

Purpose:

Rabies remains an important public health problem in many developing countries. In the Philippines, 6-8 human rabies deaths per million population occur each year, mostly among children below 15 years. The control of animal rabies entails costs for dog vaccination, population control and surveillance. Post exposure prophylaxis of more than 150,000 animal bite victims annually using expensive rabies biologicals also constitutes a significant economic burden.

Strengthening of rabies diagnostic laboratories has been recognized by the Philippine National Rabies Prevention and Control Program as a strategic approach to elimination. Confirmation of the diagnosis of rabies is very important because it saves a patient not only from unnecessary physical and psychological trauma, but more importantly from the financial burden of vaccination, if the animal is proven not to be rabid. Likewise, confirmation of rabies diagnosis is an essential part of surveillance which is mandatory for countries desiring to eliminate rabies.

In the Philippines, the network of Regional Animal Disease Diagnostic Laboratories (RADDL) under the Regional Field Units of the Department of Agriculture is mandated to provide quality services in terms of animal disease diagnosis and prevention including rabies laboratory diagnosis. The RADDLs are tasked to perform the Fluorescent Antibody Test (FAT), the gold standard for detection of rabies antigens. There is no quality control and assurance (QC/QA) program being conducted among the laboratories performing the test. Likewise, the use of rabies FAT in the RADDLs has been limited by the need for consistent supply of the expensive reagents and the financial provision for equipment maintenance, especially of the immunofluorescent (IF) microscope. The conduct of FAT remains financially prohibitive for regional laboratories, resulting in the use of the less-sensitive and obsolete Direct Microscopic Examination (DME) or Negri Body Detection Method by several of these laboratories. Hence, a rabies diagnostic tool which could be sustained in regional laboratories is needed.

One such tool is the Modified Direct Rapid Immunohistochemistry Test (DRIT). This test is a modification of the direct rapid immunohistochemistry test, an un-licensed procedure developed by the Centers for Disease Control and Prevention using monoclonal antibodies directed against rabies nucleoprotein designed for consideration as a potential alternative for FAT.

Genetic analysis can also reveal consistent nucleotide areas which can be used to develop primers for routine diagnosis as well as for epidemiological characterization of isolates in combination with epidemiological information.

This study was conducted to (1) develop and standardize rabies diagnostic methods specifically to develop a cheap and simple diagnostic test that is readily available in

the rural areas and (2) to investigate the molecular epidemiology of rabies in the Philippines including etiological characteristics of endemic rabies isolated from different geographic areas in the country.

Methods

The study will be conducted over a period of 3 years and has 2 components:

LOCAL DEVELOPMENT OF AN IMMUNODIAGNOSTIC TEST KIT

This first component is aimed at the local development of an immunodiagnostic test kit for the detection of rabies antigens by the expansion of the rabies monoclonal antibody (MAb) library of the RITM Immunology Laboratory. MAbs against rabies have initially been isolated through a project funded by the National Institute of Infectious Diseases of Japan (NIID) through the FITC project. MAb clones will be subsequently characterized for its diagnostic use in the development of DRIT and a dipstick assay. Then, the diagnostics will be optimized through field testing at selected Regional Animal Disease Diagnostic Laboratories (RADDLs).

Specific activities for the first component will include: 1) evaluation of existing rabies polyclonal antibodies developed by Japan NIID, 2) expansion of the rabies MAb library in order to develop diagnostic reagents useful for FAT or immune-histochemical methods (such as DRIT), 3) development of MAbs for therapeutic usage and 4) defining the virus neutralization epitopes to elucidate rabies viral pathogenesis.

ETIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ENDEMIC RABIES ISOLATED FROM DIFFERENT GEOGRAPHIC AREAS

This second component aimed to identify diagnostic primers targeted at the rabies gene for the generation of a more accurate description of the molecular epidemiology of rabies in the Philippines. The current rabies molecular epidemiology study provides the initial information on candidate primers for molecular detection. In order to increase the quality and validity of the molecular detection method, more samples from a larger geographic coverage is sequenced through the support of the RADDLs.

Assessment of participating Regional Animal Disease Diagnostic Laboratories (RADDL) is the first crucial step in establishing the molecular epidemiology of rabies in the Philippines. In order to get a complete picture as much as possible of the diversity of the molecular polymorphism of rabies, the laboratories were selected based on their geographical location, the capacity to perform laboratory diagnosis of rabies, and the prevalence rate of the disease in the area.

Specific activities for the 2nd component started with QC/QA of the participating

laboratories (RADDL 3, RADDL 5, RADDL 7, RADDL 10) in order to standardize procedures for FAT and ensure the quality of results. Each RADDL were visited separately for 2-3 days. An evaluation checklist was accomplished. Actual observation of the processes and procedures for rabies diagnosis using FAT were observed. Quality control FAT slides from the RITM rabies laboratory were brought to the laboratories for them to examine. Even though the FAT is the gold standard in rabies diagnosis according to World Health Organization, the validity of the test result still depends on meeting the following standards; a) the quality of the microscope, b) the quality of conjugate and other reagents and c) the skill of the microscopist. Hence, the focus of assessment of the laboratories was primarily based on meeting these standards

After the participating laboratories had satisfactorily passed the QC/QA evaluation, submission of samples proceeded. The submitted samples underwent RNA extraction. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and subsequent sequence analysis of the G gene of rabies were initially performed to determine phylogenetic relationship and divergence of rabies isolates in the Philippines. Further genetic analysis of the rabies genome will be conducted to generate universal diagnostic primers for routine molecular analysis and for further characterization of local isolates.

Results:

First component: Evaluation of existing polyclonal antibodies developed by Japan NIID

In 2008, the (NIID) in Japan embarked on the production of polyclonal antibodies which could be viable alternatives to monoclonal antibodies used for DRIT. The polyclonal antibodies were already tested in laboratory samples using experimentally infected mice brains and initial results showed that it has a potential diagnostic merit. Polyclonal antibodies in concentrations of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, and 70 μ g/ml respectively were supplied to the Rabies Laboratory of the Research Institute for Tropical Medicine to be used for optimization in field samples.

The 70 μ g/ml concentration has been optimized by NIID to work at a dilution of 1:1,000 using 1x PBS as a diluent. To verify this result, this preparation was tested using banked specimen fixed in cold acetone and the results were compared to that of FAT results. Comparison of DRIT using 70 μ g/ml concentration versus FAT shows the concordance of these 2 tests (Table 1).

Table 1. Comparison between DRIT using 70 μ g/ml concentration (1:1,000 dilution) and FAT using banked specimens of dogs brain.

Sample No:	DRIT results	FAT results
Z-09-012	(-)	(-)

Z-09-013	(-)	(-)
Z-08-169	(+4)	(+3)
Z-08-170	(+3)	(+3)
Z-08-183	(+4)	(+4)
Z-08-193	(+4)	(+4)
Z-08-216	(+3)	(+3)
Z-08-218	(+4)	(+4)

Having proven that the 70 µg/ml concentration worked properly, it was then used in the controls for the optimization of the other concentrations. The polyclonal antibodies of 50µg/ml, 100µg/ml and 200 µg/ml were diluted to 1:500 and 1: 1:000 respectively. Specimen used for this test was inactivated using 10% buffered formalin as recommended in both NIID and CDC protocols. Table 2 shows that only the dilution of 200µg/ml worked and it did not give a very strong result.

Table 2. Results of a confirmed positive dog's brain sample (Z-08-327) fixed in 10% buffered formalin.

Antibody Concentration	1:500	1:1000
50 µg/ml	not done*	(-)
100 µg/ml	(+1)	(-)
200 µg/ml	(+3)	(+2)

The same specimen was tested again but this time the brain tissue impressions were fixed using cold acetone for one hour at -20°C. The results obtained were far more accurate than when it was fixed with 10% buffered formalin (Table 3).

Table 3. Results of the same positive dog's brain sample (Z-08-327) fixed in cold acetone.

Antibody Concentration	1:500	1:1000
50 µg/ml	no done*	(+4)
100 µg/ml	(+4)	(+4)
200 µg/ml	(-)	(+1)

* conjugate supplied was insufficient to run the test

Second Component

QC/QA Assessment of RADDLs

Four RADDLs were visited and evaluated, namely RADDL 3, RADDL 5, RADDL7, RADDL 10. The focus of the assessment of the RADDLs was primarily on meeting the prescribed standards.

a) Quality of the microscope

Based on our findings and observations, majority of the IF microscopes had problems with the lenses. This is because of the absence of proper

maintenance which can also be attributed to lack of after sales services. The recommended lenses for the observation of rabies antigen is 20X and 40X; using these lenses the microscopist can observe the small dust-like fluorescence to the biggest fluorescing particles. Over time, growth of mold inside the lens renders it practically useless. Because of this, the microscopist has no choice but to use the 10X lens, which gives him a greater possibility of missing out the dust-like fluorescence.

b) Quality of conjugate and other reagents

We concluded, upon side by side comparison with other commercially available conjugate, that there is no difference in terms of quality and quantity of fluorescence among the different brands. The problem is more on the lack of supply of conjugates. Every year because of the lack of funding, each RADDL is given a fixed amount of conjugate, which is not enough for some laboratories receiving more samples than the others

c) Skill of the microscopist

In order to evaluate the skill of the microscopist, unknown slides were brought in for identification. Results of this evaluation determined that the skills of the microscopist of each laboratory were very good with an accuracy of 100 percent.

The defects in the microscope were corrected and the supply of conjugate was assured.

After the evaluation, submission of specimens commenced. Confirmatory FAT was done on submitted animal brain tissue samples. With the samples submitted as of December 2008, FAT results of RITM and RADDLs were consistent. Subsequently, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on the FAT-positive samples. PCR products were sequenced and a phylogenetic analysis of the sequenced data was done (Figure 1). The constructed phylogenetic tree shows that samples from the same region cluster together and are therefore are closely related.

From July to December 2008, a total of 95 samples were submitted by the different RADDLs (Table 4) with positivity rates ranging from 67 to 100%.

Table 4. Total number of samples from Regions III, V, VII and X as of December 2008.

