

暁、福本宗嗣、鳥居本美、坪井敬文 第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。

ソフィβ-グルカンによるNK細胞活性を利用した *Plasmodium yoelii* 感染に対する効果 高本美佐、矢野弘子、溝淵俊二、長龍充、Susiji W、Lalani Y、鳥居本美、坪井敬文、笹栗志郎、渡部嘉哉、吾妻美子、吾妻健 第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、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 第19回臨床寄生虫学会 2007年6月、東京

マラリアワクチン研究へのコムギ無細胞法の応用 坪井敬文、竹尾 暁、鳥居本美 第15回分子寄生虫学ワークショップ、草津、7/25-28、2007。

新規マラリアワクチン候補抗原探索へ向けたハイスループットスクリーニング法の開発 坂本寛和、竹尾 暁、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、坪井敬文 第15回分子寄生虫学ワークショップ、草津、7/25-28、2007。

単クローン抗体を用いた熱帯熱マラリア原虫メロゾイト先端部小器官の新規分子の同定 伊藤大輔、韓 銀澤、竹尾 暁、坪井敬文 第15回分子寄生虫学ワークショップ、草津、7/25-28、2007。

マラリア原虫の表面抗原遺伝子 *msp1* における種特異的な自然選択、澤井裕美、大谷寛人、田邊和祐 遺伝学会第79回大会、2007.9.21。

A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA 1, in *Plasmodium falciparum*. Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M. 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山、10/27-28、2007。

生殖母体抗原 Pvs230 を標的とする新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン 橘真由美、永徳千穂、大槻均、Sattabongkot J、鳥居本美、坪井敬文 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山、10/27-28、2007。

現生マラリア原虫系統の起源における急速な多様化、早川敏之、Richrad Culleton, 堀井俊宏、田辺和祐 現生マラリア原虫系統の起源における急速な多様化、第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山、2007.10.27。

Group I、II 及び III SERA 遺伝子配列から推定したマラリア原虫の系統関係 有末伸子、賈黙稚、Niriann Palacpac、田邊和祐、堀井俊宏 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山、2007.10.27。

マラリア原虫表面抗原 *msp1* における種特異的な自然選択、澤井裕美、大谷寛人、田邊和祐 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山、2007.10.27。

ゲノム多様性が語るマラリア病原体の寄生戦略、田邊和祐、日本動物学会近畿支部公開講演会、2007.11.24。

複数遺伝子配列データによるマラリア原虫の系統解析 有末伸子、橋本哲男、早川敏之、三井英也、先濱直子、賈黙稚、Nirianne Palacpac、田

邊和祐、堀井俊宏 第 30 会日本分子生物  
学会年会、2007.12.15.

2007-067096 発明者： 川本文彦、田中  
良明、宮崎好弘 発明名称： マラリア顕微  
鏡及びそれに用いる励起フィルター並びに  
マラリア原虫の観察方法

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願：平成 19 年 3 月 15 日 特願

表 1 ソロモン諸島の調査における Opti MAL と Pan-R Malaria の Sensitivity, Specificity  
の比較

RDTs の種類	Sensitivity		Specificity		
	実数	%	実数	%	
Opti MAL	<i>P. falciparum</i>	4 / 7	57.1	164 / 165	99.4
	<i>P. vivax</i>	7 / 13	54.0	156 / 159	98.0
Pan-R Malaria	<i>P. falciparum</i>	4 / 7	57.1	164 / 165	99.4
	<i>P. vivax</i>	4 / 13	30.8	156 / 159	98.0

原虫密度 100/μl以下の例を多く含む熱帯熱マラリア感染者の RDTs の sensitivity に関する先行研究では、ICT Malaria Pf/Pv で 66~95%、Opti MAL で 42~89%と幅がある。

( 表作成 大前比呂思 )

表2. 日本におけるアジア、太平洋地域からの輸入熱帯熱マラリア例における *dhfr* の遺伝子多型  
(1984-1999年)

	インドシナ半島				西太平洋地域		
	ミャンマー	タイ	タイ/ラオ ス*	ラオス	インドネシ ア	パプアニュー ーギニア	フィリピン
1984		CIRNI (2)					
1985							CNCSI (1) CNCNI (1) CNRNI (1)
1986					CNCNI (1)	CNCSI (2)	CNCSI (1)
1987						CNCNI (1) CNRNI (1)	
1988							
1989							
1990						CNCSI (1)	
1991		CIRNI (1)			CNRNI (1)		CNRNI (1)
1992		nd (1)**					CNRNI (1)
1993							
1994	nd (1)			CNRNI (1)	CNRNI (1)		
1995						CNRNI (1)	
1996							
1997	CNCSI (1)					CNRNI (1)	CNRNI (1)
1998			CNRNI (2)	CNRNI (1)		CNCNI (1)	nd (1)
計 (n=26)	1	3	2	2	3	8	7

\* 2カ国を訪ねた人

\*\* not done

(表作成: 中野由美子)

表3 新潟県新潟市佐潟におけるハマダラカ類の採集結果(2007年5～10月)

採集方法 / 採集月	5	6	7	8	9	10	合計
ドライアイストラップ	0	0	0	1	2	1	4
成虫採集(人囿採集)		0	0	0	2	0	2
幼虫採集	-	-	-	+	++	+	-

