

2006.10.28

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

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

10. 程訓佳、早坂仁、渡辺勝臣、陶艶琳、劉金也、田辺和裕、橘裕司、熱帯熱マラリア原虫の 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、第75回 日本寄生虫学会大会、2006.5.20

G. 知的所有権の取得状況

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
我が国における輸入マラリア標本を用いた東南アジアにおける
薬剤耐性遺伝子の遺伝的多型性

分担研究者 中野由美子（国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官）

研究要旨 東南アジアにおけるクロロキン耐性マラリアの遺伝的多型を解析するために、感染研が保存してきたマラリア輸入例の標本から DNA の回収を行った。標本は 1984 年から 1998 年のマラリア患者薄層標本であり、そのうち東南アジアからのサンプルとして 29 例の配列決定に成功した。クロロキン耐性の原因遺伝子である PfcRT のアミノ酸配列の多型は、2000 年以降に報告されている多型を支持しており、また新規の配列を有する変異も同定した。2000 年以前のサンプルを用いた PfcRT の多型は殆ど報告例がなく、本研究結果はクロロキン耐性マラリアの世界的流行を 2000 年以前のサンプルを用いて DNA の存在により証明したものである。また、感染推定地域別に PfcRT 蛋白の解析を進めてみると、アジアの大陸部と島嶼部（アジア：フィリピン、インドネシア、オセアニア：パプアニューギニア）では、1990 年代後半までほぼ独立して、クロロキン耐性遺伝子が拡散してきた可能性も示唆された。

A. 研究目的

1950 年代後半に東南アジアならびに南アメリカで発生したクロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫は 1980 年代までに世界中に流行し、研究者は日々新薬の開発を迫られることになった。その後熱帯熱マラリアのゲノム情報の開明と遺伝学的解析手法の進展に伴い、2000 年にはクロロキン耐性を付与する原因遺伝子が、マラリア原虫の食胞（food vacuole）上に局在するトランスポーターPfcRT タンパク質の K76T 変異に由来することが報告された。2002 年には、世界中のクロロキン耐性マラリア原虫株を用いた *pfcr*t 遺伝子のマイクロサテライト解析によって、クロロキン耐性株は世界の 4 ケ所（ペルー、コロンビア、タイ、パプアニューギニア）で独立に発生したことが報告された。さらに 4 種の独立の株は、K76T 変異周辺の

アミノ酸配列も異なることもあわせて報告された。この 2000 年の 2 つの発表以降、今日まで様々な地域での *pfcr*t 遺伝子の多型が報告されている。しかし、それらの多型は 2000 年以降に採取されたサンプルに限局されており、古い年代の多型はマイクロサテライト解析の推測にたよるほかない。

昨年度に報告した通り、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おり、昨年度は薄層標本の地域別ならびにマラリアの種別のまとめを行うと共に、薄層標本から DNA を回収する基礎実験を行った。そこで、今年度はその解析を更に発展させ、古い標本を用いて東南アジアのクロロキン耐性遺伝子の多型を明らかにした。

B. 研究方法

ギムザ染色した薄相標本はメタノールで脱色したのち、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen 社) で DNA を回収した。バルサム封埋した標本はキシレンに一昼夜浸すことによりカバーガラスを除去したのち、メタノールで脱色を行った。*pfprt* K76T 変異を含む 190 bp の DNA 断片は Phusion polymekase (NEB) を用いてネステッド PCR で増幅した。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 1 μ l 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。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委託した。

C. 研究結果

昨年度に報告した通り 1984 年から 1998 年までの薄層標本のうち、東南アジアの熱帯熱マラリア標本 58 例であり、そのうち 29 例が DNA の配列決定が可能であった (図 1)。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。PfCRT タンパク質の 72 から 76 番目のアミノ酸配列は、野生型は CVMNK であるが、CVIET ならびに SVMNT を示すものはインドシナ半島型、パプアニューギニア型として 2002 年に報告されているも

のと同一であった。また、インドシナ型の亜型と考えられる CVIDT という配列を有する株がタイ/ラオスからの 1998 年の輸入例 2 株において認められた。また、新規の配列 CVMNN を有する株を 1986 年のインドネシアからの輸入例で発見した。以上の株は全て、野生型または変異型のみを示したが、1998 年のフィリピンからの輸入例、1 例において、30%がインドシナ半島型ならびに 70%が野生型の混合感染を示した。

(倫理面への配慮)

