

B. Development of local FITC for direct antigen detection by fluorescent microscopy and evaluation of the direct rabies immunohistochemistry test as a diagnostic assay for human and animal rabies infection

Preparation of the antigen

Purified street rabies virus passed into the mice was used as antigen. Total deactivation of the brain suspension using ascorbic acid and copper sulfate was not met. The buoyant density of rabies virus was 1.17 g/cm³. Table 3 shows the protein concentration of samples. Sample 1e had the highest protein concentration (2334.577 µg/ml).

Figure 4 shows the PCR result to confirm the presence of antigen. Lanes 1, 2 and 16 are markers, lanes 14 and 17 are known positive control for rabies virus, whereas lane 15 is a negative control Dengue virus RNA. Lanes 3 to 12 are purified rabies virus aliquoted in 10 tubes. All the 10 samples showed the presence of rabies G gene.

Table 3. Protein concentration of samples

Samples	Protein concentration (µg/ml)
1a	1846.286
1b	1596.883
1c	2723.34
1d	2183.923
1e	2334.577
1f	2096.585
1g	2316.511
2a	1401.018
2b	1588.111
2c	1260.770

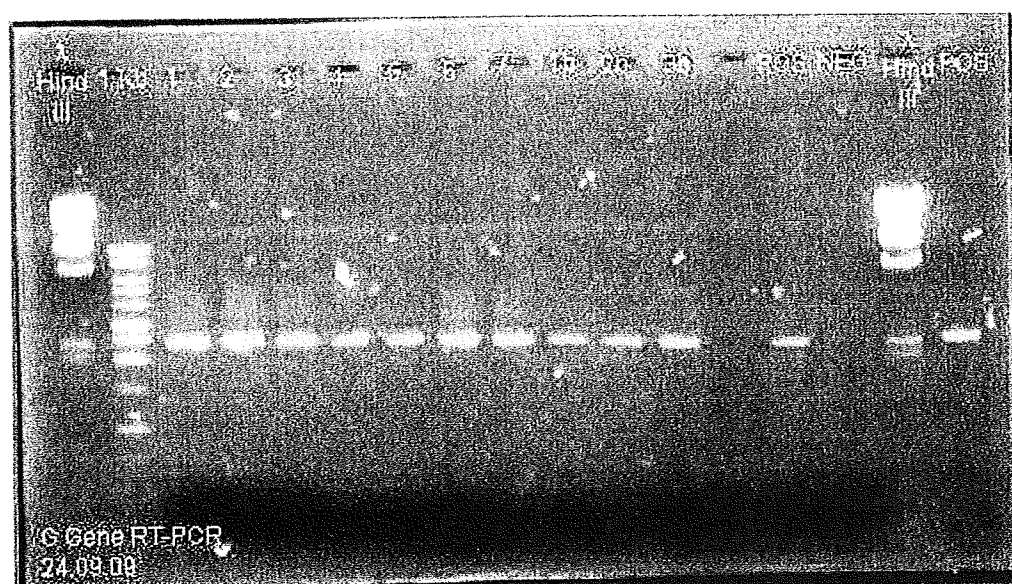


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of the amplified G gene of rabies virus from the

10 sucrose-purified samples
 Mouse immunization and screening by ELISA

One out of 3 mice showed high antibody titer (Table 4). Booster shot was given to the mice for further enhancement of antibody production. Mouse 1 and 2 expired a day after the last immunization.

Table 4. Optical density (OD₄₀₅) reading of the 3 mice sera for CVS- and PSRV-coated well.

	Day 0		Day 14		Day 30	
	CVS-coated	PSRV-coated	CVS-coated	PSRV-coated	CVS-coated	PSRV-coated
Mouse 1	0.279	0.259	0.211	0.232	0.271	0.421
Mouse 2	0.580	0.359	0.581	0.523	0.579	0.479
Mouse 3	0.291	0.326	0.306	0.306	0.232	0.334
Negative Control	0.095	0.187	0.095	0.187	0.095	0.187

Another batch of mice is now in the immunization process. Booster shots are still given to each mouse to increase the antibody titer.

DISCUSSION

Molecular technique

PCR is an antemortem and postmortem technique used for specimens from human and animal rabies cases. Saliva is the recommended specimen from rabid patients for testing using PCR (Crepin 1998). This method is being used in RITM for both antemortem and postmortem specimens. Since human cases are being diagnosed clinically, with the primers from NIID Japan and a new protocol for sample collection, there is a great possibility that this will not be limited to clinical diagnosis but to laboratory diagnosis as well.

RT-PCR is a very sensitive technique to diagnose infectious diseases provided that correct primers and good quality reagents are used. However, because of budgetary constraints in purchasing the necessary reagents and the technical expertise required to do the test, RT-PCR is limited to research laboratories in the Philippines.

An effective, easy, fast and simple molecular method of testing specimens for rabies diagnosis was developed by NIID, Japan. This is the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). The principle is based on strand displacement by *Bst* polymerase and formation of the stem-loop structure by four specifically designed primers that can recognize six distinct regions on the target DNA. Nagamine *et al.* reported a revised method which accelerated the reaction through the inclusion of additional loop primers (Nagamine 2002). The reaction is conducted under isothermal condition using a conventional water bath or heat blocks.

Hence with the establishment of RT-LAMP for rabies in NIID Japan, RT-

LAMP will be another milestone in molecular diagnosis. It is thus evident that RT-LAMP reported in this study is one of the most sensitive methods for detection of rabies virus. The specificity of RT-LAMP products was confirmed by the *RsaI* restriction enzyme. *RsaI* digestion yielded two independent bands of similar size which appeared as a single band on the gel. When subjected to nucleotide sequencing, the specimen was indeed part of rabies N gene.

The limitation of the method was the designing of the primer set which can be used for the amplification of several rabies virus strains from different regions. As shown in the result, the CVS primer set did not amplify the RNA from the Philippine rabies strains. Only the primer set designed based on the nucleotide sequence obtained from the Philippine strain, worked in the clinical specimens from Philippines. Upon comparison of the nucleotide sequences of the CVS-11 and the rabies strain from the Philippines, differences were noted at the 3' end of the FIP primer. This is responsible for the lack of amplification of strains in the Philippines using the CVS primer. There was replacement of the C-FIP primer of the CVS primer set with P-FIP. It was clearly shown that the nucleotide difference found in the FIP primer was critical for the amplification.