( 表作成 津田良夫 )

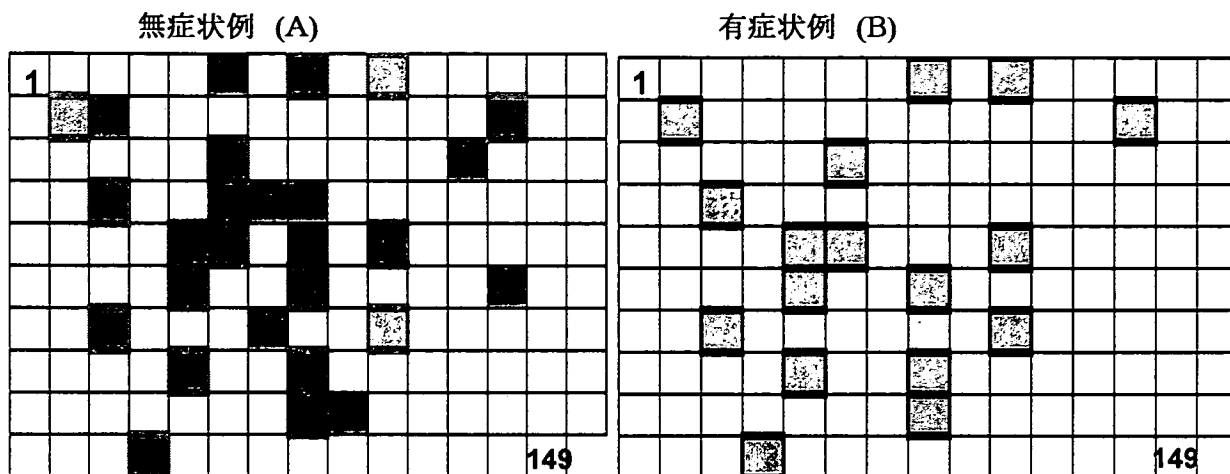
表4 日本人渡航者における国別マラリア罹患率(10万人当たりの罹患者数)(1999年4月～2005年12月)

国名	旅行者数	全マラリア		熱帯熱マラリア		三日熱マラリア	
		実数	率	実数	率	実数	率
ラオス	127900	3	2.3	2	1.6	1	0.8
タイ	7865300	14	0.2	4	0.1	10	0.1
ミャンマー	140500	11	7.8	3	2.1	7	5.0
インド	576000	32	5.6	5	0.9	27	4.7
パキスタン	79700	3	3.8	0	0.0	3	3.8
フィリピン	2487500	7	0.3	3	0.1	4	0.2
インドネシア	3927100	70	1.8	14	0.4	54	1.4
ニューギニア	26000	37	142.3	10	38.5	26	100.0
ブラジル	345800	10	2.9	1	0.3	9	2.6

\*100,000 旅行者中のマラリア感染発生率(1999-2005)

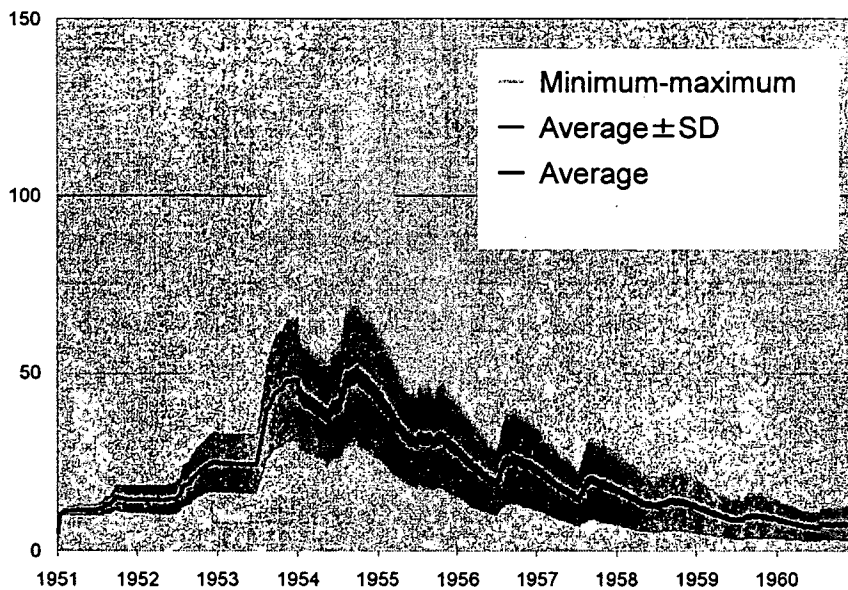
( 表作成 木村幹男 )

図1 熱帯熱マalaria感染者 無症状例( A ) と 有症状例( B ) における抗原蛋白スクリーニングの比較



( 原図作成 坪井敬文 )

図2 1950年代の石垣島, 小原村における熱帯熱マalaria流行のシュミレーション( 試行回数 200回 )



( 原図作成 石川洋文 )

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わが国への侵入監視及に関する研究  
マラリア感染状況の変化と迅速診断キットの役割と限界