Region/ RADDL	FAT Result		Total	Positivity Rate (%)
	FAT (+)	FAT (-)		
III	39	14	53	74%
V	10	5	15	67%
VII	12	0	12	100%
X	14	1	15	93%
TOTAL	75	20	95	79%

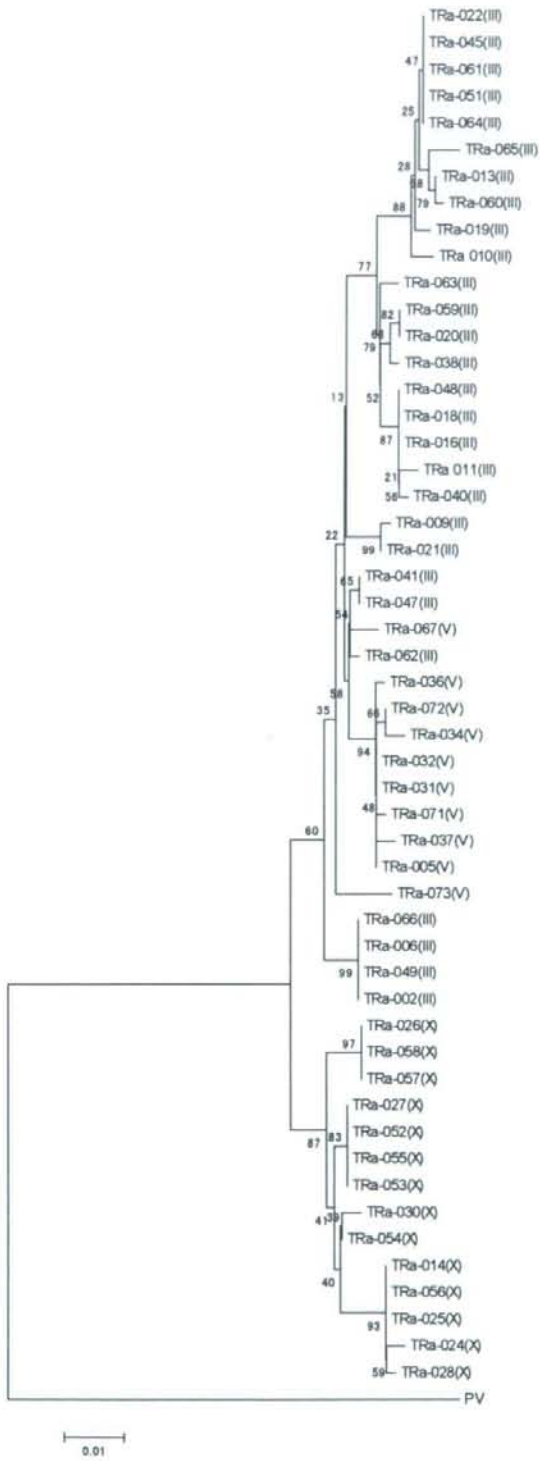


Figure 1. Phylogenetic tree of rabies isolates, 2008
N=52

Reference list:

1. Centers for Disease Control and Prevention Rabies Section Department of Health and Human Services. Standard Operating Procedure for The Direct Immunohistochemistry Test (DRIT) For The Detection of Rabies Virus Antigen. 2006.
2. Dürr S, Naïssengar S, Mindekem R, Diguimbye C, Niezgodá M, Kuzmin I, Rupprecht CE, Zinnstag J. 2008. Rabies diagnosis for developing countries. *PLoS Negl Trop Dis* 26;2(3):e206
3. Lembo T, Niezgodá M, Velasco-Villa A, Cleaveland S, Ernest E, Rupprecht CE. 2006. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg Infect Dis* 12(2):310-313.
4. Meng SL, Yan JX, Xu GL, Nadin-Davis SA, Ming PG, Liu SY, Wu J, Ming HTZhu FC, Zhou DJ, Xiao QY, Dong GM, Yang XM. 2007. A Molecular epidemiological study of targeting the glycoprotein gene of rabies virus isolates from China.
5. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H eds. Laboratory Techniques in Rabies. WHO, Geneva, 1996. 4th edition.
6. Nishizono A, Mannen K, Ellio-Villa LP, Tanaka S, Li K, Mifune K, Arca BF, Cabanban A, Martinez B, Rodriguez A, Atienza VC, Camba R & Resontoc N. 2002. Genetic analysis of rabies virus isolates in the Philippines. *Microbiol and Immunol* 46(6):413-417.
7. WHO Expert Consultation on Rabies, 1st report. 2005. WHO Geneva.
8. Velleca WM and Forrester FT. Laboratory Methods for Detecting Rabies. US Dept of Health and Human Services, CDC, Georgia USA. September 1981.

プロジェクト6：原虫

マラリア

分担研究報告書

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク
の強化に関する研究

マラリア分野総括報告書

分担研究者	大前 比呂思	国立感染症研究所 寄生動物部
	津田 良夫	国立感染症研究所 昆虫医科学部
	中野由美子	国立感染症研究所 寄生動物部
	田辺 和祐	大阪大学 微生物病研究所
	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 マラリアは、熱帯の途上国を中心に今なお世界的に大きな問題だが、1990 年代からのマラリア対策の進展により、アジア・太平洋地域では、マラリアの感染率や死亡率が劇的に減少すると同時に、流行の中心が、重症化しやすい熱帯熱マラリアから、症状に乏しいが慢性化しやすい三日熱マラリアに移っている。しかし、その変化の為、①従来の検査方法や疫学的指標、特に臨床症状を中心とした疫学的評価では、現在のマラリア感染状況を十分に把握できない。②今後の地域毎のマラリア流行の消長、特に再興(Re-emerging)や局所的流行の可能性を検討するには、マラリア原虫集団やベクターに関する情報が不足している。といった問題が生じ、同地域における今後のマラリア対策の進展を困難にしている。そこで、今年度からの本研究班の活動では、アジア・太平洋諸国のマラリア研究機関の間で、マラリアやベクターの現状に関する正確な情報を収集・共有するため、分子生物学的手法も利用しながら、基礎的データ収集を進めていくこととした。

