

results obtained by our research group that were conducted from 2006-2009, out of 31 patients who admitted to the hospitals with the rabies like symptoms, only 23 patients were confirmed to be infected with RABV. Any evidence of RABV infection could be found neither by RT-PCR nor by serological detection of anti-RABV antibody in the sera taken from the rest of those patients. This raises a question as to whether other members of the *Lyssaviruses* might be circulating in Vietnam. We, therefore, planned the project named “*Investigation of Lyssaviruses in some bat species in Northern Vietnam*”.

OBJECTIVES

Our objects were

1. To continue completing the standard operation protocol (SOP) of RT-LAMP and to establish its diagnostic criteria.
2. To develop the SOPs for detection of other members of the *Lyssaviruses* in some bat species including sample collection, transportation and shipment to our laboratory, as well as the SOPs for *Lyssavirus* detection by FAT, RT-PCR and sequencing.
3. To look for bat *Lyssaviruses* in some northern provinces and analyze molecular biologic characteristics of Vietnamese bat *Lyssaviruses* if we could obtain any.

PART 1

ESTABLISHMENT OF RT-LAMP AND EVALUATION OF ITS DIAGNOSTIC CRITERIA

1. Materials and methods

- * *Primer design*: Primers for RT-LAMP were designed in collaboration with NIID based on partial N gene nucleotide sequences of 28 RABVs

which were isolated from humans and dogs contracted rabies in Northern Vietnam.

- * *Protocol development:* RT-LAMP was performed based on the protocol provided by the manufacturer of the RT- LAMP kit (Eiken).
- * *Evaluation of RT-LAMP:*
 - RT-LAMP techniques originally developed for detection of RABV in NIID were transferred to NIHE. The relevance of this method for rabies diagnosis in Vietnam was validated using fixed RABV (CVS, Vnukovo-32) as well as samples from rabies suspected humans and animals.
 - Staff practical skills were evaluated by using positive and negative controls
 - The effectiveness of new methods for rabies diagnosis was evaluated by comparison of the results with those obtained by RT - PCR.
- * *Application of the new techniques for rabies diagnosis in NIHE*
 - Intra vital samples of saliva (SLV) and cerebrospinal fluid (CSF) were collected from rabies suspected humans in national hospitals which are located in the north of the country.

2. Results

2.1. *The RT- LAMP technique was developed as bellow:*

- ❖ *Primers designed for RT-LAMP:* Primers were designed based on the partial nucleotide sequence of N gene of 28 rabies strains isolated in Vietnam. Eleven primers for RT-LAMP were designed and shipped to the rabies laboratory at NIHE in 2009. Table 1 shows the name and nucleotide sequence of primers for Vietnam RT-LAMP.

Table 1: 11 primers for RT- LAMP to detect Vietnam rabies strains.

No	Primers	Nucleotide sequence
1	Viet F3-1	ACA TGT CCG GAA GACT
2	Viet F3-2	ACC TGC CCT GAG GAC T
3	Viet FIP-1	ACC AGA GAA CCA GGG GTG AGG ACC AGC TAT GGA ATC
4	Viet FIP-2	ACA AGA GAA TCA GGG GTG AGG ACC AGT TAT GGA ATC
5	Viet FIP-3	ACA AGA GAA TCA GGG GTG AGG ACC AGT TAT GGA AT
6	Viet BIP-1	AAG GGA ATT GGG CTC TGA CCT AAG GAC GCA TGC TCA G
7	Viet BIP-2	AAG GGA ATT GGG CTT TGA CCT AAG GAT GCA TGC TCA G
8	Viet BLP-1	GGC ATG GAA CTG ACA AGA GAC C
9	Viet BLP-2	GGT ATG GAG TTG ACG AGG GAC C
10	Viet B3-1	CAG ACT CAA GAG AAG ACC
11	Viet B3-2	CAG ACT TAA GAG AAG CCC

❖ *The SOP for RT- LAMP was MODIFIED from the prototype SOP as bellow:*

The RT-LAMP was carried out in a 50 µl reaction volume using the Loopamp RNA amplification kit protocol (Eiken, Japan). The reaction mixture consisted of eleven primers mentioned above (40pmol each of the FIP and BIP primers, 5pmol each of the F3 and B3 primers, 20pmol of the BLP primers), 1.0 µl of enzyme mixture containing Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse

transcriptase and Bst DNA polymerase, 25 μ l of 2X reaction mixture (40mM Tris-HCl, 20mM KCl, 16mM MgSO₄, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween20, 1.6M Betaine, 2.8mM of each dNTPs) and 10 μ l of RNA sample. The mixture was incubated at 63⁰C for 1 hour and the reaction was stopped by heating at 80⁰C for 5 min. Then, RT-LAMP product was detected by the ethidium bromide staining and visualized under a UV transilluminator after 1.5% agarose gel electrophoresis with TAE buffer.

