

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
総合分担研究報告書

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： 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、簡便で、信頼性の高い、薬剤感受性 *in vitro* 試験法を確立し、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。また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目指して、*P. falciparum* の分化増殖を誘導支持する既知構造物からなる増殖因子を作出した。さらに構造既知である組換えタンパク質を加え、Chemically defined medium を作製した。

ここに樹立して実用化したマラリア原虫の無血清培地を用いた培養法、lactate dehydrogenase (PfLDH) 測定法やフローサイトメトリーを用いた増殖評価法は、いずれも従来の方法の欠点を著しく改良するものである。今後本症の疫学的解析および治療薬開発に極めて有用であると考えられる。また作出できた *P. falciparum* に有効な増殖因子、および Chemically defined medium は、実用的な価値ばかりでなく、*P. falciparum* の増殖および抑制機序の解明を可能にし、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重要な手段になると考えられた。

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り、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。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* 試験法を確率し、(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あわせて行う。

B. 研究方法

(1) 薬剤感受性 *in vitro* 試験法の確立：私達が先に開発実用化した熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の無血清培地 (GFSRPMI) を用いて薬剤感受性 *in vitro* 試験法を標準化した。

(2) 増殖モニターおよび薬剤効果評価法の確立:マラリア原虫増殖評価法については、従来用いられている Giemsa 染色標本の検鏡による評価法の欠点を補う方法として私達が開発した SYBR green I を使用した Flow cytometry (FMC) およびマラリア原虫の lactate dehydrogenase (PfLDH) 測定法を標準化して比較検討した。

(3)

(4) マラリア原虫の分化増殖に関連する分子、遺伝子の特定: 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 Chemically defined medium を用いた培養系を樹立する。その後増殖因子と相互作用し、分化増殖に関与する原虫側の分子を特定する。樹立されたこの Chemically defined medium を導入した薬剤耐性試験法を従来の方法と比較検討する。

C. 研究結果

(1) GFSRPMI で培養した *P. falciparum* を用いて、いくつかの典型的な抗マラリア剤に対する感受性を測定し、従来ヒト血清添加培地を用いた場合と比較した。感染率 (parasitemia) 増加を測定する方法と、形成 schizonts 数を測定する二つの方法で評価した。GFSRPMI およびヒト血清を用いた試験方法において、各種抗マラリア剤による原虫の増殖抑制や schizonts 形成抑制は同等に評価できた。

(2) 色々な条件下における Schizont 形成抑制、および増殖抑制を比較した結果、Giemsa 法、lactate dehydrogenase (PfLDH) 測定法とフローサイトメトリーによる結果はよく一致した。一方、放出 merozoites 数を基準にして算出した増殖抑制は他の方法を用いた場合と比較して高感度に薬剤の効果を検出しているものと考えられた。

以上フローサイトメトリーが *P. falciparum* の増殖モニターに十分に有用である事が示唆された。特に他の方法では検出できないメロゾイト数を基盤にした方法は、増殖機序解析等より詳細な観測が必要な場合に極めて有用であろうと考えられた。

(3) 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。したがって「薬剤感受性の特性と薬剤耐性遺伝子特性および *in vivo* 効果との関連」に関する成果は得られなかった。

(4) *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。さらに構造既知である組換えタンパク質を加え、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。

D. 考察、結論

ここに樹立して実用化したマラリア原虫の無血清培地を用いた培養法、lactate dehydrogenase (PfLDH) 測定法やフローサイトメトリーを用いた増殖評価法は、いずれも従来の方法の実施困難な点やその他の欠点を著しく改良するものである。残念ながら、マラリア流行地でそれらを実施する機会を得る事は出来なかったが、今後、本症の疫学的解析および治療薬開発に極めて有用であると考えられる。

またここで作出できた *P. falciparum* に有効な増殖因子、および Chemically

defined medium は、実用的な価値ばかりでなく、*P. falciparum* の増殖および抑制機序の解明を可能にし、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重要な手段になると考えられた。

E. 健康危機情報
特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiroko Asahi, Tamotsu Kanazawa, Nakami Hirayama, Yousei Kajihara, Investigating serum factors promoting erythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology* 109: 7-15 (2005)

2. 学会発表

朝日博子、泉山信司、高崎智彦、遠藤卓郎
マラリア原虫の Lactate dehydrogenase 測

定法を用いた感染、増殖測定法の応用と改良。第 74 回日本寄生虫学会大会： 2005 年 4 月

Hiroko Asahi, Investigating factors promoting erythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting: December, 2005 (in USA).

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

朝日博子、泉山信司、赤内型熱帯熱マラリア原虫に対する脂質性増殖因子の作用機序
第 76 回日本寄生虫学会大会： 2007 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金(新興再興研究事業)
総合分担研究報告書

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究

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

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クロロキン(CQ)とピリメサミン(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、CQとPyr耐性遺伝子である *pfcr* と *dhfr* 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のうち96%(28/29)がCQ耐性型、77%(20/26)がPyr耐性型を示した。Archival sampleを用いた耐性遺伝子の遺伝的同定の研究はこれまで数例しかなく、本研究結果はCQならびにPyr耐性マラリアの存在を1980年代に遡って遺伝的に示したものである。

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、マラリア対策の大きな問題となっている。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示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 *dihydrophosphate 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。また、2000年にはCQ耐性の原因が *food vacuole* 上のトランスポーター *pfert* にK76T変異が入ることがCQ耐性の原因であることが証明された。これまで、インドシナ株は *pfert* の72-76残基のアミノ酸が CVIET であり、PNG株は SVMNT の配列を持つと報告されている。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。そして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、遺伝的耐性と臨床的耐性とは異なるものであるため、遺伝子型の同定による確認は

耐性の起源と歴史の調査は重要である。この点を調べるには、archival sample を調べる必要がある。

本研究では、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用いたマラリア患者の薄層標本から東南アジアにおける *pfert* と *dhfr* の遺伝的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。*pfert* K76T 変異を含む 190 bp の DNA 断片は Phusion polymekase (NEB) を用いてネステッド PCR で増幅した (Dijimde 2003)。*Dhfr* locus においても、それぞれアミノ酸残基 51 と 19、108、164 を増幅する 190bp の断片をネステッド PCR により増幅し、配列決定を行った。*Dhfr* locus を増幅するオリゴヌクレオチドの配列は H19 年度の研究報告に記載した。

C. 研究結果

C-1: 国内への輸入マラリア数

1984 年から 1998 年までの各薄層標本について患者情報が存在するものについて、ヒトに感染する 4 種のマラリアの種別を顕微鏡下で診断した。その結果、マラリア原虫が検出できたものは 588 サンプルであった (Table 1)。マラリアの種別では熱帯熱マラリアが 229 例 (39%)、三日熱マラリア 347 例 (59%)、卵形マラリア 7 例 (1%)、四日熱マラリア 5 例 (0.8%) であった。地域別の発生では、熱帯熱マラリアはアフリカでの感染が 151 例と熱帯熱マラリアの 66% を占め、第 2 位は東南アジアの 55 例 (24%) であった。一方、三日熱マラリアは東南アジアが感染の第一位であり、145 例 (三日熱マラリアの 41%) の患者発生数があった。

第 2 位はインド周辺の南アジアであり 129 例 (37%) の感染者数が報告されていた。

C-2: *pfert* の多型

東南アジアで感染した 55 サンプルのうち 29 サンプルが DNA の回収と増幅が可能であった。*pfert* の多型を Table 2 に示した。1985 年のフィリピン株一つをのぞいて、全て変異型であった。そして本結果でもインドシナのミャンマー、タイ、ラオスから CVIET (n = 8) が同定された。Myanmar とラオスにおける遺伝的耐性株の確認は 1999 年のものが報告されている (Anderson, 2005) が、本研究は両国においてそれをさらに 1994 年にまで遡る。インドシナの他の 2 例は CVIET の変異体と考えられる CVIDT (n = 2) が 1998 年のラオス (タイ) のサンプルから同定された。このタイプは 2001 年に Cambodia で認められているが (Lim 2003; Durrand 2004)、すでに 1998 年にはラオスでは存在していたことを示す。

西太平洋諸国のインドネシア、PNG、フィリピンから SVMNT 型 (n = 16) が得られた。1986 年のインドネシア株は 76 番目のコドンのリジン (AAA) がアスパラギン (AAT) に置換していた。この CVMNN 型も *in vitro* で CQ 耐性を示すことが報告されている (Cooper 2002)。PNG では 1986 年から 1998 年までのサンプル全て (n = 8) が SVMNT 型を示した。これに関連して Mehlotra は PNG で 1982-1984 年のサンプル全てに SVMNT 型を見いだしており (Mehlotra 2005)、今回の結果と同一である。一方で、Chan は 1956 年から 1966 年までのサンプルで全て野生型の存在を確認している (Chan 2006)。これらを併せると、PNG では 1982 年までに SVMNT が現れ、1986 年から 1998 年まで続き現在に至っていることを示唆する。

C-3: *dhfr* の多型

CQ の変異決定が可能であった 29 サンプ

ルのうち、*dhfr* の配列が決定できたのは 26 サンプルであった。タイでは 1984 年にすでに 3 重変異型が存在していた ($n = 2$)。1984 年にタイで分離された Indochina III 株 (Oduola 1985) は 3 重変異を持つことが報告されている。よって本結果とあわせると、3 重変異のタイで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。

西太平洋地域では野生型が 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

年間患者発生数は厚生省の伝染病統計によると年間 50-80 例とされてきたため、本薄層標本は当時の発生者数の半分以上をカバーしていると考えられる。

CQ 耐性遺伝子 *pfert* の遺伝子型は 96% (28/29) が耐性型を示し、Pyr 耐性遺伝子 *dhfr* の遺伝子型は 77% (20/26) が耐性型を示した。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。

今回の解析によって CQ 耐性変異の分布に関して 3 つの興味深い点が見つかった。第一にフィリピンにおいて *pfert* の野生型が存在していたことである。これはタイや PNG での今日の遺伝子型が 100% 耐性型 (Anderson 2005; Tanabe 2004, Sakihama 2006) を示しているのと対称的であり、そして今日でもフィリピンでは CQ での治療が有効である (Hatabu 2003)。2 番目にフィリピンにてインドシナ型の CVIET が存在していた点は興味深い。他の研究でもインドネシアやフィリピンから CVIET の単離の報告があり (Chen 2003; Nagesha 2003; Huaman 2004)、西太平洋諸国における CVIET 変異が独立発生なのか、外部移入なのかは今後明らかにされるべき課題である。最後にインドネシア株から単離された CVMNN である。この変異は野生株では過去に 1 株だけインドネシアのロンボク島から単離の報告があり (Huaman 2004)、今回の単離は 2 例目となる。さらに、*in vitro* で CQ の選択圧を掛けることによって作製された CQ 耐性株が、K76N 変異を有し、同時に *in vitro* の CQ 耐性活性を有していることが証明されている (Cooper 2002)。よって、CVMNN 変異は 1980s からインドネシアに存在し、集団は小さくとも CQ 選択圧の中で残ってきたと考えられる。

Pyr の使用は実際に 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 SP 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 初期にはピリメサミンに対する *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、ピリメサミン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。

日本ではピリメサミン-サルファドキシシン (ファンシダール) が 1987 年に認可され、CQ 耐性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 耐性マラリアの流行を考えると、免疫のない日本人においては遺伝的耐性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、96% が CQ 耐性型を、77% が Pyr 耐性型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)

(口頭発表)

中野由美子、亀井喜世子、石上盛敏、駒木-安田加奈子、河津信一郎、狩野繁之、田辺和祐、大前比呂思、遠藤卓郎 (2006) 東南アジアにおける 2000 年以前のクロロキン耐性遺伝子の多型と分布 第 66 回寄生虫学会東日本支部大会

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

Table 1

Number of blood smears from imported malaria cases in Japan

	<i>P. falciparum</i>				<i>P. vivax</i>				<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	total sample
	Africa	South Asia	South America	Africa	South Asia	South America	total country	total country			
1984	5	2	3	0	5	7	20	2			44
1985	6	4	1	0	1	9	9	0	1	1	32
1986	5	10	3	0	1	8	11	0	1	1	40
1987	5	1	3	0	4	2	10	0			25
1988	10	2	1	0	1	11	10	0	1		36
1989	6	5	0	0	2	10	4	2			29
1990	6	3	2	0	6	15	9	2			43
1991	10	4	0	2	1	16	9	2			44
1992	8	3	1	0	2	8	9	3		1	35
1993	10	3	1	0	3	9	3	2			31
1994	12	3	2	0	6	15	5	2	1		45
1995	8	3	1	0	3	9	5	0	1		30
1996	9	2	1	0	3	2	8	2	1	1	29
1997	23	3	3	1	9	14	12	3			68
1998	28	7	0	0	5	10	5	1	1	1	58
total	151	55	22	1	52	145	129	21	7	5	588

←----- 39% -----> ←----- 59% -----> 1% 1%

Table 2. Polymorphisms of *P. falciparum* *pfcr*t and *dhfr* in archival samples collected from Indochina and Western Pacific between 1984 and 1998

	Indochina				Western Pacific		
	Myanmar	Thailand	Thailand /Laos ^{*2}	Laos	Indonesia	PNG	Philippines
1984		CVIET (2)					
1985							CVMNK (1) SVMNI (2)
1986					CVMNN (1)	SVMNI (3)	SVMNI (1)
1987						SVMNI (1)	
1988							
1989							
1990						SVMNI (1)	
1991		CVIET (1)			SVMNI (1)		SVMNI (1)
1992		CVIET (1)					SVMNI (1)
1993							
1994	CVIET (1)			CVIET (1)	SVMNI (1)		
1995						SVMNI (1)	
1996							
1997	CVIET (1)					SVMNI (1)	SVMNI (1)
1998			CVIET (1) CVIDT (1)	CVIDT (1)		SVMNI (1)	SVMNI (1) CVIET (1) ^{*3} CVMNK (1) ^{*3}
Total (n = 29)	2	4	2	2	3	8	8

	Indochina				Western Pacific		
	Myanmar	Thailand	Thailand /Laos ^{*2}	Laos	Indonesia	PNG	Philippines
1984		CIRNI (2)					
1985							CNCNI (1) CNCNI (1) CNRNI (1)
1986					CNCNI (1)	CNCNI (2) CNCNI (1) CNRNI (1)	CNCNI (1)
1987							
1988							
1989							
1990						CNCNI (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	CNCNI (1)					CNRNI (1)	CNRNI (1)
1998			CNRNI (2)	CNRNI (1)		CNCNI (1)	nd (1)
Total (n = 26)	1	3	2	2	3	8	7

*1. Numbers in parentheses indicate the number of sample.

*2. Individuals visited both countries.

*3. Mixed infections of two distinct *pfcr*t genotypes.

「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: マalaria原虫の遺伝的多様性は、マalaria感染免疫と病態、また、将来的にはワクチン効果の予測と密接に関わる。本研究では、マalaria伝播度の異なる世界各地の熱帯熱マalaria原虫 (*P. falciparum*) 集団の遺伝的多様性を、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) 遺伝子 (*mssl*)、及び、ハウスキーピングタンパク質である小胞体局在性 Ca 輸送 ATPase 遺伝子 (*serca*) について解析した。PCR による *mssl* 5'ハプロタイプピングの結果から、異なる *mssl* 遺伝子型の多重感染率、及び、一人当たりの異なる *mssl* 遺伝子型の平均多重感染度は、全般的にアフリカで高く、アジア、メラネシアでは低かった。一方、遺伝子塩基配列の集団遺伝学的解析結果から、塩基多様度は *mssl*、*serca*ともタンザニアで最大で、タイが続き、メラネシアで最低であった。調べたどの地域でも *mssl* の多様度は *serca* のそれよりも高く、抗原に働く免疫圧の影響が示唆された。本研究の結果は、マalaria原虫の遺伝的多様性が感染防御免疫と密接に関係することを示唆する。

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* 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。また、抗原遺伝子の多様性が免疫圧の影響による結果なのか、あるいは、別の要因、例えば集団の歴史の古さなど、によるものなのかは、免疫圧を受けないタンパク質の遺伝子と比較することによって推定できるが、こうした研究もあまり行われていない。

こうした状況を踏まえ、本研究ではマalaria伝

播度の異なる世界各地の *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性を *mssl*、及び、免疫の攻撃を受けない細胞内タンパク質の遺伝子で比較解析した。細胞内タンパク質としては小胞体局在性 Ca 輸送 ATPase を用いた。2つの遺伝子の多様度を塩基レベルで集団遺伝学的に比較した。得られた結果から、マラリア原虫の遺伝的多様性とマラリア伝播度の関係、マラリア感染防御における株特異的免疫との関係について検討した。

B. 研究方法

1) 解析 *P. falciparum* 原虫集団

次の地域の原虫集団を対象とした。アフリカ: タンザニア、ガーナ、マラウイ。アジア: タイ、フィリピン。オセアニア: パプアニューギニア、ソロモン諸島、バヌアツ。これらの地域のサンプルの詳細は年次別報告書、及び、発表論文に記載している。

2) *mssl* 5'ハプロタイプ

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 *mssl* 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 *mssl* ハプロタイプ(5'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。

3) 塩基配列の決定

P. falciparum MSP-1 遺伝子(*mssl*)は約 5.1 kb の全長を、Ca 輸送性 ATPase 遺伝子(*serca*)は2つのイントロンを除く全長(約 3.7 kb)を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンス法によって決定した (Tanabe et al., 2004; Tanabe et al., 2007)。

4) 遺伝子多型の集団遺伝学的解析

塩基配列の整列は Clustal-W によった。繰返し配列は解析から除外した。遺伝的多様度は次のような指標を用いた。すなわち、配列の総本数あたりの異なる対立遺伝子の数、遺伝子

多様度(ランダムに抽出した2つのサンプルが異なる確率)、及び、塩基多様度(サイト当たりの多型サイト数)。後者の2つの指標は DnaSP を用いて算出した。

C. 研究結果

1. 多重感染率、多重感染度

mssl の多型を標的にした PCR タイピング法により、アフリカ(タンザニア、ガーナ、マラウイ)、アジア(タイ、フィリピン)、メラネシア(パプアニューギニア、ソロモン諸島、バヌアツ)から得た原虫株約 2,000 株について多重感染率、多重感染度を調べた。その結果、異なる *mssl* 遺伝子型の多重感染率、及び、一人当たりの異なる *mssl* 遺伝子型の平均多重感染度はアフリカで最も高く、アジア、メラネシアでは低かった。マラリア分布の辺縁であるバヌアツでは多重感染率がほとんどなかった。

2. *mssl* 及び *serca* における遺伝子多型の集団遺伝学的解析

上記のタンザニア、タイ、ソロモン諸島、バヌアツの原虫株のうち *mssl* 遺伝子型の単独感染株について、*mssl*、*serca* 遺伝子全長塩基配列をそれぞれ、339 株と 264 株、決定し、集団遺伝学的解析を行った。二つの遺伝子座位とも多様性はタンザニアで最大で、タイが続き、メラネシアで最低であった。認められ対立遺伝子数(カッコ内は総配列数)はタンザニアでは、*mssl* で 68 (71)、*serca* で 36 (69)であるのに対して、タイでは、*mssl* で 19 (49)、*serca* で 11 (82)、ソロモン諸島では、*mssl* で 10 (41)、*serca* で 3 (51)、バヌアツでは、*mssl* で 6 (178)、*serca* で 2 (62)であった。調べたどの地域でも *mssl* の多様性は *serca* のそれよりも高かった。多様度を表す二つの指標、すなわちハプロタイプ多様度、及び、塩基多様度で見た場合でも同様の結果が得られ、アフリカで多様度が高いことが明らかとなった。

D. 考察

本研究で用いた *mssl* 5'ハプロタイプピングでは、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 *mssl* 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、*mssl* 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 *mssl* 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'ハプロタイプピングは PCR 法によるものなので、実際のハプロタイプ数を過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、マラリア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ラリア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ラリア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。

mssl 及び *serca* における遺伝子多型の集団遺伝学的解析から、調べたどの地域でも *mssl* の塩基多様度が高いことが明らかになった。MSP-1 はワクチン候補表面抗原なので、免疫圧がかかるため、遺伝的多様度が高く保たれていることが示唆される。アジア、オセアニアでは *mssl*, *serca* とも塩基多様度が低かった。このことは、ワクチン、薬剤によるマラリア対策が施された場合、アジア、オセアニアではアフリカよりもその効果が高いことを示唆する。

E. 結論

本研究の結果から、*P. falciparum* の遺伝的多様性はアフリカでは、アジア、オセアニアに比較して高いことが明らかとなった。

さらに、マラリアの株特異的感染防御免疫の獲得には、マラリア伝播の強度、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が関わることも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. Dachlan, Y. P., Yotopranoto, S., Susanto, B. V., Santoso, S. H. B., Widodo, A. S., Kusmartisnawati, Sutanto, A., Gerudug, I. K. K., Takagi, M., Tsuda, Y., Tanabe, K., Kawamoto, F., Yoshinaga, K., Kanbara, H. (2005) Malaria endemic patterns on Lombok and Sumbawa islands, Indonesia. *Trop. Med. Health*, 33: 105-113.
2. Sakihama, N., Ohmae, H., Bakote, B., Kawabata, M., Hirayama, K. and Tanabe, K. (2006) Limited allelic diversity of *Plasmodium falciparum mssl* from populations in The Solomon Islands, a highly endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 31-40.

3. T. Mita, A. Kaneko, I. Hwaihwanje, T. Tsukahara, N. Takahashi, H. Osawa, K. Tanabe, T. Kobayakawa, and A. Bjorkman. (2006) Rapid selection of dhfr mutant allele in *P. falciparum* isolates after the introduction of sulfadoxine/pyrimethamine in combination with 4-aminoquinolines in Papua New Guinea. *Inf. Gen. Evol.* 6: 447-452.
4. Palacpac N. M. Q, Leung B.W.Y, Arisue N, Tanabe K, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T. (2006) *Plasmodium vivax* serine repeat antigen (SERA) multigene family exhibits similar expression patterns in independent infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150: 353-358.
5. Pacheco M. A, Poe A. C, Collins W. E, Lal A. A, Tanabe K, Udhayakumar V, Escalante A. E. (2006) 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.
6. Mita T, Tanabe K, Takahashi N, Dysoley L, Eto F, Hwaihwanje I, Ohmae H, Kita K, Looareesuwan S, Kaneko A, Björkman A, Kobayakawa T. (2007). Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1071-1077.
7. Tanabe K, Sakihama N, Rooth I, Björkman A, Färnert A. (2007) High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 1037-1045.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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 *msp1* polymorphism in *Plasmodium vivax* and related malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156: 74-79.
12. 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.
13. 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.

学会発表

1. 田辺和裕、先濱直子、I. Rooth, A. Farnert, A. Bjorkman、平山謙二、熱帯熱マラリア原虫表面抗原における単塩基多型の安定性、第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2005.11.5
2. 田辺和裕、先濱直子、I. Rooth, A. Färnert, A. Björkman、平山謙二、現生熱帯熱マラリア原虫集団における抗原多型の進化、第75回日本寄生虫学会大会、2006.5.19
3. K. Tanabe, N. Sakihama, H. Ohmae, A. Kaneko、Evolution of antigen polymorphisms of malaria parasites in isolated populations、第7回日本進化学会、2005.8.28

4. 美田敏宏、田辺和裕、大前比呂思、北潔、小早川隆敏、Independent unique evolution of pyrimethamine resistance of *P. falciparum* in Melanesia、第 5 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2006.10.28
5. Kazuyuki Tanabe. Stable antigen polymorphism in modern *Plasmodium falciparum* populations. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2007, 2007.1.16
6. Kazuyuki Tanabe. Recent evolution of *msp1* polymorphism in *P. vivax*. 41st Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases (Tokyo), 2007.2.2
7. 田辺和裕、先濱直子、早川敏之、Richard Culleton、有末伸子、堀井俊宏、橋本哲男、Sisira Pathirana、Shiroma Handunnetti、三日熱マラリア原虫メロゾイト表面タンパク質1における遺伝子多型の進化、第 76 回 日本寄生虫学会大会、2007.3.30.
8. リチャード・カレトン、シドンガ・マシュー、田辺和裕、Urbanization and malaria epidemiology in West Africa、第 76 回 日本寄生虫学会大会、2007.3.30.
9. 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
10. 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.

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）
総合分担研究報告書

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 教授

研究要旨： コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、ゲノム中に 5400 種類程度予測されている熱帯熱マラリア原虫遺伝子のうち、1500 種余りの cDNA クローンから 1200 種余りを組換えタンパク質として発現することに成功した。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探索がゲノムワイドに可能と考えられた。また、その研究のためのフィールドの設定も行った。さらに、フィールドにおける原虫保有者の同定を効率的に行うため、新規の核酸増幅法である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を応用して 4 種類のヒトマラリア原虫の新たな迅速診断法の開発を行った。

A. 研究目的

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。さらに、フィールドにおける原虫保有者の同定を効率的に行うため、新規の核酸増幅法である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を応用して 4 種類のヒトマラリア原虫

の新たな迅速診断法の開発を行った。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫抗原候補タンパク質の発現

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質のゲノムワイドな発現を実施するために、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、スポロゾイト、メロゾイト、トロフォゾイト、生殖母体期にのみ発現が示唆されている抗原ステージ特異的遺伝子から cDNA クローンを得た。さらに cDNA リソースを増加させるため、赤血球期原虫の完全長 cDNA ライブラリーも作製し、合計 1500 種余りの cDNA

クローンを得た。これらから 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。

4) マラリア原虫保有者の簡易迅速診断法の開発

上記フィールドで原虫保有者の同定を迅速かつ簡便に実施するために、新規の核酸増幅法である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を応用して 4 種類のヒトマラリア原虫の新たな迅速診断法の開発を行った。LAMP 法は、属および種特異的プライマーと鎖置換型 DNA 合成酵素により、一定温度でマラリア原虫の 18S SSU rRNA 遺伝子を高い特異性、効率性、迅速性をもって増幅することのできる方法である。本研究では、診断の感度と特異度について、LAMP 法

と既存の顕微鏡法および nested PCR 法との比較検討を行った。材料には、タイで採取した 121 人 (顕微鏡と nested PCR 法により陽性と診断された 68 人、陰性 53 人) の濾紙吸着血液を用いた。

(倫理面への配慮)

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

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、ゲノム中に 5400 種類程度予測されている熱帯熱マラリア原虫遺伝子のうち、1500 種余りの cDNA クローンから 1200 種余りを組換えタンパク質として発現することに成功した。したがって、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) マラリア感染者の簡易迅速診断法の開発

タイ国カンチャナブリ県コン・モン・ター村（人口約 1,500 人）における悉皆・経年調査においては、効率的にマラリア感染者を見つけるために、これまでの顕微鏡法や PCR 法に代わる、簡便で迅速な診断法の開発が必須であった。そこで本年度は、新規の核酸増幅法である LAMP 法を応用して 4 種類のヒトマラリア原虫の新たな迅速診断法の開発を行った。LAMP 法は、属および種特異的プライマーと鎖置換型 DNA 合成酵素により、一定温度でマラリア原虫の 18S SSU rRNA 遺伝子を高い特異性、効率性、迅速性をもって増幅することのできる方法である。本研究では、診断の感度と特異度について、LAMP 法と既存の顕微鏡法および nested PCR 法との比較検討を行った。材料には、タイで採取した 121 人（顕微鏡と nested PCR 法により陽性と診断された 68 人、陰性 53 人）の濾紙吸着血液を用いた。その結果、陽性 68 検体のうち LAMP 法では 67 サンプルからマラリア原虫遺伝子を検出し（感度 98.5%）、陰性 53 検体のうち 3 サンプルから原虫遺伝子を検出した（特異度 94.3%）。LAMP 法によるマラリア原虫の検出限界は、四日熱マラリアと卵形マラリアでは 10 コピー、ヒトマラリア属、熱帯熱マラリアおよび三日熱マラリアでは 100 コピーであった。

検出に要する時間は平均して、ヒトマラリア属は 26 分、三日熱マラリアは 31 分、熱帯熱マラリアは 32 分、四日熱マラリアは 35 分、卵形マラリアは 36 分であった。LAMP 法は、nested PCR 法に比べ迅速で、一定温度で反応が進むため特別な機械は不要、しかも反応済サンプルを目視で簡単に結果の判断ができる。以上の結果は、LAMP 法によるマラリア診断法は、臨床診断のみならず、流行地域の調査において有用な、極めて簡易、簡便、確実な優れた方法であることが示唆された。

5) 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、今年度に開発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) Rungruang T, Kaneko O, Murakami Y, Tsuboi T, Hamamoto H, Akimitsu N, Sekimizu K, Kinoshita T, Torii M. Erythrocyte surface glycosylphosphatidyl inositol anchored receptor for the malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol.* 2005,140:13-21.
- 2) Kaneko O., Yim-Lim BYS, Iriko H, Ling IT, Otsuki H, Grainger M, Tsuboi T, Adams JH, Mattei D, Holder AA, Torii M. Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Mol Biochem Parasitol.* 2005, 143:20-28.
- 3) Arakawa T, Komesu A, Otsuki H, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Matsumoto Y, Tsuji N, Wu Y, Torii M, Tsuboi T. Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2005, 73:7375-7380.
- 4) Yano K, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S, Kawazu S. 2-Cys Peroxiredoxin TPx-1 is involved in gametocyte development in *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006, 148:44-51.
- 5) Kaneko O, Templeton TJ, Iriko H, Tachibana M, Otsuki H, Takeo S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. The *Plasmodium vivax* homolog of the ookinete adhesive micronemal protein, CTRP. *Parasitol Int.* 2006, 55:227-231.
- 6) Palacpac NM, Leung BW, Arisue N, Tanabe K, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T. *Plasmodium vivax* serine repeat antigen (SERA) multigene family exhibits similar expression patterns in independent infections. *Mol Biochem Parasitol.* 2006, 150:353-358.
- 7) Han ET, Lee DH, Park KD, Seok WS, Kim YS, Tsuboi T, Shin EH, Chai JY. Reemerging vivax malaria: changing patterns of annual incidence and control programs in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol.* 2006, 44:285-294.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）
総合分担研究報告書

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

東南アジアにおけるマラリアと G6PD 欠損症の疫学的解析

分担研究者名 川本 文彦 大分大学・総合科学研究支援センター

研究要旨：平成 17 年度はベトナム・ラムドン省バオロック、インドネシア・フローレス島マウメレ、ミャンマー・モン州タトーンにおいて採集された熱帯熱マラリア原虫のスポロゾイト表面抗原 C S 遺伝子の T 細胞エピトープ (Th 2 R および Th 3 R) の遺伝子変異を解析した。これら東南アジア 3 ヶ国に分布する熱帯熱マラリア原虫のエピトープは、いずれの国でも特定の型が集中して分布していることが判明し、アフリカとは異なり免疫抑制が認められなかった。

平成 18 年度、19 年度は、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誘導体による治療の導入後に激減した。カンボジアにおける G6PD 欠損者の 95%以上が G6PD Viangchan 型であり、クメール族の祖先は一つと考えられた。また、19 年度にカンボット州から見出された一人の男性欠損者はヘテロ接合体を示した。精査した結果、XXY クラインフェルター症候群と考えられた。

インドネシアは多民族国家であるため多くの G6PD 変異型が存在するが、フローレス島マウメレ近郊のバジョー族（海洋ジプシーの一族でミンダナオ島由来）から新型の変異（G6PD Bajo Maumere）が見出された。また、この民族も Viangchan 型が優占型であり、土着のシッカ族・エンダ族の変異型の構成とは大きく異なっていた。19 年度には、フローレス島の主たる 7 部族全てを調査した結果、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

C S 遺伝子は熱帯熱マラリア原虫に対するマラリアワクチン候補抗原として知られている。東南アジア各地に分布する熱帯熱マラリア原虫の野生株の

C S 遺伝子エピトープの解析は将来のワクチン開発に重要であり、本研究を行った。

また、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