

D1-758s	GAAACGTGGATGTCCTCTGA
D1-1049s	CCAACACTGGACATTGAACT
D1-1257s	GTGGAAGAACAAGACGCGAA
D1-1515s	ATGAGATGGTGTGCTGACA
D1-1918s	ACAGATGCACCATGCAAGAT
D1-3550c	GGATCTCATTACCTCTTCGA
D1-1649c	GACCAGCAAGTCTTGTCTA
D1-2341sbam	: 5'- cgcgaGGATCCtcaaggagcacgtccctttca
Den1NIID1419c	GCA GTT GTC CCA TGT TCT CTG
Den1NIID2339s	AACTCAAGGAGCACGTCCCT
Den1NIID2647c	GTT CAA TTC ATT TGA TAT TTG C
D2-826s	CATCCAGGCTTCACCATAAT
D2-1296c	TCCATGGTAGACAGAGGATG
D2-1219s	TCCATGGTAGACAGAGGATG
D2-1279c	GTC ACG ATG CCT CCC TT
D2-1499C	CGG AGA ACA TTC CAT CGT
D2-1760c	CCTTCTTGGGATCCTAAAC
D2-1589s	TTACCATGGCTGCCCGGAGC
D2-2116c	CTTAAACCAGCTGAGCTTCAG
D2-2045s	GAACCTCCATTTCGGAGACAG
D2-2529c	GCTGAAGCTAGTTTTGAAGG
D2-2428s	GGTTGCGTTGTGAGCTGGAAA
D2-2994c	ATGTCGGCATGGACGGCTCTG

D2-2967s	ACTCATGTCAGCGGCCATAAA
D2-3547c	TTTCGTTCCCTACTCGGGTCCT

Serotyp e	Strain	Year of isolation	Origin	Sumber/ GenBank accession #
DENV-3	29472	1992	Fiji	L11422
DENV-3	1416	1984	India	L11424
DENV-3	1153	1977	Indonesia	Lee <i>et al.</i> 1993
DENV-3	1280	1978	Indonesia	L11426
DENV-3	85-159	1985	Indonesia	L11428
DENV-3	29586	1981	Malaysia	L11427
DENV-3	1558	1985	Mozambique	L11430
DENV-3	H87	1956	Filipina	L11423
DENV-3	168.AP-2	1983	Filipina	L11432
DENV-3	1340	1977	Puerto Rico	L11434
DENV-3	PR6	1963	Puerto Rico	L11433
DENV-3	1696	1986	Samoa	L11435
DENV-3	1326	1981	Sri Lanka	L11431
DENV-3	1594	1985	Sri Lanka	L11436
DENV-3	260698	1989	Sri Lanka	L11437
DENV-3	2783	1991	Sri Lanka	L11438
DENV-3	1327	1965	Tahiti	L11439
DENV-3	2167	1989	Tahiti	L11619
DENV-3	5987	1962	Thailand	L11440
DENV-3	CH3489D73-1	1973	Thailand	L11620

DENV-3	D86-007	1986	Thailand	L11441
DENV-3	MK315	1987	Thailand	L11442
DENV-3	DS 002/06	2006	Jakarta, Indonesia	Penelitian ini
DENV-3	DS 029/06	2006	Jakarta, Indonesia	Penelitian ini
DENV-3	DSA 02/06	2006	Jakarta, Indonesia	Penelitian ini
DENV-3	17/04	2004	Jakarta, Indonesia	Penelitian ini
DENV-3	CH53489	1973	Thailand	Raekiansyah, M. <i>et al.</i> 2005
DENV-3	KPS/551	1998	Thailand	Raekiansyah, M. <i>et al.</i> 2005
DENV-3	CO360/94	1994	Thailand	AY923865
DENV-3	98902890	1998	Sumatra, Indonesia	AB189128
DENV-3	98901640	1998	Bandung, Indonesia	AY912455
DENV-3	98901590	1998	Bandung, Indonesia	AY912454
DENV-3	98901517	1998	Sumatra, Indonesia	AB189127
DENV-3	CO331/94	1994	Thailand	AB189126
DENV-3	KPS/207	1998	Thailand	AY912458
DENV-3	98901403	1998	Sumatra, Indonesia	AB189125
DENV-3	98901437	1998	Sumatra, Indonesia	AB189126
DENV-1	A88	1988	Indonesia	AB074761
DENV-1		2002	Traveler Indonesia	from

