

表、アフリカにおける *dhfr* の遺伝子型

<i>dhfr</i>		1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
North	Mauritania														ICNI, NCNI	
	Mali										ICNI, IRNI	ICNI, ICSI				NCSI, ICNI, IRNI
	Niger											ICNI				NCNI, NRNI, ICNI
West	Gambia															
	Senegal														ICNI, IRNI	
	Cote d'Ivoire														ICNI, NRNI	
	Burkina Faso														ICNI, NCNI	
	Ghana										NCSI, ICSI			NCSI, IRNI	NCSI, ICNI (4), NRNI (2)	ICNI, NRNI (2)
	Togo			NCSI, ICSI											ICNI, NRNI	
	Nigeria	NCSI, ICSI							ICNI, IRNI					NCSI, IRNI		NCNI, ICNI (2), NRNI, IRNI
Central	Gabon											NCSI, IRNI				
	Congo											ICNI				ICNI (2)
East	Uganda															ICNI
	Kenya		NCSI, ICSI								IRNI	ICSI, NCSI				NCSI, ICNI, IRNI
	Tanzania		NCSI, ICSI						NCSI, ICSI	NCSI, ICSI			ICNI	ICNI, NCNI	ICNI	
	Zambia										NCNI					ICNI
	Zimbabwe													IRNI		
South	South Africa													ICNI, IRNI		
Island	Madagascar														ICNI	

我が国におけるマラリア媒介蚊の分布・分類の再検討と  
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

要旨 我国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。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。かつてシナハマダラカの分布は北海道西部に限られていたが、我々が 2004 年以来継続して調査している釧路湿原では、形態分類によってシナハマダラカと同定されるハマダラカが採集された。しかしながら、rDNA の ITS2 領域の塩基配列を比較したところ本州で採集されたシナハマダラカの塩基配列とは異なることがわかった。2005 年に韓国で記載された新種ハマダラカとの詳細な比較検討が必要と思われる。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。

A. 研究目的

マラリアはハマダラカ属の蚊によって媒介される。我国ではこれまでに 12 種のハマダラカの生息が報告されている。これらの種類の中で比較的発生密度が高い種は、水田や湿地など大きな水域に発生し、牛や豚などの家畜を主な吸血源としており、このことが発生密度だけでなく分布範囲にまで影響を与えていると推察されている。しかしながら、我が国におけるハマダラカ類の分布を近年調べた研究はなく、分布の

現状はほとんど分かっていない。1993 年以降、韓国と北朝鮮の国境地帯で三日熱マラリアの大流行が続いており、これまで主要な媒介蚊とされていたシナハマダラカの分子生物学的研究が行われた。その結果形態的には区別できない未記載の種類が混棲していることが明らかとなり、2005 年に新種として記載された。これに加えて既に記載されている種類に関しても、我が国のヤツシロハマダラカと韓国の *An. pullus*、中国の *An. anthropophagus* と我が国のオオツルハマダラカが同種であるという研究報告もあって、我が国産ハマダラカ類の分類自体を再検討する必要があると思われる。

蚊によって媒介される病気はマラリア以外にもフィラリア、日本脳炎、デング熱、ウエストナイル熱など多数知られており、これらの病気の媒介蚊にも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。国際線航空機による疾病媒介蚊の持ち込みを検査する目的で、航空機内の衛生昆虫の調査が国際空港の検疫官によって実施されている。この調査では、採集されたサンプルの多くが著しく損傷を受けており、形態的には正確な種類同定ができない現状にある。このように損傷の激しいサンプルの種同定には、体の一部から抽出された DNA を用いた分子生物学的分類手法が有用である。

本研究は本邦産ハマダラカ類の分布の現状を現地調査によって明らかにすること、ならびに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蚊を対象とした分子分類システムを構築することを目的として実施した。

## B. 研究方法

北海道釧路湿原におけるハマダラカ類の採集と得られたサンプルの分子分類：釧路湿原に隣接する釧路市動物園と釧路湿原野生生物保護センターでドライアイストラップを用いた成虫採集を行った。また、これらの調査地とその周辺の水域における幼虫採集を実施した。成虫は冷凍サンプルとして持ち帰り、幼虫は成虫まで飼育した後に殺し、冷凍で保存した。成虫の形態的特徴に従って種類同定を行った後、DNA を抽出して rDNA ITS2 の塩基配列の比較を行った。医学上重要な疾病媒介蚊の分子分類システムの構築：デング熱やチクングニヤ熱の媒介蚊として重要なネッタイシマカとヒトスジシマカについて国内外のサンプルを用いて昨年度作成したプライマーの汎用性を調べた。使用したサンプルは、

ネッタイシマカが 5 カ国（ベトナム産、エルサルバドル産、タイ産、インドネシア産、ケニア産）、ヒトスジシマカが 3 カ国（日本産：沖縄、長崎および東京、シンガポール産、ベトナム産）、ヤマダシマカが 1 カ国 2 地域（日本：佐賀および沖縄）である。

日本脳炎ウイルスの媒介蚊については、各種類の分布と発生状況を把握するために野外調査を実施した。西表島の古見、浦内、白浜で幼虫、成虫調査を 4 月 28 日—5 月 7 日、5 月 25 日—30 日の 2 回実施した。採集された日本脳炎ウイルス媒介蚊は分子分析のためにアルコール液に保存した。