従来、マラリアの疫学的指標として使われてきた脾腫について、その病態を詳細に検討したところ、脾腫は熱帯熱マラリアでより明かか、低血糖を伴う場合が多かった。熱帯熱マラリアでの低血糖は、腫大した脾臓での糖代謝の亢進によると示唆された。また、アルファスクリーン法による、熱帯熱マラリア原虫組換えタンパクからの抗原の網羅的探索は、今年度はタイで採取されたマラリア免疫血清で行い、幾つかの機能未知の分子を得た。今後は、他のマラリア浸淫地でも同様なスクリーニングを行い、地域毎にマラリアの疫学的変化と各種原虫抗原に対する抗体価の変動を追跡し、血清疫学の指標として利用できる新規抗原タンパクも同定を目指す。

また、アジア、太平洋諸国のみならず、世界中にまたがる熱帯熱マラリア原虫の集団遺伝学的解析の結果、塩基多様度はどの地域でも非抗原遺伝子よりも抗原遺伝子において高く、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高くなった。世界各地の熱帯熱マラリア原虫集団は、遺伝的多様性において一部共通点を有するものの、大きく異なっていることが示された。マラリアの獲得免疫やワクチン効果は、異なる原虫集団において必ずしも一様には現れないと示唆されるので、制圧に向かう今後のマラリア対策は、地域毎に個別性の強いものになると思われる。また、三日熱マラリアのクロロキン耐性と関連している可能性がある遺伝子 *Pvmdr* は、実際の臨床での報告があった時期より先に、存在していたこともわかった。さらに、病原体媒介蚊の遺伝子分類については、マラリア原虫を媒介するはマダラカのみならず、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカなどについても、プライマー作成を試みた。

A. 研究目的

マラリアは、エイズ・結核と並ぶ3大感染症として、熱帯の途上国を中心に今なお世界的に大きな公衆衛生上の問題である。アジア・太平洋地域でも、従来は、熱帯の南太平洋地域やインドシナ半島山岳部を中心に、高い感染率や死亡率が大きな問題となっていた。しかし、1990年代からのマラリア対策の進展により、これらの地域では、マラリアの感染率や死亡率が劇的に減少すると同時に、流行の中心が、重症化しやすい熱帯熱マラリアから、症状に乏しいが慢性化しやすい三日熱マラリアに移っている。一方、韓国や中国といった温帯の国々では、一度制圧に成功した三日熱マラリアが再興感染症として問題となっている。これらの疫学的変化は、厚生労働科学研究費「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」(平成17~19年度)での取り組みでも繰り返指摘され、関係した各国の研究者の間で確認された。今後のマラリア対策の新たな展開では、薬剤浸漬した蚊帳の使用が一般化し効果をあげた後にとられる、次の段階での介入が重要となる。昨年度までの厚生労働科学研究費での取り組みにより、この段階での介入方法は一様ではなく、個々の浸淫地の事情にあわせて、適切な方法を考えねばならないこともわかった。その為には、以下のような問題点に対する調査・研究を、早急に国際的に進めていくべきとの認識が、関係した研究者間で共有された。

- ① 従来の検査方法や疫学的指標、特に臨床症状を中心とした疫学的評価では、現在マラリア浸淫地でおきている感染状況の変化を十分に把握できないこと。
- ② 今後の地域毎のマラリア流行の消長、特に再興(Re-emerging)や局所的流行の可能性を検討する為にはマラリア原虫集団、ベクターの情報が不足していること。

そこで、今年度からの本研究班の活動では、アジア・太平洋諸国のマラリア研究機関の間で、マラリア原虫やベクターに関する正確な情報を収集・共有するため、分子生物学的手法も利用しながら、基礎的データ収集を進めていくこととした。また、国際的なマラリア防疫強化を目指して、引き続きWHOなどの国際機関や各国保健省・CDC的研究所間との交流を促進し、検査法の標準化にも取り組んでいく。このような活動をとおして、アジア・太平洋地域のマラリアの現状について、正確な情報と問題点を抽出し共有することは、わが国におけるマラリア Re-emergingの可能性を検討し対処法を考えるうえでも重要である。

B. 研究方法

上記①、②の課題に取り組みながら、アジア・太平洋関係各国のマラリア研究機関との間で、ネットワーク強化と情報の収集・共有を目指すため、本年度は研究組織を大きく3つに分けて、研究を進

めた。

- (1) アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況を的確に捉えられるような新たな方法や疫学的指標に関する研究

(分担研究者:大前比呂思,坪井敬文)

ソロモン諸島のマラリア浸淫地で臨床的疫学指標である脾腫の病態生理を、糖代謝の面から検討した。また、タイのマラリア浸淫地から得られた血清を、メロゾイト期の熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質を用いて解析し、新たな血清疫学的指標の可能性を検討した。

- (2) マラリア原虫の遺伝的多様性や薬剤耐性に関する遺伝子など、マラリア原虫の遺伝子情報に関する研究

(分担研究者:田邊和祐,中野由美子)

熱帯熱マラリア原虫集団の遺伝的多様性とその分布の定量的解析を行うため、アジア・太平洋諸国にとどまらず、ア世界から得られた熱帯熱マラリア原虫株で、様々な非抗原タンパク遺伝子、表面抗原遺伝子のシーケンスを得て、集団遺伝学的解析を行った。また、日本における1984年から1998年までの三日熱マラリアの輸入感染例の保存スライド標本を用いて、クロロキン耐性との関連が指摘される遺伝子 *pvm-dr* Y976F の解析を行った。