分担研究者	大前比呂思	国立感染症研究所・寄生動物部	室長
研究協力者	亀井喜世子	平成帝京大学・公衆衛生学	教授
海外研究 協力者	Bernard Bakote'e	Solomon Islands Medical Training and Research Institute	Director

**研究要旨** マラリア迅速診断試験法：Malaria Rapid Diagnostic Tests(RDTs)は、顕微鏡診断が困難な辺境のマラリア流行地のみならず、マラリア非浸淫地においても、トラベル・クリニックや検疫所の補助診断などで広く用いられる。現在、アジア・太平洋地域のマラリア浸淫地では、流行の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアに移っているが、従来から、RDTsの Sensitivity, Specificity は、熱帯熱マラリアに比し三日熱マラリアで低くなる傾向が指摘されてきた。そこで、2007年度は、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 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ところ、7例の熱帯熱マラリアのうち迅速診断キットで検出されたのは4例にとどまったが、2種類のキットの結果は一致した。一方、三日熱マラリアでは2種類のキットの結果は一致せず、各々13例中7例、4例が診断されたにとどまった。また、熱帯熱マラリアの場合、原虫密度  $100/\mu\text{l}$  に満たない6例のうち、検出できたのは3例にとどまった。三日熱マラリアに関しては、Opti MALキットを用いた場合、原虫密度  $100/\mu\text{l}$  以上の3例について全例検出することができたが、Pan-R Malariaキットの場合は、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。以上のことから、現在のアジア、太平洋地域のマラリア浸淫地の状況では、従来と同じように RDTs を、Rapid assessment や疫学的状況のモニタリングに利用するのは難しいと判断される。同様に、検疫所での補助診断に用いる際も、現在、アジア・太平洋地域で主流となっているマラリアに対しては信頼性が乏しいことを十分に認識しなければならない。

A. 研究目的

マラリア迅速診断試験法：Malaria Rapid Diagnostic Tests(RDTs)は、辺境のマラリア浸淫地で顕微鏡による検査が困難な場合、急性の発熱疾患の鑑別診断に有用である。また、マラリア非浸淫地に

においても、トラベル・クリニックや検疫所における診断補助など、様々な用途で用いられる。現在日本では、Now ICT Malaria P.f/P.v、Opti MALが入手できるが、従来から、RDTsの Sensitivity, Specificity は、熱帯熱マラリアに比し三

日熱マラリアの方が低くなる傾向が指摘されている。

ところで、かつてマラリアの流行に悩まされたアジア、南太平洋諸国の多くでは、対策の成果により、最近マラリアによる死亡者数・罹病者数が大きく減少している。そしてこれらの国に共通した傾向として、特に重症な熱帯熱マラリアが減少し、相対的に症状に乏しい三日熱マラリアの占める比率が増加していることもあげることができる。

1990年代には、サブ・サハラのアフリカ諸国と並ぶ熱帯熱マラリア浸淫地と言われてきた、パプア・ニューギニアやソロモン諸島においても、前記のアジア、太平洋諸国に共通した傾向は認められる。そこで、2007年度は、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 RDTs が利用できるか検討することとした。

## B. 研究方法

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 RDTs が利用できるか検討した。三日熱マラリアに対する Sensitivity が比較的高いとされる Opti MAL と、昨年を発売されまだフィールドでの使用経験が少ない Pan-R Malaria の2種類の RDTs の結果を顕微鏡的検査による診断結果と比較検討した。

## C. 研究結果

172 人の住民を対象として一斉検査を行ったところ、ギムザ染色した厚層塗沫標本による顕微鏡的形態診断により、7

例の熱帯熱マラリアと 13 例の三日熱マラリアがみつかった。熱帯熱マラリア 7 例のうち迅速診断キットで検出されたのは 4 例にとどまったが、2 種類のキットの結果は一致した (表 1)。一方、三日熱マラリアでは 2 種類のキットの結果は一致せず、Pan-R Malaria では 4 例、Opti MAL では 7 例が診断されたにとどまった。

また、検出限界と原虫密度については、小数例での観察にとどまったものの、OptiMAL, Pan R-Malaria とともに、熱帯熱マラリアにおいては、原虫密度  $1,000/\mu l$  を超えた 1 例は検出できたが、 $100/\mu l$  に満たない 6 例のうち、検出できたのは 3 例にとどまった (表 2)。一方、三日熱マラリアに関しては、Opti MAL を用いた場合、原虫密度  $100/\mu l$  以上の 3 例について全例検出することができたが、Pan-R Malaria の場合は、原虫密度と検出率の間には明確な関連はみられず、全体で検出できたのも 30%程度にとどまった。

## D. 考察

原虫密度  $100/\mu l$  以下の例を多く含む熱帯熱マラリア感染者の RDTs の Sensitivity に関する先行研究は、ICT Malaria Pf/Pv で 66.1 ~ 86.2 %、OptiMAL で 42.6 ~ 81.3% と幅がある。今回は熱帯熱マラリアの検出率は、OptiMAL, PanR-Malaria とともに、4 / 7 の 57.1%にとどまったが、原虫密度  $100/\mu l$  以下の例が多かったことを考えると、先行研究による結果と比して、極端に低かったわけではない。