2.2. Evaluation of RT- LAMP and primers used for this technique

We used the laboratory strain (Vnukovo-32) of RABV as the template to assess the sensitivity of RT-LAMP. All eleven primers were used in the reaction mix and we duplicated the volume of the reaction mix into 50 μ l compared with 25 μ l of reaction mix in the original protocol. The results show that the detection limit of RT-LAMP when using all 11 primers was at 10⁻⁵ RNA dilution, equivalent to 2x10¹ RNA molecules (Figure 1).

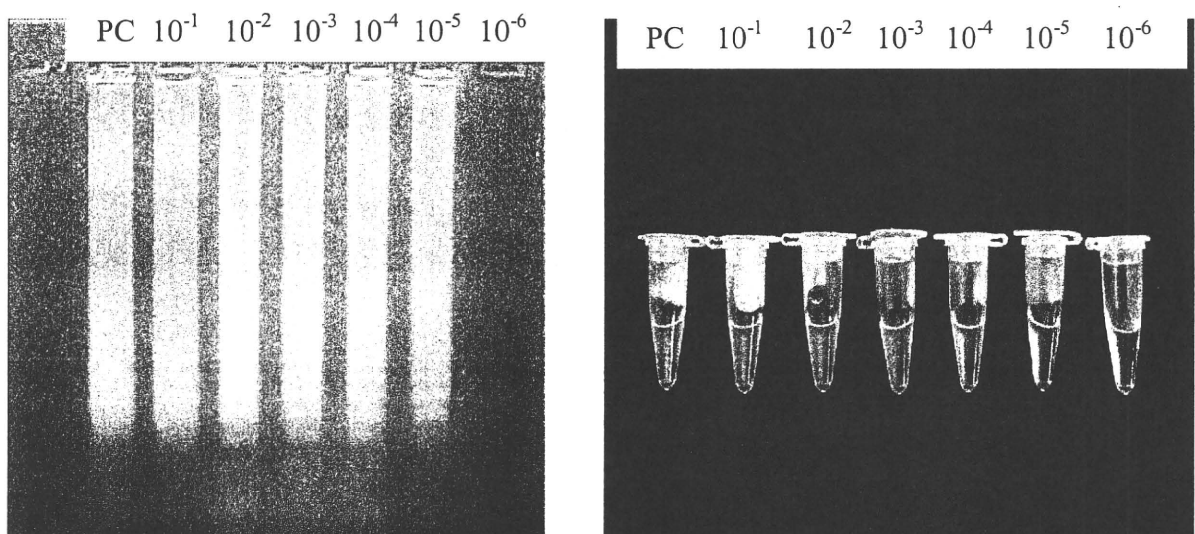


Figure 1: The electrophoresis of RT-LAMP products obtained from the 10-fold serial dilutions of RABV RNA. Starting point was 2x10⁶ RNA molecules.

Forty saliva (SLV) and 39 cerebrospinal fluid (CSF) samples taken from the rabies suspected humans were used to determine the technical criteria of RT-LAMP by comparison with RT-PCR. The results are shown in table 2.

Table 2: Test results of samples collected from rabies suspected humans by RT-LAMP and RT-PCR

TEST RESULTS	SLV		CSF	
	RT-PCR	RT-LAMP	RT-PCR	RT-LAMP
POSITIVE	20	21	14	15
NEGATIVE	20	19	25	24
TOTAL	40	40	39	39

Two samples (one SLV and one CSF) tested positive for RABV by RT-LAMP, but negative by RT-PCR (figure 2). So, the sensitivity of the modified RT-LAMP appeared higher than that of RT-PCR.

To confirm that two samples which tested positive by RT-LAMP did contain RABV specific genetic materials, we will carry out nucleotide sequencing of the products amplified by RT-LAMP. The protocol of direct sequencing of RT-LAMP products is now under development, and the results will be reported soon after we get successfully.