In this study, a simple, easy and sensitive RT-LAMP method was established which is useful for rabies diagnosis. There is no need for expensive equipment and the reaction time is shorter. This method is an alternative for expensive RT-PCR to diagnose rabies (Boldbaatar, 2009).

Immunological Technique

DRIT is a technique for rabies antigen detection which requires simple microscope that is already present in almost all diagnostic laboratories. It is a new diagnostic technique developed by the US Centers for Disease Control which is being evaluated by RITM. In previous studies, the amount of the biotinylated rabies polyclonal antibody produced by NIID Japan was optimized. In the current study, the method was polished and the test was performed in proven positive brain tissues which were subjected to different conditions. The reliability of the test on specimens that are not fresh and frozen were evaluated. DRIT gives reliable results if specimens are left at 26-31°C within 56 hours. In addition, the results are still reliable if specimens are exposed to 2-6°C within 88 hours. Since distance to rabies laboratories is a problem in the Philippines, with this findings even specimens from remote areas can still be processed and tested for rabies.

Production of monoclonal antibodies for immunological diagnosis of rabies is the answer to the limited supply of reagents for dFAT and DRIT. However, this study is still at the early stage.

CONCLUSION

Rabies is still a major problem in the Philippine in numbers. Animal rabies positivity rate is more or less stable, with dogs as the main reservoir of infection.

With the current number of rabies diagnostic laboratories in the country, it is

inevitable that most of the animal rabies cases are left undiagnosed. Seventeen laboratories are not enough to cater the whole Philippines considering that it is an island country. In terms of rabies diagnostic capability, the country is still behind when it comes to diagnosis. Only one laboratory can do several tests and the rest of the laboratories are left with either dFAT or DME techniques.

Laboratory researches in the country are still ongoing. The researches are either molecular in nature or simple and easy diagnostic tests. In addition, it is also addressing self-sufficiency by producing our own reagents for diagnosis. However, there is still a great need for rapid and simple tests.

REFERENCES

Atienza V. 2009. Lecture: Animal rabies in the Philippines in Advance course on rabies diagnosis. RITM, Alabang, Muntinlupa, Philippines

Arguin PM, Lilibridge KM, Miranda MEG, Smith JS, Calaor AB,, Rupprecht CE. 2002. Serologic evidence of *Lyssavirus* infections among bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases*; 8(3):258-262.

Boldbaatar B, Inoue S, Sugiura N, Noguchi A, Orbina JRC, Demetria C, Miranda ME, Yamada A. 2009. Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Japan J Infect Dis*; 62:187-191.

Bourhy H, Sureau P. *Laboratory Methods for Rabies Diagnosis*. Institut Pasteur, Paris. 1990.

Crepin P, Audry L, Rotvel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. 1998. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Micro*, 36(4):1117-1121.

Deray R. 2009. Lecture: Human rabies in the Philippines. Advance course on rabies diagnosis. RITM, Alabang, Muntinlupa, Philippines

Durr S, Naissengar S, Mindekem R, Diguimbye C, Niezgoda M, Kuzmin I, Rupprecht CE, Zinsstag J. March 2008. Rabies diagnosis for developing countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 2(3):1-6.

Health Policy Notes. Vol 1 issue 4 (April 2008). Department of Health, Manila Philippines.

Heaton PR, Johnston P, McElhinney LM et al. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J Clin Microbiol*, 35:2762-2766.

Kennett RH, MACKearn TJ, Bechtol KB ed. *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A*

New Dimension in Biological Analyses. Plenum Press:New York, 1981.

Lembo T, Niezgodna M, Velasco-Villa A, Cleaveland S, Ernest E, Rupprecht CE. Feb 2006. *Evaluation of the direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis*. *Emerging Infectious Disease*. 12(2):1-6.

Mercer University website.

Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H eds. *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, 1996. 4th edition.

Molecular epidemiology of rabies in the Philippines. 2009. RITM report

Nagamine K, Hase T and Notomi T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 16:223-229.

National Objectives for Health Philippines 2005-2010

Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K. 2008. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol Immunol*; 52:243-249.

NSO. 2000 census based population projection in collaboration with the inter-agency working group on population projections

Report of WHO Consultation on Monoclonal Antibody in Rabies and Research. Institut Pasteur, France, 1-2 June 1985.

Robles CD and Miranda NLJ. Jul-Dec 1992. Comparative evaluation of the rabies fluorescent antibody test and direct microscopic examination at the Research Institute for Tropical Medicine. *Phil J Micro Infect Diseases*, 21(2):69-72.

Velleca WM and Forrester FT. Sept 1981. *Laboratory Methods for Detecting Rabies*. US Dept of Health and Human Services, CDC, Georgia USA.

Wacharapluesadee S, Ruangvejvorachai P, Hemachudha T. 2006. A simple method for detection of rabies viral sequences in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. *J Virological Methods*; 134:267-271.

WHO Consultation on Rabies Monoclonal Antibody Cocktail for Rabies Post Exposure Treatment. WHO, Geneva, 23-24 May 2002.

プロジェクト6：原虫

マラリア

厚生労働科学研究費補助金（平成 21 年度厚新興再興感染症研究事業）

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

マラリア分野総合報告

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
	津田 良夫	国立感染症研究所・昆虫医科学部	室長
	中野由美子	国立感染症研究所・寄生動物部	主任研究官
	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
	田邊 和祐	大阪大学微生物病研究所	特任教授

研究要旨 アジア・太平洋地域におけるマラリア制圧に向けた動きを加速し、日本の防疫にも役立つような研究ネットワークを形成し、その中で病原体遺伝子情報の共有、検査法の開発・評価や標準化をはかることが目的とし、本年度は大きく以下のような3つのグループに分かれて研究をすすめた。また、今後のマラリア制圧に対し大きな障害となる三日熱マラリアの研究や対策に関する、アジア諸国の研究機関とのネットワーク強化を目指し、2011年1月には、関連する11カ国から14の研究機関の参加を得て、中国寄生虫症研究所、中国CDCと国立感染症研究所が共催する第2回アジア・太平洋地域三日熱マラリア国際会議を上海で開き、情報や研究成果の共有をさらに進めた。