当初 RDTs は、マラリア治療を前提とした発熱した患者で、熱性疾患の鑑別診断に使用されることが多かったが、2005 年には世界中で 2500 万キットが使用さ

れたと推測されるほど急速に普及が進む中、様々な用途に拡大されて利用される傾向がある。地域におけるマラリア浸淫状況を迅速・的確に把握する Rapid assessment や疫学的状況のモニタリング、治療後の効果判定などに積極的に利用されることも多い。しかし、今回の調査で、マラリア対策の進捗によって、低原虫密度の三日熱マラリア感染者数が相対的に増加している地域では、RDTs による診断の限界も大きいことが確認された。また、最近入手可能となったキット：Pan R-Malaria によってもその限界は克服されていないことがわかった。現在、国内の検疫所では、顕微鏡的診断と同時に Opti MALmo 利用しているが、今後、検疫所などで RDTs を利用する場合にも、これらの問題点には十分留意する必要がある。特に、三日熱マラリアの場合、熱帯熱マラリアに比して、市販されている RDTs の種類によって検出率や検出限界は大きく異なるので、今後はマラリア浸淫地のフィールドのみならず、マラリア非浸淫地の検疫所やトラベル・クリニックにおいても、目的に応じたキットの選択と利用が重要になると思われる。

#### E. 結論

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 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ところ、熱帯熱マラリアでは、原虫密度  $100/\mu\text{l}$  に満たない例のうち、検出できたのは半数にとどまったが、2種類のキットの結果は一致した。一方、三日熱マラリアでは、Opti MAL を用いた場合、原虫密度  $100/\mu\text{l}$  以上の3例につい

て全例検出することができたが、Pan-R Malaria では、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。現在のアジア、太平洋地域のマラリア浸淫地の状況では、従来と同じように RDTs を、Rapid assessment や疫学的状況のモニタリング、治療後の効果判定などに利用していくことは難しい。また、検疫所やトラベル・クリニックで利用する場合も、その限界と各キットの特徴を十分認識する必要がある。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

- (1) 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. Independent evolution of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates in Melanesia. *Antimicrobiologic Agents and Chemotherapy* 51(3):1071-1077, 2007.
- (2) Tanabe K, Sakihama N, Walliker D, Babiker H, Abdel-Muhsin AM, Bakote'e B, Ohmae H, Arisue N, Horii T, Rooth I, Farner A, Bjorkman A, Ranford-Cartwright L. Allelic dimorphism-associated restriction of recombination in *Plasmodium falciparum* msp1. *Gene* 397(3):153-160, 2007
- (3) 大前比呂思, 亀井喜世子, 中澤港 Bernard Bakote'e  
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  
臨床寄生虫学会誌 18(1) : 76-79,  
2008 (印刷中)

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  
臨床寄生虫学会 2007年6月 東京

2 口頭発表

大前比呂思, 亀井喜世子, 中澤港  
Bernard Bakote'e

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

表1 ソロモン諸島の調査における Opti MAL と Pan-R Malaria の Sensitivity, Specificity の比較

RDTs の種類		Sensitivity		Specificity	
		実数	%	実数	%
Opti MAL	<i>P. falciparum</i>	4 / 7	57.1	164 / 165	99.4
	<i>P. vivax</i>	7 / 13	54.0	156 / 159	98.0
Pan-R Malaria	<i>P. falciparum</i>	4 / 7	57.1	164 / 165	99.4
	<i>P. vivax</i>	4 / 13	30.8	156 / 159	98.0

※ 原虫密度 100 /  $\mu$  l 以下の例を多く含む熱帯熱マラリア感染者の RDTs の sensitivity に関する先行研究では、ICT Malaria Pf/Pv で 66~95%、Opti MAL で 42~89% と幅がある。

表2 ソロモン諸島の調査においてみられた原虫密度と Opti MAL と Pan-R Malaria の Sensitivity の関係

原虫密度 (No. of parasite/ $\mu$ l)	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>	
	RDTs/ 顕微鏡	Sensitivity(95% CI)	RDTs/ 顕微鏡	Sensitivity(95% CI)
<b>OptiMAL</b>				
< 100	3/6	50 (20- 80)	4/ 10	40( 25- 55 )
100 - 1,000	-	-	3/ 3	100( 34-100)
1,000 <	1/1	100	-	-
Total	4/7	57(40- 74 )	7/ 13	54(33- 75)
<b>Pan R Malaria</b>				
< 100	3/6	50 (20- 80)	3/ 10	30 ( 15- 45 )
100 - 1,000	-	-	1/ 3	33 ( 10- 56)
1,000 <	1/1	100	-	-
Total	4/7	57(37- 77)	4/ 13	31 (63-100)

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わ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の解析

分担研究者 中野由美子 国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨： 東南アジアにおけるピリメサミン（Pyr）耐性マラリアの遺伝的多型を解析するために、感染研に保存されていた国内への輸入マラリアサンプルから、Pyr 耐性遺伝子の多型を解析した。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 26 例の配列決定に成功した。Pyr 耐性の原因遺伝子である dhfr の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。よって本研究結果は Pyr 耐性マラリアの存在を 1980 年代のサンプルを用いて遺伝的に証明した。