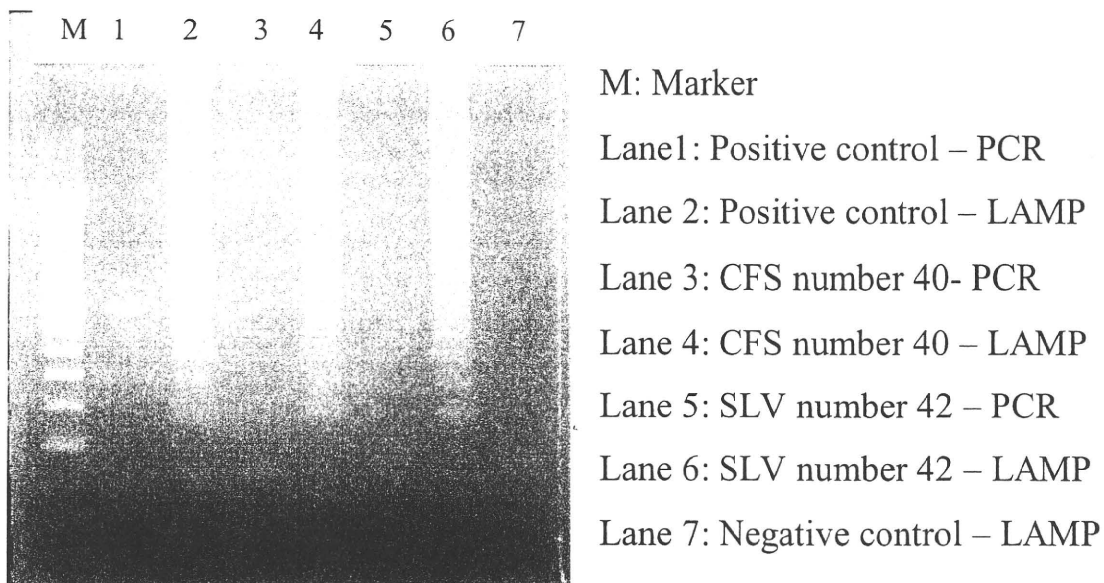


Figure 2: Electrophoresis results of samples which were negative by RT-PCR, but positive by RT-LAMP.

PART TWO

DEVELOPEMENT OF SOP FOR *LYSSAVIRUS* DETECTION AND SEARCH FOR *LYSSAVISUSES* IN SOME BAT SPECIES IN SOME PROVINCES LOCATED IN NORTHERN VIETNAM.

1. Material and methods

RNA of five genotypes of *Lyssaviruses*, RABV (CVS strain), Mokola, Lagos, Duvenhage, BLV1 were ordinarily extracted and converted to cDNAs by NIID. Then, all those cDNAs were sent to NIHE and to be used as the positive control in the development of SOP to detect *Lyssaviruses*.

The primers for detection of 7 genotypes of *Lyssaviruses* were designed by NIID then were sent to NIHE for technique development and evaluation.

Search for *Lyssaviruses* in bats was done through the field visits to Halong and Bac Giang/Lang Son provinces. The administrative procedure of bat

collection was constructed between NIHE and the local authorities and SOPs for bat collection and transportation to NIHE were conducted and implemented.

The bat brain operation SOP was developed by NIHE and brain operation processes were carried out in the BSL3.

The *Lyssaviruses* detection in bat brains were conducted in parallel by FAT and RT-PCR.

2. Results

2.1. SOPs of samples collection, packaging and shipment to NIHE were developed. The details of the protocols are attached in the appendix.

2.2. SOPs for bat brain operation were constructed. The detail of the protocol is attached in the appendix.

2.3. SOP of RT-PCR for lyssaviruses detection is described below:

Table 3: 5 primers were designed and used for lyssaviruses amplification:

No	Primer	Nucleotide sequence	Note
1	JW12 (C)	5' – ATG TAA CAC CCC TAC AAT G – 3'	targeted to N gene
2	JW6 (DPL)	5' – CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG – 3'	targeted to N gene
3	JW6E	5' – CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG – 3'	targeted to N gene
4	JW12 (T)	5' – ATG TAA CAC CTC TAC AAT G - 3'	targeted to N gene
5	JW6 (M)	5' – CAG TTA GCG CAC ATC TTA TG – 3'	targeted to N gene

Positive control of RT - PCR: following strains representing five genotypes of *Lyssaviruses* were used as the positive controls:

- Mokola (c DNA)
- Lagos (c DNA)
- CVS (c DNA)
- EBL1 (c DNA)

- Duvenhage (c DNA)
- Vnukovo (RNA)

RNA extraction from brain tissue was done following the SOP attached in the appendix

RT- PCR reaction

Mixture	1 reaction
Water	11 μ l
dNTPs	2 μ l
5X Buffer	10 μ l
Primer (JW12C – 30 μ M)	1 μ l
Primer (JW12T – 30 μ M)	1 μ l
Primer (JW6DPL – 30 μ M)	1 μ l
Primer (JW6E – 30 μ M)	1 μ l
Primer (JW6M – 30 μ M)	1 μ l
Enzym mix	2 μ l
Template	20 μ l
Total	50 μ l

Temperature cycle

50⁰C 30'

95⁰C 15'

94 ⁰ C	30''	} 40 cycles
50 ⁰ C	30''	
72 ⁰ C	1' }	

72°C 10'

4°C Hold

The sensitivity of RT - PCR:

The detection limit of RT-PCR for *Lyssaviruses* was determined by using five cDNA of each virus strains (Mokola (c DNA) ; Lagos (c DNA); CVS (c DNA; EBL1 (c DNA) ; Duvenhage (c DNA) and Vnukovo (RNA).

Figure 3 shows that the samples diluted 100,000-fold still gave rise to amplification of a band with expected size. This corresponds to 33×10^{-5} ng of viral RNA of Duvenhage strain.

