

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究研究事業)
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

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

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を何ら改変することなくゲノムワイドに組換えタンパク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 種の組換えタンパク質に加えて、新たに 800 種余りの cDNA クローンからも組換えタンパク質の合成に成功し、熱帯熱マラリア原虫抗原タンパク質アレイを作製できた。また、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。これらの抗原タンパク質アレイと各種の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。

A. 研究目的

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、既存の組換えタンパク質合成系とは全く異なる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、その研究に必須のマラリア患者および無症候性原虫保有者の血清試料を得るための調査地の設定も行った。

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。これらに特異的な PCR プライマーを用いて各 cDNA を増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。それに加えて、培養熱帯熱マラリア原虫 NF54 株を用いて赤血球期原虫の完全長 cDNA ライブラリーを作製した。これらの個別クローンの部分塩基配列解析を行ったところ、1000 種余りの cDNA クローンを得ることが出来た。上記の cDNA クローンから PCR によって転写用の鋳型 DNA を作製し、それらとコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成した。

2) ハイスループット抗原抗体反応アッセイ

システムの開発

これらのタンパク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た。この方法の利点は、ELISA法の10分の1の血清量と、微量の未精製組換えタンパク質を用いて、迅速に多検体のアッセイが可能で、検出感度もELISA法より優れている点にある。このシステムを用いることにより、ゲノムワイドな新規抗原探索が可能となる。

3) 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、現在その最終段階にある。

(倫理面への配慮)

これまでに予備的に入手した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。さらに新たに作製した完全長cDNAライブラリーから、1000種余りの独立したcDNAクローンを得ることが出来、それらも同様にコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を発現した。その結

果、800種余りのcDNAクローンから組換えタンパク質を発現することに成功した。熱帯熱マラリア原虫ゲノム中に約5400種の遺伝子が予測されていることから、我々が保有しているタンパク質アレイは、熱帯熱マラリア原虫ゲノムの約4分の1をカバーしている。現在のところ、世界的に見てこれほどの種類の熱帯熱マラリア原虫タンパク質をカバーしているタンパク質アレイは、他に存在していない。

2) ハイスループット抗原抗体反応アッセイシステムの開発

上記の組換えタンパク質の内、一部の既知の原虫抗原組換えタンパク質とマラリア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。その結果、既知の抗原タンパク質に対しては、十分に高いシグナルを得ることが出来、スクリーニング系としての有用性が示唆された。

3) 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、現在その最終段階にある。

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、今年度に関連したアルファスクリーン法を応用した高感度かつハイスループットの抗原抗体反応検出系を用いて、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なると考えられた。また、その研究のためのフィールドの設定も実現しつつある。

E. 健康危機情報

この研究は、マラリア流行の血清疫学指標の開発につながり、また、タイの流行地コホートにおいて、流行の変化と血清疫学指標の変化を対比させながら追跡することにより、それぞれの抗原に対する抗体産生の流行予測における意味づけを実証することが出来る可能性がある。ひいては、我が国への輸入マラリアの可能性の拡大傾向等の予測に利用可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mudeppa DG, Pang CKT, Tsuboi T, Endo Y, Buckner FS, Varani G, Rathod PK.
Cell-free production of functional *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase.
Mol. Biochem. Parasitol. 2007, 151:216-219.
- 2) Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M.
The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the

rhoptries.

Parasitol. Int. 2007, 56:31-43.

- 3) Kobayashi F, Waki S, Niikura M, Tachibana Mayumi, Tsuboi T, Torii M, Kamiya S.
Plasmodium berghei XAT: Protective 155/160 kDa antigens are located in parasitophorous vacuoles of schizont-stage parasite.
Exp. Parasitol. 2007, 116:450-457.
 - 4) Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T.
Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis.
J Clin Microbiol. 2007, 45:2521-2528.
 - 5) Katsube T, Matsumoto S, Takatsuka M, Okuyama M, Ozeki Y, Naito M, Nishiuchi Y, Fujiwara N, Yoshimura M, Tsuboi T, Torii M, Oshitani N, Arakawa T, Kobayashi K.
Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria.
J Bacteriol. 2007, 189:8241-8249.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M.
The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries.
Forty-first Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program. Tokyo, Japan, February 1-3, 2007.
 - 2) Tsuboi T.