DENV-1		1997	Brazil	
DENV-1	INS347689	1985	Columbia	AF425616
DENV-1	Hawaii	1945	Hawaii	Af425619
DENV-1	GZ061707	2006	China	EF508203
DENV-1	DAKAR-A1520	1985	Ivory Coast	AF425620
DENV-1	NI10V104	2004	Thailand	DQ916647
DENV-1	PUO359	1980	Thailand	AF425630
DENV-1	S275/90	1990	Singapore	M87512
DENV-1	D1.Myanmar.494	2002	Myanmar	2002
	4062			
DENV-1	PRS228686	1976	Myanmar	AF425615
	P2-1244	1972	Malaysia	AF425616
DENV-1	CAREC 86471	1986	Trinidad-Tobago	AF425639
DENV-1	AUS HATI7	1983	Australia	AF425612
DENV-1	125239	1994	Venezuela	AF425637
DENV-1				

執筆者氏名	刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行書店名	巻名	ページ	刊行年
Itoda, I., Masuda, G., Suganuma, A., Imamura, A., Ajisawa, A., Yamada, K., Yabe, S., Takasaki, T., <u>Kurane, I.</u> , Totsuka, K. and Negishi, M.	Clinical features of 62 imported cases of dengue fever in Japan.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.	75(3)	470-474	2006
Wang, H.Y., Takasaki T., Fu, S.H., Sun, X.H., Zhang, H.L., Wang, Z.X., Hao, Z.Y., Zhang, J.K., Tang, Q., Kotaki, A., <u>Tajima, S.</u> , Liang, X.F., Yang, W.Z., Kurane, I. and Liang G.D.	Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China.	<i>Journal of General Virology</i>	88	885-894	2007
Ito, M., Yamada, K., Takasaki, T., Pandey, B., Nerome, R., Tajima, S., Morita, K. and <u>Kurane, I.</u>	Phylogenetic analysis of dengue viruses isolated from imported dengue patients: possible aid for determining the countries where infections occurred.	Journal of Travel Medicine	14(4)	233-244	2007
Anantapreecha, S., A-Nuegoonpipat, A., Prakrong, S.,	Dengue virus cross-reactive hemagglutination inhibition antibody responses in patients	Japanese Journal of Infectious Diseases.	60(5)	267-270	2007

Chanama, S., Sa-Ngasang, A., Sawanpanyalert, P. and Kurane, I.	with primary dengue virus infection.				
Tajima, S., Nukui, Y., Takasaki, T. and Kurane, I.	Characterization of the variable region in the 3' non-translated region of dengue type 1 virus.	<i>Journal of General Virology,</i>	88	2214-2222	2007
Nerome, R., Tajima, S., and et al	Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolated from swine in Japan from 2002 to 2004,	<i>Journal of General Virology</i>	88	2762-2768	2007
Takasaki T., Kotaki A., Nishimura K., Sato Y., Tokuda A., Lim C. W., Ito M., Tajima S., Nerome R., Kurane I.	Dengue Virus Type 2 Isolated from An Imported Dengue Patient in Japan: First Isolation of Dengue Virus from Nepal.	J. Travel Med.	15(1)	46-49	2008
Mizuno Y., Kotaki A., Harada F., Tajima S., Kurane I., Takasaki T.	Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma.	Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.	101(7)	738-739	2007
Nawa, M., Pan, C.Y., Tsai, W.H., Chan, C.D., Machida, S., Takasaki, T., <u>Lim, C.K.</u> Harn, M.R., Kurane, I.	Evaluation of Immunoglobulin A-capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Dengue Virus Infection.	<i>Dengue Bulletin,</i>	30	157-161	2006
Pandey, B.D., Morita, K., Khanal, S.R., Takasaki, T.,	Dengue virus, Nepal	Emerging Infectious Diseases	14	514-515	2008

Miyazaki, I., Ogawa, T., Inoue, S. and <u>Kurane, I.</u>					
--	--	--	--	--	--

学会発表に関する一覧表 (平成19年度)

執筆者氏名	学会発表名	学会名	開催年	開催地
ウイルス				
高崎智彦	輸入デング熱の診断と治療	平成19年度第2回静岡県感染症医療関係者研修会	2007年10月13日	静岡市
田島 茂、 高崎智彦、 倉根一郎	デング1型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製に及ぼす影響	第55回日本ウイルス学会	2007年10月	札幌市
高崎智彦、 田島 茂、 小滝 徹、 水野泰孝、 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55回日本ウイルス学会	2007年10月	札幌市
名和 優、 町田早苗、 高崎智彦、 田島 茂 水野泰孝、 倉根一郎	デングウイルス感染の抗体検査： 患者尿中の IgA 抗体検出	第55回日本ウイルス学会	2007年10月	札幌市
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

<p>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</p>	<p>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。</p>	<p>第 80 回日本感染症学会</p>	<p>2006 年 4 月 20-21 日</p>	<p>東京</p>
<p>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</p>	<p>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</p>	<p>第 13 回トガ・フラビ・ペ スチウイルス研究会</p>	<p>2007 年 1 月 19 日</p>	<p>東京</p>

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)
総括研究報告書

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

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	(財)結核予防会新山手病院
	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
	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、蚊を介したマラリア感染例は、例外を除いて報告がなく、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認められ、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ある。

今年度の新潟県におけるシナハマダラカの調査では、再興感染症として三日熱マラリアが大きな問題となった韓国北部に比してその生息密度が低くなった。一方、八重山諸島におけるコガタハマダラカの生息密度は、大きな変化がなく、数理モデルによる解析でも、熱帯熱マラリア原虫の再侵入と定着により、小規模な流行をおこす可能性を完全には否定できないことがわかった。1998-2002年の輸入例の解析では、マラリアの感染リスクは、東南アジア地域に比して、アフリカと南太平洋地域で高かった。南太平洋地域で感染機会が多かったのは、東南アジアと同じ三日熱マラリアで、最近の世界的なマラリア流行状況の変化を反映していると思われた。現在、わが国の検疫所では、マラリアを疑った例の補助診断に迅速診断キットも使用しているが、原虫密度の低い三日熱マラリアの場合、Sensitivity が低くなり、キットによる差も大きいことがわかった。また、国内2次感染の予防には、マラリア原虫感染蚊の検出も求められているが、QIAamp 法と Real-time PCR 法を併用すると、高率に蚊内の三日熱マラリア原虫が検出できた。

熱帯熱マラリアの分子疫学的研究は、主に *msp-1* 遺伝子とピリメサミン耐性遺伝子をアジア・アフリカの大陸部と西太平洋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進化速度も遅く、株特異的な免疫が誘導されやすく、重症例・死亡例が少ない一因となっている可能性が高い。また、薬剤耐性株の拡散は、その地域での薬剤使用状況や薬剤行政とも関連しており、昨年度解析したクロロキン耐性遺伝子と異なり、ピリメサミン耐性については、大陸諸国でも野生株が 1998 年まで認められた。熱帯熱マラリア原虫遺伝子の cDNA クローンから、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて組換え蛋白質を発現する研究では、実際に、149 種の

原虫抗原組換え蛋白質とマラリア感染者血清の反応性を、アルファスクリーン法を用いて検討した。病態や臨床所見もあわせて、種々の地域で比較することにより、今後、血清疫学的な指標となる蛋白の検索が進むことが望まれる。

A. 研究目的

本研究の大きな目的は、今なおアジア・太平洋地域で流行しているマラリアのわが国への侵入監視の強化にある。1961年以降、日本では輸入マラリアが中心となり、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国内での感染拡大の報告はない。しかし、未だ国内各地に、マラリア原虫を媒介するハマダラカの生息が確認されており、今後、マラリアが、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。

本研究の目的達成にむけた基礎的データ収集として、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の正確な把握を目指した。また、国際的なマラリア防疫強化のため、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抽出し共有することも目指した。

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、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中国 CDC, WPRO との共催で上海にて行ったが、今年度は、この3年間の研究成果を共有すべく、主たる海外研究協力者との報告・連絡会議を東京で行った。

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、三日熱マラリア媒介蚊にもその調査範囲をひろげた。さらに国内発症の輸

入マラリア例については、単なる総患者数ではなく、各流行地への旅行者数との関係で感染リスクについて検討した。また、実際に日本で再流行がおきる可能性についても、数理モデルを作成して検討した。

実際のマラリア浸淫地では、流行の中心となっている三日熱マラリアや関連する血液異常について調査を継続した。また、現在の世界的な感染状況の変化に対応できる、マラリアの検査診断法や疫学的指標の評価や開発についても、研究を継続した。さらに、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・太平洋地域における、島嶼部と大陸アジアの熱帯熱マラリア原虫を比較した分子疫学的解析も続けた。

このような一連の研究の流れから、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簡易診断法, Rapid Assessment に関する研究(分担研究者:大前比呂思)
 - 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:田辺和祐、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. et al., 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 (Luchavez J. et al., Philippines)
- e) Reduction of the frequency of epidemics through better strategies using the present malaria information system in Solomon Islands (Bakotee B. Solomon Islands)
- f) Study on Forecasting and Warning of Malaria Epidemics in Anhui province, China (Tang L. China)

2) 国内におけるマラリア防疫体制の強化を目指す研究

- a) 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)
- b) 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)
- c) マラリアに関する検疫機能の強化特に感染蚊からのマラリア原虫検出に関する研究(分担研究者:大前比呂思、研究協力:検疫所研究グループ)

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簡易診断法, Rapid Assessment に関する研究(分担研究者:大前比呂思, 研究協力者:亀井喜世子)

ソロモン諸島のガダルカナル島北東岸のマラリア浸淫地において、近年、相対的に増加している低原虫密度の三日熱マラリア感染者の検出に、どの程度迅速診断法:Rapid Diagnostic Tests(RDTs)が利用できるか検討した。Opti MALとPan-R Malariaの2種類のキットで比較したが、Specificity は熱帯熱マラリア、三日熱マラリアとも、2種類のキットで高い値を示した(表 1)。一方、Sensitivity は、熱帯熱マラリア、三日熱マラリアとも、60%に満たなかった。特に Pan-R Malaria では 30.8%と低くなり、また、原虫密度と検出率の間には明確な関連はみられなかった。

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:田辺和裕、中野由美子)

本研究では、伝播度の異なる世界各地の熱帯熱マラリア原虫集団における表面蛋白:MSP-1 に注目し、関連遺伝子:*mssl* を用いて多重感染度を比較検討している。昨年度までにタンザニア、タイ、フィリピン、ソロモン諸島、バヌアツについて調べたが、本年度はガーナ、マラウイ、パプアニューギニアについて調べ、結果を総合した。感染多重率はガーナでは 77.7% (136/175), マラウイでは 97.5% (116/119), パプアニューギニアでは 38.0% (52/137)であった。MOIはガーナで 3.10、マラウイで 6.85、パプアニューギニアで 1.47 であった。マラリア伝播度の高いアフリカでは *mssl* 多重感染度が高かった。一方、メラネシアでは伝播度と多重感染度に明瞭な

相関は認められなかった。

薬剤耐性関連遺伝子については、昨年度は主にクロロキン耐性関連遺伝子：*pfcr1* について検討したが、今年度は、昨年度と同じ標本（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）を用いて、東南アジア・メラネシア地域におけるピリメサミン(Pyr)耐性と関連する *dhfr* の多型について解析した。*dhfr* によるアミノ酸配列の多型は、26 サンプルのうち 77%が耐性型を示した（表 2）。インドシナ半島と西太平洋地域で比較すると、総じてインドシナ半島諸国の方が耐性を示すことが多くなったが、国による違いが大きく、タイでは 1980 年代から 3重変異がみられたのに対し、ミャンマーでは 1990 年代でも野生株がみられた。

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を何ら改変することなくゲノムワイドに組換え蛋白質として発現することに成功した。これまで発現に成功した 469 種の組換え蛋白質に加えて、新たに 800 種余りの cDNA クローンからも組換え蛋白質の合成に成功し、熱帯熱マラリア原虫抗原蛋白質アレイを作製できた。また、これらの蛋白質とマラリア感染者血清との抗原抗体反応を検出するために、アルファスクリーン法を応用し、ELISA 法にかわるハイスループット抗原スクリーニング法も開発した。実際に 149 種の熱帯熱マラリア原虫抗原蛋白質とマラリア感染者の血清を反応させ、無症状者と有症状者とで比較したところ、大きな違いがみられた（図 1）。

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）

これまで簡便で、信頼性の高い、薬剤感受性 *in vitro* 試験法の確立を目指してきたが、今年度は、実用的な目的に加え、増殖因子の特定と熱帯熱マラリア原虫の増殖に関連する因子の特定の為に Chemically defined medium の作出を行った。Composition 5（熱帯熱マラリア原虫の分化増殖を誘導している既知構造物からなる増殖因子の仮称）を加えた Chemically defined medium を新規に作製したが、この medium による熱帯熱マラリア原虫の培養では、増殖は細胞増殖促進因子 GFS やヒト血清添加培養液を用いた場合と同等あるいはそれ以上であった。

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）

昨年度までと同様、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。カンボジアの G6PD 欠損者は全て Viangchan 型であった。インドネシアではフローレス島の主たる 7 部族を調査した結果、従来と同じく多数の変異型が観察された。

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）

昨年度までは、わが国の主な熱帯熱マラリア媒介蚊だったと言われるコガタハマダラカの生息調査を石垣島中心に行ってきた。今年度は、それに加え、わが国の主な三日熱マラリア媒介蚊と言われるシナハマダラカについて、新潟県佐潟水鳥・湿地センターで調査した。佐潟におけるシナハマダラカの発

生消長はこれまでに我が国や韓国で報告された消長とは異なり、7月まで発生がみられず8月から9月にかけて密度のわずかな上昇が観察された(表3)。人囿採集で得られた成虫もわずか2雌で発生密度はかなり低かった。また、新潟県佐潟および福島潟より得られたシナハマダラカとオオツルハマダラカのサンプルを分子分類学的手法によって検討したところ、すべてシナハマダラカと同定された。

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:木村幹夫,研究協力者:波川京子)

わが国の感染症発生動向調査の元で届け出されたマラリア症例と、国際観光振興機構が集計した国別日本人渡航者数とから、国別マラリア罹患率を算出した。アフリカでのマラリア罹患率は高く、10万人当たりのマラリア罹患患者数が100人を超える国が複数みられ、その多くが熱帯熱マラリアであった(表4)。ウガンダなど一部の国を除き、ガーナとマリなど西アフリカの国々での罹患率が高かった。一方、東アフリカの国々では、従来アフリカでは感染の機会が低いと言われていた三日熱マラリアにも、感染する可能性が高いこともわかる。アジアでは罹患率は低く、多くが三日熱マラリアであった。パプアニューギニアではアフリカのいくつかの国と同程度の高さであった。ただし、原虫種別では三日熱マラリアが70%と優位であった(表4)。

③ マラリアに関する検疫機能の強化特に感染蚊からのマラリア原虫検出に関する研究(分担研究者:大前比呂思,研究協力:検疫所研究グループ)

検疫感染症としてマラリアを考える場合は、感染者のみならずマラリア感染蚊の侵入についても考慮する必要があるが、マラリア感染蚊の有用な検出システムについては、未

だ標準化されていない。そこで、検疫所の研究グループの協力してPCR検査前の前処置を比較したところ、予備実験ではあるが、CTAB法よQIAamp DNA Micro Kit(QIAGEN)による方法の方が高い検出率を示した。特に、QIAamp法とReal-time PCR法を併用した場合、三日熱マラリア原虫は100%検出できた(表5)。

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:笛田薫)

本年度は、昨年度に続き石垣島での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、1990年代末のデータを基礎とすると、コガタハマダラカ幼虫の生息密度が、今後予想される温暖化や降水量の変化に伴って、島内の生息地で増加していく可能性が指摘された。また、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、少数の感染者より感染拡大が開始されると予測される。そこで、1951年10人の感染者から発生した石垣島、小川村でのマラリア流行パターンを流行の中央値とともに信頼区間の範囲を予測したStochastic伝播数理モデルを構成して考えた。その結果、適切な対策をとらなかった場合、マラリアの小流行がおきる可能性を否定できないことがわかった(図2)。

D. 考察

今年度も引き続き、国内でのマラリア媒介蚊の生息状況調査を行ったが、新潟県での三日熱マラリアを媒介するシナハマダラカに関する調査では、通常7月上旬と8月下旬にピークを示す発生密度が、9月になるまで上昇しなかった。人囿採集の結果も、韓