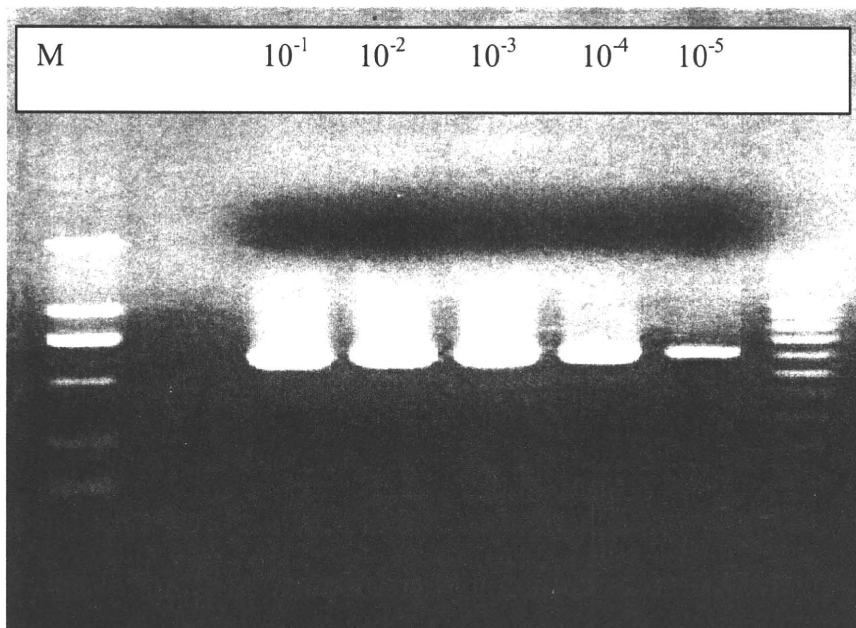
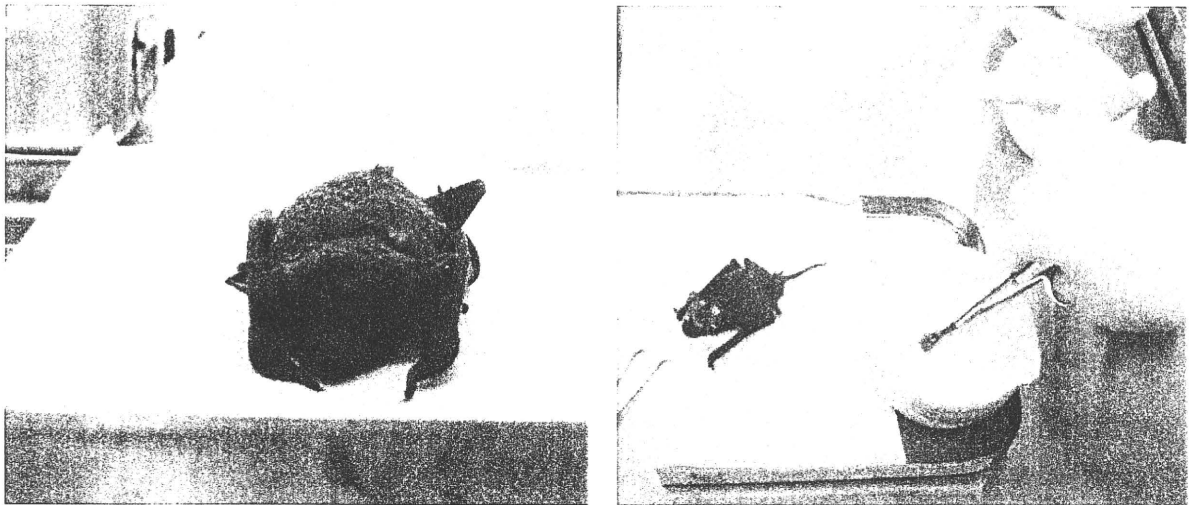


Figure 3: Electrophoresis of RT – PCR products to determine the detection limit of bat *lyssaviruses*.

2.4. Lyssaviruses in bats

Two different bats were captured in caves in Bac Giang/Lang Son border and were identified as *Molossidae Tararid Plicata* (dog face) and *Emballoniridae Taphozous Theobaldi* (mouse face).



**Figure 4: Pictures of dog face bat and the bat brain operation process
in BSL3**

One hundred bats consisting of 19 *Emballoniridae Taphozous Theobaldi* and 81 *Molossidae Tararid Plicata* were collected. All of one hundred samples were analyzed by RT-PCR, RT-LAMP and FAT. The results showed that 96 samples did not contain nucleoprotein antigen or genetic materials of *Lyssaviruses*. Four samples seemed to be suspected samples. To confirm whether those suspected samples actually contains viruses belonging to *Lyssaviruses*, the nucleotides sequence will be analyzed after further amplification followed by sequencing. The results will be reported soon after the completion. The document of *Lyssavirus* detection by RT-PCR, FAT and RT-LAMP is attached in the appendix.