該当せず

D. 考察

クロロキン耐性マラリアは、1980 年代までに世界の全てのマラリア流行地に広まったとされており、野生型が 1 株しか同定できなかった本研究結果はその報告を薬剤耐性 DNA の存在で証明したものである。また、2002 年に Wootton らのグループがマイクロサテライト解析によって、クロロキン耐性マラリアはインドシナ半島株とパプアニューギニア株 (島嶼型) は異なる起源であることを報告したが、本研究結果は Wootton の結果を実在のサンプルを用いて証明することになった。さらに本結果では、インドネシア、フィリピン、パプアニューギニアでは島嶼型を示したが、1 株において島嶼型がフィリピンにて検出された。現在でもフィリピンではインドシナ型が検出されている (Chen et al., 2003)。よって、1990 年代後半からインドシナ型のフィリピンへの移入が始まったと考えられる。インドシナ型の亜型と考えられる CVIDT は、これまでカンボジアから 2003 年に同定されていた株であった (Lim et al., 2003; Chen et al., 2003)。本研究によって、

1998年にタイ／ラオスからの株によって同様の配列が同定されているため、CVIDTの配列を有する株は1990年代後半からインドシナ半島で発生したと考えられる。最後に、新規の配列 CVMNN を有する株は1986年のインドネシアからの輸入例を最後に検出されず、これまでのどの論文にも報告例がない。*In vitro*の実験によって、K76Tの変異はクロロキン耐性を付与しうる必須の変異であることが証明されている。そこでK76N変異はクロロキン耐性活性が低く、変異が選択されなかったのではないかと推測される。このように、本研究は2000年以前という古いサンプルを用いてクロロキン耐性マラリアの存在をDNAの存在で証明した世界にも例を見ない報告である。

・ F. 研究発表

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 (2006) 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
第66回寄生虫学会東日本支部大会

Saito-Nakano, Y., Kamei, K., Iwagami, M., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S., Kano, S., Tanabe, K., Ohmae, H., Endo, T. (2007) Genetic polymorphisms of drug resistant gene in Southeast Asia through imported isolates of *Plasmodium falciparum*. The 1st Thailand-Japan Joint Forum of Infectious Diseases. Jun 29-30, Bangkok

・ G. 知的所有権の取得状況 なし

図 輸入熱帯熱マラリアでみられた PfcRT 蛋白の多型

	Myanmar	Thailand / Laos	Indonesia	Philippines	PNG	
1984		M1a (2)				
1985				WT (1), M2a(2)		
1986			M2b (1)	M2a (1)	M2a (3)	WT CVMNK
1987					M2a (1)	M1a CVIET
1988						M1b CVIDT
1989						M2a SVMNT
1990					M2a (1)	M2b CVMNN
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	

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

分担研究報告書

マラリア流行の血清疫学指標の開発

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ゲノムワイドに発現することに成功した。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、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た。また、その研究のためのフィールドの設定にも着手した。さらに、フィールドにおける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。

A. 研究目的

我々は、アジア地域におけるマラリア流行の解析に有用な新規の血清疫学指標の開発を行うために、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候補抗原を組換えタンパク質として発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。また、その研究のためのフィールドの設定にも着手し、さらに、フィールドにおける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。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫抗原候補タンパク質の発現

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タンパク質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、スポロゾイト、メロゾイト、トロフォゾイト、生殖母体期にのみ発現が示唆されている抗原ステージ特異的遺伝子を 660 種選択した。

2) タイ国におけるフィールドの設定

タイ国カンチャナブリ県のマラリア流行地コン・モン・ター村において、血清疫学指標となりうる抗原をスクリーニングするための住民血清を経年的に入手するため、共同研究者の Jetsumon Prachumsri 博士、及び Jeeraphat Sirichaisinthop 博士の協力の下、同村全

体をコホートとする追跡研究の準備を開始した。

3) マラリア原虫保有者の簡易迅速診断法の開発

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を開発を行った。LAMP 法は、属および種特異的プライマーと鎖置換型 DNA 合成酵素により、一定温度でマラリア原虫の 18S SSU rRNA 遺伝子を高い特異性、効率性、迅速性をもって増幅することのできる方法である。本研究では、診断の感度と特異度について、LAMP 法と既存の顕微鏡法および nested PCR 法との比較検討を行った。材料には、タイで採取した 121 人（顕微鏡と nested PCR 法により陽性と診断された 68 人、陰性 53 人）の濾紙吸着血液を用いた。