- Wheat germ cell-free translation system: An application to the genome-wide screening for novel malaria vaccine candidates. Forty-first Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program. Tokyo, Japan, February 1-3, 2007.
- 3) Cao J, Kaneko O, Thongkukiakul A, Tachibana M, Otsuki H, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M. *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein (PfRON2) expressed at both erythrocytic and pre-erythrocytic invasive parasites. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7, 2007.
 - 4) Tsuboi T, Jin L, Takeo S, Iriko H, Kaneko O, Sattabongkot J, Torii M. Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human immunosera. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7, 2007.
 - 5) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S. Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPX-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
 - 6) 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.
 - 7) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. Chitinase: active recombinant protein from *Plasmodium vivax*. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
 - 8) Tachibana M, Eitoku C, Otsuki H, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. Transmission-blocking activity of DNA vaccine encoding *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
 - 9) 大槻均、金子修、橘真由美、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiakul Amporn、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
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。
 - 10) Palacipac NQ, Arisue N, Tanabe K, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T
Polymorphism in malaria antigens and microsatellite markers of *Plasmodium vivax*: a parasite strategy for survival?
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。
 - 11) 金玲、坪井敬文、竹尾暁、入子英幸、金子修、鳥居本美
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
第 76 回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。
 - 12) 竹尾暁、金玲、坂本寛和、韓銀澤、入子英幸、金子修、鳥居本美、坪井

- 敬文
熱帯熱マalaria原虫赤血球期発病阻止ワクチン:新規候補抗原分子の探索
第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。
- 13) Ghoneim A、金子修、坪井敬文、鳥居本美
熱帯熱マalaria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
第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。
- 14) 入子英幸、金玲、金子修、韓銀澤、橘真由美、大槻均、竹尾暁、福本宗嗣、鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マalaria原虫は頻繁に選択的スプライシングを起こしている
第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。
- 15) 高本美佐、矢野弘子、溝渕俊二、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
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
第76回日本寄生虫学会大会、大阪、3/29-30、2007。
- 16) 坪井敬文、竹尾暁、鳥居本美
マalariaワクチン研究へのコムギ無細胞法の応用
第15回分子寄生虫学ワークショップ、草津、7/25-28、2007。
- 17) 坂本寛和、竹尾暁、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、坪井敬文
新規マalaria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
第15回分子寄生虫学ワークショップ、草津、7/25-28、2007。
- 18) 伊藤大輔、韓銀澤、竹尾暁、坪井敬文
単クローン抗体を用いた熱帯熱マalaria原虫メロゾイト先端部小器官の新規分子の同定
第15回分子寄生虫学ワークショップ、草津、7/25-28、2007。
- 19) Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M.
A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA 1, in *Plasmodium falciparum*.
第6回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム、松山、10/27-28、2007。
- 20) 橘真由美、永徳千穂、大槻均、Sattabongkot J、鳥居本美、坪井敬文
生殖母体抗原 Pvs230 を標的とする新規三日熱マalaria伝搬阻止ワクチン
第6回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム、松山、10/27-28、2007。
- 21) 竹尾暁、坂本寛和、橘真由美、鳥居本美、坪井敬文
コムギ胚芽無細胞系を用いた新規熱帯熱マalaria感染阻止ワクチン候補抗原の探索
第6回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム、松山、10/27-28、2007。
- 22) 河津信一郎、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
2-Cys型ペルオキシレドキシシン(TPx-1)ノックアウトがマalaria原虫の哺乳類体内での発育に及ぼす影響の解析
第6回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム、松山、10/27-28、2007。
- 23) 竹尾暁、久森大輔、松田周作、Joseph Vinetz、Jetsumon Sattabongkot、坪井敬文
コムギ無細胞系を用いた三日熱マalaria

ア原虫キチナーゼタンパク質の合成と
解析
第 30 回日本分子生物学会年会、第

80 回日本生化学会大会、合同大会、
横浜、12/11-15、2007。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究研究事業）
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

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： これまで既に(1)簡便で、信頼性の高い、薬剤感受性 *in vitro* 試験法を確立し、(2)精度の高い増殖モニターおよび薬剤効果評価法を確立した。今年度は、実用的な目的に加えて、増殖因子の特定と *P. falciparum* 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。

P. falciparum の分化増殖を誘導支持している物質としていくつか見いだす事ができ、既知構造物からなる増殖因子を作出した。ここに用いた化学構造既知の物質から構成される増殖因子を Composition 5 と仮に名づけた。

さらに、本原虫の培養には一定の構造のタンパク質が必須であることから、構造既知である組換えタンパク質を使用し、Composition 5 を加えた Chemically defined medium を作製した。Chemically defined medium による *P. falciparum* 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。

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重要な課題である。それらは疫学データとしてばかりでなく、流行地域および日本国内における戦略的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の薬剤感受性だけでなく、患者体内における薬剤の代

本研究は、マラリア原虫の薬剤耐性の動向について正確な情報を収集する事を目的として、(1) 簡便で、信頼性の高い、薬剤感受性 *in vitro* 試験法を確立し、(2) 精度の高い増殖モニターおよび薬剤効果評価法を確立し、(3) *in vitro* で得られた薬剤耐性の特性を

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* 試験や遺伝子レベルでの分析結果が一致しない事はしばしば報告されているが、その原因は未だ充分には解明されていない。

薬剤耐性遺伝子特性および *in vivo* 効果と関連して解析する事を行うものである。加えて、(4) 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、疫学的調査および治療薬開発に役立てる事を併せて行う。

これまで既に項目(1)と(2)に

については熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) を用いて標準化し、実用化した。今年度は、Chemically defined medium の作出と、項目 (4) に関連して、特定された増殖因子と相互作用して *P. falciparum* の分化増殖に関与する原虫側の分子の特定とその作用機序について検討する。

B. 研究方法

増殖因子 (GFS) 添加無血清培地 (GFSRPMI) を用いた *P. falciparum* 培養法を用いて、実験室内で継代維持している *P. falciparum* (FCR3/FMG) の培養液成分を構造既知の物質と置換し、*P. falciparum* の増殖を誘導維持する物質を探索する。GFS 由来の単純脂質分画が GFS の *P. falciparum* の増殖分化に対する効果を完全に代替する事を先に明らかにした事から、この脂質分画の成分を決定し、この成分を手がかりに広範囲に多くの物質について *P. falciparum* に対する効果を調べる。見出された物質を用いて、すべて構造が明らかな物質より構成され、ヒト血清添加培地あるいは GFSRPMI と同等に *P. falciparum* の分化増殖に有効な培養系を樹立する。

C. 研究結果

P. falciparum の分化増殖を誘導支持している物質としていくつか見いだす事ができ、既知構造物からなる増殖因子を作出した。ここに用いた化学構造既知の物質から構成される増殖因子は、いくつかの物質の混合物であり Composition 5 と仮に名づけた。一方、本原虫の培養には一定の構造のタンパク質が必須である事は、先に明らかにしたが、これまで用いていたヒトアルブミンやウシアルブミンの代わりに、構造既知である組換え

タンパク質を使用し、Chemically defined medium を作製した。Chemically defined medium による *P. falciparum* 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 (Figure)。

D. 考察

これまでに開発実用化したウシ血清由来増殖因子添加無血清培地 (GFSRPMI) を用いた *P. falciparum* の培養法で、従来の薬剤耐性試験法の主要な問題点は大方解決できたが、この方法でも、未だ成分は複雑で同定されていないものも多く、薬剤によっては著しい阻害をうけ、失活することも時折見受けられる。今回、安価で再現性が高い Chemically defined medium が作製できた事によって、より正確で詳細な薬剤耐性の研究調査が可能になる事は明白である。他方、本法を用いる事によって、*P. falciparum* の増殖および抑制機序の解明が可能になると考えられる。分化増殖を誘導支持している増殖因子が見いだされたことから、相互作用する原虫側の因子を特定し、その両者の相互作用を阻害する事によって、*P. falciparum* の増殖を特異的また効率的に抑制する方法を開発する目的の実現に極めて有用である。

Composition 5 は、いくつかの脂質分子の混合物であるが、いずれも市販製品があり安価で安全である。この Composition 5 を用いて、相互作用する *P. falciparum* 内の成分の特定を試み、いくつかの成分が見いだされている。今後は作用機序を解析するとともに、新規の治療薬開発およびこの分子に対する宿主免疫応答について検討する予定である。

研究目的項目 (3) については、樹立した薬剤感受性 *in vitro* 試験法および薬剤効果評価法を実施する為に必要なマ

ラリア患者の血液の入手が困難であるとともに、研究費も含め流行地でこれらの試験を実施する為の基盤を確立出来なかったことから、この点に関する成果は得られなかった。

E. 結論

P. falciparum の分化増殖を誘導支持している物質としていくつか見いだす事ができ、既知構造物からなる増殖因子を作出した。ここに用いた化学構造既知の物質から構成される増殖因子を、Composition 5 と仮に名づけた。

さらに、構造既知である組換えタンパク質を使用し、Composition 5 を加えた Chemically defined medium を作製した。Chemically defined medium による *P. falciparum* 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。

本法を用いる事によって、より正確で詳細な薬剤耐性の研究調査が可能になる事は明白である。そればかりでなく、*P. falciparum* の増殖および抑制機序の解明が可能になり、それらに関連する因子、

遺伝子、および分子を標的とした新規の治療薬の開発に極めて有用であると考えられた。

F. 健康危機情報

特に無し

G. 研究発表

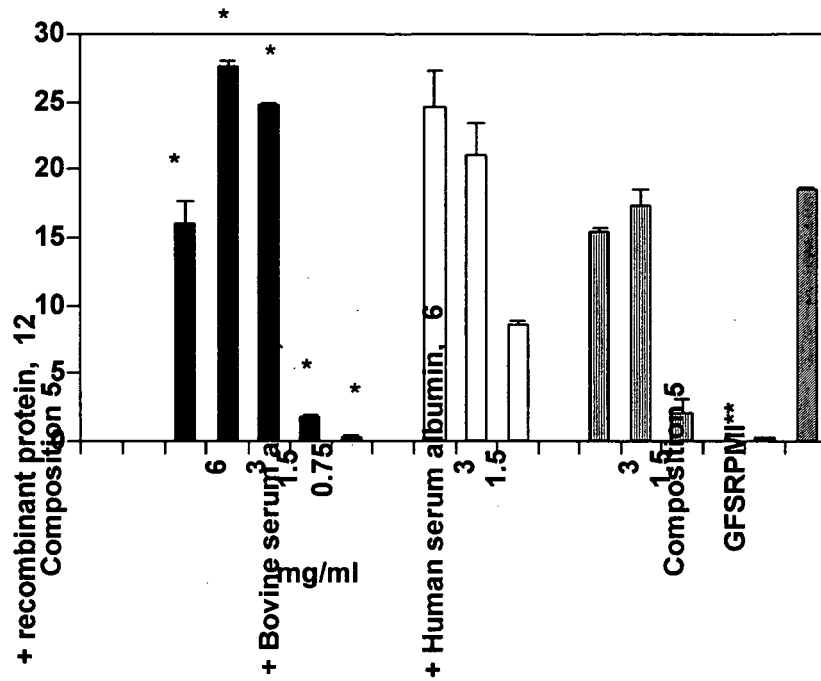
1. 論文発表
2. 学会発表

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, 大阪



Figure, Composition 5 を用いた Chemically defined medium* 中の *P. falciparum* の増殖
 **増殖促進因子(GFS) 含有無血清培地

厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究研究事業)
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

東南アジアにおけるマラリアと G6PD 欠損症の疫学的解析

分担研究者 川本 文彦 大分大学・総合科学研究支援センター

研究要旨 マラリアと 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。マラリアは両国共にアルテスネート治療の導入で激減していた。カンボジアの G6PD 欠損者は全て Viangchan 型であったが、一人の男性欠損者はヘテロ接合体を示し、XXY クラインフェルター症候群と考えられた。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。しかし、チモール島やスラウェシ島では Vanua Lava 型が非常に多かった。

A. 研究目的

カンボジアやインドネシアの東部では、G6PD 欠損症の遺伝子型の研究が少なく、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継続して行い、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・フローレス島のマンガライ族、バジャワ族、リウン族、ナゲケオ族、パルエ族、ランツカ族、シッカ族の 7 族の村においてマラリアと G6PD 欠損症の疫学調査を実施した。また、カンボジアではカンポット州の村落において、同様にマラリアと G6PD 欠損症の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 12 例前例が G6PD Viangchan 型であり、その内の 1 例は男性であるにもかかわらずヘテロ接合体であった。他の性マーカー・プライマーを用いて調べた結果、XXY クラインフェルター症候群と考えられた。インドネシアではフローレス島の 7 族を調査し、従来と同じく多数の変異型が見出された。しかし、チモール島やスラウェシ島では、見出された変異型は Vanua Lava 型が非常に多く、フローレス島の民族とは大きく異なっていた。

D. 研究発表

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

Southern Vietnam. Acta Medica Okayama,
61, 213-219, 2007

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

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

E. 知的所有権の取得状況

特許出願：平成19年3月15日 特願
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

F. 健康危機情報

特になし

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

マラリア等原虫類の研究
輸入患者情報の整理

分担研究者 木村 幹男 (財)結核予防会新山手病院
研究協力者 多田 有希 国立感染症研究所感染症情報センター
波川 京子 札幌医科大学保健医療学部

研究要旨 我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。アフリカ特に西アフリカでのマラリア罹患率は高く、しかも多くが熱帯熱マラリアであり、アジアでは罹患率は低く、しかも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。これらの結果は、渡航者における予防内服の国別優先順位などを考える際に有用と思われる。

A. 研究目的

近年の日本人海外渡航者数の増加は止まる気配がない。2001年9月の米国同時多発テロ、それに続く米国のアフガニスタン侵攻、さらに2003年のイラク戦争や重症急性呼吸器症候群(SARS)流行の影響を受けて、日本人出国者数は一時減少したが、その後増加に転じて2006年には1,753万人となり、過去最高であった2000年の数値を超える勢いである。この中にはマラリア浸淫地への渡航者も多く含まれることから、日本人渡航者のマラリア予防は重要な問題である。

マラリア予防の基本は蚊の刺咬を避けること、すなわち防蚊対策である。しかしマラリアのリスクが高い場合には、他に予防内服およびスタンバイ治療など、抗マラリア薬の使用も考慮される。なかでも予防内服は欧米の旅行者には広く勧められてきた歴史がある。しかし、予防内服に伴

う副作用も無視できるものでなく、特に我が国でマラリア予防薬として唯一認可されているメフロキンでは、精神神経系副作用の発生が危惧されている。このため予防内服に当たってはマラリア、なかでも重症化や死亡の危険があり得る熱帯熱マラリアに罹患するリスクと、抗マラリア薬の副作用のリスクとのバランスを考慮して決定すべきであることが強調されている。

渡航者のマラリア罹患のリスクを判断するには現地における発生状況が参考となるが、旅行者は現地人と条件が異なることから、旅行者におけるマラリア罹患のデータがより重要である。欧米では従来から種々のマラリア浸淫地への旅行者におけるマラリア罹患率の調査研究が行われてきたが、日本人渡航者に関しては行われていない。今回、我々は感染症発生動向調査におけるマラリアの届け出症例を解析し、また、国別日本人渡航者数の

データを入手し、渡航者の国別マラリア罹患率を算出した。

B. 研究方法

日本人渡航者のマラリア患者数については、我が国の感染症発生動向調査の元で1999年4月～2005年12月の期間の発病として届けられた症例を検討した。届け出では国籍、出生地、詳細な居住歴の記載はないが、「最近5年間の居住地」に関する記載があり、それが「国内」となっていたものを日本人渡航者と定義した。そして、それらの症例の「推定される感染地域」として記載されている国毎に算定を行ったが、複数国が記載された届け出症例は対象とせず、単一国の記載例のみを対象とした。

年別・国別の日本人渡航者数については、世界観光機関（UNWTO）、太平洋アジア旅行協会（PATA）、各国政府観光局のデータを元に国際観光振興機構（JNTO）が「日本人訪問者数」として集計したものをを用いた。我々が対象とした国の中では、マリでは「ホテル到着者数」としての集計であったが、他の国ではすべてが「国境到着者数」として集計していた。また、「日本人」とする基準については、国籍でみている国、居住地でみている国の両者がみられた。いわゆる感染症法に基づく発生動向調査の開始は1999年4月であったので、1999年の日本人訪問者数については、JNTOの数値を $9/12=0.75$ 倍して求めた。アジアの国の全ておよびブラジルでは1999年4月～2005年12月の数値が得られたが、アフリカのいくつかの国およびオセアニア（パプアニューギニア）では必ずしも全ての年の数値は得られなかった。そこで、4年間以上の数値が得られている国を解析対象とし、1999年4月～2005年12月（81カ月）の期間における日本人渡航者数として示した〔例えば4年間（48カ月）のデータがある場合、 $81/48=1.69$ 倍する〕。

なお対象期間においては、感染症発生動向調査の元での国立感染症研究所感染症情報センターへの届け出は個人を特定できない形でなされていたので、倫理面での問題はないと判断された。

C. 研究結果

アフリカでは、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た（表1）。その中で、東アフリカのウガンダ、西アフリカのガーナとマリでの罹患率が高かった。ナイジェリアでの罹患率はこれらと比べ、2分の1あるいは3分の1であった。中央アフリカの中央アフリカ共和国とチャドで高い罹患率が得られたが、罹患患者数はそれぞれ1例のみであった。西アフリカではコートジボワール、ブルキナファソ、セネガル、ギニア、カメルーンでの罹患患者もみられたが（データ示さず）、日本人訪問者数を入手できず、解析対象から除外した。東アフリカのケニア、タンザニアではガーナやマリに比べて罹患率は低く、特にケニアでは低かった。原虫種別にみると、アフリカでは熱帯熱マラリアが多く、国によっては全部を占めたが、東アフリカに属するエチオピアでは、熱帯熱マラリアと三日熱マラリアがほぼ同数であった。南アフリカ共和国での罹患率は、解析対象となったアフリカの国の中では最も低かった。

アジアでは全体的にアフリカに比べるとマラリア罹患率は低かった。国別ではミャンマーで最も高く、インド、パキスタンと続いた。インドネシアでの罹患患者数は70例でアジアでは最も多かったが、分母に当たる日本人渡航者数が多かったので、罹患率は特別高くはなかった。タイではインドネシアに比べて罹患患者数が少なく、しかも渡航者数が多かったことから、より低い罹患率を示した。アジア全体として原虫種別では三日熱マラリアが優位を占めたが、国別にその比率をみるとインドで84%、インドネシアで77%、タイで71%、ミ

ヤンマーで 64%、フィリピンで 57%であった。

オセアニアの対象国はパプアニューギニアのみであったが、アフリカの罹患率が高い国々と同程度であった。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。ソロモン諸島での罹患者は 6 例(熱帯熱マラリア 2 例、三日熱マラリア 4 例)みられたが、日本人訪問者数の入手は 3 年間のみであったので、正式な解析対象とはしなかった。

南米の対象国はブラジルのみであったが、マラリア罹患率はアジアの国々とはほぼ同レベルであり、原虫種別では殆どが三日熱マラリアであった。

D. 考察

アフリカでのマラリア罹患率は高く、しかも原虫種別では熱帯熱マラリアが多く、国により全部を占めることから、渡航者にとって最大の高リスク地域であることが確認された。西アフリカでは日本人渡航者数が入手不可能で、罹患率を示せない国が多かったが、全体として東アフリカよりも高いと思われた。東アフリカのケニア、タンザニアにおける罹患率はアフリカの中では特別高くはなかったが、観光地化されたサファリ地域への旅行者が多いためと推測された。エチオピアでは熱帯熱マラリアと三日熱マラリアがほぼ同数であったが、これは当該国が比較的アフリカの北部に位置するためと思われた。南アフリカ共和国での罹患率はアジアの高い国よりも低値であったが、同国は北東部のクルーガー国立公園あるいはその近辺を除き、殆どがマラリア浸淫地でないためと思われた。

アジアでのマラリア罹患率は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ラリア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極めて低いと思われた。一方、パプアニューギニアにおける罹患率はアフリ

カ並みの高さであることが示された。ここではアジアと同様に三日熱マラリアが優位であったが、熱帯熱マラリアの罹患率はアフリカのいくつかの国と同程度であり、高リスク国の扱いをすべきであると思われた。なお、ソロモン諸島への日本人渡航者数は、入手が可能であった 3 年間の数値から推定すると 1,600 人であり、10 万人当たりの罹患者数は 375.0 人と高値を示した。ソロモン諸島はパプアニューギニアと同様、高リスク国の扱いをすべきであると思われる。ブラジルでの罹患率はアジアの国々と同程度であり、しかも殆どが三日熱マラリアであるので、低リスク国と考えられた。

海外では、ドイツ人、スイス人、オーストラリア人を対象とした 1 ヶ月間の滞在における地域毎マラリア罹患率が出されている。全マラリアを対象とすると、パプアニューギニア/ソロモン諸島で最も高く、次いで西アフリカ、東アフリカの順となり、アジアでは低かったが、アジアの中ではインド亜大陸で高かった。しかし、熱帯熱マラリアに限定すると西アフリカが 1 位であり、パプアニューギニア/ソロモン諸島と東アフリカが同程度でこれに続いた。今回、我々が日本人渡航者を対象に解析した結果では、国/地域毎の罹患率の順位に関しては、これら海外のデータと概ね合致した。しかし全体として、日本人渡航者におけるマラリア罹患率は、欧米の旅行者と比べると 10~20 分の 1 程度の低さであった。この差違の原因として、日本人渡航者の滞在が短期であること、同一国の中での訪問地域の違いがあること、予防行動やリスク行動の違いがあること、などが考えられる。なお今回の我々の調査研究では、滞在期間についての情報は得られなかった。

このような調査研究の目的は、予防内服を含むマラリア予防行動が行われない時のマラリア罹患率を国/地域毎に推定し、そこに出かける渡航者の予防内服の

必要性を明らかにすることである。しかし、マラリア罹患率のデータに関しては予防内服の状況が大きく影響すると考えられる。実際、分母とする日本人渡航者の数値として、予防内服をしなかった渡航者数を当てはめると、分子が変らなければ罹患率の数値は上昇する。また、予防内服実施者は非常に僅かであっても、仮に高リスク者の殆どが予防内服を行なっているとすれば、予防内服をしない場合の推定罹患患者数(分子)は実際の数値よりもはるかに多くなる。

本研究の結果の解釈に当たって考慮すべき問題点として、上記の予防内服による影響以外に、感染症発生動向調査の元で届け出されるマラリア症例の診断の確実性(原虫種別診断を含む)、日本人渡航者数の確実性などが挙げられる。また、海外で発症し治癒した例については、国内の発生動向調査では把握できない限界もある。今後はこれらの検討が行われ、より意味のあるマラリア罹患率として示されることが期待される。

E. 結論

本研究結果の解釈に当たって考慮すべき問題点はあるが、日本人渡航者の国別マラリア罹患率は、予防内服の国別優先順位などを考える際に有用と思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 日本人渡航者

10万人当

1999年4月～2005年12月

地域	亜地域	国	推定渡航者数	全		熱帯熱		三日熱		卵形		四日熱	
				例数	罹患率	例数	罹患率	例数	罹患率	例数	罹患率	例数	罹患率
アジア	東南	ラオス	127900	3	2.3	2	1.6	1	0.8	0	0.0	0	0.0
		カンボジア	537200	1	0.2	0	0.0	1	0.2	0	0.0	0	0.0
		タイ	7865300	14	0.2	4	0.1	10	0.1	0	0.0	0	0.0
		ミャンマー	140500	11	7.8	3	2.1	7	5.0	0	0.0	1	0.7
		マレーシア	2278400	1	0.0	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		シンガポール	4676100	1	0.0	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		フィリピン	2487500	7	0.3	3	0.1	4	0.2	0	0.0	0	0.0
		インドネシア	3927100	70	1.8	14	0.4	54	1.4	2	0.1	0	0.0
		インド	576000	32	5.6	5	0.9	27	4.7	0	0.0	0	0.0
		パキスタン	79700	3	3.8	0	0.0	3	3.8	0	0.0	0	0.0
アフリカ	東	ネパール	191600	2	1.0	0	0.0	2	1.0	0	0.0	0	0.0
		スリランカ	99300	1	1.0	1	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		エチオピア	11200	5	44.6	2	17.9	3	26.8	0	0.0	0	0.0
		ケニア	112700	9	8.0	6	5.3	1	0.9	1	0.9	1	0.9
		ウガンダ	5600	9	160.7	8	142.9	0	0.0	1	17.9	0	0.0
		タンザニア	40000	13	32.5	10	25.0	0	0.0	2	5.0	1	2.5
		マダガスカル	20900	5	23.9	5	23.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		ナイジェリア	60900	32	52.5	28	46.0	1	1.6	3	4.9	0	0.0
		ガーナ	19200	27	140.6	26	135.4	1	5.2	0	0.0	0	0.0
		マリ	12800	15	117.2	13	101.6	2	15.6	0	0.0	0	0.0
中央	カ	中央	400	1	250.0	0	0.0	1	250.0	0	0.0	0	0.0
		チャド	400	1	250.0	1	250.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		ザンビア	18100	2	11.0	1	5.5	1	5.5	0	0.0	0	0.0
南	南	南	165200	4	2.4	4	2.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		パプアニューギニア	26000	37	142.3	10	38.5	26	100.0	1	3.8	0	0.0
南米		ブラジル	338800	10	3.0	1	0.3	9	2.7	0	0.0	0	0.0

厚生労働科学研究費補助金(新興再興研究事業)
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

本邦産ハマダラカ類の種類相と発生状況の現地調査

分担研究者	津田良夫	国立感染症研究所
協力研究者	金 京純	岐阜大学大学院
	沢辺京子	国立感染症研究所

我が国産の熱帯熱マラリア媒介蚊と三日熱マラリア媒介蚊の発生状況を現地調査によって調べた。前者は石垣島に生息するコガタハマダラカ、後者は新潟県佐潟水鳥・湿地センターで発生するシナハマダラカを対象に調査した。コガタハマダラカの発生状況を調べたところ、ドライアイストラップと人囿採集によって雌成虫 8 個体が捕獲された。人に対する半夜あたりの飛来密度は 2.3 雌で、平年並みの密度であったと思われる。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。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と思われる。新潟県佐潟および福島県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。Anopheles 亜属の分類に関しては今後の再検討が必要と思われる。

A. 研究目的

これまで我が国では 13 種類のハマダラカ類が採集され報告されている。これらのハマダラカの中にはヤツシロハマダラカのように、最近の採集例がみられず現在も生息しているかどうか疑問視されている種類もある。海外からの輸入マラリアの問題や 1999 年から続いている韓国と北朝鮮国境における三日熱マラリアの大流行を考えると、我が国におけるハマダラカ類の生息と発生がどのような状況にあるかを正確に把握しておくことは重要である。

熱帯熱マラリアを媒介できる本邦産ハマダラカとしては、八重山諸島に生息するコガ

タハマダラカが最も重要である。本種の発生状況は 1998-1999 年に八重山保健所によって石垣島、小浜島、西表島、波照間島、与那国島で調査が行われ、特に幼虫発生源である河川に関しては詳細に報告されている。しかしながら、成虫の発生密度に関しては十分な調査が行われていない。特に人を吸血に来る雌成虫の密度はマラリアの流行を予測する上で非常に重要なパラメーターであるが、標準的な方法による調査データの蓄積がほとんどないのが現状である。そこで本研究では、石垣島で発生密度が高い野底地域を対象として、トラップと人囿採集による定期調査を実施した。

三日熱マラリアの媒介蚊として、韓国と北朝鮮の国境で重要とされているのはシナハマダラカである。シナハマダラカはわが国でも広範囲に分布するハマダラカであるが、最近の発生状況の詳細はわかっていない。そこで、韓国と北朝鮮の国境とほぼ同じ緯度であり、自然の発生源である新潟県佐潟水鳥・湿地センターを調査地を選びハマダラカの発生状況調査を行い、朝鮮半島の状況と比較した。

シナハマダラカの属する *hyrcanus* グループは成虫の形態変異が大きく、形態だけで種同定を行うのは困難であるとされている。今回佐潟の調査で得られたシナハマダラカ、オオツルハマダラカについては一部のサンプルを用いて、DNA に基づいた分子分類学的な検討を行った。

B. 研究方法

石垣島野底地域にドライアイストラップ 10 台を設置し 3 日間の継続採集を行った。また、これまでの調査で成虫の飛来密度が最も高い場所を選んで夜間の人囮採集 (19:00-24:00) を 2 日間実施した。

新潟県佐潟水鳥・湿地センター (北緯 37° 48' 52.99"、東経 138° 52' 22.55") を調査地として、2007 年 5 月から 10 月まで毎月 1 回、媒介蚊調査を行った。調査は原則として 1kg のドライアイス誘引源とするトラップおよび発生源の幼虫採集によって行った。

C. 研究結果

石垣島野底地域では、7 属 14 種類 55 個体の蚊が捕獲された。このうち人囮採集では 8 種類 37 個体が捕獲された (表 1)。コガタハマダラカの構成比率はドライアイストラップによる捕獲個体数の 1.8% に対して、人囮採集では全体の 18.9% を占めており、明らかに人嗜好性が高いことが示されていた。

新潟県佐潟の採集結果を表 2 に示した。ドライアイストラップで 4 個体、人囮採集で 2 個体が捕獲された。採集された時期は 8 月以降であった。幼虫調査でも 7 月まではまった

く幼虫の発生がみられなかった。8 月により早く幼虫が採集され始め、9 月に最も発生密度が高くなった。

今年度の調査によって採集されたハマダラカの種類と発育ステージ、個体数を表 3 にまとめて示した。シナハマダラカとオオツルハマダラカは石垣島から九州、関東地方、新潟県まで広く分布していることが示唆されている。

新潟県佐潟および福島潟で採集した成虫および幼虫サンプルの形態分類と分子分類を行い、同定結果の一致性を調べた。幼虫は飼育して羽化した成虫を分析に用いた。合計 32 個体を検討したところ、形態学的にはシナハマダラカ 27 個体、オオツルハマダラカ 5 個体と同定された。これに対してリボゾーム DNA を用いた分子分類では、すべてシナハマダラカと判定された。

D. 考察

石垣島におけるコガタハマダラカの人に対する吸血密度は 2001 年から 2006 年の調査結果では 4~18.3 雌/2 人/半夜である。今回の調査では 2.3 雌/2 人/半夜でやや低めであったが、成虫密度は年によりまた時期によってかなり変動するので、ほぼ平年並みの発生であったと考えてよいと思われる。

新潟県佐潟の調査結果は予想外であった。過去にわが国で行われたシナハマダラカの発生状況調査や韓国で報告されている調査結果によれば、本種の発生は 7 月上旬と 8 月下旬にピークを示すことがふつうである。新潟県佐潟における発生も同様のパターンを示すと予想していたが、7 月までまったく幼虫の発生がみられず、かろうじて 9 月に発生密度の上昇がうかがわれた。この傾向は佐潟だけでなく周辺の水田でもほぼ同様であった。人囮採集の結果は、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い。佐潟で観察されたシナハマダラカの発生消長と発生密度がこの地域の代表値と考えられるかどうかは疑問であり、今後なんらかの形で調査を継続

する必要があると思われる。

我が国のハマダラカ特に *Anopheles* 亜属の種類に関しては、分類学的な再検討を要する種類がいくつか知られている。最近行われている分子分類学的な研究で、ヤツシロハマダラカ、*Anopheles yatsusiroensis* は朝鮮半島に分布する *Anopheles pullus* と同一種であるという報告がある (Shin & Hong 2001)。また、オオツルハマダラカ、*Anopheles lesteri*、についても、中国大陸で記載されている *Anopheles anthropophagus* と同一種であるという研究が発表されている (Hwang ら 2006)。本研究で検討した佐潟のシナハマダラカでも成虫の形態には大きな変異が認められた。朝鮮半島から中国大陸に分布する種類も含めて、我が国の *Anopheles* 亜属の分類を再検討する必要があると思われる。

E. 結論

熱帯熱マラリアの媒介能力を有するコガタハマダラカの石垣島における発生状況を調べた。ドライアイストラップと人囀採集によって、雌成虫 8 個体が捕獲された。人に対する半夜あたりの飛来密度は 2.3 雌で、平年並みの密度であった。

三日熱マラリアの媒介蚊としてシナハマダラカをとりあげ、その発生状況を新潟県佐潟水鳥・湿地センターで調べた。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異なり、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。人囀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と思われる。

本年度実施した媒介蚊調査の結果、シナハマダラカとオオツルハマダラカは石垣島、鹿児島、東京、新潟の調査地で捕獲されており、広範囲に分布することが確認された。

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。*Anopheles* 亜属の分類に関しては今後再検討することが必要と思われる。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし