

Table 1
Lack of recombination events in the central region (blocks 6 to 16) of *P. falciparum msp1*

Allelic type		Haplotype	Tanzania (1993)		Tanzania (1998)		Solomon Islands	
			Observed	Expected	Observed	Expected	Observed	Expected
block 2	block 6							
K1	K1	K2K6	17	10	8	6	27	6
MAD20	K1	M2K6	2	5	4	4	2	13
RO33	K1	R2K6	2	6	1	3	0	10
K1	MAD20	K2M6	81	88	100	102	1	22
MAD20	MAD20	M2M6	51	48	69	69	56	45
RO33	MAD20	R2M6	54	50	62	60	44	34
(total)			207	207	244	244	130	130
			$P=0.01$		$P=0.43$		$P<0.0001$	
block 6	block 16							
K1	K1	K6K16	19	3	12	1	23	6
MAD20	K1	M6K16	0	16	0	11	0	17
K1	MAD20	K6M16	0	16	0	11	0	17
MAD20	MAD20	M6M16	91	75	99	88	66	49
(total)			110	110	111	111	89	89
			$P<0.0001$		$P<0.0001$		$P<0.0001$	

Isolates from Tanzania ($n=34$) (Tanabe et al., in press), Thailand ($n=117$) and the Solomon Islands ($n=58$) having K1-type in blocks 6 to 16 always had K1 allelic sequences in blocks 4a and 4b (Sakihama et al., 2006). This concordance suggests that a region of no recombination events can be extended from blocks 6 to 16 to blocks 4 to 16. Previously, recombination events have been reported in blocks 4 to 6 in isolates having K1-type in block 6, using PCR-based haplotyping (Ferreira et al., 1998; Sakihama et al., 1999). However, we found that the lack of allele specificity of some primers used for the haplotyping could produce PCR-artifact recombinants (Sakihama et al., 2004). By improving the haplotyping method with new primers, which are highly specific to allelic types, we did not observe any recombination events in blocks 4 to 6 between K1-type and Mad20-type in isolates having K1 allelic type in block 6 (Sakihama et al., 2006).

3.2. Mapping of recombination sites

Of the 34 *msp1* sequences including 24 sequences obtained here, 30 were distinct *msp1* alleles. Six alleles (present in 9 parasite lines) were of K1-type in blocks 6 to 16 (designated as K1-type₆₋₁₆), and 24 alleles (25 isolates) were of Mad20-type in blocks 6 to 16 (designated as Mad20-type₆₋₁₆). Four of the six *msp1* alleles of K1-type₆₋₁₆ were completely identical (from parasite lines T9/94, Wellcome, T806, and T837). Two of the 24 Mad20-type₆₋₁₆ alleles had identical sequence (Sudan 60-93-11 and Sudan 121-93-12).

Sequence alignment revealed no apparent recombination events in blocks 6 to 16 between K1-type and Mad20-type sequences (Fig. 1b). In K1-type alleles, block 4a and 4b sequences were always concordant with K1-type₆₋₁₆, suggesting a region of no apparent recombination between K1-type and Mad20-type alleles spanning from block 4 to block 16.

Potential recombination sites were mapped using the four-gamete test. The minimum number of recombination sites predicted by the four-gamete test was 1 and 4 in blocks 1 and 3,

respectively (Fig. 1b). Nine recombination sites were also predicted in blocks 6 to 16 in Mad20-type₆₋₁₆. The six sequences of K1-type₆₋₁₆ obtained were nearly identical ($\pi=0.0005\pm 0.0002$, $n=6$), and thus the test to detect recombination events could not be applied to sequences of K1-type₆₋₁₆. In block 17, the test did not predict any recombination sites. However, at least two recombination sites have been identified from field isolates: sites between nucleotides 4858 (amino acid Q or E) and 5000 (K or T), and between nucleotides 5029 (G or R) and 5074 (L or F) (Qari et al., 1998; Tanabe et al., 2000; Tanabe et al., in press).

Due to the impossibility of obtaining reliable alignments in highly variable blocks 2 and 4, the four-gamete test was not applicable to sequence of these blocks. Recombination events have recently been suggested to occur in block 2, a highly polymorphic sequence region characterized by the presence of absence of 9-bp repeats and the type of the repeats (Takala et al., 2002). Here, we did not detect recombination events in block 2 in any of the 34 sequences analyzed (see Supplementary Fig. 1). However, we obtained one recombinant-type sequence in 74 isolates from Tanzania: an allele having Mad20-type sequence at the 5' end (90 bp) and RO33-type sequence at the 3' end (75 bp) in block 2 (Tanabe, unpublished data). The unique allele was unlikely to be an artifact: we can exclude the possibility of artefactual recombination during PCR because the *msp1* sequence of the isolate was obtained from a blood sample with a single parasite genotype infection. Thus, we consider that recombination events occur in block 2 in nature, although at a low frequency. A recombination site has been noted previously in block 4, separating into blocks 4a and 4b, (Kaneko et al., 1996). This recombination site was confirmed by manual alignment of our sequences (Fig. 2): two parasite lines (T815 and T838) had the K1-type sequence and Mad20-type sequence in block 4a and 4b, respectively, and six lines (VanKK, T807, T836, T842, 7G8 and VanRM1) had the opposite recombinant-type sequence. Taken together, evidence from sequences so far obtained suggests that

there are a number of recombination sites throughout the entire *msp1* sequence.

3.3. Allelic dimorphism-associated restriction of recombination events

The conclusion of the study is that the recombination does not occur between the two major *msp1* allelic forms, K1-type and Mad20-type, of *P. falciparum msp1* within a central 3.5-kb region, comprising blocks 6–16. In contrast, there are numerous recombination sites in blocks 6 to 16 within Mad20-type sequences. *msp1* alleles having sequences of Mad20-type_{6–16} also show recombination events in block 4. Therefore, *msp1* sequences can be divided into three major regions in terms of recombination events: (i) blocks 1 to 3, (ii) blocks 4 to 16, and (iii) block 17. In blocks 1, 3 and 17 inter-allelic recombination events potentially occur in all *msp1* alleles, whereas recombination events are restricted to Mad20-type sequences in blocks 4 to 16. Due to very limited sequence diversity in K1-type sequences in blocks 4 to 16, we cannot ascertain whether recombination events occur within K1-type sequences. More sequences will be needed to estimate recombination events within the K1 allelic group. Nevertheless, the present study indicates that the allelic dimorphism most notable in blocks 6 to 16 of *msp1*, as represented by the K1 allele and the Mad20 allele, greatly affects inter-allelic recombination events. *msp1* alleles of *P. vivax* do not show clear allelic dimorphism as seen in *P. falciparum msp1* and recombination sites are distributed throughout the entire *P. vivax msp1* gene (Putaporntip et al., 2002), highlighting a unique feature of recombination events in *P. falciparum msp1*.

A major question remains as to why recombination events do not occur in blocks 6 to 16 between the dimorphic groups (K1 and Mad20). Suppression of recombination events is commonly seen in genes under strong balancing selection, such as the self-incompatibility loci of plants (Clark and Kao, 1991). This is simply because mosaic alleles would be recognized as “self” by a large number of individuals in the population, resulting in severe restriction of their reproductive success. By analogy, it can be hypothesized that recombination in genes under strong immune-mediated selection might have been suppressed because recombinant Mad20/K1 sequences would be recognized by hosts exposed to either Mad20 or K1, making immune evasion more difficult. The finding that MSP-1 is a major target of protective allele-specific immunity (Martinelli et al., 2005) reinforces this hypothesis.

A recent evolutionary study shows that the K1 sequence in blocks 6 to 16 has a higher similarity to *P. reichenowi msp1* sequence than to the Mad20 sequence (Polley et al., 2005). We confirmed this finding by increasing the number of sequences: in an aligned region (3327 bp) in blocks 6 to 16, the genetic distance between K1-type ($n=6$) and Mad20-type ($n=24$) was 0.386 ± 0.014 , being much higher than that between *P. reichenowi* ($n=1$) and K1-type (0.086 ± 0.005). (The genetic distance between *P. reichenowi* and Mad20-type was 0.387 ± 0.014). Thus, the genetic distance within *P. falciparum* (K1 and Mad20-type alleles) is more divergent than between *P. falciparum* (K1 allele)

and *P. reichenowi* in blocks 6 to 16. Such a high divergence may inhibit the formation of chromosomal chiasmata, resulting in the failure of homologous recombination between K1-type and Mad20-type sequences. However, the sequences of blocks 6 to 16 contain fairly conserved stretches in blocks 7, 9, 11, 12, 13, and 15 (see Supplementary Fig. 1), probably enabling the formation of chromosomal chiasmata in these sequence regions. The origin of *P. falciparum msp1* alleles has been suggested to be very ancient (Polley et al., 2005), far exceeding the divergence of *P. falciparum* and *P. reichenowi* at six million years ago. Interestingly, at the self-incompatibility locus of plants some interspecific sequence similarities are higher than intraspecific similarities, and some of the polymorphism predates speciation and has been maintained to the present (Ioerger et al., 1990), a situation similar to polymorphism of *P. falciparum msp1*. Suppression of recombination events over several million years of evolution could be a prerequisite for allelic dimorphism at the *P. falciparum msp1* locus. Therefore, we consider that evolutionary mechanisms leading to mechanical constraints on meiotic events, though unknown, are more likely to be involved in the suppression of recombination events in blocks 6 to 16 between two major allelic forms. Alternatively, it could be argued that recombination events do occur between the dimorphic sequences during meiosis, but parasites having a recombinant MSP-1 cannot survive due to functional constraints on MSP-1. To test such an epistatic selection theory, we examined *msp1* haplotypes in oocysts that were produced by crossing between gametes of 3D7 and HB3, whose *msp1* haplotypes were K2M6-16 and M2K6-16, respectively. As *msp1* is not expressed at the mosquito stage, recombinant haplotypes should not be affected by negative selection due to functional constraints on the protein, and the presence of such recombinants would provide support for the epistatic theory. Unfortunately, we did not detect recombinants in 404 oocysts produced by 18 independent crosses, either in blocks 6 to 16 or in blocks 2 to 6 (Supplementary Table 2). Thus, we cannot draw any conclusion regarding the likelihood of an epistatic selection mechanism.

3.4. Conclusion

Meiotic recombination is a genetic mechanism to generate allelic diversity in malaria parasites. This mechanism is used by *P. falciparum* to produce extensive allelic diversity in *msp1*. In this work, we obtained 24 distinct *msp1* alleles from 25 isolates having Mad20-type sequences in blocks 6 to 16. In those Mad20-type sequences, recombination events were seen to have occurred throughout the entire gene. In contrast, the number of alleles of K1-type sequence was very limited, and recombination events were restricted to blocks 1, 3 and 17. The present study provides no evidence of recombination events in blocks 6 to 16 occurring between the two major *msp1* allelic types, K1-type and Mad20-type, indicating that allelic dimorphism of *msp1*, which is remarkable in blocks 6 to 16, greatly affects inter-allelic recombination events. Further studies would be required to understand fully why *P. falciparum* possesses such an outstanding feature of recombination-associated allelic dimorphism in nature.

Acknowledgements

We thank an anonymous reviewer for constructive comments and suggestions, Richard Culleton for discussion, and S. Jongwutiwes, M. Kimura and T. Mitamura for parasite genomic DNA. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research 18390131, 18073013, 18GS03140013 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. This work is dedicated to the late John G. Scaife, who introduced me to the study of the genetic diversity of *msp1*.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.gene.2007.04.033.

References

- Babiker, H., Walliker, D., 1997. Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: implications for control. *Parasitol. Today* 13, 262–267.
- Babiker, H.A., Abdel-Muhsin, A.A., Ranford-Cartwright, L., Satti, G., Walliker, D., 1998. Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 582–590.
- Clark, A.G., Kao, T.-H., 1991. Excess nonsynonymous substitution at shared polymorphic sites among self-incompatibility alleles of Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9823–9827.
- Conway, D.J., et al., 1999. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4506–4511.
- Ferreira, M.U., Liu, Q., Kimura, M., Ndawi, B.T., Tanabe, K., Kawamoto, F., 1998. Allelic diversity in the merozoite surface protein-1 and epidemiology of multiple-clone *Plasmodium falciparum* infections in northern Tanzania. *J. Parasitol.* 84, 1286–1289.
- Ferreira, M.U., Ribeiro, W.L., Tonon, A.P., Kawamoto, F.M., Rich, S., 2003. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene* 304, 65–75.
- Hay, S.I., Rogers, D.J., Toomer, J.F., Snow, R.W., 2000. Annual *Plasmodium falciparum* entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, internet access and review. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 113–127.
- Hii, J.L.K., Kanai, L., Foligela, A., Kan, S.K.P., Burkot, T.R., Wirtz, R.A., 1993. Impact of permethrin-impregnated mosquito nets compared with DDT-house-spraying against malaria transmission by *Anopheles farauti* and *An. punctulatus* in the Solomon Islands. *Med. Vet. Entomol.* 7, 333–338.
- Holder, A.A., et al., 1999. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccine against asexual blood stage malaria. *Parasitologia* 41, 409–414.
- Hudson, R.R., Kaplan, N.L., 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics* 111, 147–164.
- Ioerger, T.R., Clark, A.G., Kao, T.-H., 1990. Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9732–9735.
- Jongwutiwes, S., Tanabe, K., Nakazawa, S., Uemura, H., Kanbara, H., 1991. Coexistence of GP195 alleles of *Plasmodium falciparum* in a small endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 299–305.
- Kaneko, O., Jongwutiwes, S., Kimura, M., Kanbara, H., Tanabe, K., 1996. *Plasmodium falciparum*: variation in block4 of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) in natural populations. *Exp. Parasitol.* 84, 92–95.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kerr, P.J., Ranford-Cartwright, L.C., Walliker, D., 1994. Proof of intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 241–248.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Bioinformatics* 5, 150–163.
- Miller, L., Roberts, H.T., Shahabuddin, M., McCutchan, T.F., 1993. Analysis of genetic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1). *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 1–14.
- Mahanty, S., Saul, A., Miller, L.H., 2003. Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines. *J. Exp. Biol.* 206, 3781–3788.
- Martinelli, A., Cheesman, S., Hunt, P., Culleton, R., Raza, A., Mackinnon, M., Carter, R., 2005. A genetic approach to the de novo identification of targets of strain specific immunity in malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 814–819.
- Mu, J., et al., 2005. Recombination hot spots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 3, 1734–1741.
- Peterson, M.G., Coppel, R.L., Moloney, M.B.D., Kemp, D., 1988. The third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2664–2667.
- Polley, S.D., Weedal, G.D., Thomas, A.W., Golightly, L.M., Conway, D.J., 2005. Orthologous gene sequences of merozoite surface protein 1 (MSP1) from *Plasmodium reichenowi* and *P. gallinaceum* confirm an ancient divergence of *P. falciparum* alleles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 142, 25–31.
- Putapornpit, C., et al., 2002. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16348–16353.
- Qari, S.H., Shi, Y.P., Goldman, I.F., Nahlen, B.L., Tibayrenc, M., Lal, A.A., 1998. Predicted and observed alleles of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1), a potential malaria vaccine antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 241–252.
- Rooth, I., Björkman, A., 1992. Fever episodes in a holoendemic area of Tanzania: parasitological and clinical findings and diagnostic aspects related to malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 479–482.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Sakihama, N., et al., 1999. Allelic recombination and linkage disequilibrium within *Msp1* of *Plasmodium falciparum*, the malignant human malaria parasite. *Gene* 230, 47–54.
- Sakihama, N., Mitamura, T., Kaneko, A., Horii, T., Tanabe, K., 2001. Long PCR amplification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from filter paper blots. *Exp. Parasitol.* 97, 50–54.
- Sakihama, N., et al., 2004. Relative frequencies of polymorphisms of variation in block 2 repeats and 5' recombinant types of *Plasmodium falciparum msp1* alleles. *Parasitol. Int.* 53, 59–67.
- Sakihama, N., Ohmae, H., Bakote, B., Kawabata, M., Hirayama, K., Tanabe, K., 2006. Limited allelic diversity of *Plasmodium falciparum msp1* from populations in The Solomon Islands, a highly endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 31–40.
- Snounou, G., et al., 1999. Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 369–374.
- Takala, S., Branch, O., Escalante, A.A., Kariuki, S., Wootton, J., Lall, A.A., 2002. Evidence for intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*: identification of a novel allele family in block 2 of merozoite surface protein-1: Asembo Bay Cohort Project XIV. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125, 163–171.
- Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M., Scaife, J.G., 1987. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 195, 273–287.
- Tanabe, K., et al., 2000. Selection and genetic drift of polymorphisms within the merozoite surface protein-1 gene of *Plasmodium falciparum*. *Gene* 241, 325–331.
- Tanabe, K., et al., 2002. In vitro recombination during PCR of *Plasmodium falciparum* DNA: a potential pitfall in molecular population genetic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 211–216.
- Tanabe, K., Sakihama, N., Kaneko, A., 2004a. Stable SNPs in malaria antigen genes in isolated populations. *Science* 303, 493.

- Tanabe, K., et al., 2004b. Genetic distance in housekeeping genes between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium reichenowi* and within *P. falciparum*. *J. Mol. Evol.* 59, 687–694.
- Tanabe, K., Sakihama, N., Rooth, I., Björkman, A., Färnert, A., in press. High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876–4882.
- WHO, 2000. WHO Expert Committee on Malaria. WHO Tech. Rep. Ser. 892, 174–181.

石垣島におけるマラリア流行解析のための統計モデリング

植木 優夫* 中川 祐希* 笛田 薫* 石川 洋文*

Statistical modeling for analysis of malaria epidemic behavior at Ishigaki Island

Masao UEKI*, Yuuki NAKAGAWA*, Kaoru FUEDA* and Hirofumi ISHIKAWA*

It is necessary to consider a stochastic variability in modeling malaria epidemic behavior since the malaria infection cycle essentially depends on stochastic elements. For this requirement, we need to construct an appropriate statistical model from available data in advance. In this report, we provide some statistical models for the analysis of malaria epidemic behavior at Ishigaki Island. These models can be used for recurrence of past malaria epidemic and prediction of future malaria epidemic at Ishigaki Island.

Key words: *Anopheles minimus*, generalized liner model, Ishigaki Island, malaria epidemic behavior, prediction, stochastic model

1 はじめに

マラリアの感染サイクルには確率変動する要素が含まれるため、その流行をモデル化する際、確率的変動を取り入れることは実際の現象を捉えるために必要である。そのためには前もって、入手可能なデータから統計モデルを適切に構築することが必要とされる。統計モデルを構築することで、過去のマラリアの流行の再現や将来のマラリアの流行予測に利用することが可能となる。本研究報告の第一の目的は、マラリアを媒介するハマダラカの人刺咬数を観測データに基づいてモデル化することである。第2節では Toma *et al.* (2002)の調査データに基づき、一般化線型モデル (GLM; McCullagh and Nelder, 1989) を用いてモデル化する。

研究対象地として第2次世界大戦終結まで、及び1950年代に激しいマラリア流行があった八重山群島、なかでも石垣島を選んだ。モデリングは石垣島の西浜川におけるコガタハマダラカ (*Anopheles minimus*) の幼虫および成虫の発生密度、加えてシナハマダラカ (*Anopheles sinensis*) の発生密度を対象に行った。西浜川は1960年代に *An. minimus* が多く分布し、かつ熱帯熱マラリアが多発していた野底地域の主発生源である。

第3節では、第2節で構築した *An. minimus* 幼虫密度モデルを用いて熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) の流行を予測する方法について述べる。また実際のマラリア流行モデルでは蚊の一人当りの人刺咬数を求める必要がある。第4節において *An. minimus* の幼虫密度から一人当りの人刺咬数を推定する方法を述べる。

第5節では、過去の流行状況再現のために必要な1945-1960年での熱帯熱マラリア患者数を推定する方法を議論する。

*岡山大学大学院環境学研究科

近年、石垣島への観光客は過去に比べて増加しており、マラリア伝播に無視できない影響をもたらす可能性がある。そこで観光客の動きをモデルに取り入れる必要が生じる。第6節では観光客の動態をモデル化する際に必要となる観光客の滞在日数分布を構成する。

2 一般化線型モデルによるマラリア媒介蚊密度のモデリング

ここでは石垣島のマラリア媒介蚊発生密度をデータに基づいてモデル化することが目標である。用いるデータは Toma *et al.* (2002) によって、1998年11月から1999年11月の間に採取された *An. minimus* の幼虫および成虫捕獲数および *An. sinensis* の成虫捕獲数を利用する。特に今回は西浜川での観測データを用いた。

Toma *et al.* (2002) では、マラリア媒介蚊密度が西浜川の水温および降水量と相関があることが示唆されている。水温と石垣島の気温は非常に相関が高く、水温よりも入手しやすい石垣島の気温を利用した。図1は一ヶ月を前期と後期にそれぞれ分割し、石垣島における、各期間の平均気温および各期間の合計降水量を示す。

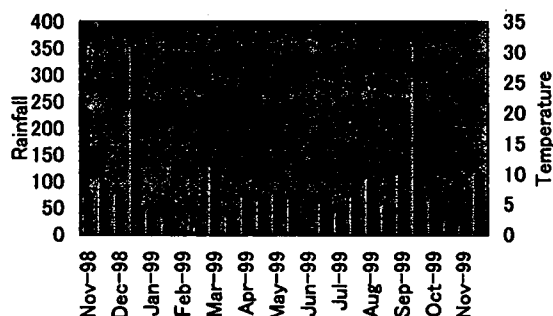


Fig. 1 Rainfall and temperature at Ishigaki Island (Temperature: line with points; Rainfall: bar plot). Data are derived from Japan Meteorological Agency.

気温と降水量を説明変数、マラリア媒介蚊密度を応答変数とした回帰モデリングを行なう。ここでマラリア媒介蚊密度データは非負であり、また散布図からマラリア媒介蚊密度が大きい値において分散が大きくなっている。例として西浜川の降水量、気温、*An. minimus* 幼虫密度の散布図行列を図2に示す。他のデータについても同様の図が得

られる。したがって、通常の線型回帰モデルを当てはめるのは好ましくない。

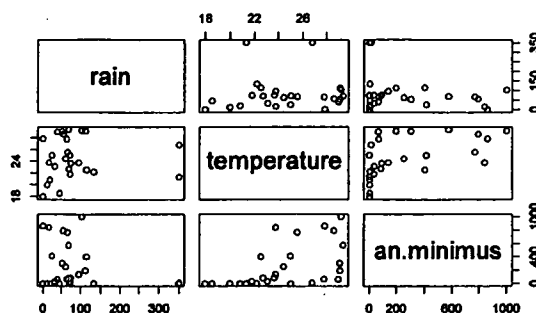


Fig. 2 Scatterplot of *An. minimus* immatures density at Nishihama stream, rainfall and temperature at Ishigaki Island

我々はガンマ分布族による一般化線型モデル (GLM; McCullagh and Nelder, 1989) を当てはめることを考えた。GLM とは、線型回帰モデルを指数型分布族に拡張し、平均関数(またはその非線形変換)に線形関係を仮定したものである。これは現在広く利用されている一般的な手法である。今回用いたモデルではマラリア媒介蚊密度の平均関数を m で表し、以下の形のものを仮定する：

$$m(\text{rain}, \text{temp}) = \exp(a + b \times \text{rain} + c \times \text{temp})$$

すなわち対数リンク関数を用いるガンマ分布族 GLM である。ここで a, b, c は回帰係数を意味し、後に最尤法によって推定する。パラメータの推定は統計ソフト R の関数 `glm` により行なう。得られたモデルは以下のとおり：

An. minimus 幼虫密度

	推定値	標準誤差	t 値	p 値
a	-2.593596	2.325966	-1.115	0.27634
b	-0.010293	0.003745	-2.748	0.01145 *
c	0.345780	0.093566	3.696	0.00119 **

An. minimus 成虫密度

	推定値	標準誤差	t 値	p 値
a	-0.6552805	2.3105212	-0.284	0.7792
b	-0.0006102	0.0037202	-0.164	0.8712
c	0.1995631	0.0929448	2.147	0.0426 *

An. sinensis 成虫密度

	推定値	標準誤差	t 値	p 値
<i>a</i>	-1.561854	1.364899	-1.144	0.264269
<i>b</i>	-0.001251	0.002198	-0.569	0.574703
<i>c</i>	0.232638	0.054906	4.237	0.000312 ***

(p 値の傍の記号は有意性を示す: '***' は 0.1%, '**' は 1%, '*' は 5% 有意)

An. minimus 幼虫の結果のみが降水量を係数として有意となり, 成虫密度の結果では気温のみが係数として有意となった。

すべてのモデルで降水量の係数 *b* は負, 気温の係数 *a* は正となった。つまり, 降水量が多いと蚊の数は減少し, 気温が高ければ蚊の数は増加することを意味する。これは実際の状況をよく説明していると言える。図 3-5 は得られたモデルの当てはめ結果を示している。

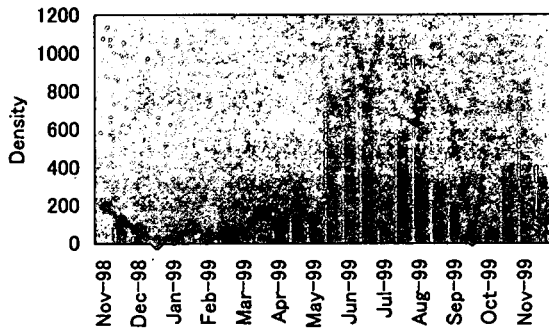


Fig. 3 *An. minimus* immatures density at Nishihama stream with fitted line (Observations: bar plot)

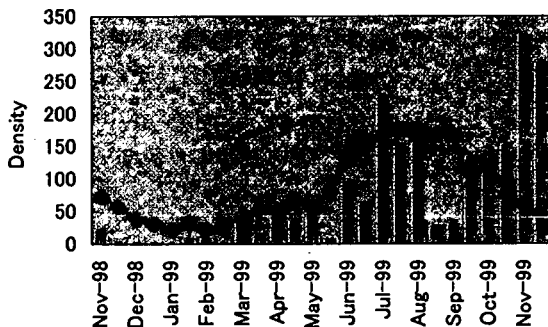


Fig. 4 *An. minimus* adults density at Nishihama

stream with fitted line (Observations: bar plot)

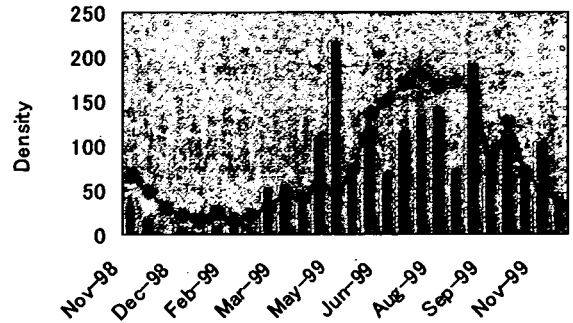


Fig. 5 *An. sinensis* adults density at Nishihama stream with fitted line (Observations: bar plot)

3 降水量と気温の将来予測

2 節では気温と降水量の関数としてマラリア媒介蚊の密度を推定する式を得た。この式を用いて将来の予測を行いたい。そのためにはまず石垣島における降水量と気温の動向を予測する必要がある。気象庁統計データベース (<http://www.jma.go.jp>) から石垣島の 1947 年 1 月 - 2007 年 9 月の降水量および気温を採取した。手始めに, 時系列データを「24 期の季節成分 + トレンド + 誤差」に分解する。トレンドを求めるため, R の関数 *stl* を利用する。これは Cleveland *et al.* (1990) で提案された従来の移動平均による分解の代わりに loess (Cleveland, 1979; Cleveland and Devlin, 1988) による分解を行なう手法である。

3.1 降水量

図 6 は, 石垣島における過去の降水量を「季節成分 + トレンド + 誤差」と分解したものを表す。上から生データ, 季節成分, トレンド, 誤差の順で与えられている。また図 7 は分解における「誤差」の正規 Q-Q プロットである。

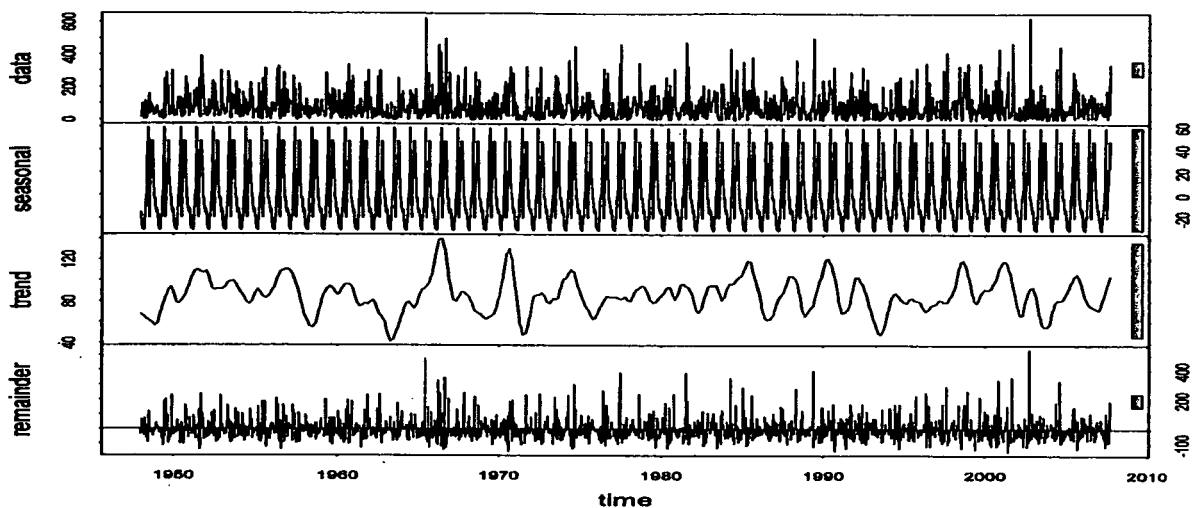


Fig. 6 Decomposition of rainfall at Ishigaki Island.

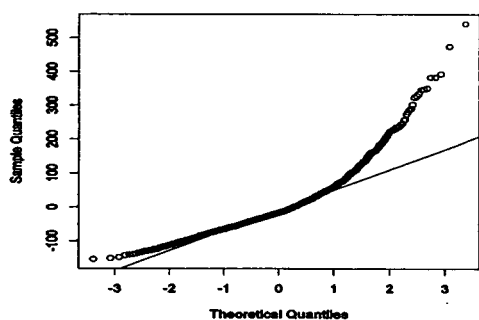


Fig. 7 Normal Q-Q plot of remainders in decomposition of rainfall

トレンドは存在しないが、誤差は正規からかなり外れている。このことは予測する上であまり好ましくない。そこで誤差がなるべく正規分布に近くなるような降水量データの変換を模索する。以下の Box-Cox べき変換を利用する：

$$g_{\lambda}(y) = \begin{cases} (y^{\lambda} - 1) / \lambda & (\lambda \neq 0) \\ \log y & (\text{otherwise}) \end{cases}$$

0 値は許されないので、 $Y = \text{降水量} + 0.1$ とおき、 Y の各成分に関する Box-Cox べき変換を考える。変換パラメー

タ λ は次の対数尤度関数を λ について最大化するものを採用する：

$$l(\lambda; Y) = \text{Const} - 0.5n \log \left(\|\mathbf{e}_{\lambda}\|^2 / n \right) + (\lambda - 1) \sum_{i=1}^n \log Y_i$$

ここで \mathbf{e}_{λ} はパラメータ λ で Box-Cox 変換した Y の分解「季節成分+トレンド+誤差」における誤差の n 次元ベクトル。 λ は -1 から 2 の範囲を 0.1 刻みで動かし、上式の対数尤度関数をプロットしたものが図 8 である。

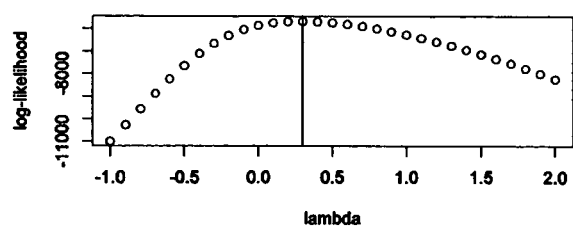


Fig. 8 Log-likelihood values

図 8 の解析の結果 $\lambda = 0.3$ が選ばれた。 $\lambda = 0.3$ で変換した Y の分解「季節成分+トレンド+誤差」を図 9 に示す。

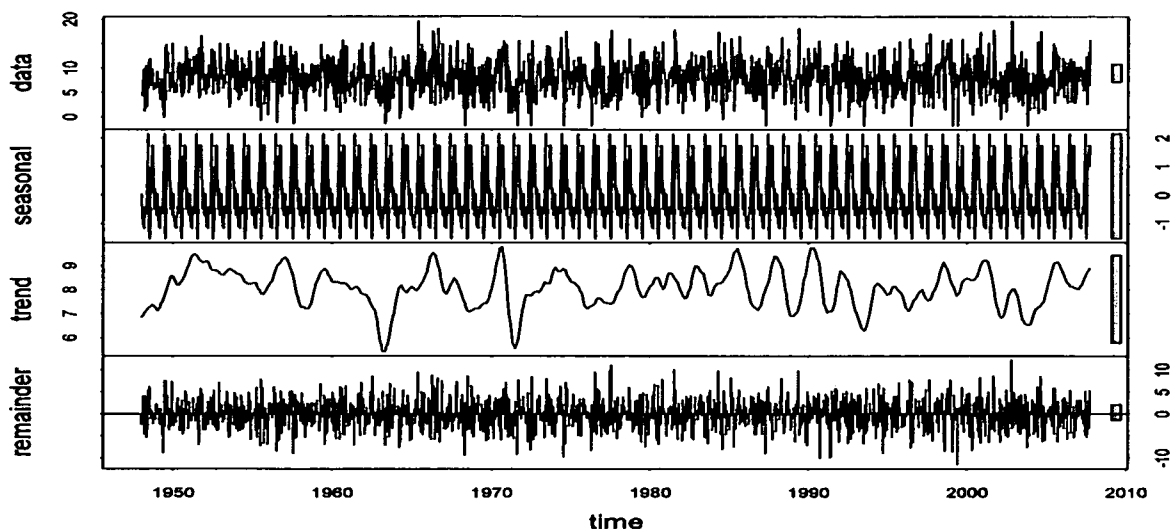


Fig. 9 Decomposition of Box-Cox transformed rainfall + 0.1 with lambda=0.3

図 10 の正規 Q-Q プロットは正規近似が図 7 に比べて改良されたことを意味する。

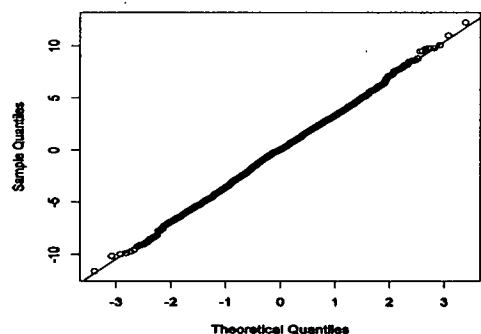


Fig. 10 Normal Q-Q plot of remainders in decomposition of transformed rainfall

変換したデータにおける「誤差+トレンド」に直線を当てはめた結果は以下の通り。仮説：傾き=0 は棄却できない。したがってトレンドは存在しないと言える。

	推定値	標準誤差	t 値	p 値
切片	15.091383	10.883764	1.387	0.166
year	-0.003546	0.005503	-0.644	0.519

3.2 気温

loess によりトレンドを推定し、データをトレンド+24期の季節成分+残差に分解した。

1975 年まではトレンドがなく、それ以降は緩やかな上昇トレンドがあるように見える。したがって、データから季節成分を除いた、季節調整済みデータに 2 次曲線を当てはめる。図 12 はその結果であり、誤差項に正規性を仮定したときの 95% 上側分位点関数を併記した。得られた結果は以下の通り：

	推定値	標準誤差	t 値	p 値
切片	1.768e+03	4.099e+02	4.313	1.72e-05 ***
year	-1.778	4.145e-01	-4.290	1.91e-05 ***
year ²	4.533e-04	1.048e-04	4.326	1.63e-05 ***

下に凸の 2 次関数が得られ、すべての係数で有意性が高く、上昇トレンドは存在していると言える。これは近年の温暖化現象を反映したモデルとなっている。

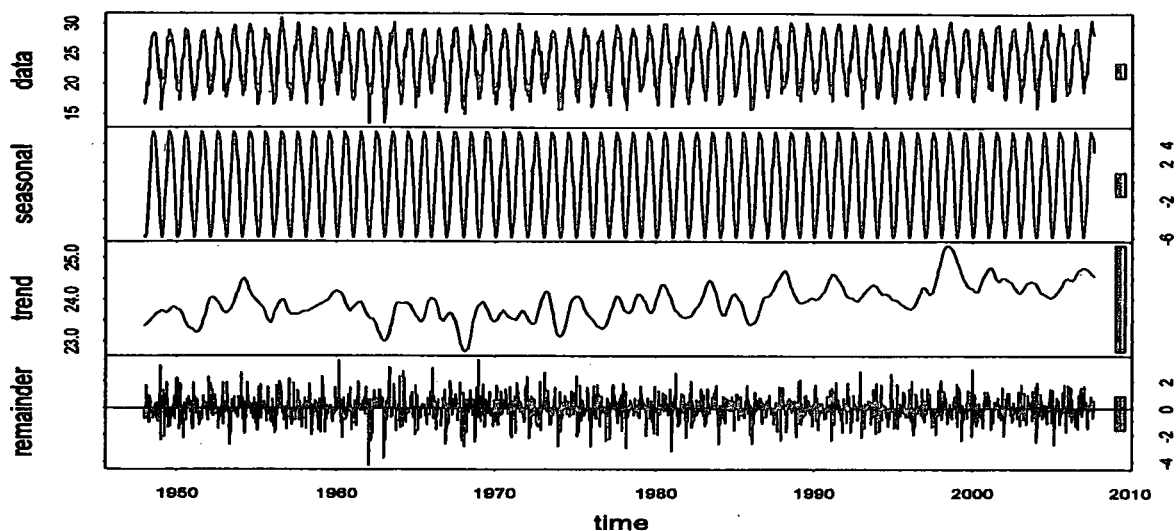


Fig. 11 Decomposition of temperature at Ishigaki Island

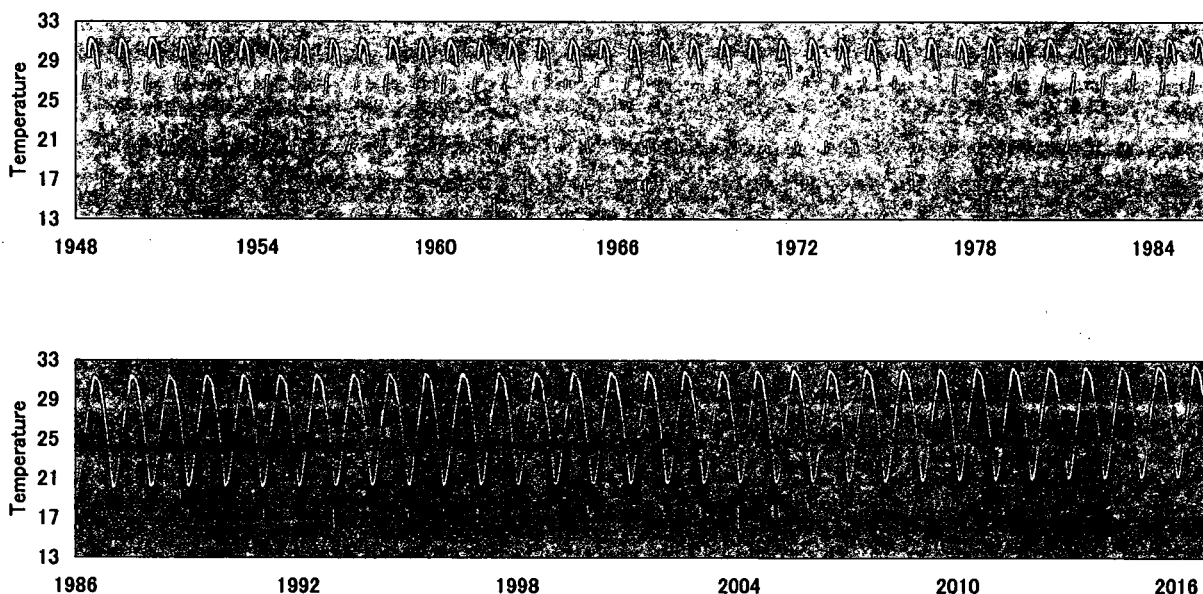


Fig. 12 Estimated and Predicted temperature at Ishigaki island (above: 1948-1985; below: 1986-2017). Green bold line indicates the estimated quadratic curve of trend. Orange line indicates the estimated temperature. Yellow line indicates the 95% upper quantile estimates of temperature. The prediction is done after September 2007.

3.3 *An. minimus* 幼虫密度の将来予測

ここでの目的は将来 10 年間の降水量と気温の予測値から、2 節で構成した *An. minimus* 幼虫密度推定式によってどのように幼虫密度が変化するかを調べる。幼虫数密度を用いた理由は、一般に幼虫密度データの方が成虫密度デ

ータよりも観測精度が高いためである。3.1 節で降水量にはトレンドが存在しないと結論されたので、上で得た分解「トレンド」と「誤差」の平均値に「季節成分」を加えたものを予測値とする。一方気温については、3.2 節で「トレンド」と「誤差」に当てはめた二次曲線から予測値を算出し、さらに季節成分を加えたものを予測値とする。これ

らを2節での *An. minimus* 幼虫密度推定式に代入すれば将来の幼虫密度が得られる。次の図13は、将来10年間の予測値と過去の降水量と気温データから求めた *An. minimus* 幼虫発生密度である。加えて、図2で得られた気温の95%上側分位点関数と、3.1節で得た降水量のBox-Cox変換データにおいて誤差項に正規性を仮定した95%下側分位点関数から計算される将来10年間に95%の確率で起こりうる最悪ケースの気温と降水量の予測値の組から求めた *An. minimus* 幼虫発生密度予測値をプロットした。この結果は今後、気温の上昇に伴って *An. minimus* 幼虫発生密度は増加するということを意味している。

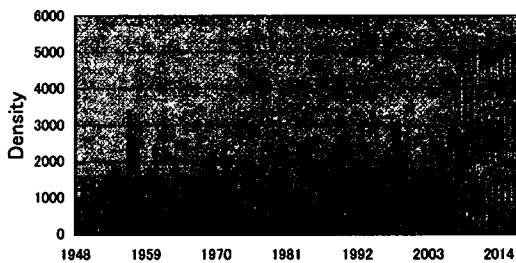


Fig. 13 Estimated and Predicted *An. minimus* immatures density at Nishihama stream. Blue line indicates the estimated mean value of the density. Pink line indicates the 95% upper quantile estimates of the density. The observed rainfall and temperature are used for the estimation before September 2007. The prediction is done after September 2007.

4 *An. minimus* の一人当たり人刺咬数

実際に熱帯熱マラリアの流行をモデル化するためには、*An. minimus* の一人当たり人刺咬数を求める必要がある。ここでは上で構築した *An. minimus* の幼虫密度から一人当たり人刺咬数への変換する方法を述べる。今回は、津田(2007)の報告書から2001-2006年に人囀法によって採取されたデータ(Y)を用いる(野底地域で採取:1960年代に *An. minimus* が多く、熱帯熱患者が多かった地域、西浜川が主発生源)。データは半夜、2人当たりの数であり、データYに0.5を掛けて一人当たりに直し、改めてそれをYとする。また、データは各年の平均値である。上で

の降水量と気温から幼虫数密度を予測する式を用いて、実験日に対応する期間の実際の降水量と気温より幼虫数密度の予測値Xを算出し、XからYへの回帰式を構成する。Xは(1233.4817, 714.5844, 2749.8755, 115.0630, 408.9671, 364.0961)と算出された。モデルは以下のもの考える

$$Y = \alpha X + \varepsilon$$

ここでεは平均0の誤差項を意味し、パラメータαの最小2乗推定量は0.004912174となった。上のように刺咬数が幼虫密度に比例すると仮定することは自然である。図14は、津田(2007)により採取された観測データ(点と直線の組)と推定した結果(太線)を示す。

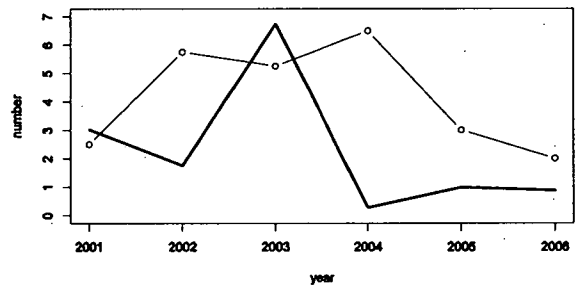


Fig. 14 Number of men bitten by *An. minimus* per night. Observations (line with points) and fitted values (bold line)

4.1 *An. Minimus* の一人当たり刺咬数予測値

1951-1960年における実際の降水量と気温データから上と同じ方法で、幼虫密度を推定し、対応する期間の一人当たり人刺咬数を上の結果を用いて推定した。

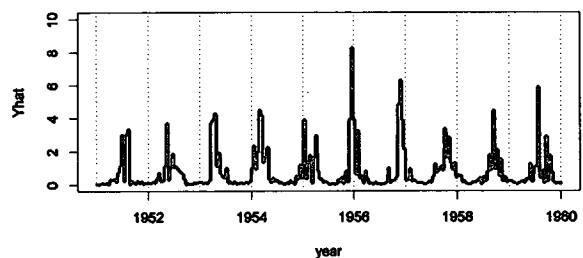


Fig. 15 Estimated human blood index per man in 1951-1960

5 過去の熱帯熱マラリア感染者数推定

石垣島における過去の熱帯熱マラリアの流行を再現するために実際の熱帯熱マラリア罹患者数が必要である。しかしながら、データには未観測の年があり、その部分のデータを補う必要がある。

1945, 1954, 1955, 1956, 1960 年において観測された八重山群島におけるマラリア患者全体に対する熱帯熱マラリア患者の割合は 0.60, 0.50, 0.27, 0.05, 0 である (八重山保健所, 1946, 1965)。目的は 1946-1960 年の未観測年における熱帯熱マラリア患者割合の推定である。1954 年にマラリア対策が強化された事実を反映させるために、1954 年の時点で折れ曲がった 1 次関数を最小 2 乗法で当てはめた (その理論は付録に記している)。ただし 0 から 1 までの値を取るデータなので、

- ①データにある変換を施し、
- ②変換したデータにモデルを当てはめ、
- ③得られたモデルに①の逆変換を施す、

という手順で推定する。変換としてはロジット変換と標準正規分位点変換の二つを用いた。ただし 0 値は不可なので 1960 年の 0 を小さい値 0.000001 で置き換える。以下の図 16 はロジット変換 (破線)、標準正規分位点変換 (実線) のそれぞれの結果を表す。

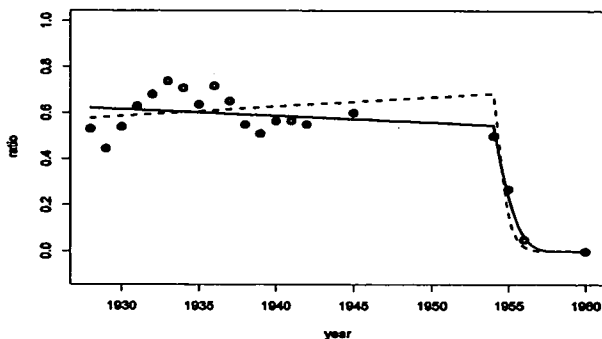


Fig. 16 Estimated ratio of *P. falciparum* patients in 1945-1960

残差はロジット変換で 0.1565862, 標準正規分位点変換で 0.1095862 となり後の方が小さくなった。ゆえに未観測年におけるデータを標準正規分位点変換の結果を利用して補うこととする。得られたモデルは以下のものであ

る:いま Φ を標準正規分布関数とし、付録の(A.1)式を用

い、 x で年を表せば、 $\Phi\{\hat{f}(x)\}$ となる。ここで

$$\hat{f}(x) = \begin{cases} \hat{a} + \hat{b}x, & (x < 1954) \\ \hat{a} + (\hat{b} - \hat{\beta})1954 + \hat{\beta}x & (x \geq 1954) \end{cases}$$

$(\hat{a}, \hat{b}, \hat{\beta}) = (14.585737852 - 0.007404353 - 0.816627969)$ である。

6 石垣島の観光客滞在日数分布

近年の石垣島に訪れる観光客の増加は、マラリアの拡散に無視できない影響を与える可能性がある。すなわち将来予測を行う上で観光客の動態をモデルに取り入れる必要が生じ、そのためには石垣島への観光客の滞在日数の分布が必要となってくる。ここでは、石垣島の観光客滞在日数の分布をデータを基づいて構成する。沖縄県庁 (2006) によると、2006 年において沖縄県への観光客が 0-6 日間滞在するそれぞれの割合は以下のように報告されている:

$$(p_0, p_1, \dots, p_6) = (0.4, 7.8, 43.6, 33.9, 10.1, 2.1, 0.8)/100$$

これをそのまま 0-6 日までの確率分布とする。7 日以上滞在する人の割合は 1.3%となっていたので、ここを等比級数 $p_j = ar^{j-7}, j \geq 7$ であらわす。

いま八重山群島への観光客の滞在日数の平均値 (2001 年) が 2.8 日である ((財) 日本交通公社, 2001) ので、以下の方程式から a と r を定める:

$$2.8 = Q + \sum_{j=7}^{\infty} ar^{j-7} j$$

$$1 = S + \sum_{j=7}^{\infty} ar^{j-7}$$

ここで $S = \sum_{j=0}^6 p_j$, $Q = \sum_{j=0}^6 p_j j$ である。その結果

$r = K/(K-1), a = (1-S)(1-r)$ を得る。ここで $K = \{7 + (Q - 2.8)\}/(1-S)$ である。

以上により石垣島の観光客滞在日数分布を求めることができた。

7 まとめ

本稿ではマラリアの流行解析のためのいくつかの統計モデルを構築した。第2節で示した、降水量と気温から *An. minimus* 幼虫および成虫と *An. sinensis* 成虫の密度を表現する式は本研究だけでなく、より一般に有効であると思われる。さらに、ここで用いた一般化線形モデルは他の同様の問題においても有効である。また、石垣島における気温は長期的に見ると緩くではあるが上昇傾向にあり、温暖化の影響であると思われる。予測のために、当てはめた2次関数はその傾向をよく捉えることができた。今後さらに気温と降水量について自己相関などの詳細な時系列解析手法を取り入れると、より高い精度の予測が可能となるだろう。マラリアの流行解析には統計モデリングが欠かせないものであり、今後さらに研究を進める必要がある。

付録 点 x_0 において繋がった直線モデルの最小二乗回帰問題

条件: $a + bx_0 = \alpha + \beta x_0$ を満たすモデル

$$f(x) = \begin{cases} a + bx & (x < x_0) \\ \alpha + \beta x & (x \geq x_0) \end{cases}$$

をデータに最小二乗法で当てはめる。

- ・ 推定すべき3つのパラメータは以下の損失関数を最小にするものである:

$$S(a, b, \beta) = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^m \{Y_j - (a + bx_j)\}^2 + \frac{1}{2} \sum_{j=m+1}^n [Y_j - \{a + (b - \beta)x_0 + \beta x_j\}]^2$$

各パラメータについて偏微分したものは以下である:

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial a} S(a, b, \beta) &= -\sum_{j=1}^m \{Y_j - (a + bx_j)\} \\ &\quad - \sum_{j=m+1}^n [Y_j - \{a + (b - \beta)x_0 + \beta x_j\}] \\ &= -Y_{\cdot 1} + ma + bx_{\cdot 1} - Y_{\cdot 2} \\ &\quad + (n - m)\{a + (b - \beta)x_0 + \beta x_j\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial b} S(a, b, \beta) &= -\sum_{j=1}^m \{Y_j - (a + bx_j)\}x_j \\ &\quad - \sum_{j=m+1}^n [Y_j - \{a + (b - \beta)x_0 + \beta x_j\}]x_0 \\ &= -\langle Y_1, \mathbf{x}_1 \rangle + ax_{\cdot 1} + b\|\mathbf{x}_1\|^2 \\ &\quad - [Y_{\cdot 2} - (n - m)\{a + (b - \beta)x_0 + \beta x_j\}]x_0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial \beta} S(a, b, \beta) &= -\sum_{j=m+1}^n [Y_j - \{a + (b - \beta)x_0 + \beta x_j\}](x_j - x_0) \\ &= -\langle Y_2, \mathbf{x}_2 - x_0 \rangle + a\{x_{\cdot 2} - (n - m)x_0\} \\ &\quad + bx_0\{x_{\cdot 2} - (n - m)x_0\} + \beta\|\mathbf{x}_2 - x_0\|^2 \end{aligned}$$

ここで

$$\mathbf{Y}_1 = (Y_1, \dots, Y_m)^T, \mathbf{Y}_2 = (Y_{m+1}, \dots, Y_n)^T, \mathbf{x}_1 = (x_1, \dots, x_m)^T, \mathbf{x}_2 = (x_{m+1}, \dots, x_n)^T$$

$$Y_{\cdot 1} = \sum_{j=1}^m Y_j, Y_{\cdot 2} = \sum_{j=m+1}^n Y_j, x_{\cdot 1} = \sum_{j=1}^m x_j, x_{\cdot 2} = \sum_{j=m+1}^n x_j$$

であり、 $\langle \cdot, \cdot \rangle$ はユークリッド内積を、 $\|\cdot\|$ はそれによって得られるノルムをあらわす。 $\mathbf{1}_2$ を成分がすべて1の $n - (m + 1)$ ベクトルとする。以上の3式=0とおいて得られる方程式は以下のものである:

$$\mathbf{M} \begin{pmatrix} a \\ b \\ \beta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} Y_{\cdot 1} \\ \langle \mathbf{Y}_1, \mathbf{x}_1 \rangle + Y_{\cdot 2} x_0 \\ \langle \mathbf{Y}_2, \mathbf{x}_2 - x_0 \mathbf{1}_2 \rangle \end{pmatrix}$$

ここで

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} n & x_{\cdot 1} - (n - m)x_0 & x_{\cdot 2} - (n - m)x_0 \\ x_{\cdot 1} - (n - m)x_0 & \|\mathbf{x}_1\|^2 + (n - m)x_0^2 & \{x_{\cdot 2} - (n - m)x_0\}x_0 \\ x_{\cdot 1} - (n - m)x_0 & \{x_{\cdot 2} - (n - m)x_0\}x_0 & \|\mathbf{x}_2 - x_0 \mathbf{1}_2\|^2 \end{pmatrix}$$

これを (a, b, β) に関して得た解を $(\hat{a}, \hat{b}, \hat{\beta})$ とするとき

次の回帰モデルが得られる:

$$\hat{f}(x) = \begin{cases} \hat{a} + \hat{b}x, & (x < x_0) \\ \hat{a} + (\hat{b} - \hat{\beta})x_0 + \hat{\beta}x & (x \geq x_0) \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

謝辞: 本研究は、厚生労働科学研究費「新興・再興感染症の研究」(Grant no. H17-Sinko-ippan-019)の補助を受けて行った。

参考文献

Cleveland, R. B., Cleveland, S., McRae, E. and Terpenning, I. (1990) STL: A Seasonal-Trend Decomposition Procedure Based on Loess. *J. Off. Statist.* **6**, 3-73.

Cleveland, W. S. (1979). Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **74**, 829-836.

Cleveland, W. S. and Devlin, S. J. (1988). Locally Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **83**, 596-610.

McCullagh, P. and Nelder, J. (1989). *Generalized Linear Models*. London: Chapman and Hall.

Toma, T., Miyagi, I., Malenganisho, W. L. M, Murakami, H., Nerome, H. and Yonamine, M. (2002). Distribution and seasonal occurrence of *Anopheles minimus* in Ishigaki island, Ryukyu archipelago, Japan, 1998-1999. *Med. Entomol. Zool.* **53**. Suppl. 2, 29-42.

津田良夫 (2007). 石垣島におけるマラリア媒介蚊の発生状況. アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究: マラリア等原虫疾患(プロジェクト3) 平成18年度総括研究報告書. 国立感染症研究所. 347-353.

(財) 日本交通公社 (2001). 八重山圏域における観光リゾートの波及効果等に関する調査.

沖縄県庁 (2006). 観光統計実態調査・観光客満足度調査: 平成18年度観光統計実態調査報告書. Available from: <http://www3.pref.okinawa.jp/site/view/contview.jsp?catid=233&id=14739&page=1>

八重山保健所 (1946). 八重山群島のマラリアに就いて. 八重山支庁衛生部業績別冊, 石垣島史所収. 565-605.

八重山保健所 (1965). 八重山群島のマラリア撲滅事業の沿革と其の成績について. 石垣島史所収. 753-810.

気象データ. 気象庁統計データベース:
<http://www.jma.go.jp>

成田国際空港に到着する国際線航空機内ならびに 空港区域における蚊の採集結果

長谷山路夫¹⁾ 飯塚信二²⁾ 大前比呂思³⁾ 津田良夫⁴⁾

¹⁾ 仙台検疫所検疫衛生課 (〒985-0011 塩竈市貞山通 3-4-1), 前所属: 成田空港検疫所

²⁾ 新潟検疫所検疫衛生課 (〒950-0072 新潟市竜が島 1-5-4), 前所属: 横浜検疫所輸入食品検疫検査センター

³⁾ 国立感染症研究所寄生動物部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1)

⁴⁾ 国立感染症研究所昆虫医科学部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1)

(受領: 2007年3月7日; 登載決定: 2007年5月11日)

Results of mosquito collection from international aircrafts arriving at Narita International Airport, Japan and mosquito surveillance at the airport

Michio HASEYAMA¹⁾, Shinji IZUKA²⁾, Hiroshi OMAE³⁾, Yoshio TSUDA⁴⁾

¹⁾ Sendai Quarantine Station, Teizandori 3-4-1, Shiogama, Miyagi, 985-0011 Japan

²⁾ Niigata Quarantine Station, Ryugashima 1-5-4, Niigata, Niigata, 950-0072 Japan

³⁾ Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases,
Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640 Japan

⁴⁾ Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases,
Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640 Japan

(Received: 7 March 2007; Accepted: 11 May 2007)

Abstract: Aircrafts arriving at Narita International Airport, Japan were inspected for mosquito vectors of human diseases accidentally introduced into the country. During 5 years from 2001 to 2005 a total of 2,161 aircrafts were inspected and 28 adult mosquitoes were found from 26 (1.2%) of the aircrafts. Thirteen aircrafts with mosquitoes came from North and South America, 12 aircrafts from Asia and Oceania, and one aircraft from Europe. The mosquito species found in the aircrafts were *Culex pipiens* complex, *Anopheles sinensis*, *Aedes vexans nipponii*, *Cx. tritaeniorhynchus*. Mosquito species occurring at the government ordinance area of Narita International Airport were examined by dipping collection of larvae, ovitraps, light traps, and dry ice traps, and identified into 12 taxa belonging to 8 genera. In the terminal building of Narita International Airport, adults *Cx. pipiens* complex were collected year round suggesting the establishment of foreign vector mosquitoes accidentally introduced from tropical/subtropical areas through aircrafts. All of 15,231 adult mosquitoes examined were negative for 5 mosquito-borne diseases; yellow fever, dengue fever, Japanese encephalitis, West Nile fever, and malaria.

Key words: aircraft, mosquito vectors, Narita International Airport, Japan

はじめに

マラリアやデング熱など蚊媒介性感染症の多くはアフ

リカ, アジア, 中南米の熱帯・亜熱帯地域に分布し, そこでは宿主動物と媒介蚊によって形成される恒常的な感染環が成立している. ところが感染環の成立していない

地域であっても、一時的に人へのマラリア感染が起こることが知られており、Airport malariaあるいはBaggage malariaと呼ばれている (Gratz et al., 2000). Gratz et al. (2000) は 1969~1999 年に 12 カ国のマラリア非流行地域から 89 例のマラリア患者を報告している。これらのマラリア患者は特に欧州や北米などで多く見られ、マラリア流行地からの国際線航空機によって運ばれたマラリア原虫保有蚊が感染源となって、到着空港の空港職員や周辺住民が感染したと考えられている。

航空機で運ばれる蚊の種類はマラリアの媒介蚊である *Anopheles* 属のみならず *Aedes* 属や *Culex* 属など他の蚊媒介性感染症の媒介蚊も含まれている (Gratz et al., 2000; Lounibos, 2002). 1999 年以降北米大陸で流行が続いているウエストナイル脳炎は媒介に関わる蚊種が多く (Turell et al., 2005), また多種の野鳥が感受性を持つことから (CDC, 2005), 渡り鳥, 感染した蚊や動物など種々のウイルスの拡散経路が想定され, 航空機による媒介蚊の持ち込みも重要視されている (Rappole et al., 2000; Kilpatrick et al., 2004). 航空機を経由した蚊の侵入状況については, 我が国においても 1970 年代に詳細な調査が行われている (Takahashi, 1984; 楠井, 1980). Takahashi (1984) は 1975~1981 年に調査した 928 機中 18.5% の航空機で蚊を採集している。楠井 (1980) は 1975~1979 年に 600 機の航空機を調査した結果, 122 機 (20.3%) から蚊を採集している。

我が国ではマラリアや Flavivirus の蚊媒介性感染症 (黄熱, デング熱, 日本脳炎, ウエストナイル脳炎など) を法令により, 検疫感染症, 検疫感染症に準ずる感染症として定め, これら感染症の侵入防止を目的として, 検疫所が空港や港における蚊の生息状況調査を行っている (例えば, 水田ら, 1999)。

我が国は海に囲まれているため, 外国からの蚊媒介性感染症の侵入を監視する上で国際空港は非常に重要な調査地である。特に成田国際空港は我が国の国際空港の中でも国際線の発着数が多く, 国際線航空機による蚊媒介性感染症の侵入が懸念されている。

本研究では成田国際空港における疾病媒介蚊の侵入ならびに空港内における生息状況を把握するために, 空港に到着する国際線航空機内と空港区域を対象に蚊の捕獲調査を行った。得られたサンプルについて病原体の保有状況を調べ, 我が国への蚊媒介性感染症の侵入リスクについて考察した。

材料と方法

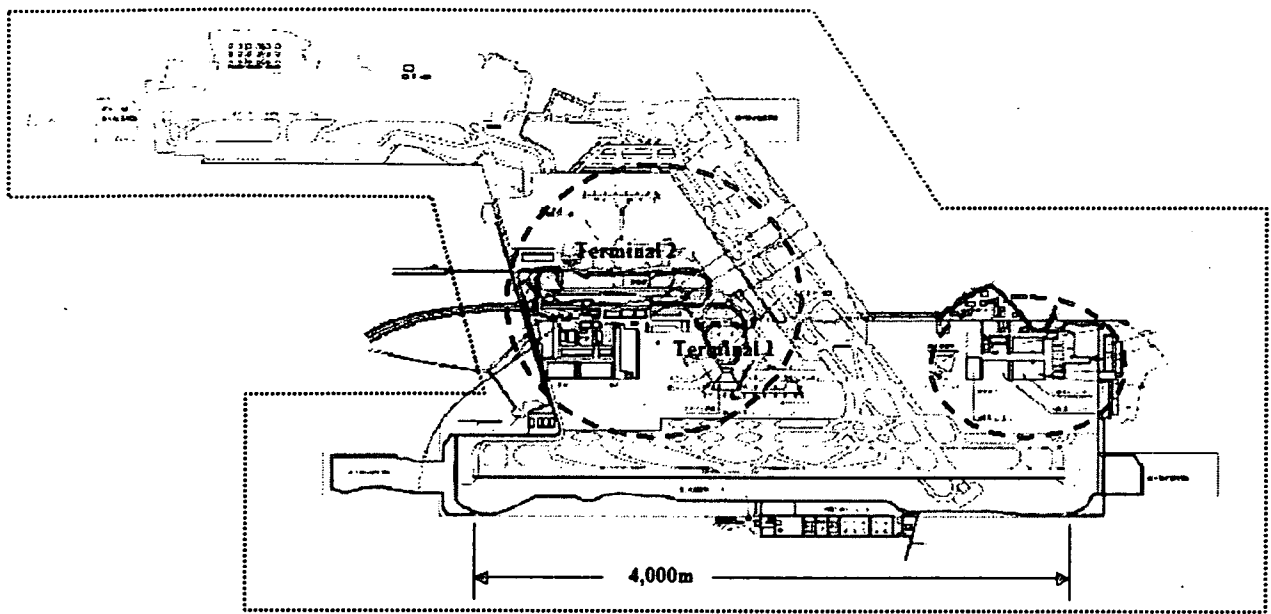
本研究では海外から航空機によって運ばれる媒介蚊を対象とした国際線航空機調査と, 空港区域における疾病

媒介蚊の侵入・定着状況の把握を目的とした空港区域調査を 2001~2005 年の 5 年間実施した。捕獲した蚊のうちマラリア, 黄熱, デング熱, 日本脳炎, ウエストナイル脳炎の媒介蚊として厚生労働省が定めた 192 種に相当する個体は, 病原体の保有状況を調査した。

国際線航空機の機内調査: 蚊媒介性検疫感染症の流行地域として法令によって定められた 130 カ国・地域から成田国際空港に到着する国際路線を中心に航空機内の蚊の捕獲を行った。旅客機では航空機が到着し乗客が降機した後, 1~2 名の調査担当者が客室デッキに立ち入り, 客室を前方から後方まで目視により昆虫の調査を行った。暗部では懐中電灯を用いた。昆虫を発見した場合は捕虫網または吸虫管を用いて捕獲した。貨物専用機では, 到着後ただちにメインデッキの貨物室に立ち入り, 旅客機と同様に目視で調査を行った。航空機内の調査時間は概ね 10 分間であった。また, 航空会社に航行中に蚊を発見した場合の通報を依頼し, 乗務員が捕獲した場合には捕獲蚊の提供を求めた。調査は旅客機, 貨物機および貨客機, 合計 2,131 機について行った。また, 航空機の航行中に蚊を発見したとの連絡を受けた 30 機についても調査を行い, これらを含め合計 2,161 機が調査の対象となった。

空港区域の成虫調査: 我が国では検疫法に基づき各国際空港で媒介蚊の調査対象区域が定められており, 成田国際空港では, 空港区域とその周辺部 400 m の範囲が調査対象とされている (Fig. 1)。成虫の捕獲はライトトラップに誘引のためドライアイス 1 kg を併置して行った。使用したライトトラップは次の 4 種類である; CDC Miniature Light Trap (John W. Hock, USA), 乾電池駆動式ライトトラップ (猪口鉄工所, 長崎), 100 V 交流電源駆動式ライトトラップ (ブラックライト付, 東京 AS 社, 東京), 100 V 交流電源駆動式ライトトラップ Model MC-8200 (石崎電機製作所, 東京)。これらのトラップを航空機によって運ばれてきた蚊が侵入する可能性が高い場所である, 航空機の駐機場所およびその区域に隣接し航空機と連結しているボーディングブリッジを含むターミナルビル (エプロン周辺), それ以外の区域に分けて設置した。トラップの設置時間は一部の地点を除き, 1 回あたり 24 時間とした。調査回数は 5 年間で延べ 1,232 回であった。ターミナルビル内では産卵ステージの蚊の捕獲に有利な CDC Gravid Trap Model 1712 (John W. Hock, USA) も併せて 6 カ所に設置した。調査は 2003~2005 年の 3 年間実施し, トラップの設置時間は 1 回あたり 24 時間, 調査回数は延

Government ordinance area



----- Place including an apron

Fig. 1. Government ordinance area at Narita International Airport, Japan.

べ330回であった。また、成虫・幼虫調査を実施中に蚊の成虫を発見した場合には、捕虫網や吸虫管により捕獲した。

ターミナルビル内については、旅客機から蚊が乗客とともにビル内に侵入する可能性もあるため、ライトトラップおよび航空機調査と同様に目視により調査した。また、ビル内の関係機関・事業所より蚊の発見に関する情報提供を依頼した。

空港区域の幼虫調査：2002～2005年の期間に空港区域内の雨水枡や池などの発生水域と人口容器を用いたオビトラップによって幼虫調査を実施した。オビトラップとしては一辺約200mmのホーロー製三角柱容器もしくはプラスチック製円柱容器に *Culex* spp. も含めて捕獲する目的で稲藁を少量加えたものを用いた。オビトラップの設置は航空機の運行への支障を考慮し、空港区域の成虫調査と同様にターミナルビル内を含むエプロン周辺の26カ所、それ以外の場所の19カ所の合計45定点を設けて調査を行った。調査頻度は年により差はあるが発生水域で延べ597回、オビトラップで延べ180回、生息状況の調査を実施した。

捕獲蚊成虫の病原体保有状況検査：捕獲された蚊成虫はマラリア原虫の検出検査では1プールを10個体、Flavivirusでは100個までとし、病原体の保有状況を検査した。Flavivirusの検出は共通遺伝子の検出が可能なプ

ライマーを用いた林ら(2003)のOne step RT-PCR法によった。ポジティブコントロールとしては細胞培養した黄熱、日本脳炎、デング熱およびウエストナイル脳炎ウイルスを使用した。マラリア原虫の検出方法は Oliveira et al. (1995)のPCR-DNA-hybridization法を応用し、Probe塩基配列と同様のanti-sense primer (*Plasmodium falciparum*; DIG1, *P. vivax*; DIG4, *P. malariae*; DIG9, *P. ovale*; DIG11)を用いたSemi-nested PCR法により行った。ポジティブコントロールとしては感染血液と未感染蚊10個体を混ぜたものを使用した。

Table 1. Results of aircraft inspection for mosquitoes at Narita International Airport, Japan from 2001 to 2005.

Year	No. of aircrafts inspected	No. of aircrafts with insects	No. of aircrafts with mosquitoes
2001	251	35 (13.9)	6 (2.4)
2002	288	61 (21.2)	1 (0.3)
2003	518	20 (3.9)	7 (1.4)
2004	609	31 (5.1)	8 (1.3)
2005	495	24 (4.8)	4 (0.8)
Total	2,161	171 (7.9)	26 (1.2)

Number in parenthesis shows the percentage of the total number of aircrafts inspected.

Table 2. Mosquito taxa and their incidence (No. of mosquitoes/No. of aircrafts with mosquitoes) by flight route observed at Narita International Airport, Japan from 2001 to 2005.

Taxa	Flight routes (No. of aircrafts inspected)			
	North & South America (1,136)	Asia & Oceania (970)	Europe (55)	All (2,161)
<i>Culex pipiens</i> complex	3/3	7/6	0/0	10/9
Unidentified spp. of <i>Culex</i>	5/5	2/2	0/0	7/7
<i>Anopheles sinensis</i>	2/2	0/0	0/0	2/2
<i>Aedes vexans nipponii</i>	2/1	0/0	0/0	2/1
Unidentified spp. of <i>Aedes</i>	1/1	0/0	0/0	1/1
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	0/0	1/1	0/0	1/1
Unidentified mosquitoes	1/1	3/3	1/1	5/5
Total	14/13 (1.1)*	13/12 (1.2)	1/1 (1.8)	28/26 (1.2)

*Number in parenthesis shows the percentage of the total number of aircrafts inspected.

Table 3. Numbers of adult mosquitoes collected at the government ordinance area of Narita International Airport, Japan from 2001 to 2005.

Taxa	2001	2002	2003	2004	2005	Total
<i>Culex pipiens</i> complex	17,530	2,359	444	40	245	20,618
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	1,061	380	215	690	234	2,580
<i>Aedes vexans nipponii</i>	360	354	181	377	131	1,403
<i>Ae. albopictus</i>	152	106	11	90	77	436
<i>Anopheles sinensis</i>	161	148	29	47	6	391
<i>Tripteroides bambusa</i>	34	28	4	15	52	133
Unidentified spp. of <i>Culex</i> (<i>Culiciomyia</i>)	116	0	5	1	18	140
<i>Ochlerotatus japonicus</i>	31	46	0	5	0	82
<i>Armigeres subalbatus</i>	33	13	4	4	5	59
<i>Uranotaenia novobscura</i>	1	1	4	15	4	25
<i>Lutzia vorax</i>	5	4	0	1	0	10
Unidentified spp. of <i>Culex</i>	0	0	0	3	5	8
<i>Cx. orientalis</i>	0	1	2	1	1	5
Unidentified spp. of <i>Aedes</i>	0	0	0	1	2	3
Unidentified spp. of <i>Armigeres</i>	0	0	0	2	0	2
<i>Cx. pallidothorax</i>	0	0	0	0	1	1
Unidentified mosquitoes	128	81	3	0	0	212
Total	19,612	3,521	902	1,292	781	26,108

結 果

国際線航空機の機内調査：蚊科を含む昆虫が確認された航空機は2,161機中、171機(7.9%)であった(Table 1)。そのうち蚊が捕獲された航空機は26機(1.2%)であった。蚊科では *Culex pipiens* complex が最も多く(9機10個体)、以下 *Anopheles sinensis* が2機2個体、*Aedes vexans nipponii* が1機2個体、*Cx. tritaeniorhynchus* が1機1個体で、合計3属4種15個体が確認された(Table 2)。その他、損傷により種が判明できなかった個体が *Culex* 属7機7個体、*Aedes* 属1機1個体、損傷が激しく属の同定ができなかった個体が5

機5個体で、合計26機28個体であった。

航空機の発航地(最終空港)とその前空港の飛行ルート別に集計すると、南・北アメリカ路線(1,136機)で13機14個体、アジア・オセアニア路線(970機)で12機13個体、ヨーロッパ路線(55機)で1機1個体であった。属別から捕獲状況を見ると *Culex* 属でアジア・オセアニア路線で9機10個体、次いで南北アメリカ路線が8機8個体であった。*Aedes* 属では南・北アメリカ路線が2機3個体あった。また、*Anopheles* 属は南・北アメリカ路線のみで2機2個体あった。

空港区域の成虫調査：2001～2005年に26,108個体の

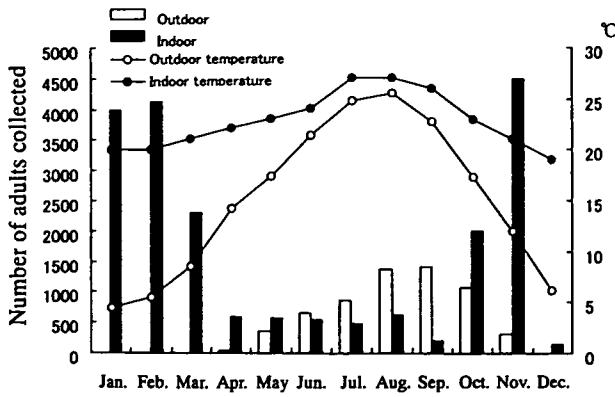


Fig. 2. Seasonal changes in number of adult *Culex pipiens* complex and monthly average temperature observed at the government ordinance area of Narita International Airport, Japan in 2001.

蚊が捕獲され、少なくとも8属12種・群に同定された (Table 3). そのうち検疫感染症および検疫感染症に準ずる感染症を媒介する種は、*Cx. pipiens* complex (20,618 個体) が最も多く 79.0% を占めていた。次いで *Cx. tritaeniorhynchus* (2,580 個体, 9.9%), *Ae. vexans nipponii* (1,403 個体, 5.4%), *Ae. albopictus* (436 個体, 1.7%), *An. sinensis* (391 個体, 1.5%), *Ochlerotatus japonicus* (82 個体, 0.3%), *Armigeres subalbatus* (59 個体, 0.2%) で合計 25,569 個体となり、全体の 97.9% を占めていた (Table 3). 捕獲総数は 2003 年以降かなり減少しているが、その理由のひとつ

はターミナルビル地下の *Cx. pipiens* complex の発生源に対する殺虫剤処理の効果と思われる。

最も捕獲個体数の多かった *Cx. pipiens* complex の季節消長を 2001 年のデータに基づいて Fig. 2 に示した。屋外の定点では 2, 3 月は成虫が捕獲されず、4 月から捕獲され始め 9 月をピークに減少し、12~1 月は *Cx. pipiens* complex が 9 個体捕獲された。屋外の月別平均気温が概ね 10°C 以上となる 4 月から生息が確認された。ターミナルビルなどの屋内では一年を通じて成虫が捕獲された。屋外に比較して気温の季節変化は小さく、捕獲成虫数は冬季である 11, 1, 2 月に多かった。4~9 月の捕獲数が少なく安定していたこと、また 12 月の捕獲数が極端に少なかった理由は明らかでない。これら捕獲成虫の 94% はターミナルビル内の鉄道の駅構内で捕獲され、その殆どが *Cx. pipiens* complex であった。この駅は空港区域の中央に位置し、国際線航空機発着が多い第 1 ターミナルビルの地下にある。構内の温度は年間を通じて 18~27°C の範囲にあり最も外気温が低くなる 1 月でも 6~10 月の外気温と同様であった。第 1 ターミナルビル地下の幼虫発生源には殺虫剤による防除を行った結果、2003 年以降 2005 年までは幼虫の発生は認められていない。

空港区域の幼虫調査: 2002 年から 2005 年の調査で、空港区域内に設置したオビトラップおよび人工水域で発生が確認された種類を Table 4 に示した。年によって

Table 4. Occurrence of mosquito larvae observed by ovi-trap and dipping at the government ordinance area of Narita International Airport, Japan from 2002 to 2005.

Year	2002		2003		2004		2005		Total	
	Apron & Terminal buildings	Other	Apron & Terminal buildings	Other	Apron & Terminal buildings	Other	Apron & Terminal buildings	Other	Apron & Terminal buildings	Other
<i>Anopheles sinensis</i>	●	●	●	●	●	●			●	●
<i>Aedes albopictus</i>	●	●		●	●	●	●	●	●	●
<i>Ae. vexans nipponii</i>			●	●	●	●			●	●
<i>Ochlerotatus japonicus</i>		●		●	●	●			●	●
<i>Tripteroides bambusa</i>	●	●		●			●	●	●	●
<i>Armigeres subalbatus</i>				●		●	●	●	●	●
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>Cx. pipiens</i> complex	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Unidentified spp. of <i>Culex</i> (<i>Culiciomyia</i>)			●	●				●	●	●
<i>Lutzia vorax</i>		●		●		●	●	●	●	●
No. of ovi-traps	29	29	41	14	34	0	25	8	129	51
No. of drains and puddles examined	2	22	45	132	35	91	103	167	185	412

Table 5. Results of flavivirus and malaria parasites detection from mosquitoes captured from aircrafts and the government ordinance area of Narita International Airport, Japan from 2001 to 2005.

Target diseases	No. of samples examined					Total	No. of positive samples
	2001	2002	2003	2004	2005		
Yellow fever	51	97	8	72	76	304	0
Dengue fever	51	97	8	72	76	304	0
Japanese encephalitis	119	318	202	668	229 (2)	1,536 (2)	0
West Nile fever	9,221	1,281	514	1,163 (7)	691 (2)	12,870 (9)	0
Malaria	95 (1)	53	21	45 (1)	3	217 (2)	0
Total	9,537 (1)	1,846	753	2,020 (8)	1,075 (4)	15,231 (13)	0

Number in parenthesis shows the number of samples collected from aircraft.

確認された種類に違いはあるものの、空港区域の成虫調査で捕獲されたほとんどの種の幼虫が生息していた。また、発生が確認された時期も空港区域の成虫調査で成虫が捕獲された時期と一致していた。

捕獲蚊成虫の病原体保有状況検査: Flavivirus, マラリアを媒介する蚊種の雌成虫を対象に、空港区域の成虫調査および国際線航空機内の調査で捕獲されたそれぞれ15,218個体および13個体についてRT-PCR法およびPCR法により病原体の遺伝子保有検査を行った結果をTable 5に示した。いずれのサンプルからも病原体の遺伝子は検出されなかった。

考 察

国際線航空機内の調査により *Culex* 属がアジア、南・北アメリカ路線、*Aedes* 属が南・北アメリカ路線から捕獲された。また *Anopheles* 属ではアメリカのロサンゼルス空港を出発した便から *An. sinensis* が捕獲された。*Anopheles sinensis* が捕獲された航空機は貨物航空機のため、貨物を搬出するハッチが開放される前に機内へ立ち入ること、航空機内は陽圧のためハッチを開けた直後に外界から蚊が侵入することは考えにくいことから、到着後に機内に侵入したとは考えられない。また本種は北アメリカには分布していないことから、ロサンゼルス空港に到着する以前の空港で侵入したと考えるのが妥当だろう。Takahashi (1984) が報告した1981年の状況と比較し、今回の調査で捕獲された蚊科の個体数は少なくなっているが、依然として航空機を運搬手段として蚊成虫が世界各地へ移動していることがうかがえ、海外から我が国への媒介蚊の侵入だけでなく我が国から海外への媒介蚊の移動も予想される。

空港区域の調査では8属12種・群の蚊が捕獲され、その中には flavivirus group の媒介種が含まれていた。三日熱マラリアの媒介種である *An. sinensis* も捕獲さ

れたが、空港周辺には同種が生息する水田が存在することから、在来個体と推測される。関西国際空港で1998年に行われた生息蚊の調査では、3属9種の蚊が採集されているが(水田ら, 1999)、本調査で生息が確認された *Ae. vexans nipponii*, *Oc. japonicus*, *Tr. bambusa*, *Ar. subalbatus* の4種類はこの中に含まれていない。これら4種は林や農村部に多く分布しており、関西国際空港が海上に建設された空港であり、一方成田国際空港が農村地域に建設された空港であるという周辺環境の違いが生息蚊の種類相の違いに反映されているものと思われる。成田国際空港の近接地で2003年と2004年に実施された媒介蚊調査では、7属16種の蚊が採集されている(津田ら, 2006)。本調査で捕獲された *Cx. orientalis* と *Cx. pallidothorax* の2種はこの中に含まれていないが、主要な種類はほぼ同じで本調査結果が空港周辺に生息する蚊相をよく反映していたことが示唆された。

蚊媒介性病原体の侵入状況については、いずれの媒介種サンプルにも病原体の遺伝子が確認されなかったことから、侵入はなかったと推測できるだろう。また、空港区域内における蚊媒介性疾患の流行の可能性については、航空機でマラリアおよび flavivirus の媒介種が捕獲されたこと、空港区域に季節を問わずウエストナイル脳炎の媒介が可能な種が生息していたことを考慮すると、成田国際空港へ病原体を保有した媒介種が侵入した場合、一時的な流行に至る可能性は否定できない。2001年の調査においてターミナルビルにある鉄道駅で *Cx. pipiens* complex が多数捕獲され、その後の水谷ら(2001)の調査ではそのほとんどが *Cx. pipiens form molestus* であった。このビルは北米を中心に多くの国際路線が乗り入れており、航空機とターミナルビルはボーディングブリッジで結ばれるため、航空機に潜伏していた蚊がターミナルビルの内部へ侵入することが可能である。また、空港ターミナルビルと首都圏は鉄道で結ばれているため、航空機を経由して侵入した蚊が鉄道を