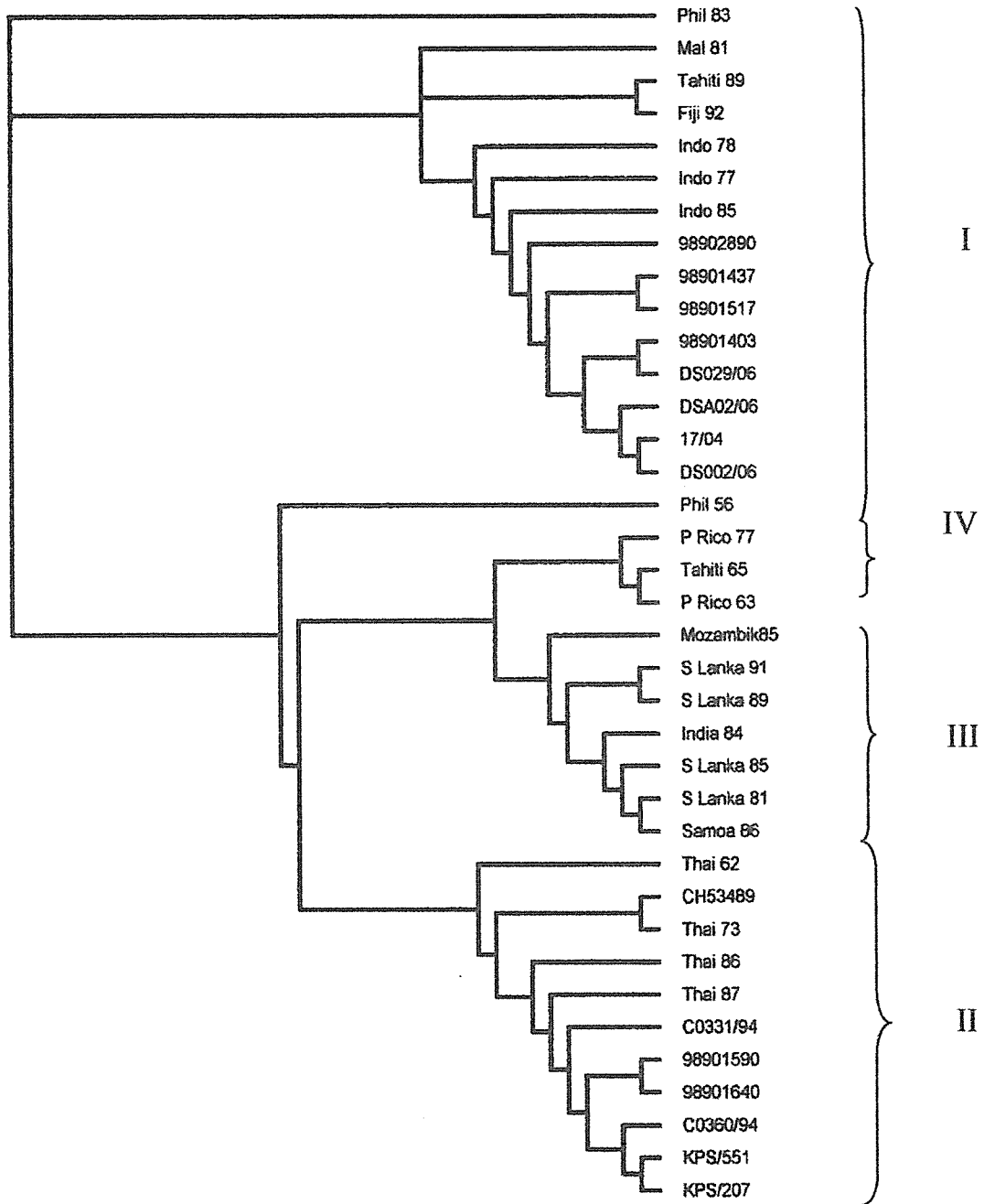


Tabel 6 . Additional Dengue viruses sequence data for phylogenetic analysis

Origen	Year	Strain	Source/ GenBank accession #
Fiji	1992	29472	L11422
India	1984	1416	L11424
Indonesia	1977	1153	Lee <i>et al.</i> 1993
Indonesia	1978	1280	L11426
Indonesia	1985	85-159	L11428
Malaysia	1981	29586	L11427
Mozambique	1985	1558	L11430
Filipina	1956	H87	L11423
Filipina	1983	168.AP-2	L11432
Puerto Rico	1977	1340	L11434
Puerto Rico	1963	PR6	L11433
Samoa	1986	1696	L11435
Sri Lanka	1981	1326	L11431
Sri Lanka	1985	1594	L11436
Sri Lanka	1989	260698	L11437
Sri Lanka	1991	2783	L11438
Tahiti	1965	1327	L11439
Tahiti	1989	2167	L11619
Thailand	1962	5987	L11440
Thailand	1973	CH3489D73- 1	L11620
Thailand	1986	D86-007	L11441
Thailand	1987	MK315	L11442

Phylogenetic tree of dengue virus type 3 based on envelope gene



REFERENCES:

- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 44:649-88.
- Corwin, A. L., R. P. Larasati, M. J. Bangs, et.al. 2001. Epidemic dengue transmission in southern Sumatra, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95:257-265.
- Dewi BE, Takasaki T, Kurane I, et al. Phenotypic and genotypic characteristic of dengue 3 viruses isolated from patients in Indonesia. (Submitted to *Infection and Immunity*).
- Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, Sulianti Saroso J. 1979. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. I. Virological and epidemiological studies. *Am J Trop Med Hyg.* 28(4):701-10.
- Lanciotti R, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. of Clinical Microbiology.*; 30 (3) : 545 – 551.
- Partana LJ, Partana S, Tharir S. 1970. Hemorrhagic fever-shock syndrome in Surabaya, Indonesia. *Kobe J. Med. Sci.* 16: 189-201.
- Raekiansyah M, Pramesyanti A, Bela B, et al. 2005. Genetic variations and relationship among dengue virus type 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue diseases in Indonesia and Thailand. *South East Asia J. Trop. Med.Hyg.* 36(5): 1187-1197.
- Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Kurane I. 2002. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *J. Clin. Virol.* 24: 203-209.

学会発表に関する一覧表 (平成 18 年度)

執筆者氏名	学会発表名	学会名	開催年	開催地
原田文植、 高崎智彦、 高木弘隆、 林 昌宏、 伊藤美佳子、 倉根一郎	日本人デング熱患者における抗ウエストナイルウイルス交差中和抗体に関する検討.	第 80 回日本感染症学会	2006 年 4 月 20-21 日	東京
井戸田一朗、 井上康子、 伊藤美佳子、 高崎智彦、 倉根一郎、 戸塚恭一、 鳴門 弘	ミクロネシア連邦ヤップ州に在住する日本人におけるデング熱発生状況について	第 80 回日本感染症学会	2006 年 4 月 20-21 日	東京
加藤廣幸、 羽田野善郎、 水野泰孝、 上田晃弘、 源河いくみ、 川名明彦、 金川修造、 原田文植、 高崎智彦、 倉根一郎、 狩野繁之、 岡 慎一、 木村 哲、 工藤宏一郎	フラビウイルス IgM 抗体が偽陽性となった熱帯熱マラリアの一例.	第 80 回日本感染症学会	2006 年 4 月 20-21 日	東京
高崎智彦、 水野泰孝、 加藤康幸、 西村聖美 原田文植、 田島茂、 工藤宏一郎、 倉根一郎	デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子検出	第 13 回トガ・フラビ・ペ スチウイルス研究会	2007 年 1 月 19 日	東京

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）

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：
マラリア等原虫疾患（プロジェクト3）総括研究報告書

分担研究者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
	大前比呂思	国立感染症研究所 寄生動物部
	木村 幹男	国立感染症研究所感染症情報センター
	津田 良夫	国立感染症研究所 昆虫医科学部
	朝日 博子	国立感染症研究所 寄生動物部
	中野由美子	国立感染症研究所 寄生動物部
	神原 廣二	長崎大学 熱帯医学研究所
	田辺 和裕	大阪大学 微生物病研究所
	川本 文彦	大分大学 総合科学研究支援センター
	石川 洋文	岡山大学 大学院環境学研究科
	坪井 敬文	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター

研究要旨 日本国内では、1961 年以降、マラリア原虫の生活環の存在は証明されておらず、それ以後問題の中心は、輸入マラリアに移っている。しかし、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認められており、今後、日本でマラリアが再興感染症として問題となる可能性は否定できない。実際、再興感染症としての三日熱マラリアは、日本と気候・環境条件が比較的類似している中国や朝鮮半島といった温帯アジアで、現在大きな問題となっている。そこで、今年度は、三日熱マラリアの積極的防疫を目指した国際連携のため、国際会議を、中国 CDC, WPRO と共催して開き、アジア・太平洋地域での三日熱マラリア感染状況に関して、情報の収集と共有に努めた。越冬した感染蚊によって三日熱マラリアの流行がおきるアジアの温帯地方においては、媒介蚊の生息状況を定期的にモニタリングしていくことが、再流行の潜在的可能性を検討し、早期警戒を促すうえで重要である。また、熱帯のアジア・太平洋諸国の多くでは、マラリア対策の進捗に伴って、マラリア感染の主体が、熱帯熱マラリアから三日熱マラリアに移っているが、この劇的な変化は、既存の疫学的指標や監視体制では正確に捉えられない。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。

昨年度から続く熱帯熱マラリアの分子疫学的研究は、主に *msh-1* 遺伝子とクロロキン耐性遺伝子をアジアの大陸部と島嶼部で比較しながら進めた。島嶼部ではマラリア原虫の遺伝子交換頻度が少なく、遺伝子の多様性にも乏しい。1984 年から 1998 年までの輸入例を用いた研究でも、アジアの大陸部と島嶼部では、かなり長期にわたり独立して、薬剤耐性株が拡散してきた可能性が示唆される。また、数理モデルを用いて島嶼部でのクロロキン耐性株の拡散を解析すると、15%以上なるのに 15 年以上かかると推定され

る。これらの知見は、今後途上国のマラリア対策を考えるうえで重要な基礎的データとなるばかりでなく、島嶼国であるわが国にマラリアが侵入した場合の防疫対策を考える場合も貴重な資料となる。

昨年度の研究結果によると、日本における最近の輸入熱帯熱マラリアの減少は、アジア・太平洋諸国でマラリア患者数が減少し、流行の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアへとシフトしている状況を反映しているものと推測される。しかし、成田空港検疫所との共同研究によると、潜伏期間が長く症状が非典型的な三日熱マラリアの場合は、80%以上の症例が入国時に全く症状を示していない。今年度の媒介蚊の生息調査では、主にかつて熱帯熱マラリアを媒介したと推定されるコガタハマダラカの生息状況はあまり変化していないことがわかったが、今後は、さらに広範な媒介蚊の国内生息状況調査を進める必要がある。また、マラリア原虫を保有した媒介蚊を検出できる検査法の改良や適正な疫学監視システムの構築も重要な課題である。

A. 研究目的

本研究の大きな目的は、アジア・太平洋地域で流行しているマラリア等の原虫疾患のわが国への侵入監視の強化にある。国内において、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、輸入マラリアが問題となり、空港マラリアや国内2次感染が疑われた例もあるが、現在に至るまで蚊を介した感染拡大の報告はない。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。

本研究の目的達成のための基礎的データ収集にむけ、昨年度に続き、わ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調査を行った。また、国内にとどまらない積極的防疫や国際連携のため、WHOなどの国際機関や各国保健省・研究所間との交流を進め、アジア・太平洋地域のマラリアの現状に関して、正確な情報と問題点を共有することを目指した。

B. 研究方法

上記目的達成のための研究組織は、主たる研究のフィールドが国内か国外かで、大きく2つに分けられた。昨年度は、主に東南アジアの国々との連携をはかって、東京でマラリア国際会議を開催したが、今年度は、わが国でも再流行が懸念される三日熱マラリアに焦点を絞った国際会議を上海で行った。この国際会議は、わが国や韓国・中国といった温帯の国々のマラリア

が抱える問題と熱帯のマラリア浸淫地が抱える問題の共通点や相違点を抽出し、研究協力や疫学監視の国際的ネットワークを作るうえで大きな意義があった。

国内における防疫体制の強化という観点からは、今年度もハマダラカの生息調査を継続し、特に琉球諸島で熱帯熱マラリアの主たる媒介蚊だったと推測されるコガタハマダラカの生息状況調査に重点を置いた。さらに日本人旅行者が海外のマラリア浸淫地で行っているマラリア予防行動について、アンケート調査で実態を調べた。

また、輸入マラリア症例と浸淫地で得られた検体の両方から、アジア・太平洋地域の島嶼部と大陸アジアのマラリア原虫を比較しながら、分子疫学的解析を進めた。病態や薬剤耐性と関連した遺伝子解析や数理モデル化によって、今後のマラリア対策の対しても、基礎となるようなデータが集積されつつある。

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及び情報の収集と共有を目指す研究

- ① アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況の変化とモニタリングに関する研究（分担研究者：大前比呂思、神原廣二）
- 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、中野由美子）

- ③ 熱帯熱マラリア表面蛋白の網羅的検索と新しいマラリア診断法に関する研究（分担研究者：坪井敬文）
- 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 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) Risk Assessment of Malaria in Thailand (Sirichaisinthop J, Thailand)
- d) Application of geographic information system(GIS) for malaria control (Espino F. et al, Philippines)
- e) Strengthening malaria surveillance system in central Java, Indonesia (Wibisono H. et al, Indonesia)
- f) Reduction of the frequency of epidemics through better strategies using the present malaria information system in Solomon Islands (Bakotee B. Solomon Islands)

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：木村幹男）

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及び情報の収集と共有を目指す研究

- ① アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況の変化とモニタリングに関する研究
（分担研究者：大前比呂思，神原廣二，研究協力者：亀井喜世子）

2007年1月16-18日に、本研究班と中国CDC、WHOの共済で三日熱マラリアに関する国際会議が上海で開かれ、そこで、WHO(WPRO, SEARO, EMRO)、韓国、中国、北朝鮮、カンボジア、フィリピン、タイ、インドネシア、ソロモン諸島の参加者から、各々の国や地域における三日熱マラリア感染状況について説明があった。東南アジアや南太平洋の国々では、従来、マラリアは大きな公衆衛生学的課題であったが、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とともに、感染の中心が熱帯熱マラリアから三

日熱マラリアにシフトしていることが共通している（図1）。一方朝鮮半島では、1970年代に一時は完全に制圧されたかに見えた三日熱マラリアが、1990年代になって休戦ラインを挟んで再興感染症として問題になっており、韓国では1999年に4142人、北朝鮮では2000年に30万人以上の患者発生をみるに至った（図2, 3）。北朝鮮では2002年以降減少する傾向を示しているが、2006年の患者数は9353人と多い。また、韓国においては、一時減少傾向を示した患者数が、2004年以降再び増加傾向を示している。しかも、休戦ライン近郊での感染が疑われる軍人や退役軍人だけではなく、一般の人々の間でも患者数が増加している（表1）。中国の温帯地域でも、三日熱マラリアが再興感染症として問題になっている例が多く報告されており、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非常に困難であることが再認識された。

またソロモン諸島国では、昨年度に続いてSentinel Siteの村落で、マラリア感染に関する横断的一斉調査を行った。2006年2月（雨季）の調査では、マラリア感染率は30%以上となり、1996年の調査と同様の高い感染率を示したが、以前とは感染の主体となるマラリア原虫種が逆転し、三日熱マラリアが感染者の60%以上を占めていた。クロロキンにプリマキンも加えた治療的介入を続けたところ、今年度の調査では、マラリア感染率は、2006年9月（乾季）:22.7%、

2007年2月(雨季):17.4%にまで減少し、三日熱マラリアも熱帯熱マラリアも同様に低下した。また、対策に進展に伴い、発熱や脾腫といった臨床症状による疫学的指標だけでは、実際のマラリア感染状況が把握できない可能性が示唆された(表2)。熱帯熱マラリアと三日熱マラリアの両方が存在し、現在もその感染状況が劇的に変化しているアジア・太平洋の熱帯地域においては、既存のマラリアの疫学的指標やモニタリングシステムに限界があることが確認された。

また、インドネシア、ロンボク島における新入植地におけるマラリア感染状況の分析では、入植初期には森林蚊による急激なマラリア流行がおき、地域が開かれるにつれて森林蚊との接触機会が減少し、代わって海岸性媒介蚊が数を増やし、安定流行をもたらしたことがわかった。新入植地でのマラリア流行でみられる媒介蚊の交代は、カンボジアの海外協力研究者によるカンボジア国内における新入植地での研究でも指摘されており、今後わが国で懸念されるマラリアの侵入・定着や東南アジアの入植地におけるマラリア新流行を考えるうえでも、重要な示唆を与えてくれる。また、インドネシアでの対策では、マラリア検査・治療チームを編成し、村々を巡って患者検出と治療に当たるとともに、実際の診療場面の中で直接が働きかけていくことが重要な教育活動であり、対策成功の鍵となることがわかった。

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:田辺和桁、中野由美子)

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。タンザニア、ソロモン諸島、タイの間では *mssl* ハプロタイプの分布を比較したところ、明らかな地域差が認められた(図4)。*mssl* ハプロタイプの数はタンザニアで多く、フィリピンのパラワン島、タイがそれに続き、ソロモン諸島のガダルカナル島では少なかった。*mssl* ハプロタイプの多様度指数(h)も同様な傾向を示し、タンザニアで非常に高く、パラワンはタイとほぼ同レベルで、ガダルカナルでは有意に少なくなった。また、連鎖不平衡は、タンザニアではほとんど認められず、高い組換え頻度が推定されたが、パラワンやガダルカナルといった島嶼部では強い連鎖不平衡が認められ、組み換え頻度は低いと思われた。

クロロキン耐性関連遺伝子:*pfprt* 遺伝子の多型のシーケンス結果では、パラワンにおいて39%の割合でクロロキン感受性型が見られ、耐性のタイプはパプアニューギニア型のクロロキン耐性型(SVMNT)であった。一方、タイやガダルカナル島では、100%が耐性型を示した。また、*pfprt* 遺伝子については、感染研に保存されている1984年から1998年の輸

入熱帯熱マラリア患者の血液薄層標本も用いて、アジア・太平洋地域における出現・拡散状況を検討した。クロロキン感受性型（野生型）を示したサンプルは、1985年のフィリピンからの輸入例1例のみであり、残りの28例は全てクロロキン耐性型（変異型）を示した（図5）。PfCRTタンパク質の72から76番目のアミノ酸配列によって、野生型(CVMNK)、インドシナ半島型(CVIET)、パプアニューギニア型(SVMNT)などと分類されるが、1997年まで、大陸アジアと島嶼部アジア（フィリピン、インドネシア、パプア・ニューギニア）の間で、*pfert* 遺伝子は地域ごとによく保存されていたことがわかった。

③ 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）

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ゲノムワイドに発現することができる。これまでに469種の組換えタンパク質を網羅的に発現することができ、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を用いることにより、マラリア流行の血清疫学指標となりうる新規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る。そして、その研究のためのフィールド設定をタイの海外協力研究者とともに着手した。さらに、フィール

ドにおけるマラリア原虫保有者の同定を効率的に行うため、新規の核酸増幅法であるLAMP(Loop-mediated isothermal amplification)法を応用して4種類のヒトマラリア原虫の新たな迅速診断法の開発を行った。実験室内であれば、30分前後で4種類のマラリア原虫を区別することができた。

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）

薬剤感受性*in vitro*試験の基本となる熱帯熱マラリア原虫の分化増殖能の測定、特に分裂体形成能の定量的評価のために、Flow cytometry (FCM)を適用し、現行のギムザ染色にて検鏡する方法と比較した。輪状体に同調化した培養条件過での分裂体形成過程（16、20、24時間後）及び増殖サイクルが完了したと考えられる44時間後、ギムザ染色で確認されるマラリア原虫の核数変化とFCMで計測した感染赤血球(PRBC)の蛍光強度(RFU)変化はよく一致し、相関係数(R^2)も0.9を超えた。

一方、クロロキン存在下での分裂体形成経過の観察では、強い蛍光を発するマラリア原虫感染赤血球がクロロキンの薬剤作用とよく相関することがわかった。FCMで求めた同調培養16-24時間における分裂体形成に対するクロロキン抑制効果(EC50)は、顕微鏡的診断で得られる原虫密度を基準に算出された値とよく一致した。

⑤ 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)

昨年度と同様、熱帯のフィールドでも利用しやすい簡便なG6PD異常症の検出法の改良をはかるとともに、各々の国で人類遺伝学的な基本データの収集を継続した。今年度は、G6PD欠損症に関する疫学調査をインドネシアとカンボジアにおいて実施した。カンボジアでは欠損者の95%以上がG6PD Viangchan型であり、クメール族の祖先は一つと考えられた。インドネシアは多民族国家で多くの変異型が存在するが、フローレス島マウメレ近郊のバジョー族(海洋ジプシーの一族でミンダナオ島由来)から新型の変異(G6PD Bajo Maumere)が見出された。また、この民族もViangchan型が優占型であり、土着のシッカ族・エンデ族の変異型の構成とは大きく異なっていた。

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)

熱帯熱マラリアを媒介するハマダラカは、主にセリア亜属(Subgenus *Cellia*)に属する種で、わが国ではコガタハマダラカ(*Anopheles minimus*)が八重山諸島に生息している(表3)。そして、コガタハマダラカは、かつて八重山諸島で熱

帯熱マラリアが流行した際の主たる媒介蚊であると推定されている。

石垣島に毎年国内外から訪れる多くの観光客の中に、マラリア感染者が含まれる可能性も皆無ではなく、この地区では熱帯熱マラリアの2次感染が生じるかもしれない。そこで今年度は、コガタハマダラカの密度が高く熱帯熱マラリア患者が多発していた野底地域と、近年多くの観光客が訪れる石垣島西部(崎枝周辺)を選び、人囷法による蚊成虫の採集を試みた。野底地域については、ドライアイストラップを用いて、広域の成虫密度調査も行った。

人囷法の結果、好適な発生源から約2キロ以内に集落があればコガタハマダラカによって吸血される可能性があることが示唆された。また、トラップ調査の結果、コガタハマダラカは山脚部に位置する採集場所で多く採集され海岸部ではほとんど採集されないこと、採集場所周辺の地形や植生構造に依存して捕獲個体数が大きく異なることがわかった。年によって異なっているため捕獲密度の比較を行うには無理があるが、少なくとも過去6年間でコガタハマダラカの密度が大きく変化している様子は見られない(図6)。

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：木村幹男, 研究協力者：波川京子)

マラリア浸淫地を訪れた日本人旅行者のマラリア予防の実態について、

European Travel Health Advisory Board (ETHAB) が作成した共通プロトコルを用いて調査し、先行研究の結果と比較した。渡航先におけるマラリアのリスクの認識については、70%以上の対象者が認識していたが、マラリア予防に関係する室内用殺虫剤スプレー、防虫剤を携帯した者はいずれも半数程度にとどまった。暗くなってから外出した者も64%に達し、それらの中の約3分の1は、防蚊対策を全く行なっていなかった。さらに、予防内服を実施した者、スタンバイ治療薬を携帯した者（必ずしも服用したとは限らない）は、それぞれ1割前後でしかなく、いずれのマラリア予防法についても、わが国では実施率が低いことがわかった。

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，研究協力者：栗原考次)

本年度は、八重山諸島でコガタハマダラマラリア媒介蚊の生息調査が行われたのに呼応して、石垣島での1950年代の熱帯熱マラリア流行を分析した国内マラリア侵入数理モデルに関する研究を推進した。八重山諸島では、現在も、コガタハマダラカが生息しているが、今後マラリアの国内侵入がおきるとすれば、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予測される。少人数の集団では、流行に揺らぎが大きく作

用し、その結果をDeterministicモデルで扱うのみでは不十分で、流行の中央値とともに信頼区間の範囲を予測したStochastic伝播数理モデルの構成して考えねばならない。

また、クロロキン薬剤耐性遺伝子に関する調査が進むのにあわせ、耐性遺伝子の拡散速度や治療的介入が薬剤耐性を導く可能性を検討するための、数理モデル作成にも努めた。ソロモン諸島を対象としてクロロキン薬剤耐性を考慮した熱帯熱マラリア伝播モデルの構成を行い、同地域における薬剤耐性株拡大の状況をシミュレートしたところ、集団治療投薬のcoverageが50%程度にとどまると、15年経過後耐性株の占める割合は15%以上になることがわかった。

D. 考察

昨年度、日本における輸入マラリアの状況を世界的なマラリア感染状況の変化と比較して検討したところ、日本における最近の輸入マラリアの減少、特に輸入熱帯熱マラリアの減少は、アジア・太平洋諸国でマラリア患者数が減少し、流行の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアへとシフトしている状況を反映しているものと思われた。また、成田空港検疫所との共同研究の結果、潜伏期間が長く症状が非典型的な三日熱マラリアの場合は、80%以上の例が入国時に全く症状を示していないことがわかった。三日熱マラリアの媒介蚊は成田空港周辺にも多く生息しており、日本で三日熱マラリアが、空港マラリアから国内2次感

染をおこし再興感染症となる可能性は否定できない。事実、日本と気候条件が似ている中国や朝鮮半島の温帯地方の一部においても、最近、三日熱マラリアの再流行が大きな問題となっている。

そのような状況を踏まえ今年度行われた三日熱マラリア国際会議では、越冬した感染蚊によって三日熱マラリアの流行がおきるアジアの温帯地方においては、媒介蚊の生息密度などを定期的にモニタリングしていくことが、再流行の潜在的可能性を検討し、早期に警戒を促すために重要であるという認識を共有することができた。わが国においても、重点地域を選んでマラリア媒介蚊の種や密度を定期的にモニタリングしていくシステムを構築することが望ましい。

また、アジアや南太平洋の熱帯地域でも、典型的な症状を示す熱帯熱マラリア感染者から典型的な症状を示さない三日熱マラリアへと、感染の中心がシフトしているので、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疫学的指標の信頼性が低下していることが確認された。また、症状の乏しい例は原虫密度が少ないことが多いが、従来のギムザ染色を主体とした顕微鏡的形態診断は、原虫密度が低い場合、診断に長時間かかってしまい、見落としも多い。今後は、分子生物学的手法も利用して、疫学的指標やフィールドでも応用できる簡便な診断法の開発を目指す必要がある。LAMP法は、Nested PCRなどの他の分子生物学的診断法に比べて迅速で、一定温

度で反応が進むため特別な機械は不要であるなど、フィールドでの使用を考えると利点も多い。反面鋭敏すぎて、フィールドの条件では偽陽性が多発する可能性も指摘されており、今後応用的研究を重ねなければならない。

マラリアの分子疫学的指標として *mSP1* 遺伝子の解析を行うと、アフリカ大陸部(タンザニア)、アジア大陸部(タイ)、アジア島嶼部(フィリピン、パラワン)、太平洋島嶼部(ソロモン諸島、ガダルカナル)で明らかかな地域性がみられた。特にソロモン諸島はアフリカに匹敵する高度マラリア浸淫地でありなら、患者当たりの対立遺伝子の数が少なく、組換えによる新規対立遺伝子の発生頻度が限られ、株特異的免疫をうまく誘導している可能性が指摘された。このことは、太平洋島嶼部でみられる熱帯熱マラリアの臨床症状が、アフリカや大陸アジアに比して軽症であることの理由の一つとも思われ、熱帯熱マラリアの病態理解や島嶼部でのマラリア対策に新たな視座を提供する可能性がある。

また、熱帯熱マラリアの薬剤耐性に関する分子生物学的研究では、輸入マラリア患者の薄層塗抹標本を用いて、東南アジアにおけるクロロキン耐性遺伝子の分布状況を解析した結果、2000年に同定されたクロロキン耐性遺伝子 *pfprt* のインドシナ半島型と島嶼部型は、15年間にわたり、地域でよく保存されており、インドシナ半島とフィリピン、インドネシア、メラネシアのクロロキン耐性は、全く別に拡散していると考え

えられた。また、ソロモン諸島での観察を基にクロロキンに臨床的耐性を示すマラリア原虫の拡散を数理モデル化すると、島嶼部においては、薬剤耐性の拡散していくスピードが大陸部より遅いと推測され、島嶼部における抗マラリア薬変更のタイミングについても示唆を与えてくれた。ただし、1990年代、フィリピンではクロロキン感受性熱帯熱マラリア株が、比較的保たれていたのに対し、クロロキンによる治療的介入が早くから行われたソロモン諸島では100%耐性株となっていた。治療的介入は有用な対策だが、今後導入にあたっては、分子疫学的に薬剤耐性状況をモニタリングしていく必要があるかもしれない。

また、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、一致しないことが度々指摘されてきた。今後は適切なマラリア原虫増殖評価法を用いて、フィールドでも応用できる薬剤耐性モニタリング法の開発が期待されている。三日熱マラリアの治療にはプリマキンが不可欠でその効果も大きい。今後その使用が拡大するに伴い、G6PD 欠損症が顕在化する可能性が高い。現在使用されているG6PD 欠損症の診断試薬は常温では1ヶ月しか使用できないので、今後は、長期の室温保存が可能な試薬の開発が望まれる。

E. 結論

再興感染症としての三日熱マラリアは、

中国や朝鮮半島といった温帯アジアでも、公衆衛生上大きな問題となっており、わが国においても再流行の可能性は否定できない。越冬した感染蚊によって三日熱マラリアの流行がおきるアジアの温帯地方においては、媒介蚊の生息状況を定期的にモニタリングしていくことが、再流行の潜在的可能性を検討し、早期警戒を促すうえで重要である。熱帯のアジア・太平洋諸国の多くでは、マラリア対策の進捗に伴って、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では、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。

マラリアの分子疫学をアジアの大陸部と島嶼部で比較すると、島嶼部ではマラリア原虫の進化速度も遅く、薬剤耐性株の拡散速度も遅い。この現象は、今後途上国のマラリア対策を考えるうえで重要な基礎的知見となるばかりでなく、島嶼国であるわが国にマラリアが侵入した場合の防疫対策を考える場合も、貴重な資料となる。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1 論文発表

2-Cys Peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development

- in *Plasmodium berghei*. Yano K, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S, Kawazu S. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006, 148:44-51.
- Kaneko O, Templeton TJ, Iriko H, Tachibana M, Otsuki H, Takeo S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. The *Plasmodium vivax* homolog of the ookinete adhesive micronemal protein, CTRP. Kaneko O, Templeton TJ, Iriko H, Tachibana M, Otsuki H, Takeo S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. *Parasitol. Int.* 2006, 55:227-231.
- Plasmodium vivax* serine repeat antigen (SERA) multigene family exhibits similar expression patterns in independent infections. Palacpac NM, Leung BW, Arisue N, Tanabe K, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006, 150:353-358.
- Reemerging *vivax* malaria: changing patterns of annual incidence and control programs in the Republic of Korea. Han ET, Lee DH, Park KD, Seok WS, Kim YS, Tsuboi T, Shin EH, Chai JY. *Korean J. Parasitol.* 2006, 44:285-294.
- Modeling of Re-emerging *Plasmodium vivax* in the Northern Area of the Republic of Korea Based on a Mathematical Model Fujita K, Chen TT, Nishina T and Ishikawa H. *J. Fac. Environmental Sci. & Tech. Okayama U.* 11(1) 1-7 (2006)
- Reactivity of blood samples spotted onto filter papers in the WST-8 method for screening of G6PD deficiency. Arai M., Kawamoto F., et al. *Acta Medica Okayama*, 60, 127-134, 2006
- Sequence variation in the T-cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite (CS) protein among field isolates is temporally stable: a five-year longitudinal study in Southern Vietnam. Jalloh, A., Kawamoto, F., et al. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 1229-1235, 2006
- Further investigations of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Flores Island, eastern Indonesia. Kawamoto, F., et al. *J. Human Genet.*, 51, 952-957, 2006
- A. 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.

Mita T, Kaneko A, Hwaihawanje I, Tsukahara T, Takahashi N, Osawa H, Tanabe K, Kobayakawa T, Björkman A. *Inf. Gen. Evol.* 6: 447-452(2006).

Independent evolution of Pyrimethamine resistance on *Plasmodium falciparum* isolates in Melanesia Mita T, Tanabe K, Takahashi N, Tsukahara T, Eto H, Dysoley L, Ohmae H, Kita K, Krudsood S, Looareesuwan S Kaneko A, Bjorkman A, Kobayakawa T. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Mar;51(3):1071-1077.

Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines. Sakihama N, Nakamura M, Palanca Jr A. A, Argubano R. A, Realon E. P, Larracas A. L, Espina R. L, Tanabe K. *Parasitol. Int.* (in press) (2007).

High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. Tanabe K, Sakihama N, Rooth I, Björkman A, Färnert A. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press) (2007).

検疫感染症としてのマラリアをどう捉えるか。 大前比呂思, 遠藤卓郎, 長谷山路夫, 新妻淳, 飯塚信二, 津田良夫 *Clinical Parasitol* 2006 17;127-130.

日本の旅行者におけるマラリア予防。 木村幹男, 波川京子 *病原微生物検出情報* 2007;28:4-6.

2. 学会・研究会発表

Identification of components of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* that interact with growth-promoting agents Asahi H, Omura M, Izumiyama S, Ohmae H, XI International Congress of Parasitology, Glasgow, UK, August 2006.

Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical malaria patients. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Takeo S, Tsuboi T. ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.

Discovering novel blood stage malaria vaccine candidates: screening with immune sera from falciparum malaria

patients and asymptomatic parasite carriers. Takeo S, Jin L, Sakamoto H, Han ET, Iriko H, Kaneko O, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Endo Y, Tsuboi T.

ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.

Malaria vaccine development: recombinant protein expression platforms. Cell-free expression system. Tsuboi T. (Invited Symposist)

ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.

Discovering novel malaria pre-erythrocytic antigens.

Aguiar JC, Iriko H, Huang F, Sacci JB, Juompan L, Jin L, Han ET, Takeo S, Krzych U, Endo Y, Richie T, Tsuboi T.
ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006

Induction in Rhesus monkeys of antigen-specific T cell responses to all vaccine components (CSP, AMA1, SSP2 and MSP1) of a multi-stage

Plasmodium knowlesi vaccine

administered by prime/boost immunization. Abot E, Ganeshan H, Banania G, Richie N, Takeo S, Tsuboi T, Sedegah M, Richie T, Doolan D, Weiss W, Jiang G. ASTMH 55th annual

meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.

Problems of malaria prevention in Japanese travelers.

Namikawa K, Kikuchi H, Kato S, Takizawa Y, Konta A, Iida T, Kimura M
6th Asia-Pacific Travel Health Conference, Bangkok, Nov. 2006.

Stable antigen polymorphism in modern *Plasmodium falciparum* populations. Tanabe K.

Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2007, Nagasaki, Jan 16, 2007.

Recent trends of malaria in Japan.

Ohmae H, Haseyama M, Tsuda Y, Endo T. International Conference on vivax malaria in Asia and Pacific area, Shanghai, January 16-18, 2007

Dynamic change of malaria epidemiology and limitation of present indicators in the Solomons.