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(CQ)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。その後ピリメサミン(Pyr)が 1970 年代から CQ 耐性マラリアに対して投与されたが、直後に Pyr 耐性が報告され、現在ではカリブ海、中国の一部、中東の一部を除き、CQ と Pyr 耐性マラリアが存在している。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、1997 年には Pyr 耐性を付与する原因遺伝子が、マラリア原虫の葉酸合成酵素系の酵素 difydrophorate reductase (dhfr) の 108 番目のセリンがアスパラギンに置換であることが解明された。in vitro では、dhfr S108N 変異に、さらに変異が二重、三重、

四重に入ることによりでの薬剤耐性活性は大きくなることが証明されている。さらに、今日の野生株ではインドシナでは 3 重、4 重変異が多く、パプアニューギニア (PNG) では二重変異が多いことが報告されている。これらの多型を集団遺伝学的手法で解析したところ、現在の耐性株にインドシナと PNG では独立な起源があることが証明された。そして現在アフリカに流行している Pyr 耐性株はインドシナから移入したものであることも示されている。以上の事実は熱帯熱マラリア原虫が薬剤圧下で容易に耐性変異を獲得できることを意味し、出現した耐性遺伝子が比較的短時間で地理的に拡散することも示している。1990 年代までの薬剤耐性の歴史は、これまで in vivo test (treatment failure), と in vitro test の結果から推察されてきた。しかし遺伝子

型の同定による確認が、どの地域でもあまり行われていない。それは遺伝的耐性と臨床的耐性とは異なるものであるからである。また、dhfr 多重変異の進化に付いてもこれまで直接的な証明は行われていない。そのために遺伝的耐性（耐性の遺伝子型）の起源と歴史の調査は重要であり、この点を調べるには、archival sample を調べる必要がある

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いる。今年度は東南アジアの Pyr 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。Dhfr 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 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。使用したプライマーの配列は(i) アミノ酸 51、59 番を含む 190bp の増幅には 21F (5'-GCC ATA TGT GCA TGT TGT AAG GTT GAA AGC-3') と 22R (5'-CTT ATA TTT

CAA TTT TTC ATA TTT TGA TTC-3')を outer primers とし、23F (5'-TGT TGT AAG GTT GAA AGC AAA AAT GAG GGG-3') と 24R (5'-TTT TTC ATA TTT TGA TTC ATT CAC ATA TGT-3') を inner primers とした; (ii) アミノ酸 108 番を含む 190bp の増幅には 25F (5'-TGT AAA TAT TTA AAC AAA GAA ACT GTG GAT-3') と 26R (5'-TTC ATC AAA ATC TTC TTT TTT TAA GGT TCT-3') を outer primers とし、27F (5'-GAACT GTG GAT AAT GTA AAT GAT ATG CCT-3') と 28R (5'-TTC TTT TTT TAA GGT TCT AGA CAA TAT AAC-3') を inner primers とした; (iii) アミノ酸 164 番を含む 190bp の増幅には 29F (5'-GAA GAT TTT GAT GAA GAT GTT TAT ATC ATT-3') と 33R (5'-AAA TAC ATC ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT-3') を outer primers とし、31F (5'-GTT TAT ATC ATT AAC AAA GTT GAA GAT CTA-3') と 34R (5'-ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT TCT AGT AAA-3') を inner primers とした。PCR 産物の配列決定は、(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

東南アジアで感染したサンプルのうち 26 サンプルが DNA の回収と dhfr locus の増幅が可能であった。dhfr の多型を Table I に示した。タイでは 1984 年にすでに 3 重変異型(CIRNI)が存在していた (n = 2)。これまでタイ分離の Indochina III 株(1984 年)は 3 重変異を持つことが報告されており (Peterson 1988 PNAS;

Wang 2004 MBP)、よって本結果とあわせると、3重変異の最も古い同定年度は1984年である。また本結果で、ラオスでは1994年と1998年に二重変異(CNRNI) (n=4) が同定された。ミャンマーでは野生型が1997年のサンプルで存在していたことを示した(n=1)。これまでラオスとミャンマーで dhfr 変異の存在を示したのは1999年までのサンプルまでしかなく(Nair 2003)、本結果が遺伝子型を示した最も古い年代となった。

西太平洋地域では wild type が1985年から1990年にPNG(n=3)とフィリピン(n=1)で存在が確認できた。CNCNI 単独変異が1985年—86年にインドネシア(n=1)、PNG(n=1)、フィリピン(n=1)で見られ、さらにPNGでは1998年にも(n=1)見られた。CNRNIの2重変異の存在がインドネシアでは1991年、PNGでは1987年、フィリピンでは1985年まで extend back 出来た。これらの国での dhfr 変異の存在は、これまでインドネシア、PNGでは1996年のサンプルが最も古い報告であり(Nagesha 2001; Reeder 1996)、本研究はそれを約10年遡った。フィリピンにおける dhfr の多型の報告は本研究が初めてである。

#### D. 考察

昨年度において、CQ 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。しかし今回 dhfr の遺伝子型は77% (20/26) が耐性型を示し、すなわち Pyr の使用開始と耐性の出現が CQ に比べて20年遅かったことを反映していると思われる。実際に

