

たわが国の現状に合うように、一部内容の修正を行なった。

アンケート調査の場としては、成田空港および名古屋空港両検疫所の了解が得られ、市立札幌病院感染症科、国内某旅行会社の了解も得られた。また、在ギニア日本大使館医務官室、スリランカの某旅行会社で、現在渡航中の日本人を対象とした調査も行なうこととなった。そしていずれにおいても、本年度中にアンケート調査が開始された。

本 KAP 調査に関する既発表論文 3 点の内容を詳細に検討したが、それぞれ元のアンケート調査プロトコールに多少の修正を加えていることが判明した。そして、マラリアのリスク国(あるいは地域)の定義に関して、相互に多少異なっていた。我々の調査についても、集計を行なう時点までにはその点を明らかにすべきであることが明らかとなった。

D. 考察

わが国のマラリア届け出数は 2000 年のピーク以降、毎年確実に減少しており、2004～2005 年においても同様であった。しかし最近数年間でみると、熱帯熱マラリアはわずかに漸増傾向を示している。全体的なマラリアの減少の理由として、2001 年後半からしばらくは、米国での同時多発テロ、イラク戦争、SARS の影響などで海外渡航者、特にマラリア流行地への渡航者数の減少が考えられたが、その後、海外渡航者数は以前のレベルに復帰しつつあり、他の要因も考える必要がある。また、2001 年末には国内で、マラリア予防薬としてメフロキンが発売された。しかし、日本からの渡航者におけるマラリア予防内服の実態については、十分なデータが得られているわけではない。その点で、本年度～来年度に企画した日本人渡航者におけるマラリア予防の調査は、意義あるものと考えられる。

地域別ではアフリカでの感染が最も多く、アフリカとの人的交流が増加していることの反映と思われた。アフリカで罹患するマラリアの多くは熱帯熱マラリアであることから、相変わらず深刻な状況と言える。逆に、アジアのマラリア流行地においては最近、アーテミスニン(チンハオス)誘導体を含む併用療法が積極的に行われ、現地における熱帯熱マラリアの発生が劇的に減少しており、それが日本人渡航者のマラリアにも反映している可能性がある。

海外渡航者のマラリア予防を考える場合、渡航先毎での罹患率が重要であるが、そのためには、渡航先毎での日本人渡航者数の正確なデータが必要である。もちろん、滞在期間も関係する。しか

し、2001 年より出国カードに渡航先の記載を行わなくなり、そこからのデータが得られなくなった。そこで今回、JNTO のデータを元に解析することを試みた。日本人訪問者数を報告している国の多くは、国境到着者数でみているので、かなり正確な数値であると思われる。しかし地域により、それを報告している国の数が様々である。アジアでは殆どの国が報告していたが、アフリカでは報告している国は少なく、オセアニアではマラリア高度流行国であるパプアニューギニアやソロモン諸島が報告していない。今後、これらのデータが広く得られるようになることが望まれる。今回我々が行なった予備的検討では、罹患率としてみると、アフリカではアジアに比して約 250 倍高かった。欧米先進国の渡航者においても同様な数値(約 500 倍)が示されている。アフリカの国でみると、ナイジェリアではケニアに比べて約 7 倍の高さであった。既に欧米のデータから、東アフリカよりも西アフリカの方が罹患率が高いことは示されているが、今回の我々のデータではそれが顕著に示された。オセアニアについては、パプアニューギニアやソロモン諸島では罹患率がかなり高値であることが予想されるが、前期の理由により、それを示すことができなかった。

この様にして日本人渡航者の渡航先別マラリア罹患率を算出することについては、その問題点も検討する必要がある。目的とするところは、マラリア予防対策、特に予防内服を行なわない状況での渡航先毎罹患率を正確に把握することである。全体的に予防内服が多く行われてないとしても、当該国へ行く高リスクの渡航者が確実に予防内服を行なっているとすると、予防内服を行なわない場合の罹患率としてはかなりの増加が予想される。この様な要因については今後、本年度に開始した KAP アンケート調査にて把握する予定である。

また、わが国における土着マラリアの再興を監視するためには、感染地不明の届け出症例における国内感染の可能性についての追求が必要であるが、来年度からはそれを積極的に進めようとしている。

E. 結論

わが国におけるマラリア全体としては、最近数年間は確実に減少傾向を示しているが、アフリカで罹患する熱帯熱マラリアについては、相変わらず問題が続いている。一部の地域や国につき、日本人渡航者の渡航先別マラリア罹患率を算出したが、アジアについては地域毎、国毎のマラリア罹患率をより詳細に把握することが求められる。日本人渡

航者のマラリア罹患の問題を適切に把握するのは、
感染症発生動向調査のみならず、他の資料も活
用しての解析が重要である。

なし
2. 学会発表
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
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
我が国における輸入マラリアの患者発生とその動向