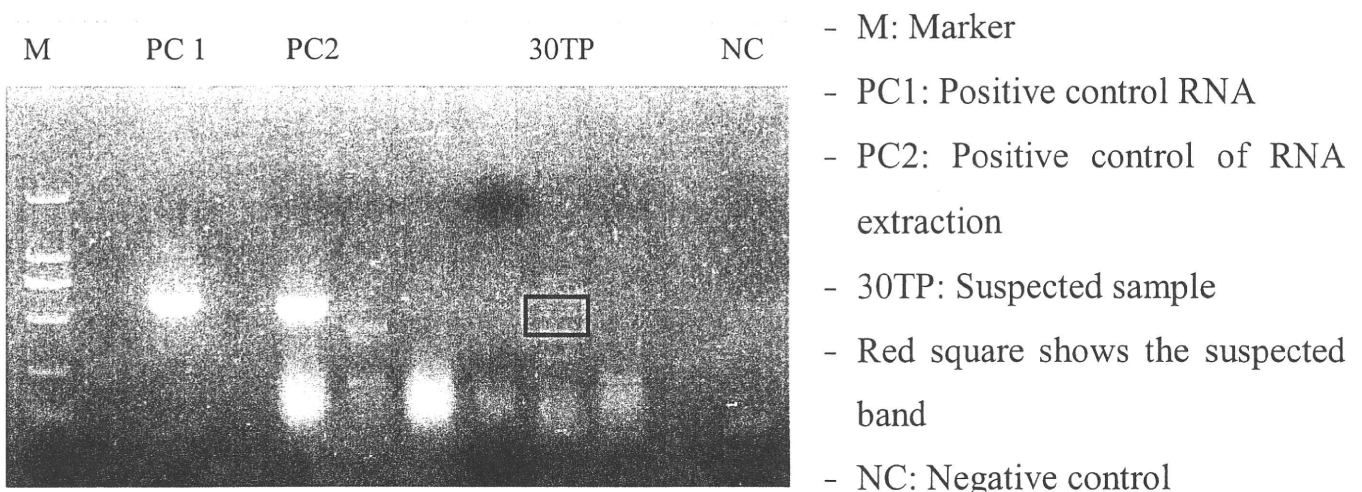


Figure 5: Electrophoresis of RT – PCR products obtained from bat brain RNAs

CONCLUSIONS

1. We found two human samples which tested positive for the presence of RABV in RT-LAMP but not in RT-PCR. We will confirm the presence of RABV-specific sequences in these two samples by nucleotide sequencing of the products amplified by RT-LAMP.
2. It was suggested that several bats captured in some caves in Bac Giang/Lang Son provinces might be infected with viruses belonging to the genus *Lyssaviruses*. Further studies will be needed to clarify whether viruses of *Lyssaviruses* are harbored by bats thriving in northern Vietnam, particularly studies focused on bats as well as seroepidemiological studies on human subjects.

PUBLICATIONS

1. NguyenThi Kieu Anh^{1*}, Nguyen vinh Dong¹, Ngo Chau Giang¹, Nguyen Van Dung², Nguyen Thi Thanh Huong¹, Pham Quoc Bao³, Satoshi Inoue⁴, Akio Yamada⁴, Dinh Kim Xuyen¹, Nguyen Thi Hong Hanh¹, Nguyen Tran Hien¹ (2010) “*Characterization nucleoprotein of isolated rabies virus in Vietnam 2006 – 2009*”, Journal of Preventive Medicine, Vietnam. volume XX , No 6(114) 2010, pp: 164- 170.
2. Anh K.T. Nguyen^{*1}, Dong V. Nguyen¹, Giang C. Ngo¹, Satoshi Inoue², Akio Yamada², Hien T. Nguyen¹, Xuyen D. Kim¹, Dung V. Nguyen³, Thao X. Phan³, Bao Q. Pham⁴, and Hanh T. H. Nguyen¹. “*Molecular Epidemiology of rabies virus in Vietnam 2006 – 2009*” will be submitted soon to Japanese Journal of Infectious Diseases.

3. Partial nucleotide sequences of twenty two wild type rabies viruses which were isolated in Vietnam were uploaded into genebank. The accession number is attached in the appendix.
4. The master thesis in microbiology namely "*Study on RT – LAMP method applied for rabies diagnosis*" will be defended at the end of 2011. The author of this thesis is Dr. Ngo Chau Giang, one of the researcher who worked for this cooperative project.

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 22 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	招聘教授

研究要旨 アジアの研究機関との連携を強化し、アジア・太平洋地域におけるマラリア制圧の動きを加速するべく、病原体遺伝子情報の共有、検査法の開発・評価や標準化を目的とした研究をすすめた。実際の研究は、前年度までと同様、大きく以下の3つのグループに分けて進められた。

① マラリアの疫学的指標や Rapid assessment 手法、及び検査診断法の開発と評価

ソロモン諸島、ガダルカナル島のマラリア浸淫地で、迅速診断キットである Mal Pf/Pv antigen と Entave Malaria の2つについて信頼性を検討したが、原虫密度の低い三日熱マラリアについては、感度が低く信頼性が乏しかった。また、感染者の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価は、3年程度で陰性化する例が多く、低浸淫地を中心に、マラリア対策のモニタリングに利用できることがわかった。さらに、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）で、約 1700 種の熱帯熱マラリア原虫蛋白について検討した結果、アフリカ、マリ共和国のマラリア流行地から得た血清で、反応する 47 種の蛋白を検出し、同法による網羅的検索の有用性を確認した。

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

採集されたハマダラカで形態分類の結果と rDNA ITS2 領域（約 550bp）および mtDNA COI 遺伝子（約 500bp）をダイレクトシーケンスで解析した結果を比較し、マラリア原虫を媒介するハマダラカ類 hyrcanus グループの分子分類を行う手法を確立した。そして、北海道釧路湿原には、これまで日本国内では生息が確認されていなかったハマダラカの一種が生息していることが明らかになった。

③ マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

マラリア対策の展開と連携を、地域として考えていく基礎となるデータを得る為に、熱帯熱マラリア原虫遺伝子の集団的な把握に努めた。アフリカ、アジア、オセアニアの7ヶ国からの原虫集団について、merozoite surface protein-1 (*msp1*)、apical membrane antigen-1 (*ama1*)、circumsporozoite protein (*csp*) の遺伝子全長配列を得た。その塩基多様度と熱帯熱マラリア原虫の起源として推定される東アフリカからの地理的距離との相関を見たところ、塩基多様度の7~9割が地理的距離に依存して低下していた。マラリア獲得免疫やワクチンの効果は、熱帯熱マラリア原虫の表面蛋白の抗原多様度が低いアジア、オセアニアで、アフリカと比較して容易に得られる可能性が示唆された。また、クロロキン耐性を付与する *pfert* 変異を国内の輸入熱帯熱マラリア/アーカイブサンプルから検出したところ、インドシナ半島型の *pfert* 耐性型が、1984年のサンプルのアフリカのサンプルから検出された。

A. 研究目的

マラリアは、現在も、世界的に大きな公衆衛生上の問題だが、環境変化や対策の進捗により、疫学的変化が起きている地域も多い。アジア・太平洋地域でも、熱帯地方を中心に、大規模な流行がみられたが、マラリア制圧(Malaria Elimination)を目指した試みの中で、幾つかの地域で、死亡率や罹病率が減少した。一方、これらの地域においては、主に臨床症状の明らかな例を想定した既存の検査診断法や疫学的指標では、実際の感染状況の把握が難しくなってきた。また、制圧を目指したマラリア対策の次のステップでは、各々の浸淫地の事情の違いに考慮した適切な介入方法の選択が重要だが、その為には、マラリア原虫に関する分子生物学的理解を、地域別に比較して深めていく必要がある。そこで、今までの研究組織の枠組みを生かし、引き続き、以下のような観点での調査・研究を進めた。

- ① 既存の検査診断法や疫学的指標だけでは、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。そこで、既存の方法を、現在の変化した状況の中で再評価するとともに、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を開発する必要がある。
- ② マラリアが、温帯地方を中心に再興感染症として問題となる可能性を検討するには、ベクターに関する情報が不足しており、国際的な比較も難しい。形態学的分類の基礎に、分子生物学的な異同の確認が必要である。
- ③ 制圧に向けたマラリア対策の次のステップとして、治療的介入を考慮した場合、治療や免疫応答と関連する、マラリア原虫の分子遺伝学的情報を、各

浸淫地で比較検討しつつ、共有していく必要がある。さらに、マラリア対策の先進地としての、アジア・太平洋地域の研究所ネットワークからは、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をしていくことが期待される。

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、研究がすすめられた。

- ① マラリアの既存の検査診断法の検証や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ソロモン諸島のマラリア浸淫地において、迅速診断キット、Mal Pf/Pv antigen と Entave Malria の2つを行って得た結果を、顕微鏡的診断の結果で検証し、各々の感度(sensitivity)と特異度(specificity)を求めた。また、過去の調査で、尿中の熱帯熱マラリア原虫に対するIgG 抗体価が陽性を示した例に対し同様な検査を行い、陰性化までの期間について検討した。

また、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた組換えタンパク質合成法で、約 1700 種類の分子を含む熱帯熱マラリア赤血球期プロテインアレイを作製した。これらのタンパク質とマリ共和国において入手した感染者血清を用いて、これまでに確立したアルファスクリーン法を応用して、マラリア感染者血清の免疫応答を検出した。

- 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

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)

北海道釧路湿原で、形態観察と DNA 分析のためのハマダラカ幼虫サンプルを採取した。成虫を得ての形態的特徴に従った種類同定の後、DNA を抽出して rDNA ITS2 領域(約 550bp)および mtDNA CO1 遺伝子(約 500bp)をダイレクトシーケンシング法で解析した。また、イエカ類の ITS 領域の塩基配列から、種特異的なプライマーを試作するとともに、ヒトスジシマカ, ネットイシマカを対象として、汎用性の高いプライマーを完成させた。

③ マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

分担： 田邊和祐, 中野由美子,
協力： 美田敏宏(東京女子医大)

アフリカとアジア・太平洋地域におけるマラリア原虫遺伝子の集団的な動きを、現地で得られた標本 及び 日本の輸入マラリア症例におけるアーカイブ標本を用いて分析し、マラリア対策のための分子生物学的基礎的データを得た。主に、merozoite surface protein-1 (msp1), apical membrane antigen-1 (ama1), circumsporozoite protein (csp) といった表面蛋白の遺伝子とマラリア薬剤耐性関連遺伝子に着目して分析した。

さらに、海外の研究機関との連携強化と情報の共有を目指して、次のような委託研究が、国内の各研究グループと協力して行われた。

- a) Molecular analysis of antimalarial drugs resistance in *Plasmodium falciparum* in China
中国におけるクロロキン薬剤耐性熱

帯熱マラリア原虫に関する分子疫学的解析

Tang Linhua (National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease 中国)

- b) Screening of transmission blocking efficacy of antibodies produced against *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* vaccine candidates.

