

比呂思、北潔、小早川隆敏第 5 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム抄録集、2006.10.28

日本人渡航者のマラリア流行地に対する危険性の認識と予防行動。波川京子，木村幹男，菊池 均，加藤成生，滝沢慶彦，今田博明，飯田忠行。第10回日本渡航医学会学術集会，2006年11月。

マラリア感染蚊からの効率的な遺伝子検出法の検討 三浦彰子，新妻淳，大神田実，大前比呂思 第9回日本検疫医学会 名古屋，2007年1月。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものはない

表1 韓国における三日熱マラリア感染報告者の変化（1993-2005） 韓国CDC

年	93-95	96	97	98	99	00	01	02	03	04	05
軍関連	22	331	1517	2805	2625	2869	1800	1327	871	798	1115
文 民	107	25	207	1127	996	1273	756	472	286	159	223
合 計	129	356	1724	3932	3621	4142	2556	1799	1157	857	1338

表2 ソロモン諸島の Sentinel Site におけるマラリアの疫学的指標の変化

	Aug. 93	Jan. 95	Jan. 96	Nov. 96	Jan. 98	Sep. 06
感染率：Parasite rate						
2 - 9	70.6	62.3	44.3	35.8	32.3	36.1
2 - 14	64.3	57.7	41.3	36.8	28.9	30.4
臨床診断の信頼性						
Sensitivity	36.7	18.9	15.4	11.1	10.2	7.6
Specificity	59.1	83.5	90.0	93.3	94.2	98.4
脾腫率：Spleen rate						
Hackett（触診）	76.1	19.0	12.0	10.3	9.7	2.4
超音波検査	77.5	52.3	40.5	34.2	25.5	8.2

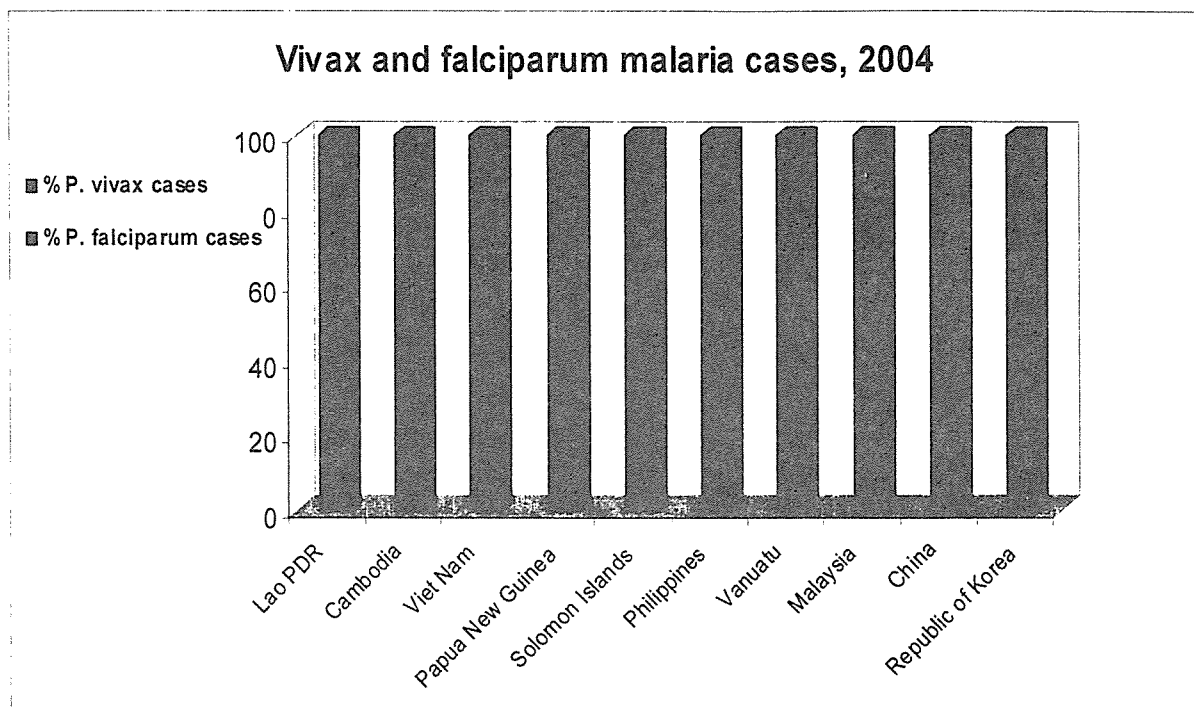
%

表3 日本各地における最近のハマダラカ生息状況

	南大東島	西表島	石垣島	鹿児島県出水市	長崎県諫早市	高知県大月町	高知県	広島県倉橋島
シナハマダラカ	●	●	●	●	●	●	●	●
オオツルハマダラカ			●			●	●	
ヤマトハマダラカ					●			
オオハマハマダラカ		●						
コガタハマダラカ		●	●					

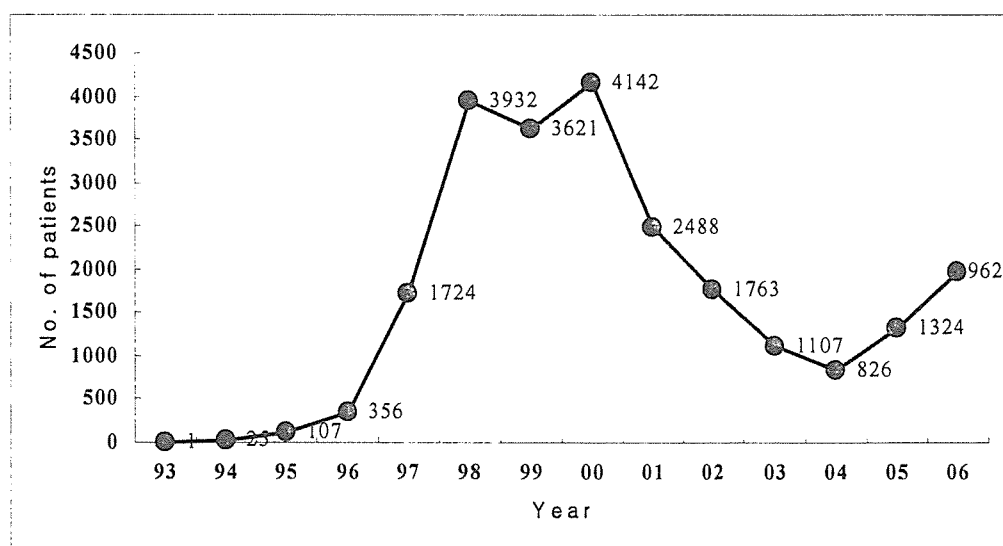
( 原表 津田良夫 )

図1 アジア・太平洋諸国における三日熱・熱帯熱マラリアの状況



(原図 Kevin Palmer *et al.* WPRO)

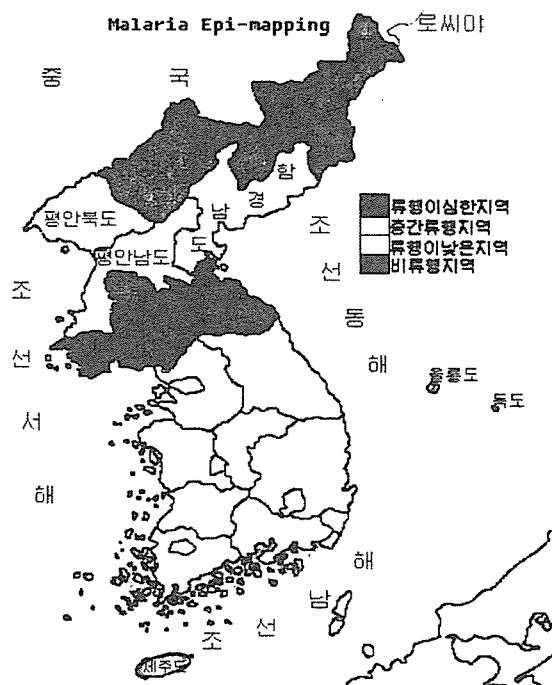
図2 韓国における三日熱マラリア患者数の推移



- The total number of cases has decreased after reaching a peak of 4,142 cases in 2000 to 826 cases in 2004.

(原図 Duk Hyong Lee *et al.* NIH, ROK)

図3 北朝鮮における再興感染症としての三日熱マラリア



- Malaria was eradicated 30 years back in DPRK.
- Reoccurred in 1998 with the peak of 300,000 cases and malaria endemic areas in all over DPRK in 2001.
- Showed decreasing trend since 2002.
- 9,353 cases and 0.5% morbidity in 2006.

( 原図 Kim Yun Chol *et al.* Malaria Control, MoPH, DPRK )

図4 熱帯熱マラリアの感染頻度と *msp-1* ハプロタイプ多様性・遺伝子組み換え頻度の地域ごとの比較

**Geographic comparison : transmission intensity and *msp1* diversity**

	Tanzania	Thailand	Solomon	Palawan	Vanuatu
Transmission intensity	very high	low	high	low	low
<i>msp1</i> haplotype diversity	very high	high	low	high	very low
Multiplicity of infections	very high	high	low	low	very low
Frequency of recombination	very high	moderate	low	low	low
Inbreeding/outcrossing	outcrossing	both	high inbr.	high inbr.	inbreeding

( 原図 田辺和裕 )

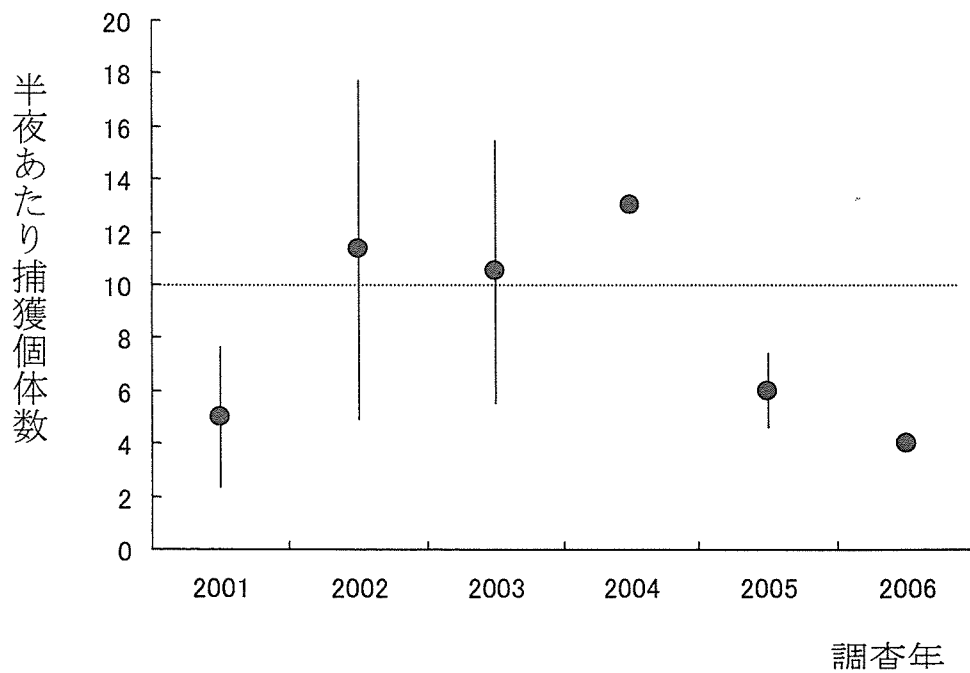
図5 熱帯熱マラリア輸入例にみる PfCRT の地域ごとの変化

	Myanmar	Thailand / Laos	Indonesia	Philippines	PNG
1984		M1a (2)			
1985				WT (1), M2a(2)	
1986			M2b (1)	M2a (1)	M2a (3)
1987					M2a (1)
1988					
1989					
1990					M2a (1)
1991		M1a (1)	M2a (1)	M2a (1)	
1992		M1a (1)		M2a (1)	
1993					
1994	M1a (1)	M1a (1)	M2a (1)		
1995					M2a (1)
1996					
1997	M1a (1)			M2a (1)	M2a (1)
1998		M1a (1), M1b (2)		M1a(1) (30%)	M2a (1)
total 29	2	8	3	8	8

WT	CVMNK
M1a	CVIET
M1b	CVIDT
M2a	SVMNT
M2b	CVMNN

( 原図 中野由美子 )

図6 石垣島野底地域の定点 (2M) で人囮法 (2人, 半夜採集) によって捕獲されたコガタハマダラカ成虫の平均個体数



( 原図 津田良夫 )

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

インドネシア，ロンボク島におけるマラリア対策と感染状況の変化  
；入植地におけるマラリア感染状況の変化を例として

分担研究者 神原廣二 （長崎大学熱帯医学研究所 教授）

2001年11月から3年間にわたり、JICA パートナースHIPプログラムのひとつとして行われた「ロンボク・スンバワ島におけるマラリアコントロール」に関し、受益者となった地域住民を対象として、アンケート調査を行い評価した。住民は一様にコントロール事業を評価し、とくに蚊帳の使用について感謝を示した。また、マラリア検出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、パンフレット、ビデオなどを用いた教育活動も行ったが、結局住民にとって最も印象的で効果があったのは、Health Volunteer と直接話し合ったことであった。住民の記憶に残るような教育活動を進めるためには、やはり単に物を配布するのではなく、検査・治療のための訪問チームを編成し、検査・治療の場面の中で直接が働きかけていくことが重要であることがわかった。また、コントロール活動の事後評価としては、単に保健所データ、実施者団体の意見聴取だけではなく、直接住民に対するアンケート調査も行うべきである。

A. 研究目的

2001年11月から2004年10月までの3年間にわたって、JICA パートナースHIPプログラムのひとつとして「ロンボク・スンバワ島におけるマラリアコントロール」事業が行われた。この事業に対するJICA 調査チームによる評価は事業実施団体の責任者に対するアンケートが中心であり、直接の受益者と考えられる住民による意見は聞かれなかった。私達はコントロール地区住民がこの事業をどのように評価し、それによってどのような影響を受けたのかを知るため住民を対象としたアンケート調査を行った。

B. 研究方法

ロンボク側では山側と海側にそれぞれ2つの部落を選定、スンバワ側では海側2ヶ村を選定してアンケート調査を行った。アンケート調査はそれぞれの保健所内に組織された調査チームを前もって数日間

のアンケート実施訓練した後に、調査を実施させた。その後アンケート回答は現地共同研究者らにより英語に翻訳され、当研究所に持ち帰り分析が行われた。倫理面では熱帯医学研究所の倫理委員会にて承認されている。現地では個々人のインフォームドコンセントを得て、聞き取りを開始した。

C. 研究結果

住民は一様にコントロール事業を評価し、とくに蚊帳の使用について感謝を示した。私達はマラリア検出治療チームを編成し、村々を巡って患者検出治療に当たらせるだけでなく、彼らの自主的住民教育活動を支援した。この他パンフレット、ビデオなどを製作し、教育活動にあたったが、結局 Health Volunteer が彼らと直接話し合ったことに最も効果があることが証明された（表1）。一方効果の中に彼らが得たメッセージとして覚えてお

るものの中に、最も多いものとして水溜りをきれいにするというのがあるが、これは直接マラリア伝染とは関連しない(表2)。

#### D. 考察

さまざまな住民からの回答中には、理解できない部分もあったが、おおむね彼らの評価は高かった。住民の記憶に残るためには、やはり単に物を配布するのではなく、直接的に働きかける検査・治療のための訪問チームの編成が重要な役割を果たしたことは喜ばしい。

#### E. 結論

さまざまなコントロール活動がこれからも各地で行われるであろうが、単に保健所データ、実施者団体の意見聴取だけで、それぞれの活動成果を評価するのではなく、直接住民に対するアンケート調査を考慮すべきであろう。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 現在投稿中
2. 学会発表

- 1) 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 : ロンボク, スンバワ島におけるマラリア流行の考察. 第75回日本寄生虫学会大会, 弘前, 2006年5月19日-5月20日.
- 2) 神原廣二, 上村春樹, Sukmawati Basuki, Yoes P. Dachlan : 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. 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.
- 3) 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 : 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. 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.

- G. 知的財産の出願・登録状況  
なし



表1 Q. What was the most useful media to understand the disease of malaria?  
(Multiple-choice question)

	Lombok	Sumbawa	Total	P (n=600)	95% CI
Leaflet	14	44	58	0.097	0.021 - 0.173
Wayang (Shadow picture)	96	12	108	0.180	0.108 - 0.252
Video	39	19	58	0.097	0.021 - 0.173
Nothing	11	8	19	0.032	(0.047) - 0.110
Direct to the health volunteer	158	210	368	0.613	0.564 - 0.663
Others	14	11	25	0.042	(0.037) - 0.120

95%CI: 95% Confidential Interval

表 2

Q. Do you still remember the message of health education for malaria?  
Please write the things. (free answer)

	Lombok	Sumbawa	Total	P (n=600)	95% CI
Use bednet while sleep	143	60	203	0.338	0.273 - 0.403
Clean the water pool (Eg; empty cans, etc)	338	46	384	0.640	0.592 - 0.688
Clean up the water area	101	90	191	0.318	0.252 - 0.384
Use insecticide spraying	18	46	64	0.107	0.031 - 0.182
Go to health center when get malaria	33	4	37	0.062	-0.016 - 0.139
Malaria is infected by mosquito	10	0	10	0.017	-0.063 - 0.096
Do not sit up at late	15	11	26	0.043	-0.035 - 0.122
Wear the long sleeved shirt	2	7	9	0.015	-0.064 - 0.094
Others	21	8	29	0.048	-0.030 - 0.126
Forget	24	7	31	0.052	-0.026 - 0.130

95%CI: 95% Confidential Interval

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

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  
；ソロモン諸島におけるマラリア感染状況の変化を例として

分担研究者 大前比呂思 （国立感染症研究所 室長）  
協力研究者 亀井喜世子 （帝京大学医学部 助教授）

**研究要旨** 昨年度に引き続き、ソロモン諸島国におけるマラリア感染状況の変化を雨季と乾季に比較調査し、治療的介入の効果について検討するとともに、既存の疫学的指標の有用性と限界について検討した。ソロモン諸島国は、1990年代前半、アフリカと並ぶマラリアの高度浸淫地と言われたが、対策の成功により1997年以降状況は大きく改善した。今世紀に入ってから、民族紛争などで国家的マラリア対策が困難な時期が続いたが、現在に至るまで明らかなマラリア再興の兆候を見せることなく経過している。昨年度、2006年2月（雨季）に、Sentinel Siteとして観察している村落で行った横断的一斉調査では、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、三日熱マラリアが感染者の60%以上を占めていた。2006年9月（乾季）の調査では、マラリア感染率は、22.7%まで減少したが、熱帯熱マラリアに比して三日熱マラリアの減少は少なかった。感染者の80%以上を対象として検査を行い、三日熱マラリア感染者に対しては、クロロキンにプリマキンを加えた治療的介入を行ったところ、2007年2月（雨季）の調査で、マラリア感染率は17.4%まで低下し、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、このような対策に進展に伴い、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くなる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

ソロモン諸島では、薬剤浸漬蚊帳の使用やクロロキンを中心とした早期治療の導入によって、1990年代の後半、マラリア感染者数を半減させるのに成功した<sup>1)</sup>。今世紀に入ってから、民族紛争によって、国家的プランによる系統的なマラリア対策の実施が困難な状況が続いたが、昨年度の調査結果では、全般的なマラリア感染者の低下傾向が、現在も続いていることが示唆された。また、マラリア対策が進んだ他のアジア・太平洋諸国でもみられる、マラリア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く傾向も確認された。

そこで今年度は、1990年代や昨年度に疫学的調査が行なわれた村落群を対象として横断的調査を行い、雨季と乾季の感染状況を従来の傾向と比較するとともに、昨年度から行っているクロロキンにプリマキンも加えた治療的介入の効果を検討することとした。

#### B. 対象・方法

2006年9月と2007年2月、ソロモン諸島のガダルカナル島北東部(図)において、全村民を対象としたマラリアの調査を行った。対象地となった地域は、ソロモン諸島国の首都ホニアラ市と直線で50kmのと

ころにあり、比較的アクセスはよい。かつては直通のバス路線もあって、人の往来も盛んだったが、民族紛争後は、破壊された橋の修復が遅れたこともあり、車道から1時間歩かなければ村に到達できない状態が続いていた。しかし、2006年8月には修復された別の車道が村近くにまで達し、11月には橋も修復されて首都ホニアラとの交通が従来と同じレベルにまで回復した。

今回対象となった村落群で、一斉検査に参加した住民の構成は表1のとおりである。予測される実際の年齢構成より、10才以下の若年者と51才以上の高齢者がやや多くなったが、男女比はほぼ同じとなった

### C. 結果

2006年2月(雨季)の調査では、マラリア感染率は、全体では31.8%と、1996年11月(乾季)の29.6%とほぼ同程度だった(表2,3)。また、熱帯熱マラリア感染者数についてはかなり減少していたが、三日熱マラリア感染者数については、むしろ実数が増加していた。

2006年9月(乾季)の調査では、マラリア感染率は22.7%まで減少し、1996年11月(乾季)と比べても、明らかに減少していた(表4)。特に熱帯熱マラリアは、感染率8.0%と10%以下まで減少した。また、2006年の2月(雨季)と9月(乾季)を比較すると、マラリア感染率は、約10%低下したが、減少の幅は、やはり熱帯熱マラリアの方が多かった。

一方、2006年2月(雨季)と2007年2月(雨季)の結果を比較すると、マラリア感染率31.8%から17.4%へとほぼ半減した(表4,5)。そして、熱帯熱マラリアが13.4%から6.7%、三日熱マラリアが18.0%から10.7%と、両種のマラリアがほぼ同様な低下傾向を示した。

### D. 考察

2005年度のマラリアのAnnual Incidenceは、ソロモン諸島全体では182/1000、ガダルカナル島では378/1000と報告された<sup>2)</sup>。いずれも数値も1990年代前半に比較するとよいが、民族紛争直前の1999年に比較すると悪化している。今回のSentinel Siteでの一斉調査においては、マラリア感染率は22.7%、17.4%と、1996年、昨年度の調査結果に比して大きく減少した。また、熱帯熱マラリアのみならず、三日熱マラリアの感染率も低下した。

今年度の乾季の一斉調査においては、住民の参加率が高くなり、80%を超えたので、症状の出やすい熱帯熱マラリアに加えて、無症状者が相対的に多い三日熱マラリアの感染者についても、かなり原虫保有者を治療することができた。このようにして、対象村落における原虫密度を下げた結果、従来媒介蚊が大量に発生し多くの患者が発生してきた雨季においても、引き続きマラリア感染率の低下を達成することができたと思われる。さらに、首都ホニアラとの間に交通事情が改善し、ヒトの移動の増加に伴う新規マラリア感染者の増加も心配されたが、ホニアラ市内でもマラリアの流行が下火になっており、今年度はそのような傾向もみられなかった。

また、昨年度の調査でも指摘されたように、世界的にマラリア感染の疫学変化を考える際に基本となるPassive Case Detection(PCD)でのデータは、三日熱マラリアが主体となると、一斉調査Active Case Detection(ACD)で得られるデータと一致しなくなることが確認された(表6)。また、熱帯熱マラリアが感染に主体であった頃は、有用な疫学的指標だった脾腫(触診及び超音波検査で補正したもの)や発熱症状といった症状を用いた指標についても、三日熱マラリアが相対的に増加すると、感

染状況を反映しなくなることを示唆された(表7) 3)。症状の乏しい三日熱マラリア感染の実態を的確に把握するには、今後適切な疫学的指標の選択が求められている。

#### E. 文献

- 1) Malaria Control Programme, Annual Report 1997, Vector Borne Disease Control Programme, Ministry of Health & Medical Service, Solomon Islands 1998
- 2) National Vector Borne Disease Control Programme, Annual Report 2004, Bakote'e B. & the senior staff of SIMTRI & VBDCP, Ministry of Health & Medical Service, Solomon Islands 2005
- 3) The usefulness and limitation of clinical diagnosis in primary health care for malaria control, Ultrasound as a technique for malaria epidemiologic surveys, Ohmae H, Mizushima Y, Kawamoto F, Uchida Y, Kato H, Kawabata M, Tanaka T, Leafasia J, Bobogare A, Ishii A. Malaria Research in The Solomon Islands (edited by Ishii A, Nihei N & Sasa M) :51-63. 1998

#### F. 研究発表

##### (1) 論文発表

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.

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.

##### (2) 学会発表

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 2006年6月.

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 2006年10月.

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

マラリア感染蚊からの効率的な遺伝子検出法の検討 三浦彰子, 新妻淳, 大神田実, 大前比呂思  
第9回日本検疫医学会 2007年1月

#### G. 知的財産の出願・登録状況 なし

図 ソロモン諸島、ガダルカナル島北東岸のマラリア浸淫地

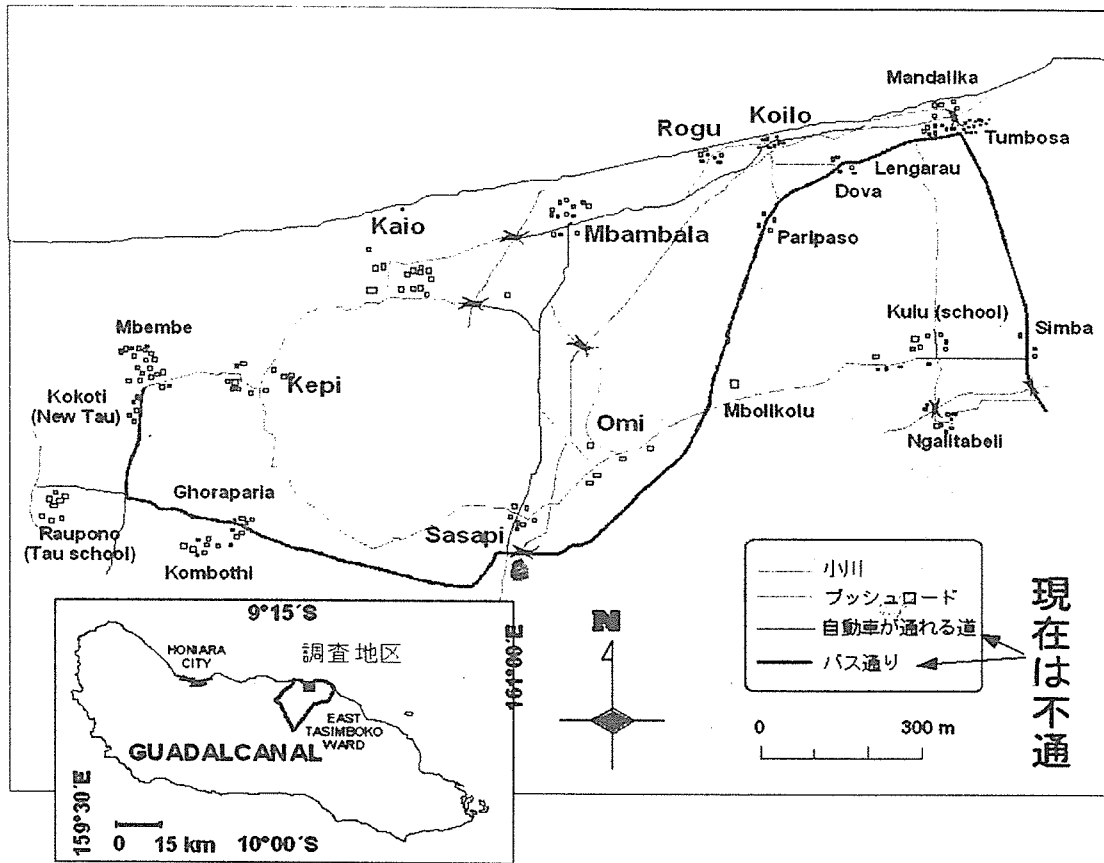


表1 対象となった村落群における村民の構成

年齢	男性	女性	計
～ 10	51	53	105
11 ～ 20	7	12	19
21 ～ 30	5	11	16
31 ～ 40	15	21	36
41 ～ 50	4	9	13
51 ～	14	15	29
計	96	121	217

表2 対象村落群におけるマラリア感染状況（1996年11月：乾季）

年齢	熱帯熱マラリア	三日熱マラリア	混合	計	感染率(%)
～10	23	8	3	34 / 95	35.8
11～20	6	1	1	8 / 21	38.1
21～30	3	0	0	3 / 12	25.0
31～40	2	3	0	5 / 22	22.7
41～50	1	1	0	2 / 11	27.3
51～	2	0	0	2 / 25	8.0
計	38	13	4	51 / 186	29.6

表3 対象村落群におけるマラリア感染状況（2006年2月：雨季）

年齢	熱帯熱マラリア	三日熱マラリア	混合	計	感染率(%)
～10	13	29	1	44 / 105	41.9
11～20	3	5	0	8 / 17	47.1
21～30	3	1	0	4 / 16	25.0
31～40	6	1	0	7 / 36	19.4
41～50	2	3	0	5 / 13	38.5
51～	2	0	0	2 / 29	6.9
計	29	39	1	69 / 217	31.8

表4 対象村落群におけるマラリア感染状況（2006年9月：乾季）

年齢	熱帯熱マラリア	三日熱マラリア	混合	計	感染率(%)
～10	8	21	1	33 / 83	36.1
11～20	6	4	0	10 / 35	18.2
21～30	0	3	0	3 / 25	12.0
31～40	2	3	0	5 / 30	16.7
41～50	1	1	0	2 / 17	38.5
51～	1	0	0	1 / 15	6.9
計	18	32	1	51 / 225	22.7

表5 対象村落群におけるマラリア感染状況（2007年2月：雨季）

年齢	熱帯熱マラリア	三日熱マラリア	混合	計	感染率(%)
～ 10	5	8	0	13 / 53	24.6
11～ 20	1	3	0	4 / 12	33.3
21～ 30	1	1	0	2 / 11	18.2
31～ 40	0	0	0	0 / 21	0
41～ 50	0	1	0	1 / 9	11.1
51～	0	0	0	0 / 15	0
計	7	13	0	13 / 121	10.7

表6 ソロモン諸島ガダルカナル島におけるマラリア感染状況の変化  
（ Passive case detection と Active case detection の比較 ）

年次と算出方法	マラリア感染率 (%)	原虫種別の比率： 熱帯熱マラリア (%)	原虫種別の比率： 三日熱マラリア (%)
1995年 PCD		87	13
1996年 PCD		88	12
1995年 ACD 雨季	41.2	82	18
1996年 ACD 乾季	29.6	75	25
2004年 PCD		71-80	20-29
2005年 PCD		67-82	18-33
2006年 ACD 雨季	31.8	44	56
2006年 ACD 乾季	22.7	37	63

表7 対象村落群におけるマラリア感染状況と様々な疫学的指標の変化

	Aug. 93	Jan. 95	Jan. 96	Nov. 96	Jan. 98	Sep. 06
感染率：Parasite rate						
2 - 9	70.6	62.3	44.3	35.8	32.3	36.1
2 - 14	64.3	57.7	41.3	36.8	28.9	30.4
臨床診断の信頼性						
Sensitivity	36.7	18.9	15.4	11.1	10.2	7.6
Specificity	59.1	83.5	90.0	93.3	94.2	98.4
脾腫率：Spleen rate						
Hackett（触診）	76.1	19.0	12.0	10.3	9.7	2.4
超音波検査	77.5	52.3	40.5	34.2	25.5	8.2

%



平成 18 年度 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」  
プロジェクト 3） 分担研究報告書

熱帯熱マラリア原虫の遺伝的多様性：アフリカと東南アジア・西太平洋の比較

分担研究者 田辺 和裕（大阪大学微生物病研究所 教授）

マラリアワクチン候補である熱帯熱メロゾイト表面タンパク質 1 の遺伝子 (*mSP1*) における対立遺伝子多様性を、マラリア伝播度の高いアフリカと伝播度の低い東南アジア・西太平洋の集団で調べ、比較した。タンザニアでは予想通り *mSP1* 対立遺伝子多様度は高かったが、アジア太平洋では伝播度の低さの割に比較的高い遺伝子多様度が認められる地域があった。また、クロロキン耐性のタイプと分布状況が地域により異なることが明らかになった。

#### A. 研究目的

マラリア原虫の遺伝的多様性は、マラリア流行地における地域住民のマラリア感染免疫と病態、薬剤耐性の広がり、また、将来的にはワクチン効果の予測と判定といった事柄と密接に関わる。熱帯熱マラリア原虫メロゾイト表面タンパク質 1 (MSP-1) はマラリアワクチンの有力な候補であるが、その遺伝子 (*mSP1*) は多型が激しく、ワクチン開発にとり大きな障害となる。*mSP1* の多型は主に蚊ステージにおける有性生殖期組換えによって生じる。組換え頻度が高ければ新規対立遺伝子が頻繁に生じる。有性生殖組換えはマラリアの伝播の度合いに依存するので、伝播の高い地域では *mSP1* の対立遺伝子多様度も高いことが予想される。しかし、マラリア伝播度と *mSP1* 対立遺伝子多様度の相関はこれまでほとんど調べられていない。本研究では、伝播度の高いアフリカの熱帯熱マラリア原虫集団と比較的伝播度の低い東南アジア・西太平洋における原虫集団の *mSP1* 対立遺伝子多様性を *mSP1* ハプロタイプで比較検討した。

さらに、クロロキン耐性遺伝子(*pfprt*)における多型についても調べ、クロロキン耐性のゲノム多様性に与える影響についても検討した。

#### B. 研究方法

タンザニアの首都ダルエスサラームの東 150km、インド洋海岸 Rufiji デルタ地域の Nyamisati 村住民を対象に、1993 年 (n=120)、1998 年 (n=132)、2003 年 (n=104) の 3 度、マラリアサーベイが実施され、その際、感染血液がサンプリングされた。この地域のマラリア流行度は通年で holoendemic 地域である。

1997 年 5-10 月、フィリピン共和国パラワン島の州都 Puerto Princesa の Palawan Provincial Hospital 及び Malaria Control Service Palawan Office の外来マラリア患者 114 人から感染血液を採取した。

ソロモン諸島ガダルカナル島 (n=90) 及びタイ北西部メソト地区の原虫株 (n=111) はすでに報告している。

(Sakihama et al, 2001; Sakihama et al., 2004; Sakihama et al. 2006)

*msp1* ハプロタイプは我々の PCR タイピング法を用いた。(Sakihama et al., 2006) 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。*msp1* 3'側 (ワクチン候補の19 kD断片領域部分) の DNA シーケンスは Big Dye を用いた直接シーケンス法によって得た。対立遺伝子多様度は Nei (1987) の指数 ( $h$ ) によった。*msp1* における組換え頻度の推定は *msp1* 多型ブロック及び多型塩基サイトの連鎖不平衡解析  $R^2$ -test によった。

クロロキン耐性遺伝子 (*pfert*) の多型を見るため、同遺伝子第2エクソン領域468塩基をシーケンスによって調べた。*pfert* は *msp1* ハプロタイプの単独感染株のみについて調べた。

インフォームドコンセントは血液提供者 (児童の場合はその親) から得た。本研究はスウェーデンカロリンスカ大学病院の研究倫理委員会、及び、フィリピンパラワン州保健局の承認を得ている。

### C. 研究結果

タンザニア、ソロモン諸島、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。サンプリングした地域における患者一人当たりの 5' recombinant type 数の平均値 (感染多重度) はタンザニアでは 3.5 (1993年)、3.8 (年)、2.7 (年)、パラワンでは 1.4 であった。既報告のタイ、ソロモン諸島ガダルカナルと比較すると、タンザニアとタイ (3.6) は同程度、パラワンとソロモン諸島 (1.4) が同程度であった。多重感染率 (全株中の多重感染株の割合) もタンザニアとタイで高く、パラワンとガダルカナルで低かった。

*msp1* ハプロタイプの数はタンザニアで 20 個 (38 株中、1993年)、15 個 (23 株中、1998年)、9 個 (13 株中、2003年) であった。パラワンでは 15 個 (57 株中)、タイと同レベルで (16 個、48 株中)、ガダルカナルよりも多かった (8 個、47 株中)。*msp1* ハプロタイプの多様度指数 ( $h$ ) は、タンザニアで非常に高く、 $0.94 \pm 0.02$  (1993年)、 $0.89 \pm 0.06$  (1998年)、 $0.94 \pm 0.05$  (2003年) であった。パラワンの  $h$   $0.88 \pm 0.02$  で、これはタイ ( $0.89 \pm 0.03$ ) と同レベルで、ガダルカナル ( $0.80 \pm 0.03$ ) よりも有意に高かった。

一方、*msp1* 内の多型ブロック/サイトの間での連鎖不平衡は、タンザニアではほとんど認められず、組換え頻度が高いことが推定された。一方、パラワンではガダルカナルと同様に強い連鎖不平衡が認められた。タイにおける連鎖不平衡はタンザニアとパラワン/ガダルカナルの間であった。

タンザニアにおける 10 年間の *msp1* 多型の推移をみると、個々の多型ブロック及び多型サイト (ブロック 17) における多型の頻度は 10 年間で有意な変化は認められなかったが、*msp1* ハプロタイプの分布は大きく異なっていた。

*pfert* 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た。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。感受性型がまだ残存していたとは、100% の耐性型の分布を示したタイ、ガダルカナルと対照的である。

### 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。

*mssl* ハプロタイプの決定の結果、マラリア伝播度の高いタンザニアでは予想通り、*mssl* 対立遺伝子多様度は高かった。一方、東南アジア、西太平洋では伝播度と遺伝子多様性に相関は認められなかった。すなわち、伝播度の低いタイ、フィリピンでは *mssl* 対立遺伝子多様度は比較的高く、逆に、ソロモンでは伝播度がかなり高いが、対立遺伝子多様度は低かった。伝播度が中程度のバヌアツでは、対立遺伝子多様度は最も低かった。

本研究から、タンザニアでは組換えにより頻繁に新規の *mssl* ハプロタイプが誕生していることが明らかになった。*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。本研究から、この株特異的免疫の獲得に組換えによる対立遺伝子多様性の発生が密接に関わっていることが示唆される。一方、ソロモン諸島では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 *mssl* ハプロタイプの数が限られ、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おり、そのため同一の対立遺伝子の感染が重なっていることが予想される。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。

東南アジア・西太平洋においては *mssl* 対立遺伝子多様度とマラリア伝播度は必ずしも相関しなかった。この相関のなさの要因は地域によって異なり、地域における *mssl* プロタイプの分布(数と頻度)、異なる *mssl* 対立遺伝子の感染多重度、ク

ロロキン耐性による原虫集団の瓶首効果などが関与することが示唆された。パラワンでは1997年の時点においてクロロキン感受性型 *pfert* 遺伝子がまだかなりの頻度で残存していることが明らかになった。島嶼では住民の移動が陸続きの大陸(タンザニアやタイ)と比べて限られており、新規のマラリア原虫遺伝子型の流入が少ないことが予想される。ソロモン諸島では過去においてクロロキンの大量投与が頻繁に行われ、その結果、クロロキン耐性型 *pfert* 遺伝子が100%になったと考えられる。クロロキン耐性型 *pfert* 遺伝子とリンクしていないゲノム中の遺伝子(*mssl*を含めて)はそれに伴って、大きく減少したことが考えられる。いわゆる“瓶首効果”が働いた結果、多様性の減少になったと思えるが、パラワンではクロロキンの大量投与はなく、感受性型 *pfert* 遺伝子が残り、ゲノムレベルでも多様性がまだ高く保たれていたと考えられる。この理由により、パラワンではマラリア伝播度が低く、組換え頻度も低いわりには *mssl* 対立遺伝子多様度が比較高く保たれていたことが推定される。

## 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全般的な傾向としてマラリア伝播強度に依存して高くなるが、これはすべてのマラリア流行地にはあてはまらない。*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

### 1. 論文発表

1. Sakihama N, Nakamura M, Palanca Jr A.

- A, Argubano R. A, Realon E. P, Larracas A. L, Espina R. L, Tanabe K. Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines. *Parasitol. Int.* (in press) (2007).
2. Tanabe K., Sakihama N, Rooth I, Björkman A, Färnert A. High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press) (2007).
3. Mita T, Tanabe K., Takahashi N, Dysoley L, Eto F, Hwaihwanje I, Ohmae H, Kita K, Looareesuwan S, Kaneko A, Björkman A, Kobayakawa T. Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia. *Antimicrob. Agents Chemother.* (in press) (2007).
4. Pacheco M. A, Poe A. C, Collins W. E, Lal A. A, Tanabe K., Udhayakumar V, Escalante A. E. A comparative study of the genetic diversity of the 42 kDa fragment of the merozoite surface protein 1 in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Inf. Gen. Evol.* (in press) (2006).
5. Palacpac N. M. Q, Leung B.W.Y, Arisue N, Tanabe K., Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T. *Plasmodium vivax* serine repeat antigen (SERA) multigene family exhibits similar expression patterns in independent infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150: 353-358(2006).
6. Mita T, Kaneko A, Hwaihwanje I, Tsukahara T, Takahashi N, Osawa H, Tanabe K., Kobayakawa T, Björkman 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. *Inf. Gen. Evol.* 6: 447-452(2006).
2. 学会発表
1. Kazuyuki Tanabe. Recent evolution of *msp1* polymorphism in *P. vivax*. 41st Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases (Tokyo), 2007.2.2
2. Y. Saito-Nakano<sup>1</sup>, K. Kamei, M. Iwagami, K. Komaki-Yasuda, S. Kawazu, S. Kano, K. Tanabe, H. Ohmae, T. Endo. Genetic polymorphisms of drug resistant gene in Southeast Asia through imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Japan. The 1st Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases (Bangkok), 2007.1.30
3. Kazuyuki Tanabe. Stable antigen polymorphism in modern *Plasmodium falciparum* populations. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2007, 2007.1.16
4. 早川敏之、Richrad Culleton, 堀井俊宏、田辺和裕、霊長類マラリア原虫とその宿主の進化、第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2006.10.28
5. 西本由利子、有末伸子、川合覚、田辺和裕、橋本哲男、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、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
6. 美田敏宏、田辺和裕、大前比呂思、北潔、小早川隆敏、Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia、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
7. Richrad Culleton, Matthieu Ndounga, Holger Unger, Richard Carter, Kazuyuki Tanabe、*Plasmodium vivax* in Africa、第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、