国北部で 1995 年に記録されている密度 (176.5/2 人/半夜) に比較して著しく低くなった。この現象が一時的なものなのか、今後も調査を継続する必要があるが、今年度の調査によれば、日本において三日熱マalariaが再興感染症となる潜在的可能性は、朝鮮半島に比してかなり低いと思われる。

日本人渡航者のアジアでのマalaria罹患率をみると、アフリカに比べて格段に低く、しかもインドを初めとして三日熱マalariaが多くを占めることから、渡航者にとっての危険性はアフリカに比べて低いと思われた。一方、パプアニューギニアにおける罹患率はアフリカ並みの高さだったが、アジアと同様に三日熱マalariaが優位であった。ヨーロッパ諸国における同様な調査では、1ヶ月以上の旅行者のマalaria感染率は、南太平洋地域で最も高く、次いで西アフリカ、東アフリカの順となり、インド亜大陸を除き、アジアでは低くなった。この結果は、日本人渡航者を対象に解析した結果と概ね合致し、各々の感染地におけるマalaria流行の疫学を反映していると思われる。

現在、アジア・太平洋地域では、原虫密度が低い三日熱マalaria感染者が流行の中心となっていることは、本研究班による調査でも確認されており、今後、輸入マalaria感染例の中心となっていく可能性が高い。そこで、世界的にも汎用されている幾つかのRDTsが、このような例の診断にも有用か検討したところ、三日熱マalariaでは、熱帯熱マalariaに比して、市販されているRDTsの種類によって検出率や検出限界が大きく異なることがわかった。マalaria浸淫地のみならず、非浸淫地での検疫やトラベル・クリニックでRDTsを使用する場合も、その特徴と限界を十分に認識する必要がある。

また、分子疫学的指標の開発を目指して、熱帯熱マalaria原虫遺伝子のcDNAクローンから、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を用

いて組換え蛋白質を発現する研究では、今年度までで総計 800 種余りの組換え蛋白質を発現することができた。実際に、既知の原虫抗原組換え蛋白質とマalaria感染者血清との反応性を、アルファスクリーン法を用いて検討したところ、高いシグナルが得られたので、今後は、様々な血清を用いて得ることができ、スクリーニング系としての有用性が示唆された。

分子疫学的研究では、昨年度クロロキン耐性遺伝子 *pfprt* の遺伝子型を解析したところ、96% (28/29) が耐性型を示したが、今年度解析した、ピリメサミン耐性遺伝子 *dhfr* の遺伝子型は、77% (20/26) が耐性型を示すにとどまった。1990 年代になっても野生型がみつかったことから、使用開始時期の違いが、両薬剤の耐性出現時期の違いに関連していたと思われる。

一般的に、マalaria原虫の組換え頻度はマalaria伝播の強い地域で高い。アフリカではマalaria伝播が高いので、蚊体内における組換えが頻繁に生じ、その結果、絶えず新しい *mssl* 対立遺伝子が生じていることが推定できる。しかし、アフリカと並ぶ高度流行地と言われたパプアニューギニア、ソロモンでは *mssl* ハプロタイプの多重感染が少なく、東南アジア、西太平洋では伝播度と多重感染度に明瞭な相関は認められない。パプアニューギニア、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、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が、このことが株特有的免疫をうまく誘導しているという可能性も指摘される。

E. 結論

新潟県におけるシナハマダラカの調査では、再興感染症として三日熱マalariaが大きな問題となった韓国北部に比してその生息密度が低くなった。一方、八重山諸島におけるコガタハマダラカの生息密度は、大き

な変化を示しておらず、数理モデルによる解析では、熱帯熱マラリア原虫の再侵入と定着により、小規模な流行をおこす可能性を完全には否定できない。

輸入例の解析では、マラリアの感染リスクは、東南アジア地域に比して、アフリカとメラネシア地域で高くなったが、メラネシアで感染の機会が多かったのは、東南アジアと同じ三日熱マラリアであった。日本の検疫所では、マラリアを疑われた例の補助診断に RDTs も使用しているが、アジア・太平洋地域でマラリア流行の中心となっている三日熱マラリアの場合、原虫密度が低くなると、RDTs の Sensitivity が低くなり、しかもキットの違いによる差が大きい。また、国内2次感染の予防に検疫所では、マラリア原虫感染蚊の検出も求められているが、QIAamp 法と Real-time PCR 法を併用すると、蚊内の三日熱マラリア原虫もほぼ 100%検出できた。

マラリア防疫の基礎となる熱帯熱マラリアの分子疫学的研究については、主にアジアの大陸部と島嶼部で比較しながら進められた。島嶼部ではマラリア原虫の進化速度も遅く、株特異的な免疫が、集団においても誘導されやすく、重症例・死亡例が少ない一因となっている可能性が高い。また、薬剤耐性株の拡散速度も比較的遅いことも、島嶼部でのマラリア対策を容易にしている。

熱帯熱マラリア原虫遺伝子の cDNA クローンから、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて組換え蛋白質を発現する研究では、実際に、原虫抗原組換え蛋白質とマラリア感染者血清の反応性を、アルファスクリーン法を用いて検討することができた。今後、血清疫学的な指標となる蛋白の網羅的検索が円滑に進むことが期待される。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1 論文発表

Diversity and evolution of the highly diverse rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*.

Iriko H, Kaneko H, Otsuki H, Tsuboi T, X-z. Su, Tanabe K, Torii M. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158: 11-21. (2008)

Recent independent evolution of *msp1* polymorphism in *Plasmodium vivax* and related malaria parasites.

Tanabe K, Escalante A, Sakihama N, Honda M, Arisue N, Horii T, Culleton R, Hayakawa T, Hashimoto T, Longacre S, Pathirana S, Handunnetti S, Kishino H. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156: 74-79. (2007)

Progress in the molecular biology and the immunology of nematode infections.

Arizono N, Nakanishi K, Horii T, Tanabe K. *Trends Parasitol.* 23: 175-181. (2007)

Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines.

Sakihama N, Nakamura M, Palanca AA Jr, Argubano RA, Realon EP, Larracas AL, Espina RL, Tanabe K. *Parasitol. Int.* 56: 185-194. (2007)

Allelic dimorphism-associated restriction of recombination in *Plasmodium falciparum msp1*.

Tanabe K, Sakihama N, Walliker D, Babiker H, Abdel-Muhsin AA, Bakote'e B, Ohmae H, Arisue N, Horii T, Rooth I, Färnert A, Björkman A, Ranford-

Cartwright L. *Gene* 392: 153-160. (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.* 76: 1037-1045. (2007)

Production of High-Affinity Human Monoclonal Antibody Fab Fragments to the 19-Kilodalton C-Terminal Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium falciparum*. Cheng Y, Hayasaka H, Watanabe K, Tao Y, Liu J, Tsukamoto H, Horii T, Tanabe K, Tachibana H *Infect. Immun.* 75: 3614-3620. (2007)

Comparative study of the genetic diversity of the 42 kDa fragment of the merozoite surface protein 1 in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*.

Pacheco MA, Poe AC, Collins WE, A. Lal AA, Tanabe K, Udhayakumar V, Escalante A. *Inf. Gen. Evol.* 7: 180-187. (2007)

Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia.

Mita T, Tanabe K, Takahashi N, Dysoley L, Eto F, Hwaihwanje I, Ohmae H, Kita K, Looareesuwan S, Kaneko A, Björkman A, Kobayakawa T. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1071-1077. (2007)

Cell-free production of functional *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase.

Mudeppa DG, Pang CKT, Tsuboi T, Endo Y,

Buckner FS, Varani G, Rathod PK. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151:216-219.(2007)

The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M. *Parasitol. Int.* 56:31-43. (2007)

Plasmodium berghei XAT: Protective 155/160 kDa antigens are located in Parasitophorous vacuoles of schizont-stage parasite. Kobayashi F, Waki S, Niikura M, Tachibana Mayumi, Tsuboi T, Torii M, Kamiya S. *Exp. Parasitol.* 116:450-457. (2007)

Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T. *J Clin Microbiol.* 45:2521-2528. (2007)

A mathematical model of *Plasmodium falciparum* transmission making allowance for drug resistance: Simulations in the situation of The Solomon Islands. Chen TT, Nishina T, Hisakane N, Ohmae H, Ishikawa H. *Tropical Medicine and Health*, 35 (2) 217. (2007)

Seven different glucose-6-phosphate dehydrogenase variants including a new variant distributed in Lam Dong Province in Southern Vietnam. Matsuoka H, Thuan DTV, Thien HV, Kanbe T, Jalloh A, Hirai M, Arai M, Dung NT, Kawamoto F. *Acta*

Medica Okayama, 61, 213-219, (2007)

A case of imported tertian malaria occurred despite prophylaxis by mefloquine in East Timor. Ikuta K, Torimoto E, Inamura H, Shindo M, sato T, Kawamoto F, Yamasaki H, Kohgo H: *J. BTHA*, 10, 50-51, (2007)

Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL, Kawamoto F, Hartl DL, Wirth DF. *Gene* 410, 105-112, 2008

クロロキン薬剤耐性に関する熱帯熱マラリア数理モデル解析。—ソロモン諸島を対象としたシミュレーション。陳甜甜、仁科朝彦、久兼直人、石川洋文 *J. Fac. Environmental Sci. & Tech. Okayama U.* 12 (1) 19-27. (2007)

マラリア感染蚊からの効率的な遺伝子検出の検討。三浦彰子、新妻淳、大前比呂思。

日本検疫医学会誌 9:118-122, (2007)。

マラリア対策の進捗による感染状況の変化とフィールドでの迅速診断キットの限界 大前比呂思、亀井喜世子、中澤港 Bernard Bakote'e *Clinical Parasitol* 18:76-79, 2008 (印刷中)

2. 学会発表

Recent independent evolution of msp1 polymorphism in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi* Tanabe K, Escalante A, Sakihama N, Honda M, Arisue N, Horii T, Culleton R, Hayakawa T, Hashimoto T, Longacre S, Pathirana S,

Handunnetti S, Kishino H. 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health. 2007.5.26

Incipient rapid diversification in the evolution of extant malaria parasites. Hayakawa T, Culleton R, Horii T, Tanabe K. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

Phylogenetic relationship of malaria parasites inferred from multiple gene data Arisue N, Hashimoto T, Hayakawa T, Mitsui H, Sakihama N, Nirianne J, Palacpac MQ, Tanabe K, Horii T. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

Plasmodium vivax in Africa. Culleton R, Mita T, Ndounga M, Unger H, Cravo P, Kaneko A, Randrianarivelojosia M, Kano S, Tsuboi T, Yadava A, Arez AP, Rosario VD, Ntoumi F, Carter R, Tanabe K. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

Genetic make-up of *Plasmodium vivax* population in Mae Sot, Thailand. Nirianne M. Palacpac Q, Arisue N, Tanabe K, Satabongkt J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

Plasmodium falciparum rhoptry neck protein (PfRON2) expressed at both erythrocytic and pre-erythrocytic invasive parasites. Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Satabongkot J, Tsuboi T, Torii M. The 7th Awaji

International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7 2007.

Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human immunesera.

Tsuboi T, Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7, 2007.

Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPX-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development.) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.

Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human antisera. Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M, AGUIAR JC, Tsuboi T. Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human antisera. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.

Chitinase: active recombinant protein from *Plasmodium vivax*. Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.

Transmission-blocking activity of DNA vaccine encoding *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230. Tachibana M,

Eitoku C, Otsuki H, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.

ASTMH 56th annual meeting Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.

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 朝日博子、泉山信司 第76回日本寄生虫学会大会、大阪 3/29-30、2007

ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子同体 EBL の局在 大槻均、金子修、橘真由美、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiatkul Amporn、鳥居本美 第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。

Polymorphism in malaria antigens and microsatellite markers of *Plasmodium vivax*: a parasite strategy for survival? Palacipac NQ, Arisue N, Tanabe K, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T 第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。

新規熱帯熱マラリア感染阻止ワクチン候補抗原分子の探索 金玲、坪井敬文、竹尾暁、入子英幸、金子修、鳥居本美 第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。

熱帯熱マラリア原虫ロプトリー蛋白質 (RhopH 複合体) のロプトリー移行シグナル Ghoneim A、金子修、坪井敬文、鳥居本美 第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。

熱帯熱マラリア原虫は頻繁に選択的スプライシングを起こしている入子英幸、金玲、金子修、韓銀澤、橘真由美、大槻均、竹尾