分担研究者 中野由美子（国立感染症研究所 主任研究官）
協力研究者 亀井喜世子（帝京大学医学部 助教授）

国内への薬剤耐性マラリアの輸入例を明らかにするために、感染研に保存されてる 1984 年から 1998 年のマラリア患者薄層標本の種別、地域別区分けを行った。その結果、以前報告されていた全国のマラリア患者発生数の約半分をカバーしていることが分かった。またダイレクトシーケンスにより、クロロキン耐性遺伝子 pfert K76T 変異の検出を行った結果、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。

A. 研究目的

現在、多剤薬剤耐性マラリア株の世界的な流行について、研究者は日々新薬の開発を求められている。これまで世界の多くの研究者により、クロロキンやメフロキン耐性などに関する遺伝子とその変異部位、ならびに世界的な広がりについて明確にされてきた。これは薬剤耐性株のその当時における「横」の流行を調べることになるが、「縦」の流行、つまり年代を溯って世界的な薬剤耐性株の流行を調べる解析は今だ報告が無い。現在、国立感染症研究所には、旧予防衛生研究所時代に行っていた伝染病予防法によるマラリア行政検査にもちいたマラリア患者の薄層標本が保存されている。本研究はこれらの薄層標本から DNA を回収し、多剤薬剤耐性遺伝子の世界的流行度合いを調べると共に、国内への薬剤耐性マラリア株の輸入例の実態を明らかにすることを目的とする。そのために今年度は標本の地域別、年代別整理を行うと共に、次年度に向けて分子論的解析の基盤を固めた。

B. 研究方法

B-1 原虫感染率の計算

光学顕微鏡下で薄層標本を観察し、原虫感染率を%で計算した。その際に薄層標本の写真を CCD カメラ(Olympus DP70)で撮影し、デジタル化を行った。

B-2 薄層標本からの DNA の回収法の確立

熱帯熱マラリア原虫 FCR3 株を、未感染赤血球で希釈し、原虫感染率の異なるギムザ染色した薄相標本を作製した。クロロキン耐性遺伝子 pfert K76T 変異の検出には K1 株を用いた(国立国際医療センター狩野博士より提供)。DNA の回収には、メタノールで脱色した標本を QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen 社)で回収し、Phusion polymekase (NEB)を用いて増幅を行った。1 回目の増幅は 98°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 20 秒の増幅を 40 サイクル行い、2 回目のネステッド PCR には、1 回目の PCR で得られたサンプルを 1ul 用い、98°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 20 秒の増幅を 30 サイクル行

った。PCR の結果、pfcrt 190 bp の増幅を電気泳動によって確認した。使用したプライマーの配列は1回目の増幅には、p1: 5'-TCA CGT TTA GGT GGA GGT TCT TGT-3'ならびに p4: 5'-TGT GAG TTT CGG ATG TTA CAA AAC-3'。2回目の増幅は p2: 5'-TCT TGT CTT GGT AAA TGT GCT CAT-3'ならびに p3: 5'-CAA AAC TAT AGT TAC CAA TTT TG-3'である。PCR 産物の配列決定は p2 をプライマーとして用い、(株)バイオマトリックス研究所に外部依頼した。

C. 研究結果

C-1 感染研に保存される標本での輸入マラリアのまとめ

1984年から1998年までの各薄層標本について患者情報が存在するものについて、ヒトに感染する4種のマラリアの種別を顕微鏡下で区別化を行った。その結果、渡航先が明らかであり、またマラリア原虫が検出できたものは589サンプルであった(表1)。マラリアの種別では熱帯熱マラリアが231例(39%)、三日熱マラリア346例(58%)、卵形マラリア7例(1%)、四日熱マラリア5例(0.8%)であった。地域別の発生では、熱帯熱マラリアはアフリカでの感染が151例と熱帯熱マラリアの65%を占め、第2位は東南アジアの58例(25%)であった。一方、三日熱マラリアは東南アジアが感染の第一位であり、146例(三日熱マラリアの42%)の患者発生数があった。第2位はインド周辺の南アジアであり129例(37%)の感染者数が報告されていた。

後に、C-2で示すように、薄層標本からDNAサンプルを回収し、分子疫学的解析を行うために原虫感染率が0.1%以上(後述)のサンプル数を表2に示す。サンプル数は275枚であり、全サンプルの46%を占める。感染地域別の種類分けでは、熱帯熱マラ

リアではアフリカでの感染が105サンプル(熱帯熱マラリアの70%)と1位を占め、2番目が東南アジアの31サンプル(20%)であった。また三日熱マラリアで一番感染者が多かったのは、南アジアの51サンプル(三日熱マラリアの41%)、2番目が東南アジアの42サンプル(34%)であった。

C-2 薄層標本からのDNAの回収ならびに限界感染率の特定

薄層標本のマラリアサンプルからDNAを回収し、分子疫学的解析を行うために、どの程度感染率が低くても回収が可能か、感染率の異なる薄層標本を作製しDNAの回収を行った。回収方法は、以前、先濱ら(2001)によって報告されていた手法に改善を加えた(研究方法参照)。増幅の対象とした遺伝子は、近年クロロキン耐性遺伝子の原因と報告されているpfcrt遺伝子のK76T変異の検出に適した領域である。原虫感染率3, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01%の薄層標本からDNAを回収し、ネステッドPCRも含めて全70サイクルPCRサイクルを行った結果、3, 0.5%のサンプルからは対象領域190bpを増幅に成功した。0.1%のサンプルについては、非常にPCR産物量は少なかった。よって、増幅に必要な限界感染率を0.1%以上と決定した。

C-3 ダイレクトシーケンスによるpfcrt K76T変異の検出

マラリア流行地では複数のマラリア株による多重感染が指摘されている。そこで、pfcrt K76T変異がどの程度混合感染していればダイレクトシーケンスによってその変異部位を決定できるかの実験をおこなった。熱帯熱マラリア野生株FCR3とK76T変異株K1のゲノムを重量比で混合し、それを鋳型として全70サイクルのネステッドPCRを行い、PCR産物の配列を決定した。その結果、最低でも変異型DNAが20%存在すれば、変異部位のピーク(A227C)を検出することができた(図1)。また変異型DNAと野生型

DNA の等量混合存在下では、同じ高さのピークが検出できた。よって、A227C のピークの高さによって、おおよその混合感染率が推論できることが分かった。

D. 考察

年間患者発生数は厚生省の伝染病統計によると年間50–80例とされてきたため、本薄層標本は当時の発生者数の半分以上をカバーしていると考えられる。ヒューマンサイエンス振興財団が発表した「輸入熱帯病・寄生虫症に対するオーファンドラッグの臨床評価に関する研究」の結果と全発生者数におけるマラリアの種別ならびに感染地は傾向は同一であった。また、薄層標本からの分子疫学的解析を行うために、最低でも 0.1%以上の感染率が必要であると推定されるため、分子疫学的解析に用いるサンプルは全サンプルの約半数(46%)となった。よってヒューマンサイエンス振興財団の発表による、全国のマラリア患者発生者数の約 25%について分子疫学的解析を次年度に着手する予定である。

1940年代から使用されるクロロキンは1960年代にその耐性株が報告されてから、東南アジアやアフリカをはじめ世界各地に蔓延した。我が国でも1990年から1995年の間に薬剤耐性株の変遷によって第一選択薬が一変させている。つまり、1990年には全症例の8割に1988年に承認されたサルファドキシシ/ピリメサミン合剤(ファンシダール)を使用

しているの

に対し、1995年には国内未承認薬のメフロキン単独療法を半数の患者に投与している。これまでクロロキン耐性遺伝子として熱帯熱マラリア原虫の *pfcrf* 遺伝子ならびに *pfmdr1* 遺伝子が、メフロキン耐性遺伝子として *pfmdr1* 遺伝子のある部位の変異が重要であることが報告されている。本研究によって1984年から1998年までの世界的な薬剤耐性遺伝子の広がり、ならびに日本への輸入例の実態が明らかにすることにより、医療現場での第一薬剤選択の評価にも少なからず還元できると考えている。

・F. 研究発表

1. 論文発表

亀井喜世子「わかる！検査値とケアのポイント」便検査 p51–59、2005 大久保昭行、井上友子編集、医学書院、東京
亀井喜世子「臨床検査ガイド 2005–2006」
7 便検査 虫卵ならびに原虫 p928–930、2005

2. 学会発表 なし

・G. 知的所有権の取得状況 なし

表1 国立感染症研究所寄生動物部に保存されている輸入マラリア症例の薄層

Year	Pf				Pv				Po	Pm	total
	Arfica	South Asia	South Ameri ca	South Ameri ca	Arfica	South Asia	South Ameri ca	South Ameri ca	total	total	
1984	5	3	2	0	5	7	20	2	0	0	44
1985	6	4	1	0	1	9	9	0	1	1	32
1986	5	10	3	0	2	8	11	0	1	1	41
1987	5	1	3	0	2	2	10	0	0	0	23
1988	10	2	1	0	1	11	10	0	1	0	36
1989	6	5	0	0	2	10	4	2	0	0	29
1990	6	3	2	0	6	15	9	2	0	0	43
1991	10	4	0	2	1	16	9	2	0	0	44
1992	8	4	1	0	2	8	9	3	0	1	36
1993	10	3	1	0	3	9	3	2	0	0	31
1994	12	3	2	0	6	15	5	2	1	0	46
1995	8	3	1	0	2	10	5	0	1	0	30
1996	9	2	1	0	3	2	8	2	1	1	29
1997	23	3	3	0	9	14	12	3	0	0	67
1998	28	8	0	0	5	10	5	1	1	1	59
total	151	58	21	1	50	146	129	21	7	5	589

塗抹標本の種別・地域別分類 (1984—1998)

表2 国立感染症研究所寄生動物部に保存されている輸入マラリア症例（原虫密度0.1%以上の薄層塗抹標本の種別・地域別分類（1984—1998））

Year	Pf				Pv				Po	Pm	total
	Arfica		South Asia	South America	Arfica		South Asia	South America	total	total	
1984	5	0	0	0	2	0	6	0	0	0	13
1985	3	3	1	0	1	2	2	0	1	1	14
1986	4	3	1	0	1	5	5	0	1	1	21
1987	2	1	1	0	2	0	3	0	0	0	9
1988	8	1	1	0	1	3	2	0	0	0	16
1989	5	3	0	0	1	2	3	0	0	0	14
1990	3	1	1	0	2	4	6	2	0	0	19
1991	6	4	0	1	0	5	4	0	0	0	20
1992	3	1	1	0	0	0	5	0	0	0	10
1993	7	0	1	0	1	2	1	0	0	0	12
1994	8	2	2	0	2	5	3	1	0	0	23
1995	6	2	1	0	0	2	1	0	0	0	12
1996	8	2	0	0	1	1	2	1	0	0	15
1997	14	2	2	0	5	6	5	3	0	0	37
1998	23	6	0	0	3	5	3	0	0	0	40
total	105	31	12	1	22	42	51	7	2	2	275

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
「マラリア流行の数理解析」に関する研究

分担研究者 石川 洋文 岡山大学環境学研究科教授

研究要旨 現在本邦において侵入したマラリアが感染拡大した事例は報告されていない。しかしながら、隣国韓国では、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、再びDMZを越えて侵入し、マラリア感染環が維持されるに至った。本年度は、韓国におけるマラリア侵入機構の数理解析を行い、その感染流行拡大状況をシミュレートした。また、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、過去の流行状況に関する資料収集、分析を進めた。

A. 研究目的

1. アジア地域では、マラリア対策が進み、マラリア流行の様相に変化が現れている。しかし、朝鮮半島では、近年三日熱マラリアが再興するに至り、また、マラリア流行国からの国際航空便によるマラリア侵入なども懸念されている。本研究では、マラリア伝播数理解析モデルに基づき、国内へのマラリア感染侵入による感染環の成立の可能性について検討する。このため、研究初年度においては、朝鮮半島において1990年代に再興したマラリア流行について、マラリア伝播数理解析モデル群を構築し、韓国におけるマラリア感染拡大状況の解析を行い、更にマラリア・コントロール効果について検討を行った。来年度以降これらの知見をもとに

マラリア媒介蚊の生息する八重山諸島などを対象として国内マラリア侵入数理解析モデルに関する研究を推進する。
2. クロロキンに抵抗性を持つマラリアがアジア太平洋地域に拡散を見せている。治療的介入が薬剤耐性マラリアの蔓延を導いている。マラリア制圧の進んだ地域に対して介入の継続についてモデルを通して検討する。合わせて薬剤耐性株がマラリア流行拡大に果たす役割を、シミュレーションにより予見する。

B. 研究方法

1. マラリア伝播数理解析モデルの構成
報告者らが従前ソロモンを対象として開発した三日熱マラリア伝播モデルに基づき、新たに朝鮮半島DMZ近傍を

対象とした伝播数理モデル群を構成した。本モデル群は、北朝鮮、韓国状況に対応して北朝鮮モデルと韓国モデルに分かれ、北朝鮮モデルは、韓国モデルに作用するものとした。いずれもDeterministicモデルである。

2. 肝臓休眠体と再発パターン 今回対象とした朝鮮半島における三日熱マラリアstrainは、発症者の中で肝臓休眠体による再発の割合が90%前後ときわめて高く、その再発パターンは、刺咬後の潜伏期間が短期(1~3月)、長期(6月~)に区分され、比較的長期に亘り再発を起こす。本研究では、2種の再発パターンを、指数分布及び対数正規分布でモデル化しマラリア伝播モデルに組み込んだ。

3. ストカステック伝播数理モデルの構成 マラリアの国内侵入は、マラリア媒介蚊の生息する地域において、少数又は1人の感染者より感染拡大が開始されると考えられる。少人数の集団では、流行に揺らぎが大きく作用し、その結果これらをDeterministicモデルで取り扱うのみでは不十分である。流行の中央値とともに信頼区間の範囲を予測し、また流行再興の確率を調べることは、マラリアの国内侵入監視の評価を行う上で、有用な道具となる。

C. 研究成果

1. 朝鮮半島DMZ地域を対象とした三日熱マラリア伝播数理モデルの構成

を行ない、同地域におけるマラリア再興の状況の解析を行なった。

2. 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・コントロールの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。

3. アジアにおける日本住血吸虫症のコントロールについての数理モデル解析について以下の研究成果を得た。

日本住血吸虫症のフィリッピン・ボホール島に於けるコントロール対策に関して、数理モデルを構築し、シミュレーションを通じて、今後の再流行予測、コントロール効果判定解析を行った。

D. 考察

i) 朝鮮半島のマラリア媒介蚊 *An. sinensis* は、6月より9月まで出現し、高い季節性を示す。媒介蚊季節動態と再発パターンモデルに基づき、高い再発率と幅広い再発期間にも拘わらず、マラリア発症者の季節変動をほぼ再現することが出来た。なお、ピークにはデータとシミュレーションには、若干のずれが生じた

ii) 朝鮮半島DMZ近傍の韓国2地域を

対象としたマラリア流行シミュレーションで同地域の流行再興をフォローアップすることが出来た。

iii) 2001年に発生した異常気象(長期に亘る少雨による乾燥持続)は、平年に比較して大幅にマラリア感染蚊密度を減少させた。シミュレーションによればこの現象が当年、翌年とマラリア流行低減に大きく寄与している。今後国内マラリア侵入の研究においても異常気象の影響を考慮する必要がある。

iv) 北朝鮮(DPRK)のマラリア流行状況については確度の高いデータを得ることが困難であり、今後検討すべき余地がある。

E. 研究協力者

栗原考次

岡山大学大学院環境学研究科教授 マラリア感染データの統計的解析とホットスポット検出

福留彩子

岡山大学大学院医歯学総合研究科、環境保健モデル数理学研究室 理論疫学、本邦への新興感染症の侵入モデル

藤田一寿

岡山大学大学院自然科学研究科、環境保健モデル数理学研究室

朝鮮半島地域の三日熱マラリアモデル

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa, H., Ohmae, H., Pangilinan,

R., Redulla, A. and Matsuda, H. Modelling the dynamics and control of *Schistosoma japonicum* transmission on Bohol island, the Philippines. *Parasitology International*. 55 (1). 23-29 (2006).

2) Fujita K., Chen TT, Nishina T and Ishikawa H. Modeling of Re-emerging *Plasmodium vivax* in the Northern Area of the Republic of Korea Based on a Mathematical Model. *J. Fac. Environmental Sci. & Tech. Okayama U.* 11(1). 1-7 (2006)

3) Ishikawa H. Mathematical modeling of *Echinococcus multilocularis* transmission, *Parasitology International*, 55S, S259-S261 (2006)

4) Nishina T, Chen TT, Fujita K, Ishikawa H. A stochastic model of *Echinococcus multilocularis* focusing on protoscoles. *J. Fac. Environmental Sci. & Tech. Okayama U.*, 11(1). 9-14 (2006)

2. 学会発表

1) 藤田一寿、西浦 博、石川洋文、韓国北部地域における三日熱マラリア再興の数理モデル解析. 第74回日本寄生虫学会大会、米子市 (2005)

2) 福留彩子、藤田一寿、仁科朝彦、陳甜甜、石川洋文、国内SARS侵入を想定した場合の数理モデルによる流行予測、ワークショップ「熱帯、輸入感染症に対する国内対応」第46回日本熱帯医学会大会、京都市 (2005)

3) Ishikawa, H., Mathematical model

of malaria transmission and control— Re-emerging of vivax malaria in Korea. Malaria and enteric protozoan infections in Southeast Asia. Tokyo (2006)

4) Ishikawa, H., Mathematical modeling of *Echinococcus multilocularis* transmission in Japan. Taeniasis / Cysticercosis and Echinococcosis International Symposium with Focus on Asia and the Pacific. Asahikawa, Hokkaido (2005)

5) 福留彩子、石川洋文、SARSによる院内感染の影響シミュレーション、感染症理論疫学研究大会 2006 - 数理疫学・数理生態学・数理統計学の融合、東京 (2006)

厚生労働科学研究費（新興・再興感染症研究事業）
研究協力報告書

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
「マラリア感染データの統計的解析とホットスポット検出」に関する研究

研究協力者 栗原 考次 岡山大学大学院環境学研究科教授

研究要旨 近年、マラリア感染者数は対策の進捗などにより大幅に減少しているが、マラリア感染のさらなる抑制に向け、より詳細なマラリア感染データの解析に加えモニタリングなど必要である。本研究では、マラリア浸淫地における感染データに対して、疫学的・統計学的な観点から解析を行った。また、時系列、空間的变化、さらに地域、時点、共変量において集積性が見られるホットスポットの検出を行うために必要とされる準備と新しい解析法の開発を行った。

A. 研究目的

近年、東南アジア・南太平洋地域におけるマラリア感染者数は、対策の進捗により大幅に減少しているが、さらなる抑制に向けたモニタリングなどの対策が不可欠である。本研究では、マラリア浸淫地における感染データを疫学的・統計学的な観点から解析するとともに時系列、空間的变化を調べる。さらに、地域、時点、共変量において集積性が見られるホットスポットの検出を行う。また、コーホート調査やモニタリングの方法についても検討する。

B. 研究方法

南太平洋西部のメラネシア地域にあり、ソロモン諸島に属するガダルカナル島において、北東海岸に位置するマラリア浸淫地3村において観測されたマラリア感染データを対象として、疫学的・統計学的な解析を行う。すなわち、性別、年齢、身長、体重、BMI、地域などの共変量をに基づき、感染の有無に関するオッズ比の計算、感染率に対するポアソンモデルの当てはめ、感染率に対するロジスティック回帰分析、各共変量に対する樹木構造接近法による解析、

データのバイアスを考慮した解析、感度分析などによる解析結果の信頼性・安定性の評価、エシェロン解析とスキャン統計量による地域、時点、各共変量における集積性の検出、などについて研究をおこなう。

C. 研究成果

マラリア浸淫地における感染データに対して、性別、年齢、身長、体重、BMI、地域などの共変量をに基づき、感染の有無に関するオッズ比の計算、感染率に対するポアソンモデルの当てはめ、感染率に対するロジスティック回帰分析、樹木構造接近法による解析などを行った。また、時系列、空間的变化、さらに地域、時点、共変量において集積性が見られるホットスポットの検出を行うために必要な新しい解析法の開発を行った。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) Koji Kurihara, Spatial clustering based on echelon and its applications, Proceedings of the

International Workshop on Modelling and Data Analysis in Environmentrics, Geostatistics and Related Areas, 1-5, 2005. (Invited Paper)

2) Koji Kurihara, Hiroshi Suito and Fumio Ishioka, Surveillance tools for detection of spatial-temporal critical areas based on scan and echelon techniques, CD-ROM of 90th The Ecological Society of America and 9th International Congress of Ecology, 2005. (Invited Paper)

2. 学会発表

1) Koji Kurihara and Fumio Ishioka, Detection of Hotspots for Multivariate Spatial Data, Proceedings of International Statistics Conference for statistics in the Technological Age, Kuala Lumpur, 2005.12.28, 103. (Invited Speaker)

A Briefer of Malaria in the Philippines A Report for Geographical Information System for Malaria Control

(Malaria Study Group, Research Institute for Tropical Medicine, Department of Health,
Manila, Philippines)

Introduction and background

Much of the information that is known about malaria in the Philippines have been derived from field-based research studies conducted by the Malaria Study Group of the Research Institute for Tropical Medicine, Department of Health. This report attempts to summarize malaria in the Philippines based on these studies and goes beyond mere reporting of malaria statistics. The major areas where these studies were carried out were Morong, Bataan, and Agusan del Sur; other areas were Apayao, and Palawan provinces. The Study Group believes that evidence based on reliable information is a foundation for effective malaria control and the platform on which to present the information is one that allows spatial and geographical analysis of data (see Annex 1).

Epidemiology

The number, prevalence and availability of the gametocyte in humans, opportunities for human-vector contact, and the vector's potential for malaria transmission maintain disease transmission. In the Philippines where malaria prevalence is low, and the period when vector numbers are large enough for disease transmission is limited, maintaining transmission is dependent upon the parasite's survival in the human host. Malaria incidence by age for either sex decreases with increasing seropositivity rates. The prevalence of parasitemia and high malaria antibody titers during the maximum transmission season are higher for males than females. Since its chances for surviving the minimum transmission season are lesser if it survives in the vector, the parasite developed mechanisms to secure its survival during this period in the human host. *P. vivax* evades human host immune response by being in the hypnozoite stage; *P. falciparum* survives in its sexual stage (i.e. gametocytes) (this is further discussed below in the studies on antigen diversity). Each species is equally transmissible and transmission appears to be independent of each other. Studies in Morong have shown acquired immunity to malaria. Malaria incidence by age for either sex decreases with increasing seropositivity rates. The prevalence of parasitemia and high antibody titers during the maximum transmission season are higher for males than females. Children below the age of 10 years are at greatest risk for infection and disease. Adult males may be the human reservoir host during the minimum transmission season.

In communities with reported malaria cases, livelihood activities are a major risk factor for infection. The months of intense farming activities coincide with the months when human-biting rate of *An. flavirostris* is highest. It has been observed that perceptions of the cause and prevention of malaria, and treatment-seeking patterns put one at risk for acquiring and transmitting the parasite. The interactions between parasite, vector and host occur in physical (geographical and meteorological) and social environments and give rise to two well-defined transmission seasons – minimum and maximum transmission seasons. Climatic and geographical factors affect vector numbers and vector longevity and human activities in rural agricultural communities.

Malaria transmission in the Philippines has been described as both stable and unstable. Malaria is stable in areas where transmission is maintained from one year to the next. Outbreaks of malaria in some others and decrease in number of cases in others (where treatment with more effective drugs and improved vector control) reveal that the ‘stability’ is precariously in equilibrium and potentially unstable. The malaria transmission in most areas in the Philippines is maintained by very low vectorial capacity; tipping points exist that can move in the direction of interruption of transmission with improved control measures that either further decrease reservoirs of infection and human vector contact.

Studies on malaria parasites

The reported species are *P. falciparum*, *P. vivax* and infrequently, *P. malariae*. A relationship between *P. vivax* and *P. falciparum* is one of synchronicity. Molecular biology studies of malaria parasites were on the following: (a) antigen polymorphism of *PfAMA1*, *PfMSP1*, *PvAMA1* and *PvMSP1*; (b) molecular analysis of drug-resistant malaria (chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine); and (c) point mutation of *Pfprt* gene. From isolates in Morong, Bataan collected over two years, Pasay (1997) suggested that *P. falciparum* faces a genetic annual bottleneck during the minimum transmission season that limited parasite genetic diversity. A high degree of *P. vivax* diversity was observed and it is surmised that because of the large *P. vivax* parasite diversity, a large number of individuals are infected with hypnozoites. From studies of the sequence of the *Pfprt* gene at defined loci, Cheng *et al* (2003) have suggested that the evolution of chloroquine resistance in the Philippines arose independently from other strains in South Pacific.

Studies on the vector

The known incriminated anopheline vectors are: *An. flavirostris* (primary), *An. balabacensis*, *An. litoralis*, *An. maculatus*, and *An. mangyanus*. *An. flavirostris*, *An. maculatus* and *An. mangyanus* are widely distributed; *An. litoralis* is mainly found in Sulu and Tawi-Tawi while *An. balabacensis* in Palawan. There are minimum and maximum transmission periods for malaria. *An. flavirostris* breeds in slow-flowing streams and pools in foothills; floodwaters wash away the breeding sites during the rainy

season. The man-biting rates of *An. flavirostris* increase during the summer months; likewise, the number of malaria cases peaks during the hot, dry season and fall during the peak of rainy season.

The malaria control program implements insecticide based vector control strategies as the major control intervention. Insecticide Treated Nets (ITNs) is the primary control option while indoor residual spraying is reserved for epidemic situations. Studies on the characterization of the malaria vectors led to more detailed DNA studies to determine presence of sibling species complexes and efficacy of insecticides used by the malaria control program have been made. With community wide and intensive use of insecticide based control strategies, the development in of resistance in malaria vectors is possible. The last documented resistance in *Anopheles flavirostris* was to dieldrin in the early 60's resulting in a total shift to DDT (MCS, 1997). Susceptibility tests conducted in the last decade indicated that *Anopheles flavirostris* and *Anopheles litoralis* were susceptible to a wide class of compounds. However, in most instances these test results were based on very limited data sets and sample sizes, and often from single locations within respective region/province.

Through a Roll Back Malaria initiative, a network of Department of Health entomologists was formed to conduct susceptibility and bioassay tests in selected areas. The formation of the Nationwide Surveillance Network ensued periodic determination of susceptibilities of *Anopheles flavirostris* from six sentinel malarious provinces against the most commonly used insecticides in malaria control namely; alphacypermethrin and deltamethrin. Another important contribution of the network was the efficacy evaluation of insecticide treated nets.

Studies on treatment

Until 2002, chloroquine was used singly to treat uncomplicated falciparum malaria; Fansidar (sulfadoxine/pyrimethamine) was used as a second line drug. Treatment failure to chloroquine was observed in clinical trials conducted in Palawan during the early 1990s; in-vitro tests revealed chloroquine resistance as early as the 1970s. Results of efficacy studies of chloroquine plus sulfadoxine and pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in two provinces in Mindanao in 2001 were the basis for a revision of the treatment guidelines. Currently, CQ+SP is the firstline drug and Coartem, secondline drug; parenteral quinine plus (quinine plus any of the following – tetracycline, doxycycline and erythromycin) is recommended for severe falciparum malaria. Surveillance of the efficacy of the firstline drug combination is currently carried out in sentinel sites. Falciparum malaria has been the major type of malaria reported; in 2004, however, it was observed that 73% the reported cases were vivax malaria. It is not known whether these are relapse cases because of poor compliance to radical treatment or poor response to chloroquine. An ongoing study of the efficacy of chloroquine to this species of malaria to date has not observed any treatment failure.

Studies on malaria control

The main challenge that the malaria control program has always faced is early detection of malaria cases. These are due to absence of skilled manpower in remote, malarious areas. It was observed that self-treatment for perceived malaria was rampant in endemic areas. Diagnosis of malaria by following a clinical algorithm was attempted; it had shown varying results in detecting malaria and its application. Field studies of rapid diagnostic tests gave various results. RITM is currently participating in a WHO/RBM endeavor to establish a quality control system with regard to malaria RDTs.

Important data for monitoring control programs are derived from records at the rural health unit, district or provincial hospital, and any health facility where diagnosis of malaria is made. This passive method of case detection from symptomatic individuals who present themselves for diagnosis and treatment is helpful if health facilities are accessible and diagnostic capabilities are available and satisfactory.

Much of the operational support of malaria control comes from two major sources: Global Fund and Roll Back Malaria (with support from AusAID). These are: nationwide training of malaria microscopists; establishing a quality assurance system for malaria microscopy; provision of the secondline drug, Coartem; insecticide treated bednets; rapid diagnostic tests; bioassay of insecticides used in treating bednets; susceptibility testing of the vectors to these insecticides; and therapeutic efficacy studies of antimalarials for uncomplicated falciparum malaria.

Research needs to improve malaria control

The research needs to improve malaria control are listed in the Table below.

Aspects	Topics
Vectors	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incriminated vectors <ol style="list-style-type: none"> a. Vectorial capacity, b. Competency c. Insecticide susceptibility and parasite refractoriness 2. Update vector geographical distribution
Parasite	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>P. vivax</i> <ol style="list-style-type: none"> a. Characterization b. Relapse studies – intrinsic hypnozoite activation in single and mixed infections (i.e. with <i>P. falciparum</i>) 2. <i>P. falciparum</i> <ol style="list-style-type: none"> a. Genetic diversity and distribution 3. Antigenic variation <ol style="list-style-type: none"> a. HRP2

<p>Therapeutic</p>	<ul style="list-style-type: none"> b. LDH c. DHFR 4. Therapeutic efficacy <ul style="list-style-type: none"> a. Extend sites of TES of <i>P. vivax</i> b. Other atemisinin combination drugs
<p>Product development</p>	<ul style="list-style-type: none"> 1. Five-day quinine plus tetracycline in non-severe falciparum malaria 2. Screening of natural products (e.g. medicinal plants) for antimalarial and insecticide properties 3. TES of chloroquine in <i>P. vivax</i> in Northern Luzon; 4. TES of primaquine in <i>P. vivax</i>
<p>Epidemiology</p>	<ul style="list-style-type: none"> 1. Screening of natural products (e.g. medicinal plants) for antimalarial and insecticide properties 1. Drug combination treatment and changing trends of infection and disease 2. Environment and meteorological changes and changing trends of infection and disease (see ANNEX 1) 3. Co-morbidity (other parasitic disease) in endemic areas 4. G6PD deficiency prevalence and distribution 5. Evaluation and validation of current indicators used in categorizing endemic areas 6. Indicators to evaluate effective control and document interruption of transmission (e.g. in school-aged treatment)
<p>Control activities</p>	<ul style="list-style-type: none"> 1. Critical period for bednet insecticide treatment 2. Rapid assessment for outbreaks 3. Efficacy of insecticide residual-spraying in controlling outbreaks

Bibliography:

Chen, N., Kyle, D.E., Pasay, C.M., Fowler, E.N., Peters, J.M., and Cheng, Q. (2003). Pfprt allelic types with novel amino acid mutations in chloroquine resistant Plasmodium from the Philippines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (11): 3500-3505.

Espino, F., Manderson, L. (2000). Treatment seeking for malaria in Morong, Bataan, The Philippines. *Social Science and Medicine* 50, 1309-1316

Espino, F. (1999). *Putting the lid on malaria: interruption of malaria transmission in a low endemic area in the Philippines*. Tropical Health Program, Australian Centre of International and Tropical Health and Nutrition, University of Queensland, Brisbane, Queensland.

Espino, F. (1999). The changing epidemiology of malaria. In *Malaria in the Philippines*, Philippine Council for Health Research and Development, publication of the Department of Science and Technology, Philippines, 5-20.

Espino, F., Manderson, L., Acuin, C., Ventura, E., Domingo, F. (1997). Perceptions of malaria in the Philippines: transmission and prevention of disease. *Acta Tropica*, 63, 221-240.

Pasay, C.M. (1997) *Genetic diversity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in an area of low malaria endemicity in the Philippines*, Ph.D. Thesis, The University of Queensland, Brisbane, Australia

Llagas L.A. (1999). Malaria Vectors and Vector Control. In *State of the Art. Malaria Research In the Philippines* P21-32

Salazar, F.V., Hugo, C.T., Ebol, A.P., Segundo U.P., Macam, O.L., and Varca, L.M. (2005). *Establishment of nationwide Surveillance Network for the Determination and Distribution of Insecticide Susceptibility of Malaria Vectors in the Philippines*. Final Report submitted to WHO Project (MVP/PHL/03/02).

Salazar, N.P., 1989. State of the Art Malaria: The Malaria Situation in the Philippines: A critique. 49p.

Saul, A., Belizario, V. Y., Bustos, M. D. G., Espino, F., Lansang, M. A., Salazar, N. P. S. (1997). The stability of malaria in a community in Bataan, the Philippines: prospects for control. *Acta Tropica*, 63, 267-274.

Torres, E.P., Fischer, K., Foley, D.H., and Kemp, D. 2002. Characterization of microsatellite loci in *Anopheles flavirostris*, the principal malaria vector in the Philippines. *Molecular Ecology Notes* 2: 257-258.

Torres EP, Foley DH, Saul A. 2000. Ribosomal DNA sequence markers differentiate two species of the *Anopheles maculatus* (Diptera:Culicidae) complex in the Philippines. *Journal of Medical Entomology*. 37: 933-937.

Torres EP, Salazar NP, Belizario VY, and Saul A. 1997. Vector abundance and behavior in an area of low malaria endemicity in Bataan, the Philippines. *Acta Tropica*. 63: 209-220.

Torres EP 2004 Population structure and Gene flow in the Philippine Malaria vector *Anopheles flavirostris* (Ludlow): Implications for Malaria Control. PhD Thesis University of Queensland Tropical Health Program, Australia. 179 p.