イエカ類を対象としたプライマーの試作では、*Culex univittatus* subgroup に属する西表島産 *Cx. fuscocephala* オビナシエカ（日本脳炎ウイルスの媒介蚊）と *Cx. pipiens* group に属する沖縄本島産 *Cx. quinquefasciatus* ネットアイエカ（日本脳炎ウイルス、フィラリア、ウエストナイルウイルスの媒介蚊）を用いた。プライマーを用いて PCR を行いその産物から ITS 領域の塩基配列を明らかにし、種特異的なプライマーを試作した。

## C. 研究結果

釧路市動物園でのトラップ採集ではハマダラカは捕獲されなかった。釧路湿原野生生物保護センターではハマダラカの成虫および幼虫がともに捕獲され、形態的特徴からシナハマダラカ、オオツルハマダラカ、エセシナハマダラカの 3 種類に同定された。これらのサンプルの中から 23 個体を選び、rDNA ITS2 の塩基配列の比較を行ったところ、形態的にシナハマダラカと同定された 10 サンプルの塩基配列は本州のシナハマダラカの配列とは明らかに異なり、分子分類によってシナハマダラカと判定されたサンプルはなかった。これと同じ配列を示すハマダラカは 2004、2005、2008 年にほぼ同じ

場所で行った調査でも採集されていた (図 1)。残りのサンプルはすべてエセシナハマダラカであった。オオツルハマダラカはトラップによって 1 個体が採集されたのみだった。エセシナハマダラカもオオツルハマダラカも 2004 年以降実施してきた釧路湿原での調査では捕獲されることがない種類である。過去に北海道で行われたハマダラカの分布調査では、シナハマダラカの分布は北海道西部に限られていた。本研究で形態的にはシナハマダラカと判定されるサンプルが得られたことから、北海道東部に生息するハマダラカの種類と分布をさらに精査する必要があると思われる。

シマカ類のサンプルについて、目的の部位が種特異的に増幅されるか否かをマルチプレックス PCR によって確認した (図 2)。その結果、ヒトスジシマカ (レーン 1、2)、ネッタイシマカ (レーン 5、6)、ヤマダシマカ (レーン 7、8) いずれも種特異的な PCR 産物が得られた。ネッタイシマカおよびヒトスジシマカについて、由来の異なるサンプルを用いてマルチプレックス PCR をおこなった結果を図 3 に示す。両種ともに、どの地域から得られたサンプルに対しても、種特異的な PCR 産物が得られた (左側がネッタイシマカ、右側がヒトスジシマカ)。2 種のみを想定してマルチプレックス PCR おこなう場合は、図 2 で示した反応液容量で、不要なプライマーを省き代わりに水を増やすことで問題なく増幅できた。反応サイクルについては同じである。

西表島での野外調査を 4 月から 5 月にかけて 2 回実施した。幼虫、成虫捕獲調査で、種々の蚊が採集されたが、水田地帯で採集されたイエカ属の蚊は、第 1 回目の調査で 5 種、第 2 回目も 5 種である (表 1)。その中で日本脳炎媒介蚊として重要である *Cx. tritaeniorhynchus*、*Cx. vishnui*、*Cx. bitaeniorhynchus*、*Cx. fuscocephala* も多

数採集された。*Cx. pseudovishnui* は 2 回の調査では採集されなかった。

*Culex fuscocephala* と *Cx. quinquefasciatus* の分子分類法の確立を目標として、前者は 2 個体 4 クローンについて、後者は 2 個体 3 クローンについて、rDNA の ITS 領域の塩基配列を解析し、種の特徴部位を調べ、プライマーを設計し、検出感度の検討を行った。その結果、*Culex fuscocephala* は約 630bp、*Cx. quinquefasciatus* は約 470bp の位置にそれぞれの種に特異的な電気泳動像が得られた (表 2)。

#### D. 考察

シナハマダラカは三日熱マラリアの重要な媒介蚊であり、過去に北海道で発生した三日熱マラリアの媒介蚊とされ、1993 年以降韓国と北朝鮮の国境付近で大流行している三日熱マラリアの重要な媒介蚊とも考えられている。我々の釧路湿原での調査結果はシナハマダラカあるいはその類似種が北海道東部にも分布していることを示している。分子分類学的手法を用いた遺伝子レベルの検討によって、釧路湿原のハマダラカは本州産シナハマダラカとは異なる可能性が高いことから、今後外国産の近縁種との比較検討が望まれる。また、その他のハマダラカ類に関しても現在の分布の詳細を明らかにし、三日熱マラリア再興のリスク評価を行うことが重要な今後の研究課題として挙げられる。

デング熱媒介蚊を対象として試作されたプライマーは種特異的に ITS 領域の目的部位を増幅することが確認された。また、外国由来の系統の検出にも使用でき、汎用性があることが確認された。ネッタイシマカは成虫だけでなく幼虫や卵で持ち込まれる可能性も高いことから、本研究で試作したプライマーが成虫以外のサンプルにも適用

できるかどうかを検討することは重要だろう。

西表島での2回の野外調査では、日本脳炎媒介蚊である *Cx. tritaeniorhynchus*、*Cx. vishnui*、*Cx. bitaeniorhynchus*、*Cx. fuscocephala* が比較的容易に採集され、多数生息していることが明らかになった。*Cx. vishnui* は最近になって南方から侵入・定着した種類で、今後どこまで分布が北進するかを注意深く監視する必要があるだろう。イエカ類を対象としたプライマーは、損傷したサンプルの形態学的分類が困難な *vishnui* complex の蚊について既に作成したが、これに加えて *univittatus* subgroup に属する *Cx. fuscocephala* と *Cx. pipiens* group に属する *Cx. quinquefasciatus* の分子分類のためのプライマーが作成できた。イエカ類が媒介する重要なウイルスには日本脳炎ウイルス以外にもウエストナイルウイルスが知られているので、さらに広範囲の種類を対象としたプライマーの作成が望まれる。

#### E. 結論

北海道におけるシナハマダラカの分布は北海道西部に限られていたが、我々が2004年以来継続して調査している釧路湿原では、

形態分類によってシナハマダラカと同定されるハマダラカが採集された。釧路産シナハマダラカの塩基配列を本州産シナハマダラカの塩基配列と比較したところ、明らかに異なることがわかった。2005年に韓国で記載された新種ハマダラカとの詳細な比較検討が必要と思われる。

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い、感度の良いプライマーが作成できた。

#### 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

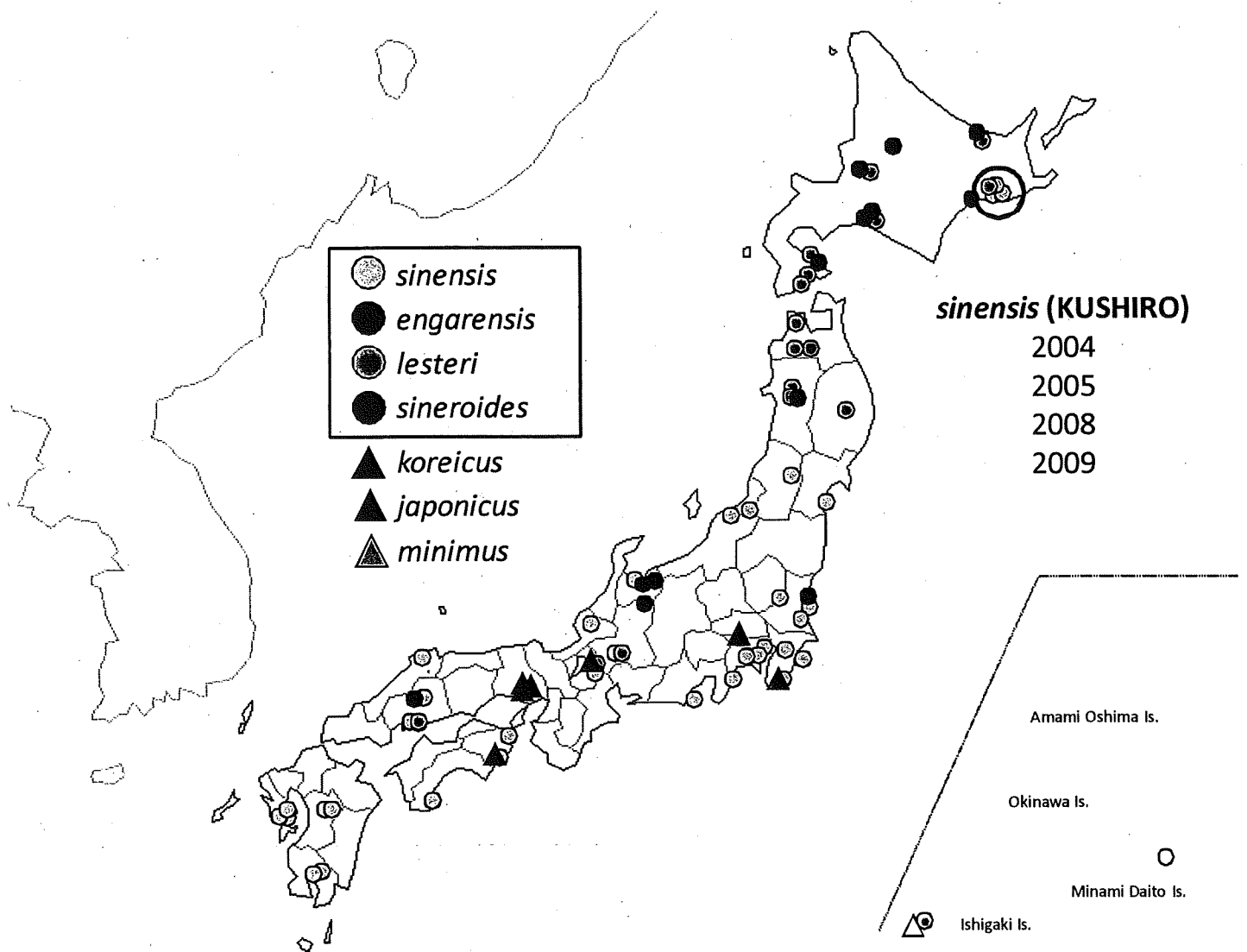
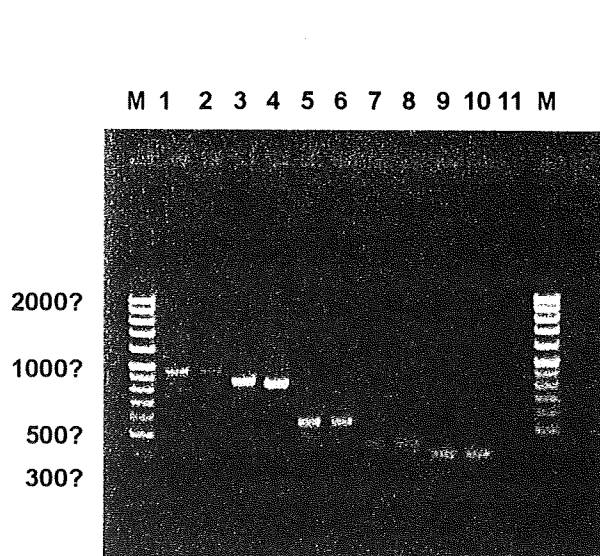