三日熱マラリア, 熱帯熱マラリアの感染防御ワクチン候補となる抗体のスクリーニング

Jetsumon Prachumsri (Entomology Department, AFRIMS / Burapha University タイ)

- c) Strengthening and integrating of malaria control activities in newly developed area in Kampot Province, Cambodia.

カンボジア, カンポット省における新入植地におけるマラリア対策活動の総合的な強化

Chea Nguon (National Centre for Parasitology, Entomology and Malaria Control カンボジア)

C. 研究結果

- ① マラリアの既存の検査診断法の検証や新しい疫学的指標や Rapid assessment 手法の開発と評価

マラリア原虫の Histidine rich protein -2 (HRP-2) と Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) の両方を検出する迅速診断キットの信頼性に関する調査では、特異度は両キットとも高いものの、感度は原虫種や迅速診断キット違いによって、かなり幅のある結果となった(表1)。Mal Pf/Pv antigen は、先進国も含め、現在、世界的に汎用されているマラリア迅速診断キットだが、原虫密度の低い三日熱マラリアに対

して感度が低かった。また、3年間の調査の中で尿中の熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価が陽性から陰性に転じた 19 例について、半年ごとの顕微鏡検査結果と対照して解析したところ、明らかな再感染がなければ、陰性化した例は 2 年間で 36.8% (7/19)、3 年間で 68.4% (13/19) となった。

また、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) により得られた約 1700 種の熱帯熱マラリア原虫赤血球期プロテインアレイで、マリ共和国のマラリア流行地で採取された 10 名の免疫血清の反応性を検討した。その結果、10 名全員の血清と反応した抗原 8 種類、半数 (5 名) 以上の血清と反応した抗原 47 種が同定された。

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

鉤路湿原の湿地・池から採集されたハマダラカ幼虫を、室温 20℃ の恒温室で成虫まで飼育した。羽化した成虫 143 個体を翅および脚の斑紋の特徴によって種類同定を行ったところ、シナハマダラカ (68 雌 57 雄)、オオツルハマダラカ (11 雌 7 雄) の 2 種類が得られた。また、rDNA の ITS2 の塩基配列を調べ近縁種と比較した結果、シナハマダラカと同定された個体の塩基配列は、韓国で 2005 年に新種として記載された *Anopheles belenrae* と一致した (図 1)。

また、イエカ (*Culex*) 属の *Culex gelidus* と *Cx. sitiens* の分子分類法の確立に向け、rDNA の ITS 領域の塩基配列を解析し、種の特徴部位に基づくプライマーを設計し、検出感度の検討を行った。さらに、デング熱ウイルスを媒介するネッタイシマカ及びヒトスジシマカの卵 1、10、20 個を用いて PCR を行ったところ、ともに卵 1 つでも種特異的な PCR 産物の増幅が確認され、2 種の卵が混合している場合も、ネッタイシマ

カの種特異的な PCR 産物の増幅が確認できた (図 2)。

③ マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

アフリカからの地理的距離に依存して、世界各地の熱帯熱マラリア原虫集団のワクチン候補の抗原遺伝子の塩基多様度が減少しているかどうかを調べた。*mssl* の θ_s 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 ($R^2 = 0.81, P = 0.006$) で地理的距離に依存して減少していた。同様に、他のワクチン候補表面蛋白の *amal* や *csp* の θ_s も、高い負の相関で東アフリカからの地理的距離に依存して減少していた。

輸入例のアーカイブサンプルでは、アフリカ由来の 128 サンプルのうち 82 サンプルが DNA の回収と *pcfrt* locus の増幅が可能であった。ダイレクトシーケンスの結果、アフリカのサンプルは 23 サンプル (全体の 28%) が二重の波長を示し、耐性型と野生型の混合感染であった。*pfert* の多型については、インドシナ半島では 100% が耐性、西太平洋諸国では 88% が耐性を示したのに対し、アフリカでは耐性の割合は 62% にとどまった (表 2)。また、今回検出できたアフリカでの 1984 年の *pfert* 耐性型は、これまで最も古い年代である。

D. 考察

マラリアの免疫診断法のうち、抗原を検出する迅速診断キットについては、2 つの抗原 ; Histidine rich protein-2 (HRP-2)、Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) の両方を検出するキットでも、原虫密度の低い三日熱マラリアに対しては、感度が低く実用的ではなかった。また、尿中の原虫抗体を検出する検査診断法については、3 年程度で陰性化する例が、70% 近くにはのぼり、

マラリア低浸淫地における対策のモニタリング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、マラリアの血清疫学マーカーとなる候補蛋白の網羅的検索に着手できた。

北海道釧路湿原から得られたシナハマダラカ類似個体は、形態学的にはシナハマダラカと区別できないが、rDNAのITS2の塩基配列は韓国で2005年に新種として記載された*Ano. belenrae*と一致していた。かつて北海道でもマラリアの流行が記録され、最近の報告では、韓国で採集された*Ano. belenrae*から三日熱マラリア原虫が検出されている。今後も、釧路湿原に生息するハマダラカについては、マラリア原虫媒介能力を含む継続調査が必要と思われる。

また、ネッタイシマカやヒトスジシマカなどシマカ類の成虫を対象として作成されたプライマーが、卵に対しても適用できることがわかったが、近年報告されるヒトスジシマカの世界的な分布拡大は、古タイヤの輸入が主要因であるとされる。古タイヤ等にシマカの卵が付着している場合、それが海外由来か、土着なのかを同定し、適切な防除法を選択する上でシマカの遺伝子分類法の確立は重要である。

熱帯熱マラリア原虫の集団遺伝学的検索では、ワクチンの候補蛋白となるような表面抗原の遺伝子についても、塩基多様性が東アフリカからの地理的距離に依存して低下していることを見いだした。従って、アフリカに比して、アジアやオセアニアでは、熱帯熱マラリア原虫の抗原多様性が低く、マラリア獲得免疫は、アフリカに比して成立しやすいことが示唆される。また、アフリカからの輸入熱帯熱マラリア症例のアーカイブサンプルでの解析からは、ピリメサ

ミン耐性はアフリカで1991年以降に同定され、1980年代にはピリメサミン感受性株が存在していたことが昨年度の解析でわかっている。今年度の解析では、インドシナ半島型のクロロキン耐性が1984年から存在していたことが判明したので、クロロキンとピリメサミンに対する熱帯熱マラリア原虫の耐性は、アジアからアフリカへ独立して別に時期に移入され、拡散したことになる。この結果は、多剤耐性マラリアがアフリカに移入したというRoperら(Science, 2004)の推測が正しくないことを示しており、たいへん興味深い。

E. 結論

複数の血中のマラリア原虫抗原を同時に検出するマラリア迅速診断キットでも、原虫密度の低い三日熱マラリアを検出できる感度は低く、今後、用途を考えた迅速診断キットの使用が大切と思われた。また、尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価は、3年程度で陰性化することが多く、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、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ことが、アジアで得られた検体だけではなく、アフリカで得られた検体からも確認された。

病原体媒介蚊の分子生物学的分類法については、マラリア媒介蚊であるハマダラカ類hyrcanusグループで手法を確立した。そして、北海道釧路湿原に、これまで日本では生息が確認されていないが、韓国で三日熱マラリア原虫のベクターの一つとされる*Ano. belenrae*が生息している可能性が指摘された。また、日本脳炎

ウイルス媒介能を持つ *Cx. gelidus* sub group の分子分類のためのプライマーを作成し、ヤブカ類(特にデング熱媒介蚊、チクングニヤ熱媒介蚊)については、卵を利用して分子分類するためのプライマーを作成した。

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、ワクチン候補となるような表面蛋白の遺伝子であっても、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した。アフリカから地理的に遠くなるほど熱帯熱マラリア原虫の抗原多様性が低くなり、マラリア獲得免疫やワクチンの効果が地域によって大きく異なることが示唆される。また、

日本国内で発症した、アフリカからの輸入熱帯熱マラリアのアーカイブサンプルの解析から、アフリカにおけるクロロキン耐性とピリメサミン耐性は、各々、全く別個にアジアから流入し蔓延したと推測された。

表1 原虫密度の低いマラリアに対する迅速診断キットの信頼性
(ソロモン諸島における調査, 2010年)

迅速診断キット (RDTs)の種類	感度(Sensitivity)		特異度 (Specificity)		
	実数	%	実数	%	
Mal Pf/PAN	マラリア	8 / 24	33.3	204 / 206	99.0
	熱帯熱マラリア	6 / 10	60.0	218 / 220	99.1
	三日熱マラリア	2 / 14	14.3	214 / 216	99.1
Enatabe Kit	マラリア	11 / 24	45.8	194 / 206	94.2
	熱帯熱マラリア	8 / 10	80.0	208 / 220	94.5
	三日熱マラリア	4 / 14	28.6	214 / 216	99.1

表2 アフリカにおける *pfcr*t 変異の同定

	<i>pfcr</i> t genotype	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	resistant genotype (%)
		Africa	CVMNK	3	2	3	2	3	2	1	1	1	4	2	3	8	
	CVIET	2			2	2	2	3	6	6	8	9	3	5	7	11	
Indochina	CVMNK								1	1		2			1	2	100
	CVIET	2															
Western Pacific	CVMNK		1													1	88
	SVMNT		1	3	1			1	2	1		1	1		2	1	