1990年代以降も Pyr に対して感受性を示す報告が in vitro 試験や、遺伝的同定によってカンボジア、ラオス、ベトナム、ミャンマー、インドネシア、PNG から行われている。一方で、タイは1970年代半ばからサルファドキリン—ピリメサミン(ファンシダール)を1st-line drug として大量に使用したアジアで唯一の国であるが、1980s 初期には Pyr に対する in vitro/vivo での耐性が100%を示し、1980年代にメフロキンへ転換せざるを得なかった。実際に、1995年のサンプルの70%が3重変異を示していた報告もある(Nair 2003)。よって、本結果でも1984年のタイ株から3重変異株が単離されたことは、Pyr 耐性の大きな流行を反映すると共に、本結果はタイで3重変異株を同定した年代としても、最も古いものとなるフィリピンにおける dhfr の多型はこれまで報告が無いが、in vivo での高い治療成功率を考えると(Bustos 1999)、現在でも多くの dhfr の野生型が存在していると推測できる。

日本ではファンシダールが1987年に認可され、マラリア治療に用いられたが、直後の耐性の問題により、1990年代にはファンシダールは殆ど使われることは無くなった。国内の薬剤耐性はアジア(そしておそらくアフリカ)における Pyr 耐性マラリアの存在を考えると、遺伝的耐性がそのまま薬剤耐性を反映していると考えられる。

#### E. 結論

1984年から1998年の東南アジアにおける熱帯熱マラリア輸入例から、77%が

Pyr 耐性の遺伝子型の存在を示した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(欧文発表)

Yumiko Saito-Nakano, Kazuyuki  
Tanabe, Kiseko Kamei, Moritoshi

Iwagami, Kanako Komaki-Yasuda,  
Shin-ichiro Kawazu, Shigeyuki Kano,  
Hiroshi Ohmae, and Takuro Endo.  
Genetic evidence for *Plasmodium*  
*falciparum* resistance to chloroquine  
and pyrimethamine in Indochina and  
the Western Pacific between 1984 and  
1998 (submitted)

表 1. 日本におけるアジア、太平洋地域からの輸入熱帯熱マラリア例における dhfr の遺伝子多型  
(1984-1999 年)

	インドシナ半島				西太平洋地域		
	ミャンマー	タイ	タイラオス*	ラオス	インドネシア	パプアニューギニア	フィリピン
1984		CIRNI (2)					
1985							CNCSI (1) CNCNI (1) CNRNI (1)
1986					CNCNI (1)	CNCSI (2)	CNCSI (1)
1987						CNCNI (1) CNRNI (1)	
1988							
1989							
1990						CNCSI (1)	
1991		CIRNI (1)			CNRNI (1)		CNRNI (1)
1992		nd (1)**					CNRNI (1)
1993							
1994	nd (1)			CNRNI (1)	CNRNI (1)		
1995						CNRNI (1)	
1996							
1997	CNCSI (1)					CNRNI (1)	CNRNI (1)
1998			CNRNI (2)	CNRNI (1)		CNCNI (1)	nd (1)
計 (n=26)	1	3	2	2	3	8	7

\* 2 カ国を訪ねた人

\*\* not done

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

熱帯熱マalaria原虫の遺伝的多様性

分担研究者 田邊 和裕 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨: 熱帯熱マalaria原虫 (*P. falciparum*) の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。この免疫現象には株特異的免疫が関わるので、マalaria流行地における原虫集団の抗原多様性とその多様性を決める要因の研究は重要である。マalariaワクチン候補抗原である *P. falciparum* 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組換えによって生じる。この組換えはマalaria伝播の度合いに依存するので、伝播の高い地域では *mssl* の遺伝的多様度も高いことが予想される。本研究では、伝播度の異なる世界各地の *P. falciparum* 集団における *mssl* の多重感染度を比較検討する。これまでにタンザニア、タイ、フィリピン、ソロモン諸島、バヌアツについて調べているが、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。その結果、マalaria伝播度の高いアフリカでは予想通り、*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。得られた結果に基づき、マalaria伝播強度、遺伝子多様度、及び、マalaria感染防御獲得免疫の関係を検討した。

A. 研究目的

マalaria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。最近の研究で、マalaria原虫集団には異なる遺伝子型が数多く存在し、それらの多重感染がまれでないことが明らかにされている。異なる遺伝子型原虫は抗原型も異なり、抗原型の異なる株がマalaria原虫集団に多数あれば、感染防御免疫の獲得は度重なる感染を経た後に成立する。マalaria感染では株特異的免疫が作用するので、流行地で分布するマalaria原虫の抗原型の種類や数、抗原多様性を生じる遺伝的機構、また、異なる遺伝子型原虫の多重感染の程度は解明されるべき重要な研究課題になる。

熱帯熱マalaria原虫 (*P. falciparum*) メロゾイト表面タンパク質1 (MSP-1) はマalariaワクチンの

有力な候補抗原であるが、その遺伝子 (*mssl*) は多型が激しい。*mssl* 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alaria伝播の度合いに依存するので、伝播の高い地域では *mssl* の遺伝子型が多く、対立遺伝子多様度も高いことが予想される。しかし、マalaria伝播度と *mssl* 対立遺伝子多様度の相関に関する数量的解析はこれまであまりない。これまで、タンザニア、タイ、フィリピン、ソロモン諸島、バヌアツの *P. falciparum* 集団における *mssl* 組換えによる遺伝子多様性と多重感染度の地理的差異について調べてきた。本年度の研究では、伝播度の高いアフリカのガーナ、マラウイ、ガーナ、及び、パプアニューギニアにおける原虫集団を



調べ、これまでに得ている原虫集団における多様性と比較し、マラリア伝播の度合い、多重感染度とマラリア感染防御における株特異的免疫の関わりについて検討した。

## B. 研究方法

マラリア原虫フィールド株の採取は共同研究機関である東京女子医科大学熱帯医学国際環境教室(小早川隆敏教授)によって行われた。ガーナでは、2004年11月、西部沿岸 Winneba 付近の3村(Okyereko, Mpotia, Apam)の0—15歳の子供を対象にしたマラリアサーベイを行い、マラリア陽性感染血液を182検体得た。マラウイでは、2000年7—8月、Salima 地区のマラリアサーベイにおいて120検体得た(Mita et al., 2003)。パプアニューギニアでは、2001年8—9月、及び、2002年2月、東 Sepik 州 Wewak 地区の5村(Kiniambu, Jawia, Witupe, Boiken, Wingei)のマラリアサーベイから195検体を得た。

感染血液 75 ml を Whatman 社の濾紙(31ETCHR)に吸着させ、乾燥させた後、日本に運んだ。濾紙からの熱帯熱マラリア原虫のゲノム DNA は我々の方法によって抽出した(Sahikama et al., 2001)。*m*sp1 5'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)。この方法は、nested PCR法を用いて *m*sp1 のブロック2-6の組換え型を24通りに分けて検出するもので、マラリア感染血液サンプルが異なるハプロタイプに多重感染しているかどうか(多重感染率 = 全株中の多重感染株の割合)、及び、一人当たりの異なるハプロタイプの数(MOI = multiplicity of infection)を調べる。

## C. 研究結果

PCR陽性検体はガーナでは175検体、マラウイでは119検体、パプアニューギニアでは137検体であった。この陽性検体について *m*sp1 5'ハプロタイプ多重感染率、及び、一人当たりの

多重感染数(MOI)を求めた。

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。これまでに得ている他の地域の結果は以下である。感染多重率は、タンザニアが77.3%、タイが96.3%、フィリピンが33.0%、ソロモン諸島が35.4%、バヌアツが0.7%であり、MOIは、タンザニアが3.42、タイが3.61、フィリピンが1.44、ソロモン諸島が1.41、バヌアツが1.01であった。

以上のすべて結果を総合すると、多重感染率、MOIともよく似た傾向を示し、全体的にアフリカでは高く、アジア、オセアニアでは低い。例外はタイであるが、タイのサンプルは地域マラリア診療所を訪問した患者からのサンプリングであるために高くなっていると思われる。タイ以外の地域ではマラリアサーベイによるサンプリングなので自然流行集団を反映していると思える。実際に、タイでも西部 Kanchanaburi 県のサーベイによるサンプリングでは多重感染率、MOIともアジア、オセアニア地域と同程度であった(未発表)。バヌアツは感染多重率、及び、MOIも極めて低く、単一遺伝子型原虫のクローナルな伝播が示唆された。

## D. 考察

本研究で用いた *m*sp1 5'ハプロタイプタイピングでは、遺伝子 5'側 1 kb の多型領域(ブロック2-6)の組換えによる遺伝子型を測定し、同一サンプル中の異なる *m*sp1 5'ハプロタイプの数を決する。一般的に、マラリア原虫の組換え頻度はマラリア伝播の強い地域で高い。得られた結果ではマラリア伝播度の高いアフリカの3地域(ガーナ、マラウイ、タンザニア)では予想通り、*m*sp1 5'ハプロタイプのMOIが高かった。アフリカではマラリア伝播が高いので、MOIが高いことは、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 *m*sp1 対立遺伝子が生じ

ていることが推定できる。本研究で用いた *mssl* 5'ハプロタイプはPCR法によるものなので、実際のハプロタイプの数を通小評価していると思える。従って、本研究から、アフリカでは異なる遺伝子型の多重感染が高く、蚊体内における組換えにより、絶えず新規遺伝子型が創出され、その結果、マalaria感染防御免疫の獲得が容易ではないことが示唆される。

一方、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かった。すなわち、伝播度がアフリカ並みに高いパプアニューギニア、ソロモン諸島ではMOIは低かった。伝播度が中程度のバヌアツでは、MOIは最も低かった。パプアニューギニア、ソロモン諸島ではマalaria伝播が強いにもかかわらず感染がアフリカに比べて軽度である。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いことが本研究で明らかになった。従って、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。

バヌアツでは多重感染がほとんどなく、単独遺伝子型原虫のクローナルな伝播が示された。バヌアツでは重症マalariaが極めてまれであるが、分布する遺伝子型の単純さがこのことに関わると思える。

マラウイではMOIが調べた原虫集団では最も高かったが、その理由は本研究からは不明である。マラウイではクロロキンの使用が1990年代始めに禁止され、その結果、クロロキン感受性を示すマalaria原虫集団が周辺地域から流入し、すでに2000年(サンプリングの年)には感受性原虫集団にほぼ置き換わったことが示唆されている。このこととMOIの高さに何らかの関係があるものと思える。MOIの変動はマalaria原虫集団のダイナミズムを理解する上で興味深い現象であるので、今後の研究が待たれる。

