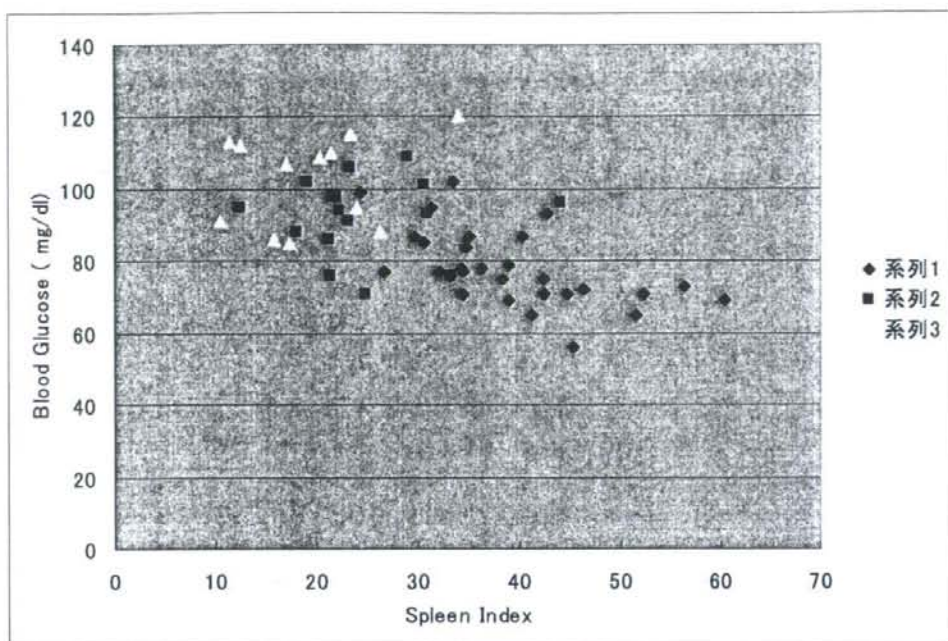


図 熱帯熱マラリア、三日熱マラリアにおける脾腫と血糖低下の関係



我が国における輸入マラリア標本を用いたマラリア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

研究要旨

クロロキン（CQ）耐性三日熱マラリアは1980年代中頃より西太平洋諸国で報告され、その原因遺伝子の候補の一つとして *pvmdr1* Y976F 変異が挙げられる。そこで1984年から1998年の三日熱マラリア患者薄層標本において Y976F の頻度が年代を下るごとに多くなっているかどうかを調べた。その結果、*in vivo* で CQ 耐性三日熱マラリアが報告される以前の1984年にインドネシアと PNG のサンプルで Y976F 変異が同定された。よって西大西洋諸国の集団における Y976F 変異は CQ 耐性が出現する前から原虫に存在していた多型であると考えられる。

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広まった。現在ではカリブ海、中国の一部、中東の一部を除き、CQ 耐性熱帯熱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解明と遺伝学的解析手法の進展に伴い、2002年にはCQ耐性を付与する原因遺伝子が、熱帯熱マラリア原虫の *pfert* 遺伝子の K76T 変異に由来することが証明された。一方で1980年代中頃より、パプアニューギニアやインドネシア等の西大西洋諸国で CQ 耐性三日熱マラリアの存在も報告され始めたが、三日熱マラリアは *in vitro* 培養が困難なため、原因遺伝子と変異部位の特定には至っていない。CQ 耐性三日熱マラリアの *pvert* 遺伝子内には変異が存在せず、CQ 耐性を付与するメカニズムは

熱帯熱マラリアと異なるのではないかと推測されている（Nomura T, 2001）。

近年、三日熱マラリアにおける CQ 耐性遺伝子の候補の一つとして *pvmdr1* Y976F 変異が報告された（Suwanarusk R, 2007）。*pvmdr1* Y976F を有する三日熱マラリアの頻度はタイの株よりもインドネシアの株で多く、Y976F 変異を有する株は野生株よりも CQ に対する IC50 が高い。そこで、国立感染症研究所に保管されている1984年から1998年までの三日熱マラリア患者の薄層標本から *pvmdr1* Y976F の同定を試み、西太平洋諸国での CQ 耐性の広まりと共に Y976F 変異の頻度も多くなっているかどうかを解析し、archived サンプルから *pvmdr1* Y976F が CQ 耐性の原因遺伝子の可能性を推測することを試みた。

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。*pvmdr1* 変異を含む 190 bp の DNA 断片は Phusion polymerase (NEB) を用いてネステッド PCR で増幅した。1 回目の増幅は 98°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 20 秒の増幅を 40 サイクル行い、2 回目のネステッド PCR には 1 回目の PCR で得られたサンプルを 1 μ l 用い、98°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 20 秒の増幅を 30 サイクル行った。使用したプライマーの配列は Y976F-1F (5' -GTC ATT TTT ACT CAC TTT ATA GTG CTC -3') と Y976F-2R (5' -TCT CTA CAT CCT TGT TGG CTG CTA TCC-3') を outer primers とし、Y976F-3F (5' -TTA TAG TGC TCT TCC TTG TGA GTA CGG-3') と Y976F-4R (5' -GTT GGC TGC TAT CCT CGC TCT GAT GGC-3') を inner primers とした。PCR 産物の配列決定は、(株) バイオマトリックス研究所に外部依頼した。

C. 研究結果

東南アジアで感染した三日熱マラリア薄層サンプルは 159 サンプルであった。(Table 1)。患者の渡航国は日本人の商用や旅行の頻度を反映してミャンマー、タイ、インドネシア、パプアニューギニアが 8 割以上を占めた。複数の国を渡航していた患者をアルファベットで示した。そのうち、DNA の回収を試みたのは原虫感染率が 0.03 以上の 73 サンプルであり、73 サンプルのうち 16 サンプルの DNA の増幅が可能であっ

た。*Pvmdr* Y976F 変異の有無を Table 2 に示した。Y976F 変異は 1984 年のインドネシアと PNG サンプル、1985 年の PNG サンプル (シークエンスの二重波長からこれは野生型との混合感染であった)、1994 年の PNG サンプルから同定された。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。

D. 考察

In vivo で CQ 耐性三日熱マラリアが初めて報告されたのは PNG における 1986 年の症例である (Rieckmann KH 1989)。さらにインドネシアでは 1989 年に *in vivo* 耐性が報告されている (Baird JK, 1991)。本研究結果では *in vivo* 耐性の報告に PNG deha 2 年、インドネシアでは 5 年遡り、Y976F 変異の存在を示した。インドネシアからは 1984 年の Y976F 変異が 1 つ同定された以外は野生型が単離されておらず、今日の CQ 耐性の広まりと相関して Y976F 変異の頻度は大きくなっていない。PNG に於いても野生型と Y976F 変異は 1994 年に至るまでほぼ同数が同定されている。以上の結果を総合すると、Y976F 変異は西大西洋諸国の三日熱マラリアの集団に耐性が出現する前から存在していた多型ではないかと推測される。アフリカのマダガスカル島の三日熱マラリアにも Y976F 変異を有する集団が存在し、さらに Y976F 変異の存在は CQ 耐性と相関が無いことが報告されている (Barnadas C, 2008)。よって西大西洋諸国の集団における Y976F 変異は CQ 耐性が出現する前から原虫に存在していた多型であり、CQ 耐性を付与する原因は他の変異部位に起因すると推測される。

E. 結論

西大西洋諸国の集団における Y976F 変異は CQ 耐性が出現する前から原虫に存在していた多型であり、CQ 耐性を付与するは他の変異部位に起因すると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(欧文発表)

1. 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79:613-619.

Table 1, 三日熱マラリア薄層標本の推定感染地

	Myanmar	Laos	Thailand	Malaysia	Viet Nam	Cambodia	Singapore	Hongkong	Taiwan	China	Indonesia	Philippines	PNG
1984	1		2								3		1
1985											2	2	5
1986			1	1				1 (a)	1 (a)			2	3
1987			1 (b)								1 (b)		1
1988	1		1							1	2	2	4
1989			1		1						5 (d)		4 (d)*
1990	2 (g,h)	1	4 (f,g,h)				1 (e)				8 (e,f)		3
1991	6 (j)		6 (j)	1							2		1
1992			4 (k,m)		1		1 (m)			1	2 (k,m)		3
1993	1 (n)		2 (n)								4		2
1994	1		3		1						3		5
1995			1 (o)			1 (o)				1	3		4
1996		1 (p)	2 (p)										
1997	2 (q,s)	1 (q)	3 (q,s,t)			1 (s)	2 (u)				7 (u)		1
1998	1										5		4
total	15	2	31	2	3	3	4	1	1	3	47	6	41

Table 2, *pvm*dr Y976F 変異の有無

	Myanmar	Thailand	Indonesia	Philippines	PNG
1984			Y976F		Y976F
1985					WT = (2), Y976F =
1986				WT	WT
1987				WT	
1988			WT	WT	
1989			WT		
1990					
1991	WT	WT	WT		
1992		WT			
1993					
1994					WT, Y976F
1995					
1996					
1997					
1998					
total	1	2	4	2	6

医学上重要な疾病媒介蚊の分子分類システムの構築

分担研究者	津田良夫	国立感染症研究所
協力研究者	沢辺京子	国立感染症研究所
	當間孝子	琉球大学医学部
	比嘉由起子	長崎大学熱帯医学研究所
	金 京純	岐阜大学大学院

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、航空機や船舶に便乗して侵入する蚊を対象とした検査が行われている。検疫業務で得られる蚊サンプルは損傷が激しいものが多く、形態的な分類によって種類を特定することは非常に難しい現状にある。そこで、分子分類学的手法によって医学上重要な疾病媒介蚊を分類するためのシステム構築を目的とした研究をはじめた。蚊媒介性疾患として重要度が高いマラリア、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルスを選び、これらの媒介蚊として注意すべき外国産種とその近縁種をリストした。本邦産マラリア媒介蚊の中で *hyrcanus group* に属し、形態的な分類が難しい種類について、rDNA の ITS2 領域の塩基配列を比較した。日本脳炎ウイルス媒介蚊の中から *vishnu complex* に属する種類を選んで、rDNA の ITS 領域の塩基配列からプライマーを設計し、検出感度の検討を行った。デング熱ウイルス媒介蚊の中から媒介能力の高さや地理的分布の広さから考えて、媒介蚊としての重要度が極めて高いネッタシマカとヒトスジシマカを選んだ。本邦産ヤマダシマカを加えて、rDNA の ITS 領域の塩基配列を読み、そのバリエーションをもとに種特異的なプライマーを試作した。

A. 研究目的

海外からの感染症の侵入を防止するために、国際空港や港を対象として種々の検査および調査が行われている。東南アジアなど熱帯地域で流行している感染症にはマラリア、フィラリア、デング熱、日本脳炎など蚊によって媒介される疾患が多く報告されている。これらの蚊媒介性疾患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、航空機や船舶に便乗して侵入する蚊を対象とした検査が行われている。

2001 年から 2005 年に成田空港の国際線航空機を対象として実施された衛生昆虫の調査では、調査した 2,161 機の 1.2% で蚊成

虫が採集されている (長谷山ら、2007)。これらのサンプルは種類同定の後、さらに病原体を保有しているかどうかをチェックしている。種類同定は形態的特徴によって行われているが、サンプルによっては損傷が激しく正確に種類を同定できないことが多い。成田空港の場合、採集された蚊成虫の 46% は種類を特定できなかった。損傷が激しい個体であっても媒介蚊の種類を特定し、合わせてその個体が病原体を保持しているかどうかをチェックするためには、体の一部から抽出できる DNA を用いた分子生物学的分類方法の開発が必要である。

疾病媒介蚊のグループによっては、形態的な特徴だけでは正確に同定できない種類

が報告されている。最近では、韓国と北朝鮮の国境地帯で 1993 年以降三日熱マラリアの大流行が続いているが、これまで主要な媒介蚊とされていたシナハマダラカを分子生物学的に詳しく調べたところ、形態的に区別できない未記載の種類が存在し、しかも流行に密接に関与していることが分かってきた。このように分子生物学的手法による種同定が必要な疾病媒介蚊グループは、ハマダラカ属だけでなく他属の蚊グループでも知られている。

本研究は本邦産疾病媒介蚊と感染症侵入監視の観点から特に注意を要する外国産疾病媒介蚊を対象として、分子分類システムを構築することを目的としている。今年度は疾病媒介蚊を 3 グループに大別し、分子分類システムの対象種の選定を行い、遺伝子情報の収集と分析を行ってプライマーを試作した。また、本邦産ハマダラカに関しては、各種類の分布と発生状況を把握し実験用サンプルを採取するために野外調査を実施した。

B. 研究方法

文献によって本邦産疾病媒介蚊および外国産疾病媒介蚊のリストを作成し、本研究の対象とする種類を選んだ。既に研究されている重要種の遺伝子情報に基づいて、分子分類に利用できる領域を選定した。主として本邦産サンプルを用いてリボゾーム DNA を抽出し、ITS 領域の塩基配列を読んで種特異的プライマーを設計・試作した。今回研究の対象とした疾病媒介蚊はイエカ類 (*vishnui* グループ)、シマカ類 (ネックイシマカ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ)、ハマダラカ類 (*hyrcanus* グループ) である。

我が国におけるハマダラカ類の分布と発生状況の現状を調べ、分析用サンプルを採集するために、石垣島、出雲平野、房総半島でハマダラカの野外調査を実施した。

C. 研究結果

マラリア、デング熱、日本脳炎の主要媒介蚊とその近縁種を表にまとめて示した (表 1~4)。我国産のハマダラカは 12 種類報告されており、このうちマラリアの媒介蚊は 5 種類である。外国産のマラリア媒介蚊としては、東南アジア産の 8 種類をリストしている。検査対象とする種類がこれらの種類で十分であるかどうか判断が難しい。重要なマラリア媒介蚊ではないが広範囲に分布し、野外調査での出現頻度が高い *An. vagus* などは含めるべきかもしれない。さらに検討が必要である。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。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。房総半島ではシナハマダラカ以外に、チョウセンハマダラカが 1 個体採集された。

日本脳炎ウイルスの媒介蚊とその近縁種を表 2 に示した。この中でコガタアカイエカの重要度は最も高い。コガタアカイエカと形態が酷似し、損傷したサンプルの形態学的分類が困難な種類は *vishmui* complex に属している。本年度は、これら *vishmui* complex に属する種類を想定した分子分類法の確立を目標として、rDNA の ITS 領域の塩基配列からプライマーを設計し、検出感度の検討を行った。

東南アジア諸国で毎年大流行をくりかえしているデング熱ウイルス (DEN) と、近年大きな流行が起りヨーロッパでも感染拡大が危惧されているチクングニアウイルスの媒介蚊を表 3 にまとめた。リストされた種類はいずれもヤブカ属の種類で、昼間吸血性で人嗜好性も高いことから、人ととも

に紛れ込む可能性がある。これらの種類以外にもセズジヤブカが DEN に感受性であることが実験的に示されているが、分布が局所的であるため表には含めていない。このリストの中から媒介能力の高さや地理的分布の広さから考えて、媒介蚊としての重要度が極めて高いネッタイシマカとヒトスジシマカを選びこれに本邦産ヤマダシマカを加えて、rDNA の ITS 領域の塩基配列を読み、そのパリエーションをもとに種特異的なプライマーを試作した。

D. 考察

本邦産媒介蚊のサンプルを中心としてプライマーの設計・試作を行った。リストに示したように外国産の重要種は多数存在することから、どの種類まで分類対象に含めるかを慎重に決める必要がある。

検疫業務で得られるサンプルは損傷の程度やサンプルの保存条件など様々であるため、サンプルの保存条件と分子分類法の適用可能性についても今後検討しておく必要があるだろう。

E. 結論

蚊媒介性疾患として重要度が高いマラリア、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルスを選

び、これらの媒介蚊として注意すべき外国産種とその近縁種をリストした。本邦産マラリア媒介蚊の中で *hyrcanus group* に属し、形態的な分類が難しいシナハマダラカとオオツルハマダラカを対象として、rDNA の ITS2 領域の塩基配列を比較した。日本脳炎ウイルス媒介蚊の中から *vishnui complex* に属する種類を選んで、rDNA の ITS 領域の塩基配列からプライマーを設計し、検出感度の検討を行った。デング熱ウイルス媒介蚊の中から媒介能力の高さや地理的分布の広さから考えて、媒介蚊としての重要度が極めて高いネッタイシマカとヒトスジシマカを選んだ。本邦産ヤマダシマカを加えて、rDNA の ITS 領域の塩基配列を読み、そのパリエーションをもとに種特異的なプライマーを試作した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

表 1. マラリア媒介蚊とその近縁種（本邦産種と東南アジアの重要種）のリスト

グループ	種 類	本邦産	媒介能
<i>Cellia</i>	<i>An. minimus</i>	+	+
	<i>An. tessellatus</i>	(+)	
	<i>An. dirus</i>		+
	<i>An. balabacensis</i>		+
	<i>An. sondaicus</i>		+
	<i>An. subpictus</i>		+
	<i>An. culicifacies</i>		+
	<i>An. maculatus</i>		+
	<i>An. stephensi</i>		+
	<i>An. aconitus</i>		+
<i>Anopheles</i>	<i>An. sinensis</i>	+	+
	<i>An. lesteri</i>	+	+
	<i>An. saperoi</i>	+	+
	<i>An. koreicus</i>	+	+
	<i>An. pullus</i>		+
	<i>An. kleini</i>		+
	<i>An. engarensis</i>	+	
	<i>An. lindesayi japonicus</i>	+	
	<i>An. omorii</i>	+	
	<i>An. yatsushiroensis</i>	+	
	<i>An. sineroides</i>	+	
	<i>An. bengalensis</i>	+	
	<i>An. belenrae</i>		

表 2. 日本脳炎ウイルス(JEV)媒介蚊とその近縁種

グループ	種 類	本邦産	JEV
<i>Culex vishnui</i> subgroup	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	+	+
	<i>Cx. whitei</i>		
vishnui complex	<i>Cx. vishnui</i>	+	+
	<i>Cx. pseudovishnui</i>	+	+
	<i>Cx. alienus</i>		
	<i>Cx. perplexus</i>		
<i>Culex bitaeniorhynchus</i> subgroup	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	+	+
	<i>Cx. infula</i>		+
	<i>Cx. epidesmus</i>		+
<i>Culex mimetics</i> subgroup	<i>Cx. mimetics</i>	+	×
<i>Culex univittatus</i> subgroup	<i>Cx. fuscocephala</i>	+	+
	<i>Cx. perexiguus</i>		×
<i>Culex gelidus</i> subgroup	<i>Cx. gelidus</i>		+
<i>Culex sisitens</i> subgroup	<i>Cx. whitmorei</i>	+	+
	<i>Cx. sitiens</i>	+	
<i>Culex pipiens</i> group	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	+	+

表 3. デング熱ウイルス、チクングニアウイルス媒介蚊とその近縁種

種類	本邦産	デング熱	チクングニア
<i>Aedes aegypti</i>		+	+
<i>Ae. albopictus</i>	+	+	+
<i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	+	+	
<i>Ae. flavopictus miyarai</i>	+		
<i>Ae. flavopictus downsi</i>	+		
<i>Ae. riversi</i>	+	+	
<i>Ae. daitensis</i>	+		
<i>Ae. polynesiensis</i>		+	
<i>Ae. scutellaris</i>		+	
<i>Ae. cookie</i>		+	
<i>Ae. hebrideus</i>		+	
<i>Ae. mediovittatus</i>		+	

マラリア原虫の遺伝的多様性とその分布

分担研究者 田邊 和祐, 大阪大学微生物病研究所 特任教授

研究要旨

マラリア原虫の遺伝的多様性はマラリアの免疫病態やワクチンの有効性と密接に関わる。熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) 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、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、ベネズエラから約 1,300 株を集め、そ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かった。SNP の分布を見ると、非抗原遺伝子の SNP の分布では地域特有かつ低頻度アレルが多いが、抗原遺伝子では集団間で多くが共有され、低頻度アレルは少なかった。アミノ酸置換を高める方向に働く多様化選択は、*mssl* の 3' 側領域及び *csp* においてどの地域でも認められた。以上は、世界各地の *P. falciparum* 集団が遺伝的多様性において共通点を有するが、大きく異なることを示し、マラリアの獲得免疫やワクチン効果が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を示唆する。

A. 研究目的

エイズ、結核と並び世界の 3 大感染症の一つとされているマラリアは毎年、3 億人がかかり、百万人以上の命を奪っている原虫感染症である。マラリアの制圧のためにマラリアワクチンの開発が求められ、これまでに多くの費用と努力が投入されてきた。しかし、ワクチンはいまだ現実のものとなっていない。

一方、マラリアの免疫獲得や将来のワク

チンの効果にはマラリア原虫の遺伝的多様性が密接に関わる。マラリア感染では感染を何度も繰り返すことによって徐々に防御免疫が獲得される。マラリア原虫集団には異なる遺伝子型が数多く存在し、抗原型の異なる株が多数あれば、感染防御免疫の獲得は容易ではなく、度重なる感染を経た後にはじめて成立することが推察できる。以上から、マラリア原虫の遺伝的多様性の地理的差異、多様性発生の機構、また原虫集団

の歴史の解明は重要である。

本研究では、マラリアのうちで最も重要な熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) について、世界各地の原虫集団における遺伝的多様性とその分布の解析を行う。解析にあたっては、ワクチン候補抗原遺伝子とともに非抗原ハウスキーピング遺伝子の多様性も調べ、両者の比較から抗原遺伝子に特徴的な遺伝的多様性の解明を目指す。

B. 研究方法

P. falciparum の野外株は以下の国 (地域) から得た。タンザニア東沿岸部 Rufiji 地区、356 株 (1993 年-2003 年) (Tanabe et al., 2007)、タイ北西部 Mae Sot 地区 (1995 年) (Sakihama et al., 1999)、フィリピンパラワン島、114 株 (1996 年) (Sakihama et al., 2007)、ソロモン諸島ガダルカナル島、90 株 (1996 年) (Sakihama et al., 2006)、ガーナ及びパプアニューギニアからは東京女子医科大学熱帯医学国際環境教室 (小早川隆敏教授) のグループが採取したサンプルを用いた。ガーナは西沿岸部 Winneba 付近、182 株 (2004 年)、パプアニューギニアは東 Sepik 州 Wewak 地区、195 株 (2001-2002 年)、ベネズエラの 10 株はアリゾナ州立大学の Escalante 博士、ブラジルの 151 株はサンパウロ大学の Ferreira 博士から供与を受けた。

感染血液 75 ml を Whatman 社の濾紙 (31ETCHR) に吸着させ、乾燥させた。濾紙からのマラリア原虫のゲノム DNA は我々の方法によって抽出した (Sakihama et al.,

2001)。

全長塩基配列を決定した遺伝子は、抗原遺伝子として、メロゾイト表面タンパク質 1 (*mssl*, 約 5 kb)、スポロゾイト表面タンパク質 (*csp*, 約 1.4 kb)、非抗原遺伝子として Ca^{2+} -ATPase (*serca*, 約 3.7 kb)、adenylosuccinate lyase (*adsl*, 約 1.4 kb)。塩基配列の決定は、PCR による *mssl* ハプロタイプングにより多重感染株を除いた単独遺伝子型感染の 458 株についてダイレクトシーケンス法で行った。

塩基配列に基づいて、塩基多様度 (塩基サイト当たりの多型サイト数)、多様化選択 (非同義置換率と同義置換率の差) を算出した。これらの集団遺伝学的解析は DnaSP version 4.5, MEGA version 3.0 を用いた。

C. 研究結果

得られたシーケンス本数と認められた SNP (単塩基多型) サイトの数は以下である。*serca* では 434 本 (49 SNP サイト)、*adsl* では 442 本 (14 SNP サイト)、*mssl* (MAD20 タイプのみ) では 364 本 (128 SNP サイト)、*csp* では 416 本 (37 SNP サイト)。

1) 塩基多様度

塩基多様度は、地域による差異、遺伝子による差異が明瞭に認められた。しかし、調べたどの地域でも非抗原遺伝子 (*serca*, *adsl*) よりも抗原遺伝子 (*mssl*, *csp*) において 5-10 倍ほど高かった。また、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高かった。*serca*, *adsl*, *mssl* では東南アジア、オセアニア、南米では大きな差はなかったが、*csp* で

は地域差が明瞭で、東南アジア>南米>オセアニアという順になった。

2) SNP の分布

非抗原遺伝子 (*serca*, *ads1*) の SNP は、地域特有かつ低頻度 (頻度 5%以下) アレルの SNP が多いが、抗原遺伝子 (*m脾*, *csp*) では低頻度 (頻度 5%以下) アレルが少なく、集団間で多くの SNP が共有されていた。

3) 多様化選択

塩基置換において非同義置換率が同義置換率よりも多ければ、アミノ酸置換を高める多様化選択が働いていると推定できる。原虫集団ごとにこの多様化選択の有無を調べたところ、非抗原遺伝子では予想通り、どの集団でも認められなかった。一方、*m脾* では遺伝子全体として見ると有意な差は認められなかったが、成熟タンパク断片化領域に区切ると、C末端側の 38 kD 領域及び 42 kD 領域で有意な差がどの集団でも認められた。*csp* ではどの地域でも有意な差が認められた。

D. 考察

世界各地の *P. falciparum* 集団における塩基多様度の比較を行ったのは本研究が初めてである。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いことが明らかとなった。世界の原虫集団間の多様度比較は Anderson ら (Mol. Biol. Evol. 2000) がマイクロサテライト多型を指標にして行っているが、本研究の結果と同様にアフリカで最

高の多様度を認めている。マイクロサテライトでは数塩基反復配列の変異が DNA strand slippage 機構によって生じるのに対し、SNPs は点突然変異によって生じる。従って、両者では変異発生の遺伝的機構が全く異なる。さらに、点突然変異がアミノ酸変化を起こす場合、抗原性の変化にもつながるので、SNP を指標とした塩基多様度を調べることは重要である。

マラリア感染では株特異的免疫が働くので、多様度の高いアフリカではマラリアの獲得免疫が多様度の低い東南アジア、オセアニア、南米よりも容易には成立しないことが推察できる。同時に、将来のマラリアワクチンの効果も多様度の低い地域でより有効なことが予想できる。マラリアの防御免疫の獲得では、多重感染の度合いやマラリア伝播の強度も関わるので、塩基多様度だけに限定することはできないが、本研究から、アフリカとアフリカ以外との間では獲得免疫の成立が大きく異なると言える。

非抗原遺伝子における SNP の地理的分布結果から、地域の *P. falciparum* 集団の歴史が推定できる。SNP 数がアフリカで最大であることから、現生 *P. falciparum* はアフリカに起源をもち、他の大陸へ拡散したと考えられる。チンパンジーマラリア原虫である *P. reichenowi* と *P. falciparum* の遺伝的距離、及び *P. falciparum* 集団間の遺伝的距離を、*serca* データを用いて原虫集団の共通祖先年代を計算すると、アフリカでは約 9-14 万年、東南アジアでは約 5-6 万年、オセアニアでは約 3-4 万年となった。

抗原遺伝子の SNP の地理的分布では大陸間で同じ SNP が数多く共有されていた。しかもそれらの SNP では非同義置換がほとんどであった。上述の共通祖先年代の推測から、抗原多型は数万年間、安定であることが示唆される。一般に、突然変異が生じる場合アミノ酸置換を導く非同義置換はたいてい有害で、そうした細胞や個体は死滅する。しかし、マラリア原虫の抗原遺伝子ではアミノ酸置換になる変異が免疫回避にとり有利になり、そうした変異体が集団に長期間残される。調べた 2 つの抗原遺伝子において非同義置換率が同義置換率よりも高い多様化選択が認められたことは抗原多型の安定性の結果と一致する。

以上の事実は有効なマラリアワクチンの開発に重要な示唆を与える。従来のワクチン開発において多型領域は対象外とされていた。しかし、保存領域はしばしば抗原性の弱い領域でワクチンには適さないものがある。本研究から、新たな抗原多型が発生しにくく、ワクチン耐性株の出現がそれほど危惧する問題ではないことが示唆される。将来的には抗原多型を積極的に考慮したワクチン開発の可能性が検討できる。

E. 結論

本研究から、世界各地の *P. falciparum* 集団が遺伝的多様性において共通点を有するが大きく異なることが明らかとなった。この知見から、マラリアの獲得免疫やワクチン効果が地域によって異なり、必ずしも一様には現れないことが示唆される。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Y. Nishimoto, N. Arisue, S. Kawai, A. A. Escalante, T. Horii, K. Tanabe, and T. Hashimoto. (2008) Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47: 45-53.
2. Saito-Nakano, Y., K. Tanabe, K. Kamei, M. Iwagami, K. Komaki-Yasuda, S. Kawazu, S. Kano, H. Ohmae, T. Endo. (2008) 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: 613-619.
3. T. Hayakawa, R. Culleton, H. Otani, T. Horii, and K. Tanabe (2008) Big bang in the evolution of extant malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2233-2239.
4. R. Culleton, T. Mita, M. Ndounga, H. 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. (2008) Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. *Malaria J.* 7:174.
5. T. Mita, K. Tanabe, N. Takahashi, R. Culleton, 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.

6. 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).

学会発表

1. 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,

2. K. Tanabe. Evolutionary genetic approach to antigen polymorphism of malaria parasites. 16th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, Goettingen, Germany, 2008.9.26.

3. 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.

4. 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.

5. 堀部舜, 岸野洋久, 田邊和裕, 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.

6. 田邊和裕, 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.

7. 早川敏之, 有末伸子, 平井啓久, 鶴殿俊史, 堀井俊宏, 田邊和裕, 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.

8. 有末伸子, Nirianne M. Q. Palacpac, 川合覚, 平井誠, 田邊和裕, 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.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「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」
平成20年度 分担研究報告書

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、熱帯熱マラリア原虫遺伝子を何ら改変することなくゲノムワイドに組換えタンパク質として発現することに成功した。これまで発現に成功した熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質の内、メロゾイト期の組換えタンパク質 114 種をモデルに用いて、我々が確立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、タイから得られたマラリア免疫血清を用いて熱帯熱マラリア原虫の新規抗原タンパク質のスクリーニングを試行した。

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、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れてい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組換えタンパク質を発現し、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。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

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内、マラリアゲノム情報データベース（PlasmoDB）より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている抗原ステージ特異的遺伝子を選択した。これらに特異的な PCR プライマーを用いて各 cDNA を増幅し、プラ

ズミドベクターにクローン化した。これらの cDNA クローンから PCR によって転写用の鋳型 DNA を作製し、それらとコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成した。最終的に得られた組換えタンパク質を用いて、以下のスクリーニングを実施した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行

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、これまでに確立した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。

3) タイ国におけるマラリア流行地からの血清試料の入手

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、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中で得られたマラリア免疫血清を入手した。

(倫理面への配慮)

これまで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。また、本血清試料の利用は愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得ている。

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

上記で選択した 171 種の熱帯熱マラリア原虫メロゾイト遺伝子全ての cDNA クローンを得た。次いでこれらの cDNA クローンからコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてそれらを組換えタンパク質として発現した結果、現在までに 114 種 (67%) の組み換えタンパク質をタンパク質合成と同時にピオチン化した状態で発現することに成功した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行

上記の組換えタンパク質 114 種類を用いて、タイの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、18 人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。その内訳は、これまでに抗原として研究されてきた既知分子が 8 種類、機能未知の分子が 12 種類であった。以上の結果から、本法のハ

イスループット免疫スクリーニング系としての有用性が確認された。

3) 今後の課題

アルファスクリーン法を用いて、既に保有している 1500 種類以上のゲノムワイドな熱帯熱マラリア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。先ず、上述したタイのマラリア免疫血清を用いて実施するが、その後、他のマラリア流行地からもマラリア免疫血清を入手し、同様のスクリーニングを行うことにより、地域間の原虫抗原に対する反応性の違いが検討できる。これらの結果が系統的に得られれば、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、大規模に追跡することが出来、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が可能となる。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスループット抗原抗体反応スクリーニングにより、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。

E. 健康危機情報

本研究は、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も利用可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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.

- 3) 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.

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, Stockholm, Sweden, June 11, 2008.

- 5) Tsuboi T.

Wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery.

Symposium on Capacity Building for Malaria Vaccine Development, Pune, India, June 21, 2008.

- 6) Tsuboi T, Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Otsuki H, Torii M.

- Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 8-11, 2008.
- 7) Hitoshi Otsuki, Osamu Kaneko, Thongkukiattkul Amporn, Mayumi Tachibana, Hideyuki Iriko, Satoru Takeo, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii
Erythrocyte- Binding-Like molecule and Virulence of *Plasmodium yoelii*.
19th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, September, 2008.
- 8) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Torii M.
Wheat germ cell-free system: A breakthrough in malaria vaccine candidate discovery.
17th International Congress for Tropical medicine and Malaria, Jeju Island, Korea, September 29 – October 3, 2008.
- 9) Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Otsuki H, Sattabongkot J, Takeo S, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with recombinant proteins of a gametocyte protein Pfs230 expressed using wheat germ cell-free system successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 10) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 11) Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M.
A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 12) 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiattkul Amporn、鳥居本美
ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子相 同体 EBL の局在と病原性
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 13) 曹俊、金子修、Thongkukiattkul Amporn、橘真由美、大槻均、坪井敬文、鳥居本美
A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*.
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 14) Palacipac NQ, Arisue N, Culleton R, Tanabe K, Zeyrek FY, Coban C, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Hotii T
Diversity in geographically distinct *Plasmodium vivax* populations.
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 15) 竹尾暁、坂本寛和、平林直己、鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫赤血球期発病阻止ワ クチン：新規候補抗原分子の探索
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。

- 16) 橘真由美、永徳千穂、大槻均、
Sattabongkot Jetsumon、鳥居本美、坪井敬
文
生殖母体抗原 Pvs230 を標的とする新規三
日熱マラリア伝搬阻止ワクチン
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、
4/3-4、2008。
- 17) 坪井敬文、竹尾 暁
マラリアワクチンの歴史
第 16 回分子寄生虫学ワークショップ、草
津町、8/3-6、2008。
- 18) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上弘
恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、坪
井敬文
新規マラリアワクチン候補抗原探索へ向
けたハイスループットスクリーニング
法の開発
第 16 回分子寄生虫学ワークショップ、草
津町、8/3-6、2008。
- 19) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上
弘恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、
Jetsumon Sattabongkot、鳥居本美、坪井敬
文
熱帯熱マラリア原虫感染におけるヒトの
抗体応答プロファイリング
第 7 回分子寄生虫・マラリア研究フォー
ラム、松山、10/10-11、2008。
- 20) 横内ゆき、韓銀澤、大槻均、伊与久菜
摘、竹尾暁、坪井敬文、鳥居本美
LDH 活性測定によるネズミマラリア原虫
増殖率の迅速簡便測定法の確立
第 49 回日本熱帯医学会大会、東京都、
10/25-26、2008。