- (3) ベクターの正確な分類・同定に有用な、分子生物学的な研究

(分担研究者:津田良夫)

シナハマダラカを初めとする主要な

感染症媒介蚊について、遺伝子分類が可能になるような、プライマーの作成と調整を行った。

以上の研究は、下記の海外研究協力者の研究とも密接に関連して行われた。

- a) Epidemiology and control of malaria in a newly developed region in Cambodia (Socheat D. et al, Cambodia)

- b) Establishment of new monitoring tools of malaria (Prachumsri JS Thailand)

- c) Application of geographic information system (GIS) for malaria control (Luchavez J. et al, Philippines)

- d) Study on Forecasting and Warning of Malaria Epidemics in Anhui province, China (Tang L. China)

C. 研究結果

ソロモン諸島で、マラリアの小児を対象として、超音波検査による脾腫の計測と、血糖測定調査を同時に行った。熱帯熱マラリアでは28例全例が脾腫を示したが、三日熱マラリアで脾腫を示した例は約80%程度で、脾腫の大きさも熱帯熱マラリアに比して小さかった。また、熱帯熱マラリアでは、空腹時血糖が100mg/dlを超えた例はなく、全例が低血糖を示した。一方、三日熱マラリアでは、80mg/dlを下回った例は、17例中3例だけであった。また、非感染例で空腹時血糖が80mg/dlを下回った例はみられなかった。熱帯熱マラリアの場合、非感染例・三日熱マラリアに比して有意な脾

臓の拡大と血糖低下が確認された。

タイのマラリア浸淫地から得られた血清は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて発現に成功した、メロゾイト期の熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質 114 種を用いて解析した。ハイスループット抗原スクリーニング法(アルファスクリーン法)により、タイ、コンモンタ村から得られたマラリア免疫ヒト血清 22 人分との反応性を検討したところ、80%以上の血清と反応した抗原性の高い分子が 20 種類選択された。その中には、機能未知の分子が 12 種類含まれていた。

マラリア原虫集団に関する解析では、タンザニア、ガーナ、タイ、フィリピン、パプアニューギニア、ソロモン諸島、ブラジル、ベネズエラから集めた 1300 株のうち、多重感染を除いた 458 株について、非抗原タンパク遺伝子(*serca*, Ca^{2+} -ATPase; *adsl*, adenylosuccinate lyase), 表面抗原遺伝子(*mssl*, merozoite surface protein 1; *csp*, circumsporozoite protein)のシーケンス(約 5 Mb, 228 SNPs)を得た。集団遺伝学的解析の結果、塩基多様度はどの地域でも非抗原遺伝子よりも抗原遺伝子において高く、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高くなった。

また、三日熱マラリア原虫に関する解析では、*Pvmdr* Y976F 変異が、1984 年のインドネシアとパプア・ニューギニアのサンプル、1985 年、1994 年のパプア・ニューギニアのサンプルから同定された。一方、1984 年から 1998 年までの、ミャンマー、タイ、フィリピンのサンプルからは野生型のみが同

定された。

ハマダラカの遺伝子分類法の開発に関しては、本年度は *hyrcanus group* に属し、形態的な分類が難しいシナハマダラカ、オオツルハマダラカを対象として、rDNA、ITS2 の塩基配列の比較を行った。石垣島、出雲平野、房総半島で採集されたハマダラカの分子分類を行ったところ、形態的にオオツルハマダラカと判定されたサンプルもあったが、すべてシナハマダラカであった。また、日本脳炎ウイルス媒介蚊の中から *vishmii complex* に属する種類、デング熱媒介蚊からは、ネッタイシマカとヒトスジシマカを選んで、rDNA の ITS 領域の塩基配列からプライマーを設計した。

D. 考察

今年度のソロモン諸島における調査結果では、熱帯熱マラリアの例を中心に、脾腫や血糖低下を示す例が多くみられた。熱帯熱マラリアでみられる脾腫の原因について、*P. coatneyi* 感染ニホンザルと同様、脾臓での血糖代謝亢進と関連した病態変化を指摘することができる。さらに、熱帯熱マラリアが流行の中心であれば、簡便な疫学的指標として、超音波検査で補正した脾腫率が利用できることを確認することもできた。また、アルファスクリーン法を用いた、熱帯熱マラリア原虫組換えタンパクからの抗原の網羅的探索は、本年度はタイで採取されたマラリア免疫血清で行い、機能未知の分子を得るなど注目すべき結果を得た。今後は、他のマラリア浸淫地でも同様のスク

リーニングを行って、各々の地域でのマラリアの疫学的変化と、各種原虫抗原に対する抗体価の変動を追跡することができれば、血清疫学の指標として利用できる新規抗原タンパクの同定が可能になるかもしれない。

マラリア原虫集団の解析では、世界各地の熱帯熱マラリア原虫集団が遺伝的多様性において一部共通点を有するものの、大きく異なることが示された。マラリアの獲得免疫やワクチン効果は、異なる原虫集団において必ずしも一様には現れないことが示唆され、マラリア対策の次の段階においては、各浸淫地の事情にあった対策の選択が重要になることが確認された。