## E. 結論

株特異的免疫を介した熱帯熱マalariaの感染防御免疫の獲得はマalaria流行地によって異なる。株特異的感染防御免疫の獲得には、マalaria伝播の強度、蚊体内の組換え頻度、さらに地域に分布する原虫の遺伝子型の数と多重感染の程度に関わることが本研究より示唆された。

## F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. H. Iriko, . Kaneko, H. Otsuki, T. Tsuboi, X-z. Su, K. Tanabe, and M. Torii. (2008) Diversity and evolution of the highly diverse rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 158: 11-21.
2. K. Tanabe, A. Escalante, N. Sakihama, M. Honda, N. Arisue, T. Horii, R. Culleton, T. Hayakawa, T. Hashimoto, S. Longacre, S. Pathirana, S. Handunnetti, H. Kishino. (2007) Recent independent evolution of *mssl* polymorphism in *Plasmodium vivax* and related malaria parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 156: 74-79.
3. N. Arizono, K. Nakanishi, T. Horii and K. Tanabe. (2007) Progress in the molecular biology and the immunology of nematode infections. Trends Parasitol. 23: 175-181.
4. N. Sakihama, M. Nakamura, A. A. Palanca Jr, R. A. Argubano, E. P. Realon, A. L. Larracas, R. L. Espina, and K. Tanabe (2007) Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines. Parasitol. Int. 56: 185-194.
5. K. Tanabe, N. Sakihama, D. Walliker, H. Babiker, A. A. Abdel-Muhsin, B. Bakote'e, H. Ohmae, N. Arisue, T. Horii, I. Rooth, A. Färnert,

A. Björkman, and L. Ranford-Cartwright. (2007) Allelic dimorphism-associated restriction of recombination in *Plasmodium falciparum msp1*. *Gene* 392: 153-160.

6. K. Tanabe, N. Sakihama, I. Rooth, A. Björkman and A. Färnert. (2007) High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 1037-1045.

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

8. T. Mita, K. Tanabe, N. Takahashi, L. Dysoley, F. Eto, I. Hwaihwanje, H. Ohmae, K. Kita, S. Looareesuwan, A. Kaneko, A. Björkman, and T. Kobayakawa. (2007) Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1071-1077.

9. M. A. Pacheco, A. C. Poe, W. E. Collins, A. A. Lal, K. Tanabe, V. Udhayakumar, and A. E. Escalante. (2007) 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.* 7: 180-187.

#### 学会発表

1. Toshiyuki Hayakawa, Richard Culleton, Toshihiro Horii, Kazuyuki Tanabe. Incipient rapid diversification in the evolution of extant malaria parasites. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

2. Nobuko Arisue, Tetsyo Hashimoto, Toshiyuki Hayakawa, Hideya Mitsui, Naoko

Sakihama, Mozhi Jia, Nirianne M. Q. Palacpac, Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Horii. Phylogenetic relationship of malaria parasites inferred from multiple gene data. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

3. Richard Culleton, Toshihito Mita, Mathieu Ndounga, Holger Unger, Pedro Cravo, Akira Kaneko, Milijaona Randrianariveolosia, Shigeyuki Kano, Takafumi Tsuboi, Anjali Yadava, Anna P. Arez, Virgilio do Rosario, Francine Ntoumi, Richard Carter, Kazuyuki Tanabe. *Plasmodium vivax* in Africa. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

4. Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Jetsumon Satabongkt, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii, Rachanee Udomsangpetch, Toshihiro Horii. Genetic make-up of *Plasmodium vivax* population in Mae Sot, Thailand. 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.4.

5. Kazuyuki Tanabe, Ananias Escalante, Naoko Sakihama, Masanori Honda, Nobuko Arisue, Toshihiro Horii, Richard Culleton, Toshiyuki Hayakawa, Tetsuo Hashimoto, Shirley Longacre, Sisira Pathirana, Shiroma Handunnetti, Hirohisa Kishino. Recent independent evolution of msp1 polymorphism in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health. 2007.5.26

6. 田邊和裕、ゲノム多様性が語るマラリア病原体の寄生戦略、日本動物学会近畿支部公開講演会、2007.11.24.

7. 澤井裕美、大谷寛人、田邊和裕、遺伝学会第79回大会、マラリア原虫の表面抗原遺伝子 msp1 における種特異的な自然選択、2007.9.21.

8. 早川敏之、Richard Culleton, 堀井俊宏、

田邊和祐、現生マラリア原虫系統の起源における急速な多様化、第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2007.10.27.

9. 有末伸子、賈黙稚、Niriann Palacpac、田邊和祐、堀井俊宏、Group I. II 及び III SERA 遺伝子配列から推定したマラリア原虫の系統関係、第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2007.10.27.

10. 澤井裕美、大谷寛人、田邊和祐、マラリア原虫表面抗原 *msp1* における種特異的な自

然選択、第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2007.10.27.

11. 有末伸子、橋本哲男、早川敏之、三井英也、先濱直子、賈黙稚、Nirianne Palacpac、田邊和祐、堀井俊宏、複数遺伝子配列データによるマラリア原虫の系統解析、第30回日本分子生物学会年会、2007.12.15.