避ける事が望まれる。無血清培地の使用はこうした問題を解決出来る。また *in vitro* 薬剤耐性試験は Parasitemia が血液 1 μ l 中に 1000-80000 の感染赤血球が必要である事、またマラリア治療のための投薬がなされていない事等いくつかの制限要項がある。この点においても、無血清培地を用いる事によって、Parasitemia の低すぎる検体の場合に数日間培養して Parasitemia を高くしてから試験する等の方法が簡単に利用できる利点も考えられる。

これまでに得られた結果は実験室内でよくコントロールされた条件下で行った結果であり、実際フィールドにおいて利用出来るシステム、例えばアネロパックを用いた場合等の条件の変化による影響を慎重に調べる必要がある。

増殖評価法に関しては FCM および pLDH 測定法は非常に有効であったが、比較的高い Parasitemia が必要である。実際フィールドの感染者の Parasitemia は低い傾向にあり、特に近年では検鏡で検出されない例も多くなっている。こうした低 Parasitemia の例も疫学的見地からは情報を得る必要がある事からも定量的 PCR 法の導入が望まれる。

全体的にみると、こうした薬剤耐性

試験の対象は熱帯熱マラリア原虫に限定される。他のマラリア、特に三日熱マラリアの台頭の現況を勘案すると、種の鑑別と同時に、他のマラリア原虫の薬剤耐性試験ができる方法も樹立すべきであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiroko Asahi, Tamotsu Kanazawa, Nakami Hirayama, Yousei Kajihara, Investigating serum factors promoting erythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology* 109: 7-15 (2005)

2. 学会発表

朝日博子、泉山信司、高崎智彦、遠藤卓郎、マラリア原虫の Lactate dehydrogenase 測定法を用いた感染、増殖測定法の応用と改良。第 74 回日本寄生虫学会大会：2005 年 4 月

Hiroko Asahi, Investigating factors promoting erythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 54th Annual Meeting: December, 2005 (in USA).

G. 知的所有権の取得状況

1.特許取得：なし

2.実用新案登録：なし

3.その他：なし

Table 1, HSRPMI および GFSRPMI 培養液を用いて得られた CQ の FCR/FMG に対する GIC50

Culture period	GIC50* of CQ	
	Culture medium: HSRPMI	GFSRPMI
Day 1	16.84 +1.16	20.15±0.25
Day 2	14.16 +0.50	16.25 ±1.05
Day 3	14.06 +0.77	14.02 ±0.80
Day 4	13.31 +0.41	16.17 ±0.22

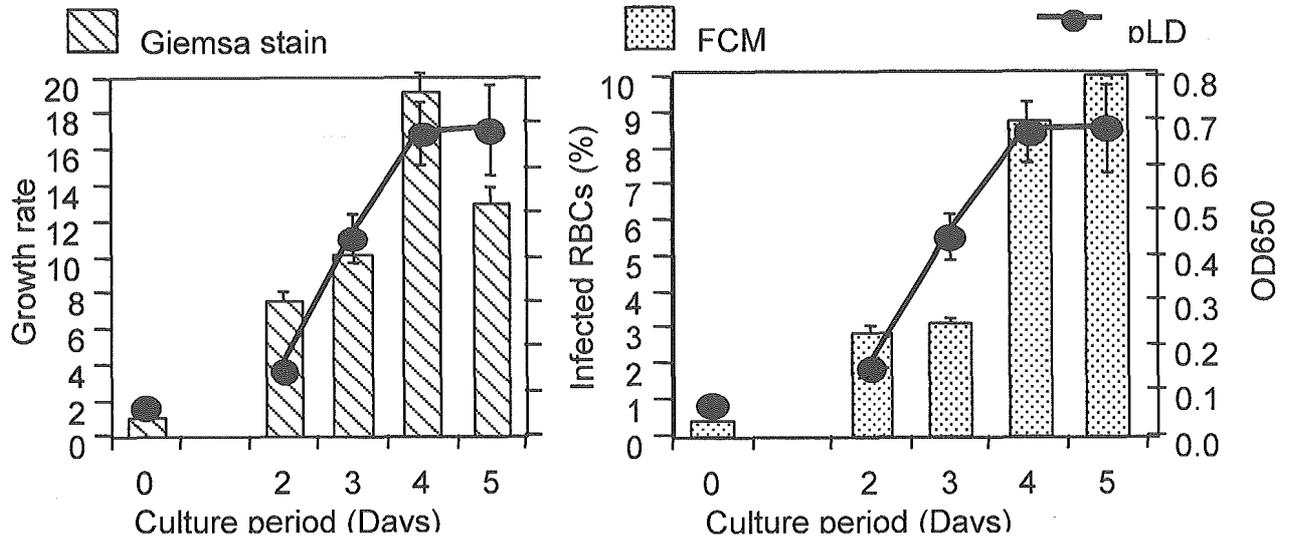
*, nM ±SD

Table 2, HSRPMI および GFSRPMI 培養液を用いて得られた CQ および Artemisinin の FCR/FMG に対する EC50

Culture medium	EC50* of :	
	CQ	Artemisinin
HSRPMI	17.10 +0.18	28.45 ±2.22
GFSRPMI	17.42 +0.32	30.95 ±3.42

*, nM ±SD

Figure 1, Giemsa 染色法、FCM、pLDH を用いて測定した FCR/FMG の増殖



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
コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いた新規マラリア伝搬阻止ワクチン抗原の探索

分担研究者 坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター教授

研究要旨 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。

A. 研究目的

マラリア伝搬阻止ワクチンは、それ単独でマラリアの流行を抑制できるのみならず、現在開発中の他種のマラリアワクチン及び治療薬に対する新たな耐性原虫の拡散を阻止できる点でユニークであり、カクテルマラリアワクチンの必須の構成成分と考えられている。ところが、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(Pfs25、Pfs28、Pfs48/45、Pfs230)にすぎず、未だ実用化に至ったワクチンはない。また、そのうちの3種類(Pfs28、Pfs48/45、Pfs230)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年熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報が公開され、約5400個の遺伝子が予測された。そのうち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。つまり、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ことが可能となっている。本研究課題は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに伝搬阻止ワクチン候補抗原をスクリーニングし、新規のワクチン抗原を同定することを目的に実施した。

B. 研究方法

1) 標的分子の選択

本研究では、データベース PlasmoDB (<http://plasmodb.org/>)の情報を基に、熱帯熱マラリア原虫の生殖母体で特異的に発現している遺伝子192種をワクチン候補抗原タンパク質のスクリーニングの標的に選択

し、プラスミドにクローン化した。

2) PCR法を用いた転写鋳型の作成

タンパク質の合成に用いる mRNA の転写鋳型を作成するため、PCR 法により標的の熱帯熱マラリア原虫遺伝子を含むプラスミドクローンから各遺伝子を増幅した。引き続き、上記のPCR産物を鋳型として再びPCRを行い、標的遺伝子に転写プロモーター配列及びコムギ無細胞タンパク質合成用の翻訳エンハンサー配列が付加された転写鋳型を作成した。

3) 転写

上記のPCR産物を鋳型として転写反応を行い、mRNAを得た。

4) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成

これらの mRNA を鋳型に用いて、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法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合成した。

5) 流行地におけるマラリア伝搬阻止患者血清の採取

タイ国メソ市のマラリア診療所において治療に訪れた熱帯熱マラリア患者の内、血流中に生殖母体の感染が確認された患者から、インフォームドコンセントを得た後原虫感染血液を採取した。これらを、タイ国における主要なマラリア媒介蚊である *Anopheles dirus* にメンブレンフィーダーを用いて実験的に吸血させた。これらの蚊をバンコクの在タイ米軍医学研究所 (AFRIMS) に持ち帰り、1週間飼育した後、感染蚊を個別に解剖して各蚊の中腸の感染オーシスト数を顕微鏡下に算定した。これにより、オーシストの感染

が確認されなかった患者の血清を、伝搬阻止患者血清とした。また、媒介蚊へのオーシストの感染が確認された患者の血清を、伝搬阻止活性のないマラリア患者血清とした。

6) 伝搬阻止ワクチン候補抗原のスクリーニング

上記で発現した組換えタンパク質を、伝搬阻止活性が確認された熱帯熱マラリア患者血清を用いて ELISA でスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

タイ国におけるマラリア患者血液の採取に当たってはタイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。

C. 研究結果および考察

1) コムギ無細胞タンパク質合成法の熱帯熱マラリア原虫タンパク質発現への応用例

先ず、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系が、遺伝子の平均 AT 含量 76%という特異な塩基組成を持つ熱帯熱マラリア原虫の組換えタンパク質の発現に適用可能かどうかを検討した。分子内に 22 個のシステイン残基を有し、複雑な立体構造を取っていることが知られている、既知の伝搬阻止ワクチン候補抗原であるオーキネート表面蛋白 (Pfs25) をモデルとして、原虫本来のコードン (AT 含量が 70%以上) の遺伝子、及び酵母で発現させるためにコードンを改変した人工合成遺伝子 (AT 含量が約 50%) をコムギ胚芽無細胞系を用いて発現し、AT 含量が組み換えタンパク質の発現レベルに及ぼす影響を検討し

た。その結果、いずれの遺伝子を用いても、同等量の組換えタンパク質が発現できた。また、組換え Pfs25 のフォールディングを検討するため、発現された Pfs25 を精製の後、マウスに免疫して抗血清を得た。この抗血清を用いて培養熱帯熱マラリア原虫オーキネートに対して Western blot を行ったところ、いずれの抗血清にも原虫由来の Pfs25 を認識する抗体が誘導されており、その反応性は原虫抗原を還元することにより消失した。また、これらの抗体は、間接蛍光抗体法にてオーキネート表面の原虫タンパク質を認識していた。一方、Pfs25 を発現していない、無性生殖ステージ原虫及び生殖母体は染色されなかった。以上の結果より、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は AT 含量の如何に関わらず、Pfs25 を発現することができ、しかも得られた組換えタンパク質は原虫由来の Pfs25 の立体構造を再現できていることが示唆された。

次に、上記で得られたマウス抗血清の熱帯熱マラリア伝搬阻止活性を測定した。タイ国における流行地の熱帯熱マラリア患者のうち、生殖母体の感染が確認された血液とマウス抗血清を混合した後、マラリア媒介蚊に人工膜吸血装置を用いて吸血させた。その後1週間飼育した後蚊を解剖し、中腸壁に形成されたオーシスト数を算定した。その結果、いずれの抗血清も、2倍希釈で完全な伝搬阻止活性を示し、32倍希釈でも有意な伝搬阻止活性を認めた。したがって、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は、熱帯熱マラリア原虫タンパク質を網羅的に発現する

ために応用可能と考えられた。

2) 網羅的生殖母体タンパク質の発現

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫生殖母体特異蛋白のゲノムワイドな発現を実施するために、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、生殖母体期にのみ発現が示唆されている遺伝子を218種抽出し、そのうち192種のcDNAクローニングを行った。その結果、現在までに150種のクローンを得た。次いでこれらのcDNAクローンの内、全長の塩基配列が確認された82種類についてコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて発現した結果、現在までに80種の組み換えタンパク質を発現することに成功した。

3) 流行地におけるマラリア伝搬阻止患者血清の採取

タイ国メソ市のマラリア診療所において治療に訪れた熱帯熱マラリア患者の内、血流中に生殖母体の感染が確認された患者から、インフォームドコンセントを得た後原虫感染血液を採取した。これらを、タイ国における主要なマラリア媒介蚊である *Anopheles dirus* にメンブレンフィーダーを用いて実験的に吸血させた。これらの蚊をバンコクの在タイ米軍医学研究所 (AFRIMS) に持ち帰り、1週間飼育した後、感染蚊を個別に解剖して各蚊の中腸の感染オーシスト数を顕微鏡下に算定した。これにより、オーシストの感染が確認されなかった患者の血清を、伝搬阻止患者血清とした。また、媒介蚊へのオーシストの感染が確認された患者の血清を、伝搬阻止活性のないマラリア患者血清とした。