マラリア原虫など、蚊媒介性病原体の侵入経路の一つとして、病原体に感染した媒介蚊の持ち込みが考えられ、検疫業務の一環として、航空機や船舶によって侵入する蚊を対象とした検査が行われている。このような業務で得られる蚊のサンプルは損傷が激しいものが多く、形態分類によって種類を特定することは難しいことがある。遺伝子分類学的手法によって、幾つかの疾病媒介蚊を分類するためのシステム構築ができれば、その裨益は日本の検疫業務だけにとどまらず、今後、マラリアの制圧に向かう多くのアジア諸国にとっても重要である。

E. 結論

マラリアの疫学的指標として使われる脾腫は、熱帯熱マラリアでより明らかで、低血糖を伴う場合が多かった。熱帯熱マラリアでの低血糖には、腫大した脾臓での、糖

代謝の亢進が関与している可能性が高い。また、アルファスクリーン法による、熱帯熱マラリア原虫組換えタンパクからの抗原の網羅的探索は、今年度はタイで採取されたマラリア免疫血清で行い、幾つかの機能未知の分子を得た。今後は、他のマラリア浸淫地でも上記のスクリーニングを行い、各地域でのマラリアの疫学的変化と、各種原虫抗原に対する抗体価の変動を追跡し、血清疫学の指標として利用できる新規抗原タンパクの同定を可能にしたい。

また、アジア、太平洋諸国のみならず、アフリカ、南米にもまたがる熱帯熱マラリア原虫の集団遺伝学的解析の結果、塩基多様度はどの地域でも非抗原遺伝子よりも抗原遺伝子において高く、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高くなった。世界各地の熱帯熱マラリア原虫集団は、遺伝的多様性において一部共通点を有するが、大きく異なっていることが示された。マラリアの獲得免疫やワクチン効果は、異なる原虫集団において必ずしも一様には現れないことが示唆された。また、三日熱マラリアのクロロキン耐性と関連している可能性がある遺伝子 *Pvmdr* は、実際の臨床での報告があった時期より先に、存在していたことがわかった。さらに、病原体媒介蚊の遺伝子分類については、マラリア原虫を媒介するはマダラカのみならず、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカなどについても、プライマー作成を試みた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Saito-Nakano Y, Tanabe K, Kamei K, Iwagami M, Komaki-Yasuda K, Kawazu S, Kano S, Ohmae H, Endo T. Genetic evidence for *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and pyrimethamine in Indochina and the Western Pacific between 1984 and 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 79(4): 613-619, 2008
- (2) Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol* 121(2):144-150, 2009.
- (3) Nishimoto Y, Arisue N, Kawai S, Escalante A, Horii T, Tanabe K, Hashimoto T. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47 : 45-53. 2008
- (4) Hayakawa T, Culetton R, Otani A, Horii T, Tanabe K. Big bang in the evolution of extant malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.* 25 : 2233-2239. 2008
- (5) Culetton R, Mita T, Ndounga M, Unger, P. Cravo, G. Paganotti, N. Takahashi, A. Kaneko, H. Eto, H. Tinto, C. Karema, U. D'Alessandro, V. do Rosário, T. Kobayakawa, F. Ntoumi, R. Carter, and K. Tanabe. Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. *Malaria J.* 7:174. 2008
- (6) T. Mita, K. Tanabe, N. Takahashi, R. Culetton, M. Ndounga, M. Dzodzomenyo, W. S. Akhwale, A. Kaneko, and T. Kobayakawa (2009) Indigenous evolution of *Plasmodium falciparum* pyrimethamine resistance multiple times in Africa. *J. Antimicrob. Chemoth.* 63: 252—255, 2008.
- (7) S. Cheesman, K. Tanabe, H. Sawai, E. O'Mahony, and R. Carter (2009) Strain-specific immunity may drive adaptive polymorphism in the Merozoite Surface Protein 1 of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Infect. Genet. Evol.* (in press).
- (8) Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M. Diversity and evolution of the rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol. 2008, 158:11-21.

- (9) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y.

Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates.

Infect Immun. 2008, 76:1702-1708.

- (10) Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S, Kawazu S.

Disruption of the *Plasmodium berghei* 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene hinders the sporozoite development in the vector mosquito.

Mol Biochem Parasitol. 2008, 159:142-145.

- (11) 大前比呂思, 石川洋文. 気候変動と寄生虫症 資源環境対 44(9):29-38, 2008.

- (12) 大前比呂思 マラリア 化学療法の領域 24(11): 69-75, 2008.

2. 学会発表

- (1) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T.

Functional production of malaria proteins with wheat germ cell-free system.

Keystone Symposia, Structural Genomics and its Applications to Chemistry, Biology and Medicine, Steamboat Springs, USA, January 6 - 11, 2008.

- (2) Tsuboi T, Takeo S.

Wheat germ cell-free system: A breakthrough in malaria vaccine research.

Forty-second annual U.S.-Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Davis, USA, January 16-18, 2008.

- (3) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y

Expression of malaria vaccine candidates using a wheat germ cell-free protein synthesis system without codon optimization.

Third molecular Approaches to Malaria Meeting, Lorne, Australia, February 3-7, 2008.

- (4) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Torii M. Genome-wide malaria vaccine candidate discovery using wheat germ cell-free system.

JSPS presents Sweden-Japan joint Seminar, Malaria Research - Diversity & Control,

- (5) H. Sawai, H. Otani, T. Horii, K. Tanabe, Lineage-specific positive

- selection in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008.9.10,
- (6) K. Tanabe. Evolutionary genetic approach to antigen polymorphism of malaria parasites. 16th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, Goettingen, Germany, 2008.9.26.
- (7) R. Culleton, M. Ndounga, A. Yadava, F. Zeyrek, R. Carter and K. Tanabe. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of Congo, West Africa. XIVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Jeju, Korea, 2008.9.30.
- (8) T. Hayakawa, R. Culleton, H. Otani, T. Horii and K. Tanabe, Incipient rapid diversification in the evolution of extant malaria parasites, International Symposium on Protistology, Evolution and Diversity, Tsukuba, Japan, 2008.11.8.
- (9) Nakazawa M, Ohmae H, Kamei K, Yamauchi T, Frusawa T, Kawabata M, Utusmi T, Bakote'e B. Continuous urinalyses clarified that urine pH reflected the changes of dietary habits and that urobilinogen reflected
- (10) 堀部舜,岸野洋久,田邊和祐, アレル頻度分布に基づくマラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 集団履歴の推定,2008 年度日本計量生物学会, 2008.6.4.
- (11) 田邊和祐, 遺伝的多様性が語るマラリア原虫の歴史と寄生適応,琉球大学分子生命研究センターシンポジウム,2008.6.6.
- (12). 早川敏之,有末伸子,平井啓久,鶴殿俊史,堀井俊宏,田邊和祐,チンパンジーからの四日熱マラリア原虫の検出.第7回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム,松山,2008.10.9.
- (13) .有末伸子, Nirianne M. Q. Palacpac, 川合覚, 平井誠, 田邊和祐, 堀井俊宏,マラリア原虫 SERA 遺伝子ファミリーの分子進化,第31回日本分子生物学会年会,2008.12.9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク
の強化に関する研究

マラリアの疫学的指標である脾腫の病態に関する研究

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

研究要旨 小児において触知できるような脾腫を示した例の割合、脾腫率：Hackett's Spleen Rates(SRs)は、簡便なマラリアの疫学的指標として広く利用されてきた。一方、最近の positron emission tomography (PET)を用いた研究で、*Plasmodium coatneyi* 感染ニホンザルの腫大した脾臓で糖代謝が盛んになっていることがわかった。そこで、マラリアにおける脾腫の病態を血糖代謝の面から検討し、疫学的指標としての意義を確認するために、ソロモン諸島のマラリア浸淫地で小児を対象として、マラリア感染状況の調査と腹部超音波検査による脾臓の計測、及び血糖計測を同時に行った。熱帯熱マラリアの場合は、脾腫と同時に血糖低下を示す例が多く、脾臓における糖代謝が亢進し低血糖をきたした可能性が指摘された。一方、三日熱マラリアの場合、脾腫や血糖低下を示した例は、各々 8 割、5 割程度にとどまり、血糖値については非感染例との間で有意差が認められなかった。また、両種のマラリア感染とも、原虫密度と脾腫及び血糖値との間に、特に相関はみられなかった。さらに、超音波検査で補正された脾腫率：SRs は、熱帯熱マラリアが流行の中心であれば、簡便な疫学的指標として利用できることが確認できたが、現在のアジア・太平洋地域の浸淫地のように、流行の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアに移っているところでは、感染率との間の乖離が増し信頼性が低下することが判明した。

A. 研究目的

マラリアの疫学的指標としては、発熱や脾腫といった臨床症状を利用したものが最も簡便で利用しやすい。例えば、小児において触知できるような脾腫を示した例の割合、脾腫率：Hackett's Spleen Rates(SRs)は、マラリアの感染状況を簡単に把握することができる方法として広く利用されてきた。また、治療的介入を中心としたマラリア対策が進むと、この触診による脾腫率は、感染率：Parasite Rates(PRs)と一致しなくなるが、超音波検査を用いて修正した脾腫率は、

小児の感染率とほぼ一致することも報告されている (Ohmae H *et al*, 1996)。一方、最近の *Plasmodium coatneyi* 感染ニホンザルでの positron emission tomography (PET)を用いた研究の結果、マラリア原虫に感染して腫大した脾臓で糖代謝が盛んになっていることが判明した (Kawai S *et al*, 2006)。そこで、マラリアにおける脾腫の病態を検討し、疫学的指標としての意義を確認するために、1990 年代からマラリア感染状況を経時的にフォローしているソロモン諸島のマラリア浸淫地において、マラリア

感染と脾腫、及び糖代謝の関係について調べた。

B. 研究方法

ソロモン諸島のガダルカナル島北東岸のマラリア浸淫地において、2008年9月と2009年2月に、住民のマラリア感染状況の調査と腹部超音波検査による脾臓の計測、及び血糖計測を同時に行った。5歳から14歳までの小児を対象とし、保護者から書面で同意を得た後検査した。なお、一連の調査は、ソロモン諸島国での審査で承認されており、同国保健省によって計画された地域マラリア対策事業の一環として行われた。マラリア感染の有無は、ギムザ染色による厚層塗沫標本を用いて顕微鏡的診断で確認し、脾腫については、超音波検査で脾臓係数:Spleen Index で20以上の例を腫大と判定した。血糖は、朝食を摂取せずに、早朝簡易型血糖計測装置（グルコスター）を用いて計測した。

C. 研究結果

2回の一斉検査で計162人の小児を対象として一斉検査を行ったところ、ギムザ染色した厚層塗沫標本による顕微鏡的形態診断により、28例の熱帯熱マラリアと17例の三日熱マラリアが見つかった。脾臓の計測では、全例の熱帯熱マラリアがSIで20を超える脾腫を示したが、三日熱マラリアで脾腫を示した例は、17例中14であった（表1）。さらに、熱帯熱マラリアでは、SIが40を超えるような大きな脾腫を示す例が、28例中11例と30%以上を示したのに対し、三日熱マラリアでは1例にとどまった。また、マラリアの非感染例では、SIで20以下の例が60%以上を占めた。

また、血糖値とマラリア感染、脾腫の関係については、熱帯熱マラリアでは、空腹時血糖が100mg/dlを超えた例はなく、28

人中19人は80mg/dl以下の低血糖を示した。一方、三日熱マラリアでは、80mg/dlを下回った例は、3例だけであった（図）。また、非感染例で空腹時血糖が80mg/dlを下回った例はみられなかった。熱帯熱マラリアの場合、非感染例・三日熱マラリアに比して有意な血糖低下が確認されたので、次に、原虫密度と血糖との関係調べたが、特に相関はみられなかった。

D. 考察

マラリア対策、特に治療的介入が進んで抗マラリア薬へのアクセスがよくなると、感染率も低下するが、発熱などの典型的症状を継続する例も少なくなるので、臨床診断の信頼性も低下してくる（表2）。触診によるHackettの脾腫率が、感染率と一致しなくなってからも、超音波検査で補正した脾腫率は、感染率とほぼ一致して推移するが、三日熱マラリアのマラリア流行に占める割合が増すにつれて、感染率との間で乖離が目だつようになる。

今年度の調査結果では、熱帯熱マラリアの例を中心に、脾腫や血糖低下を示す例が多くみられた。これらの傾向は、原虫密度との間で特に関係を認めなかったが、三日熱マラリアでは、その傾向自体ははっきりしなかった。今回の研究調査により、熱帯熱マラリアでみられる脾腫の原因についても、*P. coatneyi*感染ニホンザルと同様、血糖代謝との関連した病態変化を指摘することができ、マラリアでの脾腫について新たな視点を得ることができた。また、熱帯熱マラリアが流行の中心であれば、簡便な疫学的指標として、超音波検査で補正した脾腫率が利用できることを確認することができた。もっとも、現在のアジア・太平洋地域では、マラリア対策の進捗によって、低原虫密度の三日熱マラリア感染者数が相対的に増加しているところが多い。そのような地域で

は、超音波検査で補正された脾腫率も含め、症状や臨床所見に基礎を置く疫学的指標は、信頼性が低く、利用に限界があると思われる。

E. 結論

ソロモン諸島のガダルカナル島北東岸のマラリア浸淫地において、小児にみられる脾腫と血糖低下、及びマラリア感染の関係について検討した。熱帯熱マラリアの場合は、脾腫と血糖低下を示す例が多いが、三日熱マラリアの場合、脾腫や血糖の低下を示す例は少なく、非感染例との間で有意差は認められなかった。熱帯熱マラリアでは、脾臓における糖代謝が亢進し、結果として低血糖をきたしている可能性もある。また、超音波検査で補正された脾腫率は、熱帯熱マラリアが流行の中心であれば、簡便な疫学的指標として、利用できることが確認できたが、低原虫密度の三日熱マラリア感染者数が多いところでは、感染率との間の乖離が増す。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Saito-Nakano Y, Tanabe K, Kamei K, Iwagami M, Komaki-Yasuda K, Kawazu S, Kano S, Ohmae H, Endo T. Genetic evidence for *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and pyrimethamine in Indochina and the Western Pacific between 1984 and 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 79(4): 613-619, 2008
- (2) Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium*

falciparum: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol* 121(2):144-150, 2009

- (3) 大前比呂思, 石川洋文. 気候変動と寄生虫症 資源環境対策 44(9):29-38, 2008.
- (4) 大前比呂思. マラリア 化学療法の領域 24(11): 69-75, 2008.

2 口頭発表

- (1) Nakazawa M, Ohmae H, Kamei K, Yamauchi T, Frusawa T, Kawabata M, Utusmi T, Bakote'e B. Continuous urinalyses clarified that urine pH reflected the changes of dietary habits and that urobilinogen reflected *falciparum* malaria in Solomon Islands. International Congress of Tropical Medicine and Malaria Nov 1-3, Cheju, Korea 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

表1 小児におけるマラリアと脾腫の関係（2008年度ソロモン諸島、ガダルカナル北東岸における調査）

	脾腫（脾係数：Spleen Index）			
	～20	21～40	41～	総計
熱帯熱マラリア	0	17	11	28
三日熱マラリア	3	13	1	17
非感染例	7	5	0	12

表2 ソロモン諸島、ガダルカナル北東岸におけるマラリア感染状況と疫学的指標の変化（1995～2008年）

	95年1月	96年1月	98年1月	06年9月	08年9月
感染率：Parasite Rate					
2-9才	62.3	44.3	32.3	26.1	10.9
1-14才	57.7	41.3	28.9	30.1	8.9
マラリアの種別変化					
熱帯熱マラリア	82.3	84.3	77.3	46.1	43.9
三日熱マラリア	15.7	11.3	18.9	50.1	54.9
混合感染	2.0	4.4	3.8	3.8	2.2
臨床診断の信頼性					
Sensitivity	36.7	15.4	11.4	7.6	7.2
Specificity	59.1	83.5	90.0	94.2	93.6
脾腫率：Spleen Rate					
触診（Hackett）	19.0	12.1	9.7	2.4	2.0
超音波検査	52.3	40.5	25.5	12.3	4.2

%