図 1. 国内におけるハマダラカ類の分布(2001-2009 年の調査結果)



1: *albopictus* (N-1), 2: *albopictus* (O-1),  
 3: *riversi* (N-1), 4: *riversi* (Is-2),  
 5: *aegypti* (TH-6), 6: *aegypti* (TH-7),  
 7: *flavopictus* (S-101), 8: *flavopictus* (O-101),  
 9: *daitensis* (KD-4), 10: *daitensis* (KD-5),  
 11: Negative control

### PCR reaction

TemplateDNA (5ng)	6.0
10 x PCR buffer	2.0
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.4
dNTP	2.0
18SFHIN (2pmol)	1.2
alb. r1 (2pmol)	1.2
riv. r1 (2pmol)	1.2
aeg. r1 (2pmol)	1.2
fla. r3 (2pmol)	1.2
dai. r1 (2pmol)	1.2
Taq. polymerase	0.1
water	0.3
20μl	

### PCR thermal cycles

96°C	12min	
96°C	30s	} 40 cycles
52°C	30s	
72°C	90s	
72°C	4min	
4°C	8	

図 2. 試作プライマーを用いたシマカ類の PCR による分子分類結果.

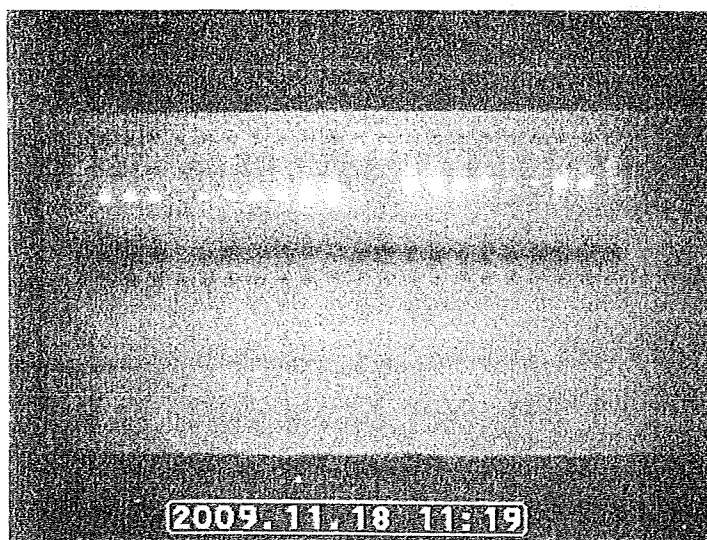


図 3. 海外より得られたネットアイシマカ (左側) およびヒトスジシマカ (右側) サンプルの PCR による同定結果.

表 1. 西表島の水田地帯で採集したイエカ属の蚊(2009年)

種名	調査日						JEV 媒介能	
	4月28日-5月7日			5月25日-30日				
	古見 成虫	浦内 成虫 幼虫		白浜 成虫	古見 成虫	浦内 成虫 幼虫		
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	○	○	○		○	○	○	+
<i>Cx. vishnui</i>		○	○			○	○	+
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	○			○	○			+
<i>Cx. fuscocephala</i>				○		○		+
<i>Cx. nigropunctatus</i>	○	○		○	○	○		

表内の成虫, 幼虫は成虫採集, 幼虫採集を意味する.

表 2. 日本脳炎媒介蚊 *Cx. fuscocephala* と *Cx. quinquefasciatus* 同定のためのプライマ-の作成

種名	供試虫	産地	DNAの抽出	N	CN	プライマ- 作成領域	作成したリバ- スプライマ-	生成物の サイズ
<i>Cx. fuscocephala</i>	成虫	西表島 (2009年)	ボーリング法 キット (Sigma)	2	4	rDNAのITS	CfscR1	約630bp
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	幼虫	沖縄本島 (2009年)		2	3	rDNAのITS	CfscR1	約470bd

N=解析個体数, CN=解析クローン数



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21年度 分担研究報告書

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 和裕, 大阪大学微生物病研究所 特任教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 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が, *P. falciparum* 集団の遺伝的構成に関しては不明な点が多い. 本研究では, *P. falciparum* 集団の多様性とその分布の定量的解析を行った. 世界9カ国から原虫株を集め, 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, 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 *P. falciparum* の遺伝的多様性に大きな影響を与えていなかった. 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と約6万年前の出アフリカ移動と大まかに一致した. 以上の結果は, *P. falciparum* はアフリカにおいて現生人類に古くから感染しており, ヒト集団の移動とともに世界に広まったという仮説を支持し, 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深く関わりながら形成されてきたことを示唆する.

A. 研究目的

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. マラリアの免疫獲得や将来のマラリア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. 以上から, マラリア原虫の遺伝的多様性とその地理的分布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った. これまでの *P. falciparum* の遺伝的多様性に関する研究から, 大陸間の原虫集団では多様性が異なり, 遺伝的に分化している点が明らかにされているものの, どの地

域において最大の多様性が見られるのかについては一致した結論が得られていない。この不一致の主な原因は原虫株の広範な地域からの分散的サンプリングが考えられる。また、*P. falciparum* の共通祖先の年代推定も一致していない。年代は遺伝的多様性を決定する大きな要因であるが、報告により約1万年前から30万年前とばらついてい。 *P. falciparum* はヒトのみを自然宿主とするので、*P. falciparum* 集団の履歴は人類集団の起源とアフリカからの拡散に大きく依存すると考えられる。人類集団の遺伝的多様性は、アフリカを起点として地理的に離れるにつれてゆるやかに減少することが最近の研究で明らかにされている。この緩やかな減少は、アフリカを起源とする人類の祖先集団が世界へ広がってゆく過程で、小規模で連続的なボトルネックを受けたことによるとされている。一方、マラリア流行地域の疫学的状況や伝播度の地域差は非常に大きく、これらが地域の原虫集団の遺伝的多様性に影響を与えている可能性もある。また、薬剤や殺虫剤によるマラリア対策による選択圧も影響していると思える。

本研究では、世界9カ国のマラリア原虫集団について2つのハウスピーニング遺伝子における単塩基多型を解析し、人類集団の履歴、及び、最近のマラリア疫学的状況の *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性に与える影響について検討した。

## 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)、ガーナは西沿岸部 Winneba 付近、182株(2004年)、パプアニューギニア地区 Sepik 州 Wewak 地区、195株(2001-2002年) (東京女子医科大学熱帯医学国際環境教室 美田敏広博士からの分与)。バヌアツの4島、141株 (Sakihama et al., 2001)。ベネズエラの10株はオリノコ河上流地域 (アリゾナ州立大学 Escalante 博士の分与)、ブラジルの151株はロンドニア州、アクレ州など各地から得た (サンパウロ大学 Ferreira 博士からの供与)。マラリア原虫ゲノム DNA は我々の方法によって抽出した (Sakihama et al., 2001)。

塩基配列を決定した遺伝子は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (*serca*, 約 3.7 kb)、及び、adenylosuccinate lyase (*adsl*, 約 1.4 kb) である。PCRによる *msp1* ハプロタイピングにより多重感染株を除いた単独遺伝子型感染の519株について、遺伝子全長塩基配列の決定をダイレクトシーケンス法で行った。

塩基多様度は2つの指標、塩基サイト当たりの多型サイト数 ( $\theta_s$ )、及び、塩基サイト当たりの平均置換数 ( $\theta_\pi$ ) を用いた。これらは DnaSP version 4.5 によって算出した。

世界各地の *P. falciparum* 集団の共通祖先の年代推定は、チンパンジーマラリア原虫 *P. reichenowi* の *serca* 及び *adsl* 遺伝子の塩基配

列を決定し、それを外群にして *P. falciparum* との種間、及び、*P. falciparum* 集団内の遺伝的距離を測定して求めた (Tanabe, et al., 2004). このとき、*P. reichenowi* と *P. falciparum* の分岐年代を 250 万年前から 600 万年前とした.

### C. 研究結果

SNP (単塩基多型) サイトの数は、*serca* では 49 サイト、*adsl* では 14 サイトの計 63 サイトであった。予備的解析により、同義置換率は非同義置換率よりも有意に高くはなかったため、解析では全置換サイトを用いた。なお、同義置換サイトのみの解析は、全置換サイトの解析結果とほとんど同じ結果を出している。

二つの遺伝子座位の塩基多様度は、アフリカが他の地域よりも高かった。二つの遺伝子座位の間の塩基多様度には有意な差がなかったため、以下の解析では、データを集合して用いた。

アフリカからの地理的距離に依存して世界各地の *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性が減少しているかどうかを調べた。地域の原虫集団のアフリカからの距離は人類集団のアフリカからの移動ルートに沿って測った。*P. falciparum* 集団の $\theta\pi$ は、タンザニアを起点として東南アジア、オセアニアに至り、高い負の相関 ( $R^2 = 0.83$ ,  $P = 0.004$ ) で地理的距離に依存して減少していた。南米では負の相関が認められなかった。ガーナを起点としても有意な相関 ( $R^2 = 0.69$ ,  $P = 0.02$ ) が認められたが、タンザニア起点の方が高かった。この傾向は、 $\theta_s$  でも同様であった。

*P. falciparum* 集団の遺伝的多様性が地理的距離以外の要因によって決定されている可能性があるため、マラリア流行度とマラリア伝播度が相関するかどうか検討した。その結果、文献的に調査した Annual parasite incidence (API), Entomological inoculation rate (EIR) はともに原虫の遺伝的多様度とは有意に相関しなかった。

地域の *P. falciparum* 集団の年代推定の結果は、アフリカが 5.5 万年 - 14.6 万年、東南アジアが 3.1 万年 - 8.1 万年、オセアニアが 1.8 万年 - 6.2 万年、ブラジルが 4.6 万年 - 12.5 万年であった。この中で、ブラジルは南米における人類集団の出現年代と一致しない。南米における *P. falciparum* はおそらく、奴隷貿易時代の断続的なアフリカ人の移動に伴って移動したものと思える。また、バヌアツにおいても人類の出現時期 (約 4 千年前) と原虫の年代推定が一致しない。それ以外の地域では、*P. falciparum* 集団の年代は人類集団の年代とおおまかに一致した。

### D. 考察

本研究から、*P. falciparum* 集団の遺伝的多様性はおもに過去の人類集団の起源と移動に依存して形成されており、薬剤や殺虫剤による最近のマラリア対策は大きく影響していないことが明らかになった。例えば、ソロモン諸島ではマラリアコントロール計画により 1970 年代後半にはマラリア罹患率が大きく減少したが、このことによってアフリカからの地理的距離に依存した原虫の遺伝的多様性の低下という相関の例

外となることはなかった。本研究の結果はさらに、世界各地で生息種が異なるマalaria媒介蚊の種類は *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性にそれほど影響を与えていないことも示唆する。

#### E. 結論

本研究から、南米以外の世界各地における *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性の約8割が東アフリカからの地理的距離によって決定されていることが明らかとなった。さらに、この距離依存性と原虫集団の共通祖先の年代推定の結果は現生人類のアフリカ、アジア、オセアニアにける存在と一致する。本研究の結果を総合すると、*P. falciparum* は約6万年前の現生人類の出アフリ移動より前にすでに人類に感染しており、人類の出アフリ移動に伴って南米以外の熱帯世界に広まったことを強く示唆する。*P. falciparum* の起源が現生人類の起源と一致することを示唆する先行研究はあるが、本研究は過去の人類の移動が原虫集団の遺伝的多様性の分布に非常に大きな影響を与えていることを初めて示すものである。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

論文発表

1. Moritoshi Iwagami, Pilarita T. Rivera, Elena A Villacorte, Aleyla S Escueta, Toshimitsu Hatabu, Shin-ichiro Kawazu, Toshiyuki Hayakawa,

Kazuyuki Tanabe, Shigeyuki Kano. (2009) Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in the Philippines. **Malaria J.** 8: 96.

2. Toshihiro Mita, Kazuyuki Tanabe, Kiyoshi Kita. (2009) Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. **Parasitol. Int.** 58: 201-209.

3. Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kosuke Haruki, Kazuyuki Tanabe, Yuichi Chigusa. (2009) Cross-reactivity in rapid diagnostic tests between human malaria and zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infections. **Parasitol. Int.** 58: 300-302.

4. Richard Culleton, Mathieu Ndounga, Fadile Yildiz Zeyrek, Cevayir Coban, Prisca Nadine Casimiro, Satoru Takeo, Takafumi Tsuboi, Anjali Yadava, Richard Carter, Kazuyuki Tanabe (2009) Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of Congo, West Central Africa. **J. Infect. Dis.** 200 (9): 1465-1469.

5. Toshiyuki Hayakawa, Nobuko Arisue, Toshifumi Udono, Hirohisa Hirai, Jetsumon Sattabongkot, Tomoko Toyama, Takafumi Tsuboi, Toshihiro Horii, and Kazuyuki Tanabe. (2009) Identification of *Plasmodium malariae*, a human malaria parasite, in imported chimpanzees. **PLoS One** 4 (10): e7412.

6. Hideya Mitsui, Nobuko Arisue, Naoko Sakihama, Yuji Inagaki, Toshihiro Horii, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe, and Tetsuo Hashimoto. (2010) Phylogeny of Asian primate malaria parasites inferred from apicoplast

genome-encoded genes with special emphasis on the positions of *Plasmodium vivax* and *P. fragile*. **Gene** 450: 32-38.

7. Kenji Hikosaka, Yoh-ichi Watanabe, Naotoshi Tsuji, Kiyoshi Kita, Hiroe Kishine, Nobuko Arisue, Nirianne Marie Q. Palacpac, Shin-ichiro Kawazu, Hiromi Sawai, Toshihiro Horii, Ikuo Igarashi, Kazuyuki Tanabe. (2010) Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. **Mol. Biol. Evol.** (in press).

8. 田邊和祐,美田敏宏. 集団遺伝学的アプローチが明かす新しいマラリア感染像 (2009) **医学のあゆみ**, 229: 247-251.

9. Hiromi Sawai, Hiroto Otani, Nobuko Arisue, Nirianne Palacpac, Leonardo de Oliveira Martins, Sisira Pathirana, Shiroma Handunnetti, Satoru Kawai, Hirohisa Kishino, Toshihiro Horii and Kazuyuki Tanabe. (2010) Lineage-specific positive selection at the merozoite surface protein 1 (*msp1*) locus of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. **BMC Evol. Biol.** (in press).

#### 学会発表

1. Nirianne M. Q. Palacpac, Nobuko Arisue, Kazuyuki Tanabe, Hiromi Sawai, Richard Culleton, Rachanee Udomsangpetch, Jetsumon Sattabongkot, Fadile Zeyrek, Cevayir Coban, Tetsuo Hashimoto, and Toshihiro Horii. Comparative analysis of human vivax malaria infections in different endemic areas. The 9<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and

Immunity. 2009.9.9.

2. Nobuko Arisue, Nirianne M. Q. Palacpac, Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, and Toshihiro Horii. The SERA gene family: Important clues from several *Plasmodium* species. The 9<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2009.9.9.

3. Hiromi Sawai, Hiroto Otani, Toshihiro Horii, and Kazuyuki Tanabe. Evolution of the merozoite surface protein 1 gene (*msp1*) in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. The 9<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2009.9.9.

4. Yoko Tsumori, Mathieu Ndounga, Toshihiko Sunahara, Rie Isozumi, Haruki Uemura, Kazuyuki Tanabe, Osamu Kaneko, and Richard Culleton. Molecular epidemiology of urban malaria in west Africa. The 9<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2009.9.9.

5. 遠山知子,永宗喜三郎,田原美智留,堀井俊宏,田邊和祐, 植物生長調節物資の抗マラリア作用,第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム,2009.10.10

6. 美田敏宏,田邊和祐,遠藤弘良, アフリカにおける独立起源ピリメタミン耐性熱帯熱マラリア原虫,第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム,2009.10.10

7. Akira Kaneko, Luis F. Chaves, George Taleo, Hedvig Perlman, Hideaki Eto, Satoru Takeo, Takafumi Tsuboi, Chris Drakeley, Kazuyuki Tanabe, Marita Troye-Blomberg. *Plasmodium vivax* resurgence, a decade after malaria elimination on Aneityum island. 第8回分子寄

生虫・マalaria研究フォーラム,2009.10.9

8. 橋本哲男,有末伸子,三井英也,Nirianne M. Q. Palacpac,青枝大貴,長谷川政美,堀井俊宏,田邊

和祐,マalaria原虫アピコプラストゲノムの比較解析,第8回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム,2009.10.9.

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21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、遺伝子を何ら改変することなくゲノムワイドに熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質約1100種を発現することに成功した。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、その内374種類の組換えタンパク質とタイから得られた19人分のマラリア免疫血清によりスクリーニングを試行した。その結果、少なくとも一人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。

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約200種類のcDNAを増

幅し、プラスミドベクターにクローン化した。また、cDNAクローン数を増加させるため、赤血球期原虫から完全長cDNAライブラリを作製し、約1000種類の独立したcDNAクローンを得た。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

昨年度と同様、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。

3) タイ国において入手したマラリア流行地からの感染者血清の使用

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昨年度同様使用した。

(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

約 1200 種の熱帯熱マラリア原虫赤血球期 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、現在までに約 1100 種 (約 90%) の組み換えタンパク質をタンパク質合成と同時にビ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の内 374 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 19 人分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、少なくとも一人以上の血清と反応した抗原分子が 161 種類選択された。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、既に保有している約 1100 種類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、太平洋島嶼部等のマラリア流行地からも免疫血清を入手し、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) Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T. Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research. *Expert Opin Drug Discov.* 2009, 4:1191-1199.
- 2) Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, west central Africa. *J Infect Dis.* 2009, 200:1465-1469.
- 3) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. *Parasitol Int.* 2009, 58:243-248.
- 4) Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, 106:7167-7172.
- 5) Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int.* 2009, 58:196-199.
- 6) Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites.

*Parasitol Int.* 2009, 58:29-35.

2. 学会発表

- 1) Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Erythrocyte-binding-like molecule and virulence of *Plasmodium yoelii*. Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 2) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T. Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates. Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 3) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Igarashi I, Kano S. Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development. Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 4) Suktawonjaroenpon W, Watanabe R, Han ET, Buates S, Krasaesub S, Takeo S, Sirichaisinthop J, Tsuboi T, Sattabongkot J. Update on field evaluation of LAMP for malaria diagnosis in Thailand. Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.

- 5) Tsuboi T, Wu Y.  
Pfs230:Prefertilization  
Transmission-blocking Vaccine Candidate.  
Malaria Transmission Blocking Strategies.  
Bangkok, Thailand, March 12-13, 2009.
- 6) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Tachibana M,  
Sattabongkot J, Torii M.  
Wheat germ cell-free protein synthesis  
system: a breakthrough for the post-genome  
malaria vaccine candidate discovery.  
Vivax malaria research III: 2009 and beyond,  
Gamboa, Panama, May 24-28, 2009.
- 7) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G,  
Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H,  
Torii M, Tsuboi T.  
Immunization with N-terminal region of a  
gametocyte protein Pfs230 successfully  
induce transmission-blocking antibodies  
against *Plasmodium falciparum*.  
The 9th Awaji International Forum on  
Infection and Immunity, Awaji, Japan.  
September 8-11, 2009.
- 8) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G,  
Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H,  
Torii M, Tsuboi T.  
Immunization with N-terminal region of a  
gametocyte protein Pfs230 successfully  
induce transmission-blocking antibodies  
against *Plasmodium falciparum*.  
ASTMH 58th annual meeting, Washington  
DC, USA, November 18-22, 2009.
- 9) Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Tachibana  
M, Miura K, Varma S, Sattabongkot J, Torii  
M, Tsuboi T.  
Identification of novel blood-stage vaccine  
candidates against *Plasmodium falciparum*  
by high-throughput immunoscreening.  
ASTMH 58th annual meeting, Washington  
DC, USA, November 18-22, 2009.
- 10) Aguiar JC, Bolton J, Wanga J, Urquhart A,  
Sacci JB, Limbach K, Tsuboi T,  
Ockenhouse C, Richie TL.  
Discovering novel pre-erythrocytic antigens  
for malaria vaccines.  
ASTMH 58th annual meeting, Washington  
DC, USA, November 18-22, 2009.
- 11) 宮田 健、小濱秀泰、原國哲也、坪井  
敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、  
鳥居本美、松崎吾朗、新川 武  
マラリアワクチン開発のための三部構  
成五価免疫賦活複合体  
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、  
3/27-28、2009。
- 12) Sungkapong Tippawan、Culleton Richard、  
矢幡一英、坪井敬文、鳥居本美、  
Sattabongkot Jetsumon、金子 修、  
Chotivanch Kesinee  
Characterization of *Plasmodium vivax*  
subtelomeric transmembrane protein  
(PvSTP), a homolog of *P. falciparum*  
SURFIN.  
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、  
3/27-28、2009。
- 13) 横内ゆき、大槻 均、橘 真由美、伊  
与久菜摘、韓 銀澤、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  
虫感染率の迅速簡便測定法の確立  
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、  
3/27-28、2009。
- 14) 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、

- Sattabongkot Jetsumon、鳥居本美、坪井敬文  
 高速免疫スクリーニングによる新規熱帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗原の探索  
 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 15) 橘真由美、Wu Yimin、入子英幸、大槻均、Sattabongkot Jetsumon、竹尾 暁、鳥居本美、坪井敬文  
 コムギ無細胞系を用いた抗体誘導可能な熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 Pfs230 の作製  
 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 16) Kangwanransan Niwat、Jenwithisuk Rachaneeporn、橘真由美、坪井敬文、鳥居本美  
 A novel ookinete surface protein with high potential of transmission-blocking vaccine candidate.  
 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 17) 小濱秀泰、宮田 健、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川 武  
 酵母 *Pichia pastoris* 発現三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン Pvs25 の感染防御効果  
 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 18) 高橋優三、奥祐三郎、青木 孝、赤尾信明、嶋田淳子、鈴木 守、松岡裕之、有園直樹、坪井敬文、金澤 保、由井克之、竹内 勤  
 日本における寄生虫学・医動物学教育の現況調査報告  
 第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 19) 加藤 晶、竹尾 暁、坪井 敬文  
 マラリア原虫メロゾイトにおける新規 Inner Membrane Complex 関連分子の探索  
 第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 20) 竹尾 暁、坪井 敬文  
 網羅と決め打ち：コムギ胚芽無細胞系組換えタンパク質合成法を用いた、マラリア原虫赤血球期発現分子の解析  
 第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 21) 金子 隆昌、坂本 寛和、竹尾 暁、坪井敬文  
 マラリア原虫に対する増殖阻害率を測定済みの抗体を用いた新規ワクチン候補抗原の探索  
 第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 22) 埜本 竜宏、竹尾 暁、坪井 敬文  
 熱帯熱マラリア原虫メロゾイトにおける新規抗原タンパク質の性状解析  
 第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 23) 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum K、三田村俊秀、坪井敬文、朝日博子、太田伸生  
 熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* におけるオートファジーの役割  
 第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/6-9、2009。
- 24) 佐野 桂、畑 昌幸、坪井敬文、上田貴志、由比良子、伊藤喜重、中野明彦、北 潔、室伏きみ子、佐々木成江

- 熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリア DNA polymerase の解析  
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 25) 大槻 均、石野智子、金子 修、橘 真由美、坪井敬文、鳥居本美  
ネズミマラリア原虫赤血球結合タンパク(EBL)の細胞内輸送ドメインの機能解析  
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 26) 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum K、三田村俊秀、坪井敬文、太田伸生  
熱帯熱マラリア原虫のオートファジー関連分子  
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 27) Akira Kaneko、Luis Fernando Chaves、George Taleo、Hedvig Perlmann、Hideaki Eto、Satoru Takeo、Takafumi Tsuboi、Chris Drakeley、Kazuyuki Tanabe、Marita Troye-Blomberg  
*Plasmodium vivax* resurgence a decade after malaria elimination on Aneityum island.  
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 28) 竹尾 暁、坂本寛和、金子隆昌、埜本竜宏、Jetsumon Sattabongkot、坪井敬文  
熱帯熱マラリア原虫の赤血球期分子：免疫スクリーニングから新規抗原分子の解析  
第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、豊中市、10/9-10、2009。
- 29) 竹尾 暁、坂本寛和、金子隆昌、坪井敬文  
赤血球期マラリアワクチン候補抗原分子を探索する免疫スクリーニング  
第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12、2009。
- 30) 大槻 均、金子 修、Amporn Thongkukiatkul、橘 真由美、入子 英幸、竹尾 暁、坪井 敬文、鳥居 本美  
マラリア原虫の赤血球侵入に必須な分子(EBL)の細胞内移行と病原性を決定する部位の同定  
第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12、2009。