(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) 熱帯熱マラリア原虫タンパク質の網羅的発現

上記で選択した 660 種の熱帯熱マラリア原虫遺伝子のうち 535 種の cDNA クローンを得た。次いでこれらの cDNA クローンからコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系

を用いてそれらを組換えタンパク質として発現した結果、現在までに 469 種 (88%) の組み換えタンパク質を発現することに成功した。

2) タイ国のマラリア流行地におけるフィールドの設定

タイ国カンチャナブリ県のマラリア流行地コン・モン・ター村において、血清疫学指標となりうる抗原をスクリーニングするための住民血清を経年的に入手するため、共同研究者の Jetsumon Prachumsri 博士、及び Jeeraphat Sirichaisinthop 博士の協力の下、同村全体をコホートとする追跡研究の準備を開始した。

3) マラリア感染者の簡易迅速診断法の開発

タイ国カンチャナブリ県コン・モン・ター村 (人口約 1,500 人) における悉皆・経年調査においては、効率的にマラリア感染者を見つけるために、これまでの顕微鏡法や PCR 法に代わる、簡便で迅速な診断法の開発が必須であった。そこで本年度は、新規の核酸増幅法である LAMP 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を開発を行った。LAMP 法は、属および種特異的プライマーと鎖置換型 DNA 合成酵素により、一定温度でマラリア原虫の 18S SSU rRNA 遺伝子を高い特異性、効率性、迅速性をもって増幅することのできる方法である。本研究では、診断の感度と特異度について、LAMP 法と既存の顕微鏡法および nested PCR 法

との比較検討を行った。材料には、タイで採取した121人（顕微鏡とnested PCR法により陽性と診断された68人、陰性53人）の濾紙吸着血液を用いた。その結果、陽性68検体のうちLAMP法では67サンプルからマラリア原虫遺伝子を検出し（感度98.5%）、陰性53検体のうち3サンプルから原虫遺伝子を検出した（特異度94.3%）。LAMP法によるマラリア原虫の検出限界は、四日熱マラリアと卵形マラリアでは10コピー、ヒトマラリア属、熱帯熱マラリアおよび三日熱マラリアでは100コピーであった。検出に要する時間は平均して、ヒトマラリア属は26分、三日熱マラリアは31分、熱帯熱マラリアは32分、四日熱マラリアは35分、卵形マラリアは36分であった。LAMP法は、nested PCR法に比べ迅速で、一定温度で反応が進むため特別な機械は不要、しかも反応済サンプルを目視で簡単に結果の判断ができる。以上の結果は、LAMP法によるマラリア診断法は、臨床診断のみならず、流行地域の調査において有用な、極めて簡易、簡便、確実な優れた方法であることが示唆された。

4) 今後の課題

上記の流行地住民から得られた各種血清を用いて、マラリアの感染動向と、各種の原虫抗原に対する抗体価の変動を、大規模に追跡するため、高感度かつハイスループットの抗原抗体反応検出系を確立する。また、本検出系を用いて、先に発現したゲノムワイドな原虫組換えタン

パク質から血清疫学指標となりうる抗原の網羅的探索をおこなう。そのような研究から、将来の流行予知等に有用な血清疫学研究に用いることの出来る新規抗原タンパク質の同定を目指す。

D. 結論

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に成功した。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、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た。また、その研究のためのフィールドの設定にも着手した。さらに、フィールドにおける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。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yano K, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S, Kawazu S. 2-Cys Peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development in *Plasmodium berghei*. Mol. Biochem. Parasitol. 2006, 148:44-51.
- 2) 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. *Parasitol. Int.* 2006, 55:227-231.
- 3) Palacpac NM, Leung BW, 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.* 2006, 150:353-358.
- 4) Han ET, Lee DH, Park KD, Seok WS, Kim YS, Tsuboi T, Shin EH, Chai JY. Reemerging vivax malaria: changing patterns of annual incidence and control programs in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 2006, 44:285-294.
2. 学会発表
- 1) Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Takeo S, Tsuboi T. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical malaria patients. *ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.*
- 2) Takeo S, Jin L, Sakamoto H, Han ET, Iriko H, Kaneko O, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Endo Y, Tsuboi T. Discovering novel blood stage malaria vaccine candidates: screening with immune sera from falciparum malaria patients and asymptomatic parasite carriers. *ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.*
- 3) Tsuboi T. (Invited Symposist) Malaria vaccine development: recombinant protein expression platforms. Cell-free expression system. *ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.*
- 4) Aguiar JC, Iriko H, Huang F, Sacci JB, Juompan L, Jin L, Han ET, Takeo S, Krzych U, Endo Y, Richie T, Tsuboi T. Discovering novel malaria pre-erythrocytic antigens. *ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.*
- 5) Abot E, Ganeshan H, Banania G, Richie N, Takeo S, Tsuboi T, Sedegah M, Richie T, Doolan D, Weiss W, Jiang G. 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. ASTMH 55th annual meeting, Atlanta, GA, USA, November 12-16, 2006.
- 6) 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、鳥居本美
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
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。
- 6) 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
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
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。
- 7) 入子英幸、竹尾暁、金玲、大槻均、金子修、鳥居本美、坪井敬文
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
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。
- 8) 竹尾暁、金玲、韓銀澤、入子英幸、金子修、鳥居本美、坪井敬文
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
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。
- 9) 仲本賢太郎、坪井敬文、所正治、野崎智義
赤痢アメーバにおける S-adenosyl-1-methionine synthase および S-adenosyl-1-homocysteine hydrolase の解析
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。
- 10) 鳥川行雄、竹尾暁、坪井敬文、新川武、辻尚利、林良博、松本安喜
コムギ胚芽無細胞蛋白合成系によるブタ回虫感染防御抗原 As16 の産生及び、その防御効果の検討
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。
- 11) 荒井朋子、仲本賢太郎、木俣勲、北出幸夫、坪井敬文、所正治
リアルタイム PCR を用いたアデノシンアナログのクリプトスポリジウム増殖抑制効果の評価
第 75 回日本寄生虫学会大会、弘前、5/19-20、2006。
- F. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきものはない

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：マラリア等原虫疾患（プロジェクト3）

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

研究要旨 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の分化増殖測定、特に schizonts 形成観測のために、Flow cytometry (FCM) を適用し、現行の Giemsa 染色後検鏡する Giemsa 法と比較し、以下の事が明らかになった。Giemsa 法で観察計測した赤血球内の *P. falciparum* の核数の変化と FCM で計測した感染赤血球 (PRBC) の蛍光強度 (RFU) の変化はよく一致した。Chloroquine (CQ) の存在下での schizonts 形成経過の観察では強い蛍光を発する PRBC (H-F1) のみが CQ の薬剤作用と相関する。同調培養 16～24 時間における schizonts 形成に対する CQ の抑制効果 (EC50) は FCM および Giemsa 法と共に、44 時間培養後に得られる parasitemia を基準に算出した 50% 増殖抑制効果とよく一致した。Life cycle 完了時に放出される merozoites 数は正常な分化増殖や薬剤の作用を鋭敏に反映するインディケーターとなることがわかった。

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マラリア対策に不可欠である。

マラリア患者に対する抗マラリア剤の治療効果は原虫自体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 試験結果や遺伝子レベルでの分析結果が一致しない事はよく知られているが、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実験室内ばかりでなく、フィールドでも利

用出来る簡便、迅速で、信頼性の高い薬剤感受性 *in vitro* 試験法および効果評価法を確立し、②*in vitro* 試験で得られた薬剤感受性の特性、遺伝子特性および *in vivo* 効果とを比較検討し、相互関連を調べるものである。加えて③熱帯熱マラリア原虫の分化増殖に関連する分子、遺伝子を特定し、疫学的調査に役立てる事を併せて行う。

第一段階として私達が先に開発実用化した熱帯熱マラリア原虫の無血清培地を用いて薬剤感受性評価法を標準化した。従来のヒト血清培地を用いた評価方法と比較した結果、この無血清培地を用いた評価方法においても各種抗マラリア剤による原虫の増殖や schizonts 形成抑制効果を同等に評価できた。更にこの無血清培地に用いる増殖促進因子は、市販製品であり、添加時余計な処理等が不要で、非常に安定した結果を得る事ができた。

マラリア原虫増殖評価法については、先に開発した SYBR green I を使用した Flow cytometry (FCM) およびマラリア原虫の lactate dehydrogenase (pLDH) 測定法を導入して従来用いられている Giemsa 染色標本の顕微鏡観察による評価法 (Giemsa 法) と比較した結果、同等の評価をすることができると考えられた。また FCM や pLDH 測定法は、一度に多量の検体を扱う事ができ、迅速、簡便で、客観的な数値として結果を得る利点もあり、広い範囲での応用が期待出来る。

ここで標準化した FCM は核酸染色性

蛍光色素 SYBR Green I を用いて行うものであるが、従来多用されている Acridine Orange や Hoechst 33258 等に比較して強い蛍光シグナルを発生し、鋭いピークを得る事ができ、核酸に対する高い選択性があるという多くの利点を有する事から、個々の赤血球内の原虫の発育段階を評価できる可能性が推測された。この事から今回この FCM を Schizont 形成評価法に応用した。

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 (*Plasmodium falciparum* FCR3/FMG-Gambia) を用いて、Ring form に同調化したカルチャーの正常な分化増殖とともに、経時的に感染赤血球 (PRBC) の蛍光強度 RFU (relative fluorescent units) を 3 段階のカテゴリー (強い蛍光、H-F1; 中程度の蛍光、M-F1; 弱い蛍光、L-F1) に分けて計測した。同一のカルチャーの Giemsa 染色塗抹標本作製し、核数によって 3 段階 (3 核未満、<3N-G; 3 から 6 核、3-6N-G; 6 核より多数、>6N-G) に分けて計測し、FCM の測定結果と比較した。

次いで抗マラリア剤 Chloroquine (CQ) で増殖抑制下にある PRBC 内の *P. falciparum* の Schizonts 形成過程を FCM および Giemsa 染色法で観察した。

更に培養 44 時間後の成熟 Schizonts

から放出された merozoites の計測を FCM で行った。

C. 研究結果

Ring form に同調化したカルチャーの schizonts 形成過程 (16、20、24 hrs) 及び増殖サイクルが完了したと考えられる 44 hrs 後に得た PRBC の核数変化 (Giemsa 法) と RFU (FCM) 変化はよく一致した (Fig. 1). 相関係数 (R^2) は、0.922 (H-FL と >6N-G), 0.999 (M-F1 と 3-6N-G) 及び 0.965 (L-F1 と <3N-G) であった。

次いで濃度の異なる CQ の存在下での schizonts 形成過程を FCM 及び Giemsa 染色法で観察した。その結果、FCM において schizonts 形成に対する薬剤作用を反映するのは H-F1 の PRBC 数のみであり、M-F1 の PRBC 数は変化を受けない事が明らかになった。代表的な結果として 24 hrs 培養における結果を Figs. 2A, B, C に示した。

更に 44 hrs 培養後の成熟 schizonts から放出される merozoites の計測をしたところ、薬剤の作用を明瞭に反映している事が判明した (Fig. 3)。

以上の測定結果から CQ による 50% schizonts 形成抑制 (EC50) および放出 merozoites 数をインディケーターにした CQ による抑制効果 (GIC50) を算出した (Table 1)。その結果、16、20、24 hrs における Giemsa 法と FCM による EC50 及び GIC50 はよく一致した。一方、放出 merozoites 数を基準にして算出した GIC50 は他の方法を用いた場合と比較し

て高感度に CQ の効果を検出しているものと考えられた (Table 1)。

D. 考察

本研究では schizonts 形成を、個々の細胞を測定できる利点を利用して FCM で蛍光強度 (RFU) を指標として *P. falciparum* の schizonts 形成を評価する方法について検討した。

FCM では蛍光の強い H-FL のカテゴリーに含まれる PRBC を測定する事により、CQ の抗 schizonts 作用を Giemsa 法と同等に測定する事ができる。FCM は Giemsa 法で個々の PRBC 内の核数を計測する方法に比較してはるかに迅速で、短時間内に、客観的な数値として作用を評価できる事を示唆している。

放出される merozoites 数を分化増殖のインディケーターとして使用する方法は特に鋭敏であった。Giemsa 法では放出 merozoites の計測は困難である事から無視されているが、FCM で好適条件の固定を併用する事により、破壊されやすい merozoites の形態を保つ事が出来、薬剤や増殖因子の効果判定に極めて有用な方法になると考えられた。

付随的になるが、CQ による増殖抑制が核酸合成阻害というよりむしろ成熟 schizonts (正常 merozoites) 形成に顕著な障害作用を及ぼしている事が明らかになった。この事から SYBR Green I を用いた FCM は抗マラリア剤や増殖因子の作用機序の解明等に有用な手段となるものと

考えられる。

FCMは先に報告した原虫のpLDH測定法と同様非常に有効な手段であり、加えて今回の報告にみられるようにschizonts形成を含む分化増殖も正確に観察できる。しかしやはり比較的高い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。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

Hiroko Asahi, Mako Omura, Shinji Izumiyama, Hiroshi Ohmae,
Identification of components of
intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. that interact with
growth-promoting agents
XI International Congress of
Parasitology: August, 2006 (in

Scotland).

朝日博子、泉山信司

赤内型熱帯熱マラリア原虫に対する脂質性増殖因子の作用機序

第76回日本寄生虫学会大会： 2007年3月29日

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

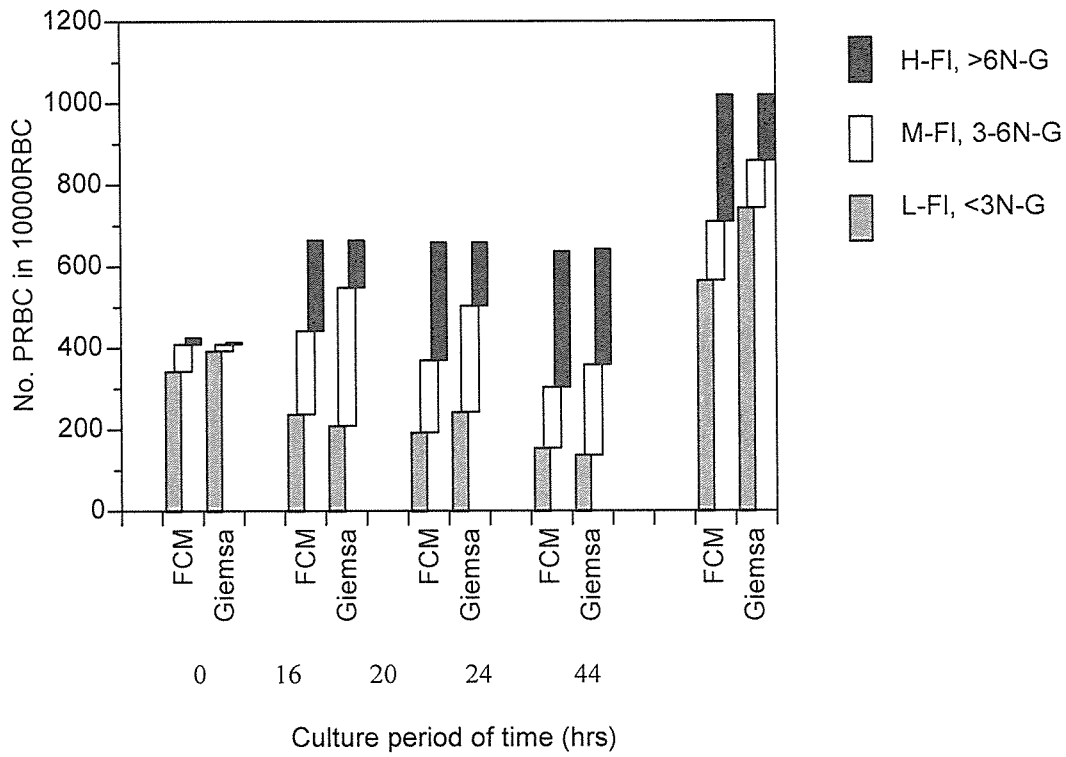
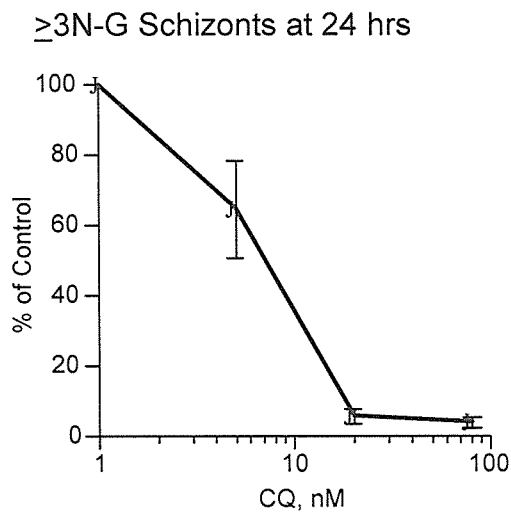


Fig. 1 培養経過に伴う PRBC 内の *P. falciparum* の核数と RFU の変化



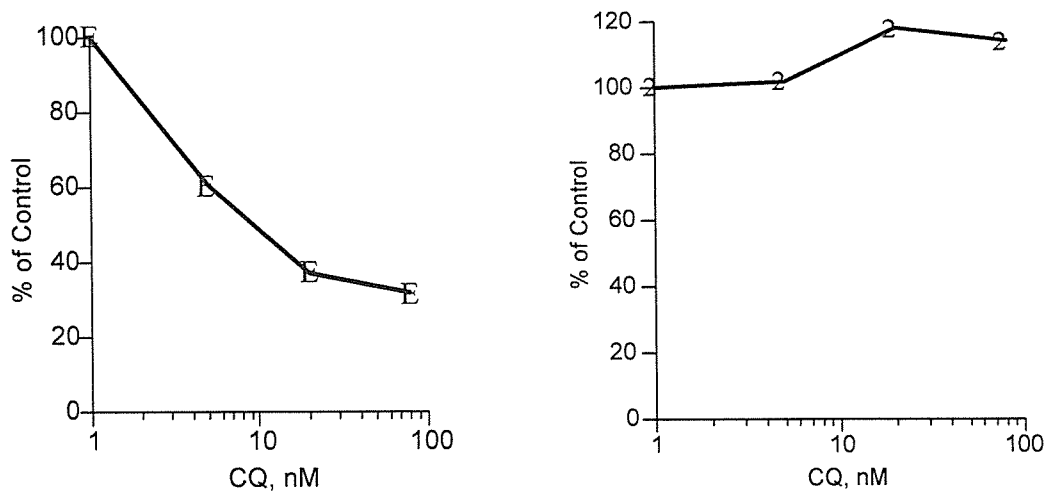


Fig. 2 CQ 存在下における培養開始後 24 hrs の schizonts 形成及び RFU

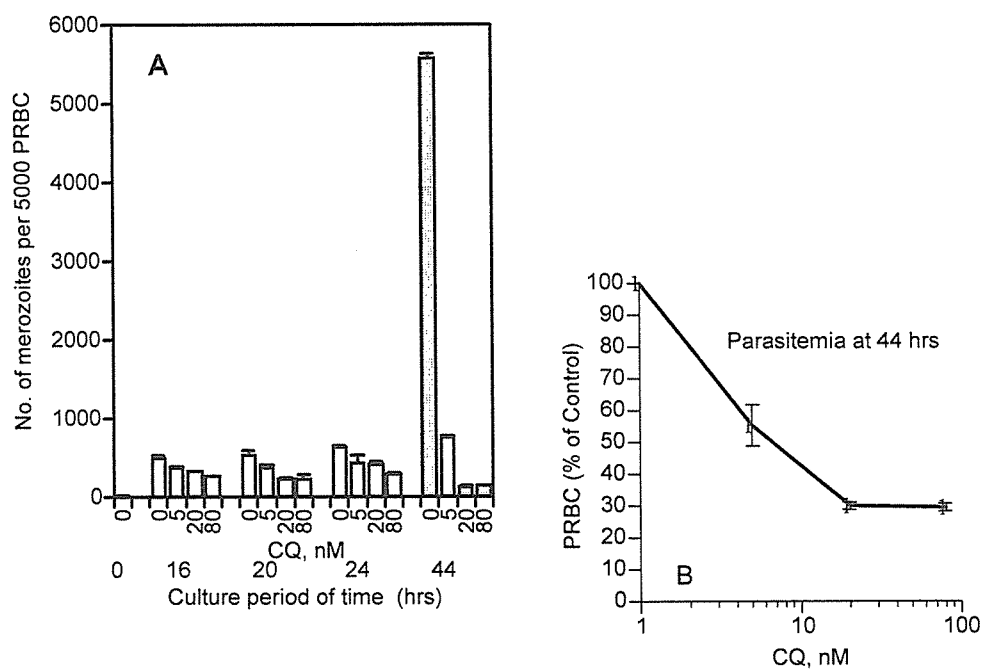


Fig. 3 培養液中に放出された merozoites 数 (A) および培養 44 hrs 後の Parasitemia (B)

Table 1 各種測定法で得られた CQ による *P. falciparum* に対する schizonts 形成抑制効果

Culture period (hrs)	GIC50* of CQ		EC50* of CQ	
	Parasitemia released	merozoites	Giemsa	FCM
44	7.38± 3.93*	2.91± 0.01		
16			11.52± 0.29	7.47± 4.2
20			11.02± 2.10	7.15± 1.4
24			7.98± 4.07	11.55± 1.5

*, nM± SD

研究要旨 G6PD 欠損症の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。

A. 研究目的

カンボジアやインドネシアでは、G6PD 欠損症の遺伝子型の研究はなされておらず、いかなる遺伝子型が存在しているのかについては不明であった。そこでカンボジアやインドネシアにおいてマラリアの疫学調査と同時に、G6PD 欠損症の疫学調査を行い、得られた試料から遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

インドネシア・フローレス島マウメレ、カンボジア・プノンペン市およびラッタナキリ州、バタンバン州、カンポット州の村落において G6PD 迅速診断法を用いて疫学調査を実施した。採血は現地関係者が行い、インフォームドコンセントが得られたボランティアから 0.5~1.0 ml の静脈血を採取した。遺伝子型の解析は自治医大・松岡教授のグループが実施した。

C. 研究結果と考察

カンボジアでは 47 例中 46 例が G6PD Viangchan 型であり、クメール族の祖先は一つと考えられた。残りの 1 例は G6PD Union であり、海洋性民族のものであった。インドネシアでは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 型が優占型であったが、土着のシッカ族・エンデ族の

変異型の構成で Viangchan 型は極めてまれで、47 例中 1 例しか認められなかった。シッカ族では 33 例中半数以上の 14 例が中国広東省由来の G6PD Kaiping であり、エンデ族とも大きく異なっていた。

E. 研究発表（論文発表）

Arai, M., et al.: Reactivity of blood samples spotted onto filter papers in the WST-8 method for screening of G6PD deficiency. *Acta Medica Okayama*, 60, 127-134, 2006

Jalloh, A., et al.: 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. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 1229-1235, 2006

Kawamoto, F., et al.: Further investigations of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Flores Island, eastern Indonesia. *J. Human Genet.*, 51, 952-957, 2006

F. 知的所有権の取得状況

特許登録： 特許名称：四日熱マラリア原虫とその診断、発明者名 川本 文彦、権利者名 科学技術振興事業団、特許登録 特許第3828022号（平成18年7月14日登録）

特許出願： 特許名称：グルコースー6
ーリン酸脱水素酵素異常症の保因の診
断方法、発明者 川本 文彦、権利者名
同仁化学、出願番号 特願
2003-071219：（平成15年3月17日出願）

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
石垣島におけるマラリア媒介蚊の発生状況

分担研究者	津田良夫	（国立感染症研究所 室長）
協力研究者	飯塚信二	（新潟検疫所）
	長谷山路夫	（仙台検疫所）
	田島章太郎	（成田空港検疫所）
	新妻 淳	（横浜検疫所）
	山内健生	（広島大学）

過去の調査で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、人囮採集による蚊成虫の採集を試みた。また、野底地域を対象としてドライアイストラップを用いた広域の成虫密度調査を平行して行った。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。観光客が頻繁に訪れる市街地や島の西部地域で、コガタハマダラカによって吸血されるリスクがどの程度であるかは今回の調査では結論できなかった。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示唆された。

A. 研究目的

熱帯熱マラリアは死亡率が高く、アジアで流行しているマラリアの中で最も注意を要するマラリアである。熱帯熱マラリアを媒介するハマダラカはセリア亜属

（Subgenus *Cellia*）に属する種類に限られ、我国では熱帯熱マラリアを媒介可能なハマダラカとして、コガタハマダラカ、*Anopheles minimus*、一種のみが八重山諸島に生息している。特に石垣島では現在もコガタハマダラカの生息が広範囲にわたって確認されている。

石垣島には毎年国内外から多くの観光客が訪れるため、マラリアに感染している観光客が石垣島を訪れる可能性もある。また、遠洋漁業に出かけ外地でマラリアに感染した船員が石垣港に立ち寄った例も過去には

報告されている。このように何らかの方法でマラリアに感染した人が石垣島を訪れたとき、コガタハマダラカがこれらのマラリア患者から吸血し、マラリア原虫を保有した感染蚊となって2次患者を発生させる可能性がどの程度であるのかを検討しておくことは重要である。

石垣島における幼虫発生源に関しては1998～1999年に全島を対象とした詳細な調査が行われているが、成虫の飛来密度に関しては詳しい調査は行われておらず、人が実際にコガタハマダラカによって吸血される機会がどれくらいあるかはよくわからない。そこで、本研究では石垣島におけるコガタハマダラカ成虫の吸血飛来密度の現地調査を人囮法によって実施し、コガタハマダラカによる吸血リスクを検討した。