Ohmae H, Kamei K, Nakazawa M, Bakote'e B. International Conference on vivax malaria in Asia and Pacific area, Shanghai, January 16-18, 2007

Genetic polymorphisms of drug resistant gene in Southeast Asia through imported isolates of *Plasmodium falciparum*.

Saito-Nakano Y, Kamei K, Iwagami, M, Komaki-Yasuda K, Kawazu S, Kano S, Tanabe K, Ohmae H, Endo T. The 1st Thailand-Japan Joint Form of Infectious Diseases. Bangkok, Jan 29-30, 2007

Recent evolution of msp1 polymorphism in *P. vivax*.

Tanabe K. 41st Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases, Tokyo, Feb 2, 2007.

現生熱帯熱マラリア原虫集団における抗原多型の進化. 田辺和祐、先濱直子、I. Rooth, A. Färnert, A. Björkman、平山謙二
第 75 回 日本寄生虫学会大会、2006.5.19

マラリア原虫アピコプラスト DNA の分子系統. 三井英也、先濱直子、田辺和祐、金子明、川合覚、長谷川政美、橋本哲男
第 75 回 日本寄生虫学会大会、2006.5.19

マラリア原虫の merozoite surface protein-1₁₉ を認識するヒトモノクローナル抗体 Fab 断片の大腸菌による作製
程訓佳、早坂仁、渡辺勝臣、陶艶琳、劉金也、田辺和祐、橋裕司
第 75 回 日本寄生虫学会大会、2006.5.20
ロンボク、スンバワ島におけるマラリア流行の考察. 神原廣二、吉永一未、前川芳秀、高木正洋、Yoes P. Dachlan, I. K. Gerudug, AAN Suryanata, S. Iskandar :

第 75 回日本寄生虫学会大会 弘前、2006 年 5 月 19 日-5 月 20 日.

ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子相同体 EBL の局在と病原性
大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、鳥居本美

第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。

2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (TPx-1) ノックアウトがマラリア原虫のオーシスト発育に及ぼす影響の解析 矢野和彦、大槻均、新井明治、坪井敬文、鳥居本美、駒木-安田加奈子、狩野繁之、河津信一郎
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。

コムギ胚芽無細胞系を用いた新マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索
入子英幸、竹尾暁、金玲、大槻均、金子修、鳥居本美、坪井敬文
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。

熱帯熱マラリア原虫新規赤血球型ワクチン候補抗原分子の探索 竹尾暁、金玲、韓銀澤、入子英幸、金子修、鳥居本美、坪井敬文
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。

検疫感染症としてのマラリアをどう捉

えるか。 大前比呂思, 遠藤卓郎, 長谷山路夫, 新妻淳, 飯塚信二, 津田良夫
第17回日本臨床寄生虫学会 東京 2006年6月.

マラリア感染に対するヒトの抵抗力を考慮したモデル構築とその統計的評価. 勝田啓子, 石川洋文, 栗原考次, 大前比呂思
日本計算機統計学会 第20回シンポジウム 東京, 2006年10月

クロロキン薬剤耐性を考慮した熱帯熱マラリア伝播モデルの構成: ソロモン 諸島を対象として 陳甜甜, 仁科朝彦, 久兼直人, 大前比呂思, 石川洋文 第47回日本熱帯医学会, 第21回日本国際保健医療学会合同大会, 長崎, 2006年10月11日-10月13日.

ソロモン諸島におけるマラリア感染状況の変化 大前比呂思, 亀井喜世子, 中澤港, 山内太郎, Bernard Bakote' e 第47回日本熱帯医学会, 第21回日本国際保健医療学会合同大会, 長崎, 2006年10月11日-10月13日.

インドネシア, スンバワ島入植地における急速なマラリア流行発生. 神原廣二, 上村春樹, Sukmawati Basuki, Yoes P. Dachlan 第47回日本熱帯医学会, 第21回日本国際保健医療学会合同大会, 長崎, 2006年10月11日-10月13日.

インドネシア・ロンボク島及びスンバワ島におけるマラリアコントロールプロジェクトの事後評価 依田健志, 峰松和夫, 阿部朋子, Sukmawati Basuki, Yoes Prijatna Dachlan, 門司和彦, 神原廣二, 樂得康之, 溝田 勉 第47回日本熱帯医学会, 第21回日本国際保健医療学会合同大会, 長崎, 2006年10月11日-10月13日.

東南アジアにおける2000年以前のクロロキン耐性遺伝子の多型と分布 中野由美子, 亀井喜世子, 石上盛敏, 駒木-安田加奈子, 河津信一郎, 狩野繁之, 田辺和裕, 大前比呂思, 遠藤卓郎 第66回寄生虫学会東日本支部大会, 東京, 2006年10月

霊長類マラリア原虫とその宿主の進化 早川敏之, Richrad Culleton, 堀井俊宏, 田辺和裕 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 2006.10.28

核コード細胞質 SSUrRNA 遺伝子に基づくマラリア原虫 *Plasmodium* 属の系統解析 西本由利子, 有末伸子, 川合覚, 田辺和裕, 橋本哲男, 第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム抄録集, 2006.10.28

Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia. 美田敏宏, 田辺和裕, 大前