① マラリアの新しい疫学的指標や Rapid assessment 手法の開発と評価

ソロモン諸島、ガダルカナル島のマラリア浸淫地で、対策の進捗状況が異なる地域を選び、住民の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価を測定した結果、尿中抗体価陽性率は、マラリア低浸淫地における Rapid assessment や対策の成果をモニタリングする指標として利用できる可能性が示された。また、新たなマラリア血清疫学の指標発見を目指し、タイのマラリア浸淫地で採取された血清を用いて、コムギ胚芽無細胞蛋白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る新規抗原蛋白質のスクリーニングを開始した。

② マラリア原虫など主要病原体の媒介蚊の検査法の改良

マラリア原虫媒介蚊の国内調査で、採集されたハマダラカで形態分類の結果と rDNA の ITS2 領域の塩基配列を用いた遺伝子分類の結果が必ずしも一致しない例がみられた。最近アジアの温帯地方で報告されている新種ハマダラカの分類確立も含め、病原体媒介蚊分類法の国際的標準化の必要性が再認識された。

③ マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

今後の地域ごとのマラリア対策の展開と連携に向けた基礎的データを得る為に、アジア地域に限らず、世界的に熱帯熱マラリア原虫遺伝子の集団的な把握に努めた。アジア・太平洋地域とアフリカを中心に世界各地から得られた熱帯熱マラリア原虫の遺伝子解析を進めた結果、各地域集団内の原虫遺伝子の塩基多様度は東アフリカからの地理的距離と負の相関を示すことがわかり、原虫集団の遺伝的多様性が現生人類集団の出現とその地理的拡散と関わりながら形成されてきたことが示唆された。また、国内輸入マラリアのアーカイブ標本での原虫遺伝子解析からは、東南アジア起源のピリメサミン薬剤耐性は、アフリカに移入された後、同薬の使用拡大を契機として10年ほどの期間で拡大した可能性が示された。

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、今なお世界的に大きな公衆衛生上の問題とである。アジア・太平洋地域でも、熱帯地方を中心に、長くその高い感染率や死亡率が問題となっていた。現在、これらの地域では、1990年代からのマラリア対策の進展により状況は大きく改善し、マラリア患者数やマラリアによる死亡者が劇的に減少している。ただ、その一方で、流行の中心が、重症化しやすい熱帯熱マラリアから、症状に乏しいが感染が長期化しやすい三日熱マラリアに移り、一部では、三日熱マラリア感染者数の増加も報告されている。一方、韓国や中国といった温帯の国々では、やはり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、明らかになり、平成18年度には、中国寄生虫症研究所、中国CDCと国立感染症研究所が共催する第1回アジア・太平洋地域三日熱マラリア国際会議（The 1st International Conference on Vivax malaria in Asia and Pacific area）が上海で開かれた。

それに続き、アジア・太平洋地域では、マラリア制圧（Elimination of malaria）を目指した野心的な試みも幾つかみられるようになった。今後の同地域でのマラリア対策の進展にあたっては、各々の地域の事情の違いに考慮した的確な介入方法の選択が重要になるが、以下のような観点での調査・研究が共通の課題として重要なことが、認識されてきた。

- ① 既存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ので、従来の疫学的指標や検査診断法・モニタリング手法にかわる方法の開発や評価が不可欠であること。

- ② 今後のマラリア流行の消長、特に再興感染症として問題となる可能性を検討する為のベクター情報が不足しており、国際的な比較が困難なこと。
- ③ 臨床診断に基づくART（アルテスネート+メフロキン）治療の普及により、アフリカでも、マラリアをめぐる状況の改善がみられる。マラリア対策の先進地域として、アジア・太平洋地域の研究所ネットワークは、同地域内だけではなく、アフリカなどにも関連した情報提供ができるようになることが期待されること。

WHOなどの国際機関やアジア・太平洋地域の研究機関とのネットワーク強化を基礎に、上記のような課題の解決に寄与することが、本研究班の意義と考えられる。アジア・太平洋地域におけるマラリア制圧に向けた動きを加速し、日本の防疫にも役立つような研究ネットワークを形成し、その中で病原体遺伝子情報の共有、検査法の開発・評価や標準化をはかることが大きな目的となる。

B. 研究方法

上のような目的を達成するために、大きく以下のような3つのグループに分かれて、研究をすすめることとした。

- ① マラリアの新しい疫学的指標や Rapid assessment 手法の開発と評価
分担：大前比呂思， 坪井敬文
協力：伊藤誠（愛知医科大学）
典型的な臨床症状を示さない例が多数をしめるマラリア浸淫地（タイとソロモ

ン諸島)で、マラリアの最近の疫学的変化を把握・モニタリングできる指標や Rapid assessment 手法の開発と評価を行う。

② マラリア原虫などの主要病原体の媒介蚊の検査法の改良

分担： 津田良夫

協力： 沢辺京子, 當麻孝子(琉球大学), 比嘉良子(長崎大学)

ベクターに関する形態学的分類と遺伝学的分類の異同を整理し、標準化する。

③ マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

分担： 田邊和裕, 中野由美子,

協力： 美田敏宏(東京女子医大)

マラリア原虫遺伝子の集団的な動きを、アフリカとアジア・太平洋地域、アジア・太平洋地域における大陸部と島嶼部で比較し、今後の地域ごとのマラリア対策への基礎的データをを得る。

さらに、アジア諸国の研究機関とのネットワークを強化し、情報や研究成果の共有をさらに進めるため、2011年1月29~31日には、11カ国から14の研究機関の参加を得て、中国寄生虫研究所、中国CDCと国立感染症研究所が共催する第2回アジア・太平洋地域三日熱マラリア国際会議(The 2nd International Conference on Vivax malaria in Asia and Pacific area)を上海で開いた。参加国・参加地域におけるマラリアの流行状況や対策に関する情報交換を進めるとともに、前回の国際会議で重点的に研究を進める分野とされた、三日熱マラリアにおける臨床診断・迅速診断法の意義・LAMP法のフィールド応用・プリマキン集団治療に効果などの項目については、詳細な報告と討議がなされた。

C. 研究結果

① マラリアの新しい疫学的指標や Rapid assessment 手法の開発と評価

1990年代初めにはマラリア感染率が人口の30~40%と同じだったソロモン諸島の2地域で、住民の尿中の熱帯熱マラリア原虫IgG抗体価の違いを比較した。1990年代にマラリア対策が進んだ地域A(ホニアラ市)では、B(ガダルカナル島北東岸、タシンボコ地域村落群)に比して、特に20歳以下の若年者で陽性率が低く抗体価も低い例が多くなった。

また、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スクリーニング法(アルファスクリーン法)により得られた、熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質374種類について、タイのコモンタ村から得られた無症候マラリア感染者19人の免疫血清によりスクリーニングを試行した。その結果、感染者の血清と反応する抗原タンパク質は161種存在することが明らかとなった。

② マラリア原虫などの主要病原体の媒介蚊の検査法の改良

日本国内のマラリア媒介蚊の分布状況を現地調査によって調べ、得られた蚊サンプルの遺伝子分析によって分類の再検討を行った。これまで報告されている12種のハマダラカのうち6種類の分布が確認されたが、過去の分布と比較して、北海道におけるシナハマダラカの分布が異なることが示された。また、釧路湿原で採集され、形態分類ではシナハマダラカと同定されたハマダラカと、本州で採集されたシナハマダラカのrDNAのITS2領域の塩基配列を比較したところ、大きく異なることがわかった。

また、マラリア媒介蚊以外の疾病媒介蚊についても、形態的に分類が難しいサンプルについて、種類同定が可能な分子分類システムの検討を行った。日本脳炎ウイルス

媒介蚊を主とするイエカ類、デング熱媒介蚊を主とするシマカ類について rDNA の ITS 領域の塩基配列から種特異的なプライマーを設計し、検出感度の検討を行った結果、感度の良いプライマーが作成できた。

③ マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) 集団の多様性とその分布の定量的解析を行った。アジア・太平洋地域以外に、アフリカを含む世界 9 개국から原虫株を集め、多重感染を除いた 519 株についてハウスキーピング遺伝子 (*serca*, *adsl*) のシーケンスを得て、その中で同定した単塩基多型 63 カ所を解析した。その結果、各地域集団内の塩基多様度は東アフリカからアジア、オセアニアに至る地理的距離と強い負の相関を示した。一方、地域におけるマラリア伝播度の差異や過去のマラリア対策は熱帯熱マラリア原虫の遺伝的多様性に大きな影響を与えていなかった。また、地域の原虫集団の共通祖先の年代推定は現生人類集団の東アフリカ起源と約 6 万年前の出アフリカ移動と大まかに一致した。

さらに、薬剤耐性遺伝子に関する研究では、ピリメサミン (Pyr) 耐性遺伝子に着目して、東南アジア起源の耐性株が他の地域に及ぼした影響を解析するために、アフリカの Pyr 耐性遺伝子としての *dhfr* の遺伝子型を 1984 年から 1998 年までの国内での輸入熱帯熱マラリアのアーカイブ標本により明らかにした。その結果、東南アジア由来と考えられる耐性株は 1990 年代に入ってアフリカで広まっていることが明らかになった。

D. 考察

マラリアの新しい疫学的指標や Rapid assessment 手法の開発を目指す研究では、尿中の熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価の陽

性率の各年齢層での比較が、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できると思われた。また、マラリア免疫ヒト血清との反応性のアルファスクリーン法を用いての検討の結果、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ので、マラリアの血清疫学マーカーとなる候補蛋白の検索が、今後飛躍的に進むことが期待される。

マラリア原虫媒介蚊の検査法改良では、国内の調査でも、採集されたハマダラカで形態分類の結果と遺伝子分類の結果が必ずしも一致しない例がみられた。今後は、2005 年に韓国で記載された新種ハマダラカをはじめ、近縁と思われる種の間で詳細な比較検討が必要と思われる。

マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握を目指す研究では、熱帯熱マラリア原虫の各地域集団内の塩基多様度は東アフリカからアジア、オセアニアに至る地理的距離と負の相関を示すことがわかった。地域の原虫集団の共通祖先の年代推定は現生人類集団の東アフリカ起源やアフリカからの移動時期と大まかに一致し、原虫集団の遺伝的多様性が現生人類集団の出現とその地理的拡散と関わりながら形成されてきたことが示唆された。

一方、Pyr 耐性と関連した熱帯熱マラリア原虫の解析では、1984 年以降のタイでの感染例で、三重変異が同定されたが、この変異は約 10 年という歳月を経てアフリカに移入していた。そして、Pyr 使用が拡大したのを契機に、急速にアフリカに広まったことが示唆された。

E. 結論

ソロモン諸島、ガダルカナル島のマラリア浸淫地で、マラリア対策の進捗状況が異なる 2 つの地域で、住民の尿中熱帯熱マラ

リア原虫 IgG 抗体価を測定した結果、尿中抗体価陽性率は、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できる可能性が示された。また、タイのマラリア浸淫地で採取された血清を用いて、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る、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を開始した。また、マラリア原虫媒介蚊の国内調査では、採集されたハマダラカで形態分類の結果と遺伝子分類の結果が必ずしも一致しない例がみられ、病原体媒介蚊の分類法の国際的標準化の必要性が、再認識された。

アフリカを含む世界各地から得られた熱帯熱マラリア原虫の各地域集団内の塩基多様度は東アフリカからアジア、オセアニアに至る地理的距離と負の相関を示すことが

わかり、原虫集団の遺伝的多様性が現生人類集団の出現とその地理的拡散と関わりながら形成されてきたことが示唆された。また、日本国内の輸入マラリアのアーカイブ標本での原虫遺伝子解析からは、アフリカでの熱帯熱マラリア Pyr 耐性は、東南アジア起源で、アフリカでの Pyr 使用拡大を契機として 10 年ほどの期間で拡大した可能性が示唆された。

また、アジア・太平洋地域におけるマラリア制圧に、大きな障害となる三日熱マラリアに関するアジア諸国の研究機関とのネットワーク強化を目指し、2011 年 1 月には、11 カ国から 14 の研究機関の参加を得て、中国寄生虫症研究所、中国 CDC と国立感染症研究所が共催する第 2 回アジア・太平洋地域三日熱マラリア国際会議を上海で開き、情報や研究成果の共有をさらに進めた。

厚生労働科学研究費補助金（平成 21 年度厚新興再興感染症研究事業）

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

マラリア疫学における熱帯熱マラリア原虫尿中抗体価の意義

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
研究協力者	伊藤 誠	愛知医科大学・寄生虫学	准教授
海外研究協力者	Bernard Bakote'e	Solomon Islands Medical Training and Research Institute	Director

研究要旨 マラリアの疫学調査には、発熱・脾腫といった臨床症状が利用されることが多かったが、対策が進みマラリア感染率が低下した地域では、原虫密度が低く症状に乏しい例が多いので、臨床所見を疫学指標としては実際の感染状況を把握できない。また、顕微鏡的形態診断法や分子生物学的方法は、マラリア浸淫地における Rapid Assessment という目的では利用しにくい。そこで、1990年代からのマラリア感染率の推移がわかっているソロモン諸島において、熱帯熱マラリア原虫に対する尿中抗体価の測定が、マラリア低浸淫地での疫学的指標や Rapid Assessment 手法として利用できる可能性を検討した。1990年代初めにはマラリア感染率が人口の30～40%と同じだった2地域で、住民の尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の違いを比較したところ、1990年代にマラリア対策が進んだ地域 A（ホニアラ市）では、B（ガダルカナル島北東岸、タシンボコ地域村落群）に比して、特に20歳以下の若年者で陽性率が低く抗体価も低い例が多くなった。尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、年齢層毎に比較することにより、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できると思われる。

A. 研究目的

マラリアの疫学調査には、従来の小児での脾腫率をみる簡便法以外に、最近迅速診断キットを用いた方法も利用される。しかし、対策が進んでマラリア感染率が低下し、原虫密度の低い例が相対的に増加した地域では、これらの方法ではなかなか実際の感染状況を把握できない（大前ら、第18回臨床寄生虫学会、東京2007年6月）。

感度と特異性を考えれば、従来の血液スライド標本を用いた顕微鏡的形態診断やPCR法・LAMP法などが、もっとも正確だが、マラリア浸淫地における Rapid Assessment という目的では、利用しにくい。

尿を用いた簡便なマラリア診断の可能性については、ラオスの高度流行地での検討で、住民の97.4% (225/231)から尿中抗体が検出されたが、PCR法との間の一致率は低く、尿を用いた抗体検査は、検査時での感染状態を診断するには、有用性が低いと思われた（伊藤ら、第77回日本寄生虫学会、長崎2008年4月）。そこで、今回は、マラリア原虫に対する尿中抗体価の測定が、もう少し長い観察期間での感染状態の変化やマラリア対策の進捗をモニタリングする疫学的指標として応用できないか、最近の10年間で、急速にマラリア対策が進んだソロモン諸島において検討した。

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、タシンボコ村落群において、2009年9月と2010年2月に、マラリア感染状況に関する一斉調査を行い、顕微鏡的な形態診断の結果に基づいて、陽性者に対する治療を行った。また、あわせて尿を採取し、尿中のマラリア原虫に対するIgG抗体価を計測した。また、2009年9月には、1990年代は多くのマラリア感染者がみられたが、現在はマラリア患者の報告が殆どないホニアラ市においても、同様な調査を行って尿を採取した。

実際の検査には、ヒトO型血球を用いて培養した熱帯熱マラリア原虫NF54株より作成した抗原を使用し、尿中抗体はプレートELISA法で測定した。尿は5倍希釈して用い、二次抗体には抗ヒトIgG標識抗体を用いた。日本人40人の抗体価の平均+3SDをcut off値として、陽性例を求めた。

なお、一連の調査は、ソロモン諸島国での倫理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。

C. 研究結果

2009年9月の調査でのSentinel Siteのタシンボコ村落群でのマラリア感染率は、10.5%にとどまった。1996年9月、2006年9月、2009年9月の結果を比較すると、マラリア感染率は、30.6%、29.3%、10.5%と減少しているが、熱帯熱マラリア、三日熱マラリアごとに、年齢別感染率をみた場合も、大きな変化が確認された。熱帯熱マラリアがマラリア流行の中心だった1996年9月には、若年層ほど熱帯熱マラリア感染率が高くなる、マラリア高度浸淫地に典型的なパターンを示した(図1)。しかし、2006年以降、熱帯熱マラリア感染率は大きく減少すると同時に、三日熱マラリアが相

対的に増加すると、熱帯熱マラリアでは、この年齢特性が消え、かわりに三日熱マラリアでは、若年層で感染率が高くなる傾向がみられた(図2)。また、強い治療的介入が行われた後、2009年には全年齢層で、熱帯熱マラリア、三日熱マラリアとも感染率が低くなる傾向を示した(図1, 2)。

また、尿中の熱帯熱マラリア原虫IgG抗体価の検査では、10歳以下の若年者の例では、陽性を示す例の比率が少なかった。特に、ホニアラ市内の例では1例も検出できなかった。各年齢層で、ホニアラ市での被験者の方が、陽性率が少なくなる傾向を示したが、年齢が進むにつれこの傾向は弱くなった(表1, 2)。また、抗体価についても、ホニアラ市とタシンボコ地域の村落群を比較すると、ホニアラ市の若年層で低くなる傾向を示した(図3, 4)。

D. 考察

ガダルカナル北東岸のマラリア浸淫地では、マラリア対策の進展から、1990年代に流行の中心だった熱帯熱マラリアの感染率が急速に減少した。2000年代になると、一時、三日熱マラリアの感染率が増加したが、最近では、全般的にマラリア感染率が減少している。尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、低年齢層で低くなり、高齢層で高くなった。このことは、マラリア対策の進展により、最近では感染の機会が減っていることを反映している可能性が高い。

一方、1990年代末から熱帯熱マラリア患者数が減少し、現在ほぼ制圧されているホニアラ市において、10歳未満の若年層で尿中抗体価が陽性となった例はなかった。両地域の結果の比較から、尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、マラリア低浸淫地におけるRapid assessmentやマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できる可能性が示された。

E. 結論

ソロモン諸島、ガダルカナル島のマラリア浸淫地で、マラリア対策の進捗状況が異なる2つの地域で、住民の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価を測定した。その結果、尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できる可能性が示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

Nakagawa Y, Ueki M, Fueda K, Ohmae H, Ishikawa H.
Risk assessment of re-emerging *Plasmodium falciparum* on Ishigaki Island using a stochastic model. *Trop Med & Hlth* 37(3): 97-107, 2009.

2 口頭発表

(1) Ohmae H.

Limitation of clinical diagnosis and evaluation of rapid diagnostic tests to detect vivax malaria in the field

The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area.

January, 2010, Shanghai

(2) Sawabe K, Tsuda Y, Ohmae H.

Current distribution and molecular identification of anopheline mosquitoes in Japan

The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area.

January, 2010, Shanghai

- (3) Ohmae H, Ishikawa H, Fueda T, Ono M, Tnag L, Gu Z, Basic analysis to estimate relationship between climate change and emerging of vivax malaria.

The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area.

January, 2010, Shanghai

- (4) 大前比呂思, 中澤港, Suraj Eka 伊藤誠, 長岡史晃, 木村英作, 亀井喜世子, 山内太郎, Bernard Bakote' e

ソロモン諸島におけるマラリア疫学調査への尿診断法の応用
第50回日本熱帯医学会, 2009年10月、沖縄

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 熱帯熱マラリア原虫尿中 IgG 抗体価陽性率と年齢の関係
 (2009年度ソロモン諸島、ガダルカナル北東岸における調査)

	－ 10	11 － 30	31 －	
陽性例	17	22	33	72
陰性例	14	9	5	28
	31	31	38	100

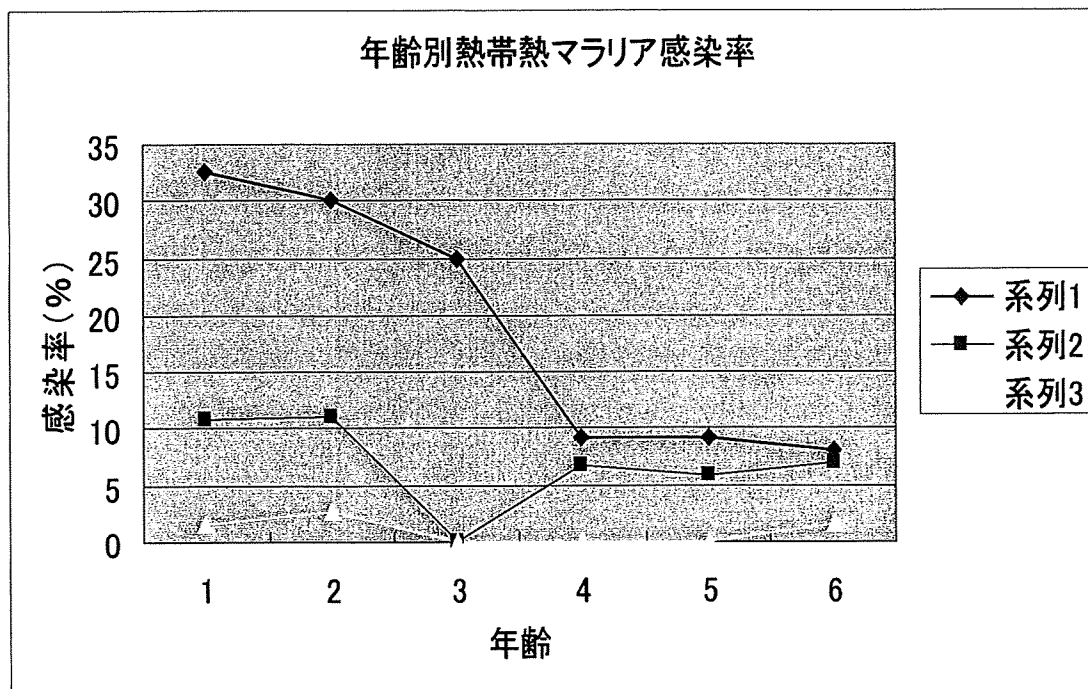
%

表2 熱帯熱マラリア原虫尿中 IgG 抗体価陽性率と年齢の関係
 (2009年度ソロモン諸島、ホニアラ市における調査)

	－ 10	11 － 30	31 －	
陽性例	0	17	39	56
陰性例	19	13	12	44
	19	30	51	100

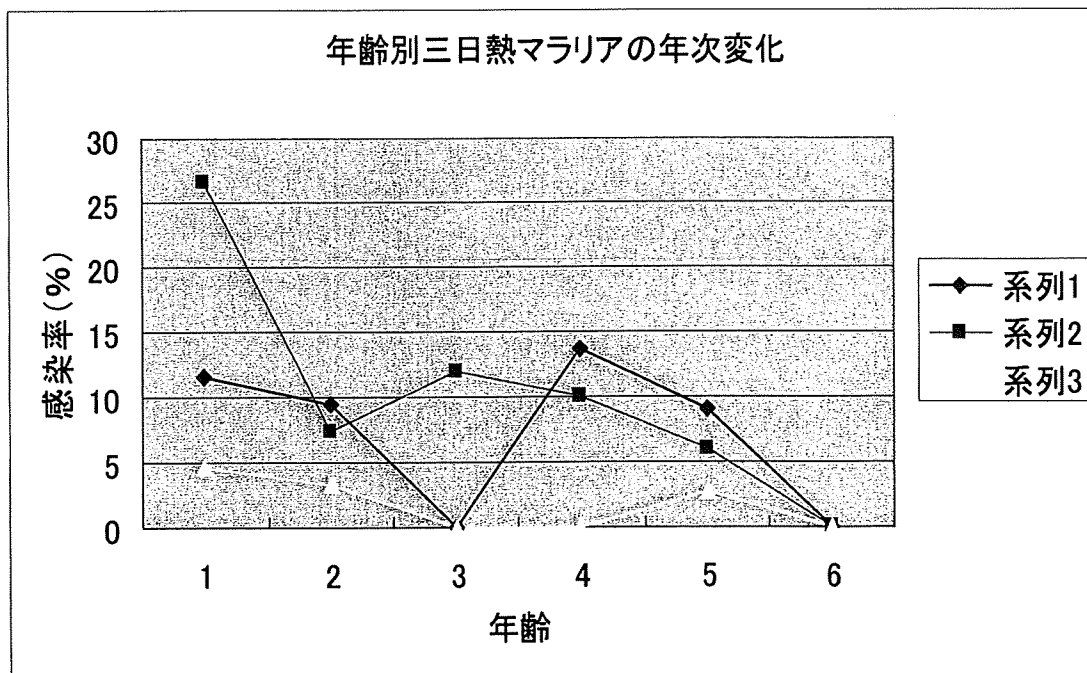
%

図1 ガダルカナル北東岸、タシンボコ地域の村落群における熱帯熱マラリア感染率の推移



系列1 1996年, 系列2 2006年, 系列3 2009年

図2 ガダルカナル北東岸、タシンボコ地域の村落群における三日熱マラリア感染率の推移



系列1 1996年, 系列2 2006年, 系列3 2009年

図3 ガダルカナル北東岸、タシンボコ地域の村落群における住民の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価 (2009年調査)

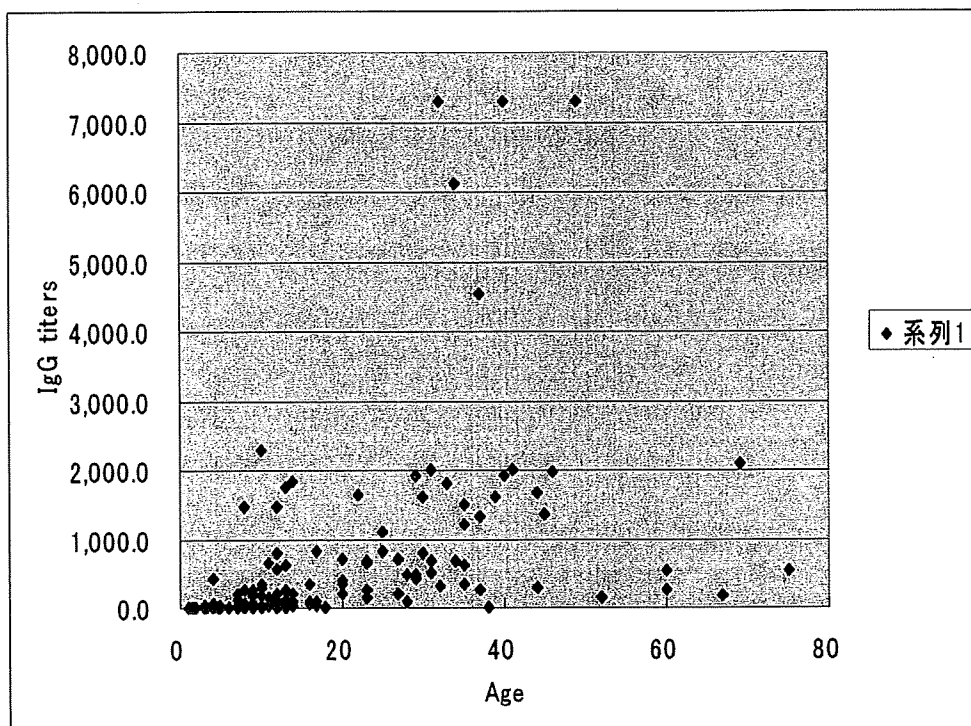
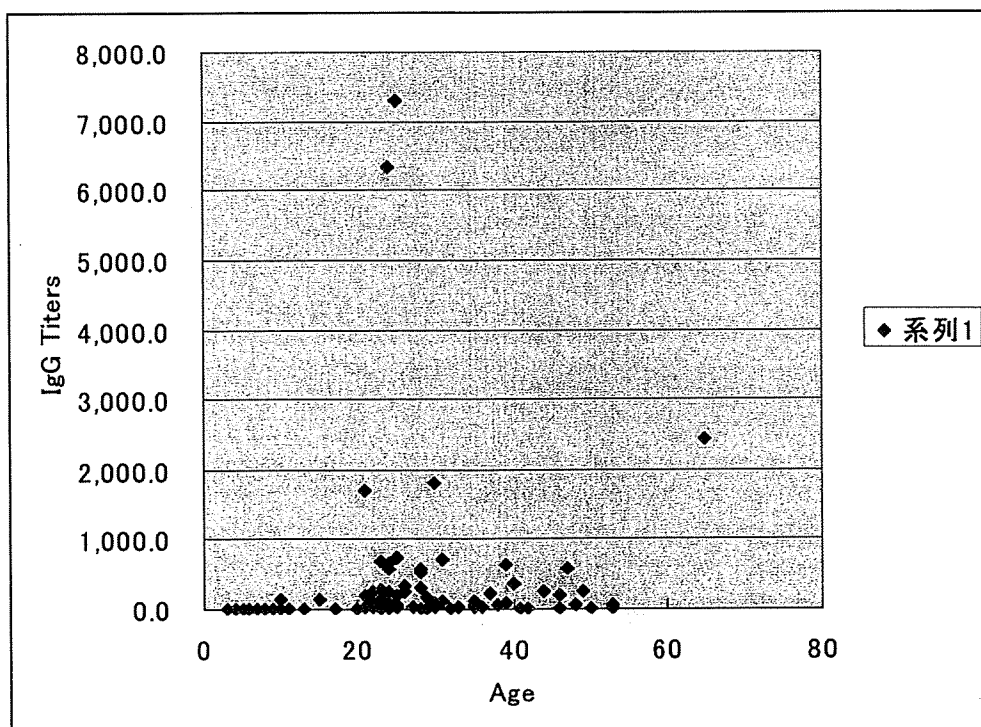


図4 ガダルカナル北東岸、ホニアラ市における住民の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価 (2009年調査)



輸入マラリア薄層標本による薬剤耐性遺伝子の遺伝的多型：

ピリメサミン耐性遺伝子の歴史

分担研究者：中野由美子

研究要旨

ピリメサミン (Pyr) はクロロキンに代わる抗マラリア薬として 1970 年代から主に東南アジアで使用が開始されたが、使用開始直後に Pyr 耐性熱帯熱マラリアの発生が報告された。これまでの研究により、東南アジアにはインドシナ半島と西太平洋諸国の二つの起源の Pyr 耐性マラリアが独自に発生し、そのうちインドシナ半島の耐性株がアフリカに広まったことが現在の株のマイクロサテライト解析により明らかにされている。本研究では東南アジアの耐性株が他の地域に及ぼした影響を解析するために、アフリカの Pyr 耐性遺伝子としての *dhfr* の遺伝子型を 1984 年から 1998 年までのアーカイブ標本により明らかにした。その結果、東南アジア由来と考えられる耐性株は 1990 年代に入ってアフリカで広まっていることが明らかになった。

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。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、現在では一部の地域を除き、CQ と Pyr 耐性マラリアが世界中に存在している。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、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 difydrophorate 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、現在の野生株ではインドシナでは三重、四重変異が多く、西太平洋諸国では二重変異が多いことが報告されている。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。その後の解析により、アフリカに流行している Pyr 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。以上の報告は熱帯熱マラリア原虫の耐性遺伝子が比較的短時間で地理的に拡散したことを示している。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。しかし遺伝子型の同定による確認が、サン

プルが存在していることにより、行われていないのが現状であった。また、*dhfr* 多重変異の進化に付いてもこれまで直接的な証明は行われていない。よって耐性の遺伝子型の起源と歴史を明らかにするために、アーカイブ標本を用いた。

これまでの分担研究者の解析により、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もちいたマラリア患者の薄層標本が保存されている。そのアーカイブ標本を用いて、アフリカで広まったインドシナ由来の Pyr 耐性株の歴史を解明することにした。

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。*Dhfr* 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。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 1ul 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 (i) アミノ酸 51、59 番を含む 190bp の増幅には 21F (5' -GCC ATA TGT GCA TGT TGT AAG GTT GAA AGC-3') と 22R (5' -CTT ATA TTT CAA TTT TTC ATA TTT TGA TTC-3') を outer primers とし、23F (5' -TGT TGT AAG GTT GAA AGC AAA AAT GAG GGG-3') と 24R (5' -TTT TTC ATA TTT TGA

TTC ATT CAC ATA TGT-3') を inner primers とした; (ii) アミノ酸 108 番を含む 190bp の増幅には 25F (5' -TGT AAA TAT TTA AAC AAA GAA ACT GTG GAT-3') と 26R (5' -TTC ATC AAA ATC TTC TTT TTT TAA GGT TCT-3') を outer primers とし、27F (5' -GAA ACT GTG GAT AAT GTA AAT GAT ATG CCT-3') と 28R (5' -TTC TTT TTT TAA GGT TCT AGA CAA TAT AAC-3') を inner primers とした; (iii) アミノ酸 164 番を含む 190bp の増幅には 29F (5' -GAA GAT TTT GAT GAA GAT GTT TAT ATC ATT-3') と 33R (5' -AAA TAC ATC ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT-3') を outer primers とし、31F (5' -GTT TAT ATC ATT AAC AAA GTT GAA GAT CTA-3') と 34R (5' -ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT TCT AGT AAA-3') を inner primers とした。PCR 産物の配列決定は、オペロンバイオテクノロジー (株) に外部依頼した。

C. 研究結果

アフリカ由来の 128 サンプルのうち 62 サンプルが DNA の回収と *dhfr* locus の増幅が可能であった。サンプルはアフリカ東部と西部に集中しており、その内訳は、東部アフリカが 48 サンプル (ケニア、タンザニア、ウガンダ、ルワンダ、ザンビア、マラウイ、ジンバブエ、南アフリカ、マダガスカル)、中央アフリカが 7 サンプル (コンゴ、ガボン、カメルーン)、西部アフリカが 62 サンプル (ガーナ、ナイジェリア、コートジボワール、ブルキナファソ、ギニア、ガンビア、セネガル)、サハラ砂漠近郊の北部アフリカが 11 サンプル (モーリタニア、マリ、ニジェール、チャド) であった。ダイレクトシーケンスの結果では、東南ア

ジアの株は1種のシークエンスの波長として結果が得られていたが、アフリカのサンプルは42サンプル(全体の67%)が二重の波長を示し、異なる遺伝子型の原虫が混合感染していることがわかった。*dhfr*の多型を表に示した。東南アジアと異なり、アフリカでは1980年代にはN51あるいはC59に変異の入った単独変異(NRSI, ICSI)が存在していた。三重変異が初めてアフリカで同定されたのは1991年であり、これまでの報告を(Certain, 2009)二年さかのぼることができた。マラウイでは1993年よりPyrを第一次選択薬として大量に使用したが、それ以前に高いIC50を示す三重変異が存在していたことを示す。二重変異ICNIは1991年以降アフリカ東部と西部で、NRNIは1995年以降アフリカ西部と北部で同定された。この結果は、NRNIが現在のアフリカ西部を起源としている報告(Mita, 2009)と一致した。

D. 考察

本結果では多くのサンプルが混合感染をしており、ダイレクトシークエンスとそのピークの高さから遺伝子型を推測した。よって、遺伝子型の最終結論にはPCR産物をクローニングし、それぞれの変異のlinkageを確認する必要がある。しかし、以下のような興味深い結果を得た。まず1980年代に存在していたNRSI, ICSIはIC50が単独変異NCNIよりも低いことが報告されており、これらの変異はPyr感受性型として扱ってもよいと推測される。またNRSI, ICSIは1980年代のアフリカに存在していただけでなく、現在でも非常にわずかながらフィールドで単離されている(Mockenhaupt, 2001、

Kyabayinze, 2003 AJTMH)。このような遺伝子型は東南アジアでは同定されず、アフリカ独自の多型だと考えられる。

本結果により三重変異の最も古い同定年代は1991年になった。マラウイでは1993年よりPyrを第一次選択薬として大量に使用したが、それ以前に三重変異がアフリカに存在していたことを示す。この三重変異が、東南アジア起源なのか、それともアフリカ起源の二重変異より発生したのか結論するには、マイクロサテライト解析による詳細な解析が必要となろう。

本アーカイブ標本により解析した東南アジアの遺伝子型は、1984年に以降タイで三重変異が同定されている(saito-Nakano, 2008)。そのことを合わせると、東南アジアから約10年の歳月を経てアフリカに三重変異が移入しており、Pyrの使用が拡大した1990年代に入って急速にアフリカに広まったことを示していると考えられる。

E. 結論

アフリカにおける*dhfr*の遺伝子型は1980年代は感受性であった。また東南アジア起源と考えられる三重変異が移入を開始し始めていた。Pyrの使用が拡大した1990年代に入って、三重変異は急速にアフリカに広まると同時に、アフリカ起源の二重変異も発生した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし