

図1 rDNA・ITS2領域の塩基配列の類似度に基づいて描いた北海道産ハマダラカの樹状図

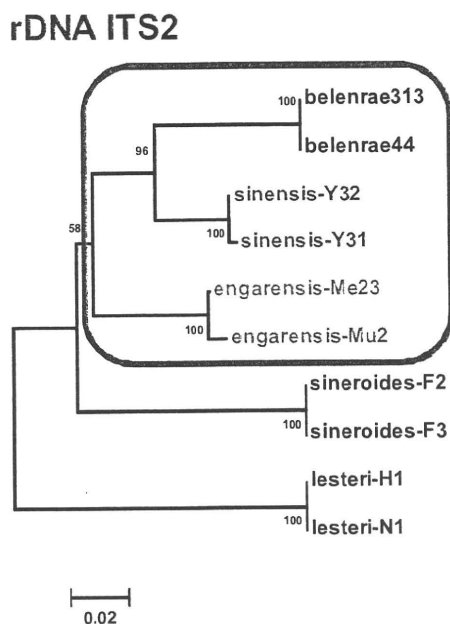
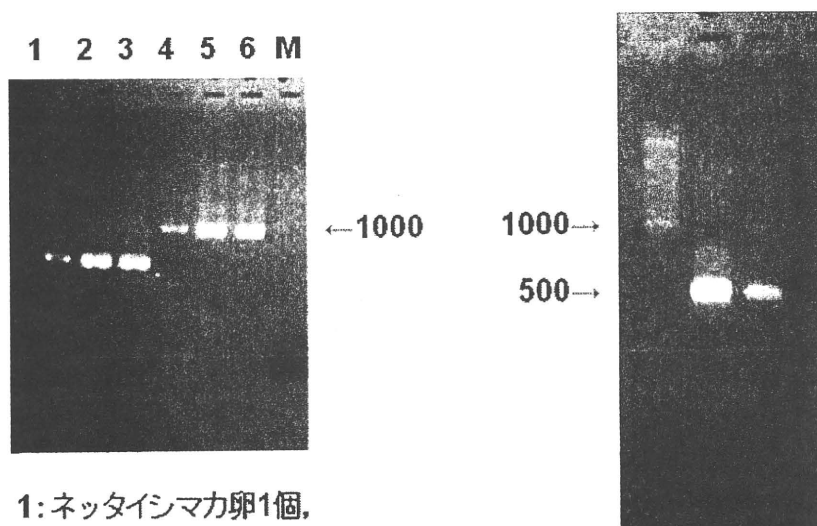


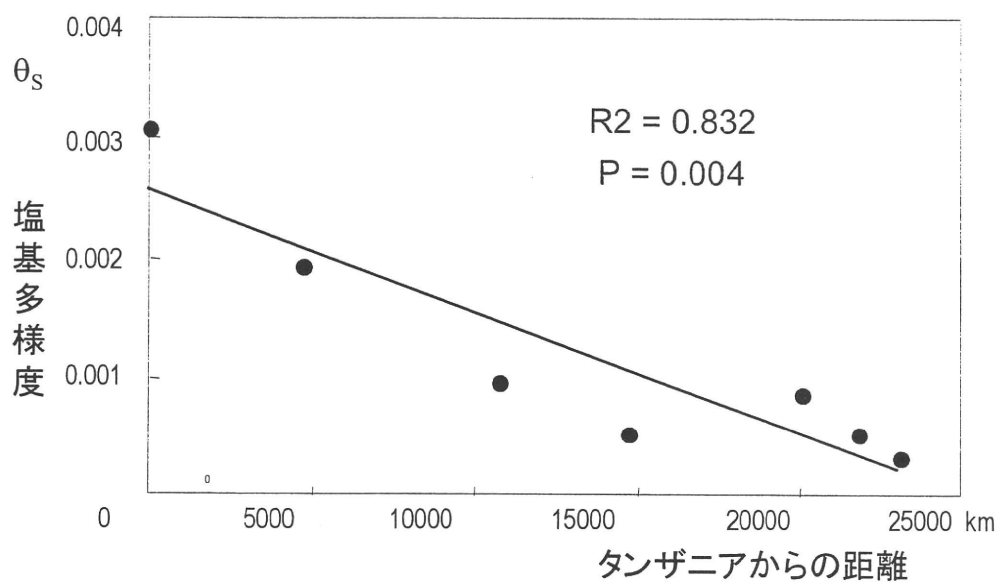
図2 ネットアイシマカとヒトスジシマカの卵を用いた種特異的な PCR 産物の増幅結果



- 1: ネットアイシマカ卵1個,
- 2: ネットアイシマカ卵10個,
- 3: ネットアイシマカ卵20個,
- 4: ヒトスジシマカ卵1個,
- 5: ヒトスジシマカ卵10個,
- 6: ヒトスジシマカ卵20個,
- M: マーカー

- 1: ネットアイシマカの卵10個+ヒトスジシマカの卵1個
- 2: ネットアイシマカの卵1個+ヒトスジシマカの卵10個
- M: マーカー

図3 遺伝的多様度と東アフリカからの地理的距離の関係 ( $m_{sp-1}$ )



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

マラリア免疫診断法の開発と評価

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	教授
研究協力者	石川 洋文	岡山大学・環境学研究科	教授
海外研究協力者	Bernard Bakote'e	Solomon Islands Medical Training and Research Institute	Director

**研究要旨** 原虫抗原を検出するマラリア迅速診断キットは、マラリア原虫の Histidine rich protein-2 (HRP-2) か Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) のいずれかを検出するタイプに大別されるが、最近、同時に両方を検出するタイプも市販されるようになった。本年度は、ソロモン諸島のマラリア流行地で、新しいキットである Mal Pf/Pv antigen と Entave Malaria の2つについて、原虫密度  $100/\mu\text{l}$  以下の例を中心に感度と特異度を検討した。原虫密度  $100/\mu\text{l}$  以下の例が、対象の多くを占めるようになっても、特異度は 94.2~99.1%と高かったが、感度は、熱帯熱マラリアで 60~80%、三日熱マラリアで 30%以下となった。また、熱帯熱マラリアについては、原虫密度  $50/\mu\text{l}$  まで検出できたが、三日熱マラリアの検出限界は、両キットとも原虫密度  $100/\mu\text{l}$  程度であった。また、原虫抗体を検出する検査診断法については、本研究班で研究を重ねてきた、尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体を検出する方法について、陰性化までの期間を検討した。顕微鏡的診断による半年毎の感染状態のチェック、マラリア感染・治療歴の聞き取り調査による確認の結果、37%の例が2年で陰性化し、68%の例が3年で陰性化することがわかった。

A. 研究目的

マラリアの免疫診断法には、原虫抗原を検出する方法と抗体を検出する方法があるが、検査の特性と用途を考慮しながら、色々な目的で利用されている。原虫抗原を検出する迅速診断キットは、様々なタイプが実用化されているが、三日熱マラリアについては、WHO が推奨する原虫密度  $100/\mu\text{l}$  以上を検出という水準を満たさないものも多い。従来、迅速診断キットは、マラリア原虫の Histidine rich protein-2 (HRP-2) か Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) のいずれかを検出するタイプに大別されたが、最近、両方を検出するタイプも市販さ

れ、マラリア流行国のフィールドのみならず、マラリア非流行国である先進国の検疫所やトラベルクリニック等でも利用されるようになった。そこで今年度は、新しい迅速診断キット、Mal Pf/Pv antigen と Entave Malaria の2つについて、ソロモン諸島のマラリア流行地で、特に三日熱マラリアの検出限界について検討した。

一方、マラリアの抗体検査については、血中抗体の場合、一度陽性になると、5~10年以上たないと陰性化しないことが多く、感染者個々の臨床検査での診断的意義には乏しい。しかし、集団の中でやや長い観察期間での陽性率の推移を見れば、対策

が進み、新しい感染者が減少しているような地域を中心に、疫学調査に応用できる可能性がある。本研究では、マラリア原虫に対する尿中抗体価測定、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の可能性について検討してきたが、今年度は、住民のマラリア感染・治療歴が明らかでないソロモン諸島のマラリア流行地で、尿中抗体価が陰性化する期間について検討した。

## 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、2010年9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、新しい迅速診断キット、Mal Pf/Pv antigen と Entave Malaria 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、各々のキットについて感度 (sensitivity) と特異度 (specificity) を求めた。

さらに、あわせて採取した尿を用い、尿中の熱帯熱マラリア原虫に対する IgG 抗体価を計測した。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 + 3 SD 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も承認されており、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

マラリア原虫の Histidine rich protein-2 (HRP-2) と Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) の両方を検出する新しい迅

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、世界的に最も使用されているマラリア迅速診断キットの一つだが、原虫密度の低いマラリアに対して感度が低く、原虫密度  $100/\mu\text{L}$  以下の例が半分以上占める対象の場合、感度は、熱帯熱マラリアで 60.0%、三日熱マラリアで 14.3% となった。一方、Entave Malaria では、感度は、熱帯熱マラリアで 80.0%、三日熱マラリアで 28.6% であったが、特異度は 94% で、偽陽性がやや多い傾向を示した (表1)。

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、その間半年ごとに行われた顕微鏡による血液標本の検査結果の推移とマラリア感染・治療歴の関係について解析した (表2)。その結果、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。

## D. 考察

マラリア迅速診断キットについては、低原虫密度のマラリア、特に原虫密度が  $100/\mu\text{L}$  以下の三日熱マラリアでは、総じて感度が低いことを、2007年に報告している (第18回日本臨床寄生虫学会、於東京)。今回は、新しく市販されたマラリア原虫の Histidine rich protein-2 (HRP-2)、Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) の両方を同時に検出するキットの信頼性を検討したが、特異度は高いものの、原虫密度の低い三日熱マラリアでは、感度が低くなる傾向は同じであった。

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%近くにのぼることがわかった。本研究では前年度までに、マラリア対策が進み熱帯熱マラリアの感染率が減少した地域では、尿中抗体価が低年齢層で低くなり、高齢層で高くなることが確認されている。血中のマラリア原虫抗体価よりも早く陰性化するとすれば、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しやすい。

#### E. 結論

Histidine rich protein-2 (HRP-2) 、Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) の両方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が低く、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。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

- (1) *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa  
Tanabe K, Mita T, Jombart T, Eriksson A, Horibe S, Palacpac N, Ranford-Cartwright L, Sawai H, Sakihama N, Ohmae H, Nakamura M, Ferreira MU, Escalante AA, Prugnolle F, Björkman A, Färnert A, Kaneko A, Horii T, Manica A, Kishino H, Balloux F.

*Curr Biol.* 20(14):1283-9. 2010

- (2) Impact of ethnic conflict on the nutritional status and quality of life of suburban villages in the Solomon Islands  
Yamauchi T, Nakazawa M, Ohmae H, Kamei K, Sato K, Bakote'e B.

*J Nutr Sci Vitaminol* 56(4):227-34. 2010

#### 2 口頭発表

- (1) Ohmae H, Bito N, Nakagawa N, Fueda T, Ishikawa H.

Risk analysis of vivax airport malaria in Japan

The 8th international conference on travel medicine in Asia and the Pacific  
November 2010, Nara Japan

- (2) 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-2

第79回日本寄生虫学会, 2010年5月、旭川

#### 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 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 マラリア感染歴と熱帯熱マラリア原虫尿中 IgG 抗体の陰性化  
( ソロモン諸島のマラリア流行地における調査 2007-2010年 )

年齢	最近のマラリア感染歴								尿中抗体価の変化		
	2007年		2008年		2009年		2010年		2008年	2009年	2010年
	2月	9月	2月	9月	2月	9月	2月	9月	9月	9月	9月
8	Pf	Pv	-	Pv	-	-	-	-	+	-	-
15	-	Pf	Pv	-	-	-	-	-	+	+	-
21	Pv	Pf	-	-	-	-	-	-	+	-	-
24	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
33	-	Pf	Pv	-	-	-	-	-	+	-	-
40	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
49	-	Pf	-	-	-	-	-	-	+	+	-
58	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
65	Pf	-	-	-	Pv	-	-	-	+	+	-
67	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3	-	Pf	-	-	-	-	-	-	+	+	-
4	Pv	Pf	-	-	Pv	-	-	-	+	-	-
7	Pv	Pf	-	-	-	-	-	-	+	+	+
13	Pf	-	Pv	-	-	-	Pv	-	+	+	+
22	-	Pf	-	-	Pv	-	-	-	+	-	+
24	-	Pf	-	Pv	-	-	Pv	-	+	-	-
26	-	Pf	Pv	Pv	-	-	-	-	+	-	-
33	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
49	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成22年度 分担研究報告書

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：

クロロキン耐性遺伝子の歴史

分担研究者：中野由美子

研究要旨

1950年代後半にインドシナ半島で発生したクロロキン（CQ）耐性熱帯熱マラリアは、1978年にはアフリカ東側から全土に広まった。しかし、マラリアの流行度が高いアフリカでは薬剤耐性原虫の有無と患者の臨床症状が相関しない例が多く報告されている。CQ耐性を付与する *pfcr* 変異をアーカイブサンプルから検出したところ、もっとも古い1984年からインドシナ半島型の *pfcr* 耐性型を検出した。またアフリカでのマラリア流行度の高さを反映し、野生型も多く検出された。最後に、CQとPyr耐性熱帯熱マラリアは、異なる時代にアフリカに移入したことを遺伝学的に示した。

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dihydrophosphate 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。また、2000年にはCQ耐性の原因がfood vacuole上のトランスポーター*pfcr*にK76T変異が入ることがCQ耐性の原因であることが証明された。これまで、インドシナ株は*pfcr*の72-76残基のアミノ酸がCVIETであり、PNG株はSVMNTの配列を持つと報告されている。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CQと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の原因により、行われていないのが現状であった。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。

昨年度までの解析で、ピリメサミン (Pyr) 耐性の原因遺伝子である *dhfr* 変異は 1990 年代にアフリカで急速に広まっていたことを示した。そこで最終年度では、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、CQ 耐性マラリアが東南アジアからアフリカに移入した年代を遺伝学的に明らかにするため、*pfprt* のアフリカにおける遺伝子型の同定をおこなった。

## 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 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℃ 5 秒、45℃ 20 秒、72℃ 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℃ 5 秒、45℃ 20 秒、72℃ 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使用したプライマーの配列は 1 回目の増幅には、p1: 5' -TCA CGT TTA GGT GGA GGT TCT TGT-3' ならびに p4: 5' -TGT GAG TTT CGG ATG TTA CAA AAC-3'。2 回目の増

幅は p2: 5' -TCT TGT CTT GGT AAA TGT GCT CAT-3' ならびに p3: 5' -CAA AAC TAT AGT TAC CAA TTT TG-3' である。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 82 サンプルが DNA の回収と *pfprt* 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 種のシーケ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 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ることがわかった。*pfprt* の多型を表に示した。インドシナ半島では 100% が耐性西太平洋諸国では野生型は 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。このことは、アフリカではマラリアに対する免疫の高い人が多いため、薬剤使用量が少ないことを反映していると考えられた。1984 年での *pfprt* 耐性型の検出はこれまで最も古い年代である。西太平洋型 SVMNT 変異はアフリカサンプル



から検出されなかった。

#### D. 考察

昨年の報告より、Pyr 耐性はアフリカで 1991 年以降に同定され、1980 年代には Pyr 感受性が存在していたことを示した。本研究によって、インドシナ半島型の CQ 耐性が 1984 年以降に存在していたことを考えると、CQ と Pyr 耐性のアジアからアフリカへの移入は独立の時代に起こったことを示している。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) の推測は正しくなかったことを示している。

#### E. 結論

アフリカにおける CQ と Pyr 耐性は異なる時代にインドシナ半島から移入したことを示した。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

1, 中野由美子, 美田敏宏, 中曾根英子, 田邊和裕 (2010) アーカイブ標本による熱帯熱マラリア原虫における薬剤耐性遺伝子型の同定. (Genetic identification of drug resistance in *Plasmodium falciparum* from Africa using archive blood smears.) 第 79 回日本寄生虫学会大会 2010 年 5 月 20-21 日, 旭川.

2, Yumiko Saito-Nakano (2010) Genetic identification of drug resistance in *Plasmodium falciparum* using archive

blood smears. The 7<sup>th</sup> Taiwan-Japan Symposium on Immunization and Travel Medicine. Taiwan, Taipei, Sep 9-10

表、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	6	62
	CVIET	2			2	2	2	3	6	6	8	9	3	5	7	11	
Indochina	CVMNK																100
	CVIET	2							1	1		2			1	2	
Western Pacific	CVMNK		1													1	88
	SVMNT		1	3	1			1	2	1		1	1		2	1	

厚生労働科学研究費補助金(新興再興研究事業)

H22 年度分担研究報告書

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	国立感染症研究所
	今西 望	明治大学農学部

要旨 北海道釧路湿原でハマダラカ幼虫の発生状況を調査し、形態観察と DNA 分析のための幼虫サンプルを採取した。飼育した幼虫より羽化させた成虫の形態的特徴に従って種類同定を行った後、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。マラリア媒介蚊であるハマダラカ類 *hyrcanus* グループの分子分類を行うための手法を確立した。この手法を適用した結果、北海道釧路湿原には、これまで我が国では生息が確認されていなかったハマダラカの一つが生息していることが明らかになった。日本脳炎ウイルス媒介能を持ち *Cx. gelidus* subgroup に属する *Cx. gelidus* と *Cx. sitiens* subgroup に属する *Cx. sitiens* について分子分類のためのプライマーを作成した。ヤブカ類 (特にデング熱媒介蚊、チクングニヤ熱媒介蚊) の卵を分子分類するためのプライマーを試作した。これまでに開発したプライマーを使用することで、形態的に破損したマラリア媒介蚊、日本脳炎ウイルス媒介蚊、フィラリア媒介蚊、デング熱媒介蚊の種同定ができるようになった。

A. 研究目的

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な検討が行われた。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。中国や朝鮮半島から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も報告されており、我が国産ハマダラカ類の分類に関

しても DNA 分析に基づいた分子生物学的な再検討を行う必要があると思われる。

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。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は病気によって大きく異なる。航空機内の衛生昆虫の調査では、多種類の疾病媒介蚊を対象にしているが、採集されたサンプルの多くは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、残されている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とともに、疾病媒介蚊と感染症侵入監視の観点から医学的重要度の高いハマダラカ属、イエカ属、ヤブカ属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

北海道釧路湿原でハマダラカ幼虫の発生状況を調査し、形態観察と DNA 分析のための幼虫サンプルを採取した。幼虫は実験室に持ち帰り、個別に成虫まで飼育して同一個体の幼虫、蛹の脱皮殻と成虫標本を作成した。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 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。

イエカ類の *Culex gelidus* subgroup に属するベトナム産 *Cx. gelidus* (日本脳炎ウイルスの媒介蚊) と *Cx. sitiens* subgroup に属するフィジー産 *Cx. sitiens* ミツホシイエカ (日本脳炎ウイルスの媒介蚊) を対象として、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。

デング熱媒介蚊として重要なヒトスジシマカ, *Aedes albopictus*, ネットアイシマカ, *Aedes aegypti*, を対象として、汎用性の高いプライマーを完成させるとともに、マルチプレックス PCR 条件の最適化を行った。シマカ類の場合成虫だけでなく卵の状態でも海外から持ち込まれる可能性も高いため、本研究では特に卵サンプルを対象にして感度の高いプライマーの製作を試みた。

## C. 研究結果

釧路湿原に点在する湿地・池の中から 6ヶ所を選び幼虫サンプルを採集した (図 1)。これら 6 水域の内 5ヶ所でハマダラカ幼虫が採集された。採集された幼虫を持ち帰り、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。これら 2 種類は 5ヶ所の水域すべてから得られており、釧路湿原全体に広く分布していることが示唆された。rDNA の ITS2 の塩基配列を調べ近縁種のそれと比較した結果、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 2)。CO1 遺伝子配列を分析した結果 *hyrcanus* グループの PCR 法による簡易鑑別が可能であることがわかった。

*Culex gelidus* と *Cx. sitiens* の分子分類法の確立を目的として、両者共に 2 個体 4 クローンについて、rDNA の ITS 領域の塩基配列を解析した。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。その結果、*Culex gelidus* は約 835bp、*Cx. sitiens* は約 1,015bp 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 1)。

ネットア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た (図 3 左)。2 種の卵が混合している場合でも、ネットアイシマカの種特異的な PCR 産物の増幅が確認された (図 3 右)。

## D. 考察

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、種類同定を行う上で重要な形質とされる翅の斑紋や中脚基節の鱗片

を観察する限りでは、シナハマダラカと区別できない。本研究で検討した 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 *Anopheles belenrae* と一致しているため、この種類が釧路湿原に生息している可能性が高い。最近の報告によれば、韓国で採集された *Anopheles belenrae* から三日熱マラリア原虫が検出されている。したがって、今後の調査で釧路湿原に生息するハマダラカが *Anopheles belenrae* であることを確定するとともに、どの程度のマラリア媒介能力を有するかを明らかにすることが必要である。

これまで、日本脳炎ウイルスの媒介蚊として重要なコガタアカイエカ (*Cx. tritaeniorhynchus*) と形態的に類似した 4 種類について、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てきた。今年度は吻や脚に白帯を有する蚊で、日本脳炎ウイルス媒介能を持つ *Cx. gelidus* subgroup に属する *Cx. gelidus* と *Cx. sitiens* subgroup に属する *Cx. sitiens* について検討した結果、それぞれ約 835bp と約 1,015bp の位置に種特異的な電気泳動像がみられ、種を容易に同定することができるようになった。これまで開発したプライマーを用いることで、形態的に破損した個体でも、主要な日本脳炎ウイルスとフィラリアを媒介するイエカ属の蚊 7 種の同定が可能になった。

ネットア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。近年報告されてい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ている。シマカ類の卵は幼虫発生容器の壁面に産みつけられ、1 カ月程度の乾燥条件に暴露されても生存することが知られている。古タイヤは保水力が高く非常に好適なシマカ幼虫の発生源

であることから、タイヤ内面に多くの卵が付着していると思われる。古タイヤのようにシマカの卵が付着している場合にそれが海外由来のものなのか、土着の種類であるのかを素早く同定し、適切な処置を施す上で今回得られたプライマーは非常に有用だろう。

## E. 結論

マラリア媒介蚊であるハマダラカ類 *hyrcanus* グループの分子分類を行うための手法を確立できた。北海道釧路湿原には、これまで我が国では生息が確認されていなかったハマダラカの一つが生息していることが明らかになった。

日本脳炎ウイルス媒介能を持ち *Cx. gelidus* subgroup に属する *Cx. gelidus* と *Cx. sitiens* subgroup に属する *Cx. sitiens* について分子分類のためのプライマーを作成した。

ヤブカ類（特にデング熱媒介蚊、チクングニヤ熱媒介蚊）の卵を分子分類するためのプライマーを開発した。

これまでに開発したプライマーを使用することで、形態的に破損した日本脳炎ウイルスやフィラリア媒介蚊でも種の同定ができるようになった。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Higa, Y., Toma, T., Tsuda, Y. and Miyagi, I. 2010. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the Genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago,

Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 63:  
312-316.

Somboon, P., Rory, A., Tsuda, Y.,  
Takagi, M. and Harbach, R. E. 2010.  
Systematics of *Anopheles* (*Cellia*)  
*yaeyamaensis* sp. n., alias species E  
of the *An. minimus* complex in  
southeastern Asia (Diptera:

Culicidae). *Zootaxa* 2651: 43-51.

## 2. 学会発表

今西望、高井憲治、金京純、津田  
良夫、小林睦生、糸山亨、沢辺京  
子。釧路湿原周辺に生息するハマ  
ダラカ成虫の形態的特徴。第62回  
日本衛生動物学会東日本支部大会、  
2010. 10. 16. 千葉県印西市。



図1 釧路湿原の幼虫採集を行った6ヶ所(①～⑥)を示す地図。

## rDNA ITS2

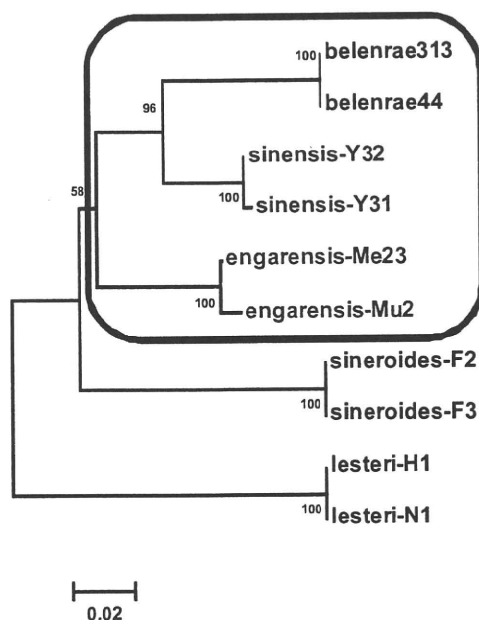


図2 rDNA・ITS2領域の塩基配列の類似度に基づいて描いた北海道産ハマダラカの樹状図

表1 本研究で作成されたイエカ属の日本脳炎ウイルス媒介蚊 *Culex gelidus* と *Culex sitiens* 同定のためのプライマー

種名	供試 個体	産地 (採集年)	DNAの 抽出	解析個 体数	解析クロ ーン数	プライマー 作成領域	リバー ス プライマー名	生生物の サイズ
<i>Culex gelidus</i>	成虫	ベトナム (2008年)	キット (Sigma)	2	4	rDNA ITS	CgliR1	835bp
<i>Culex sitiens</i>	成虫	フィジー (2005年)	キット (Sigma)	2	4	rDNA ITS	CsitR1	1,015bp

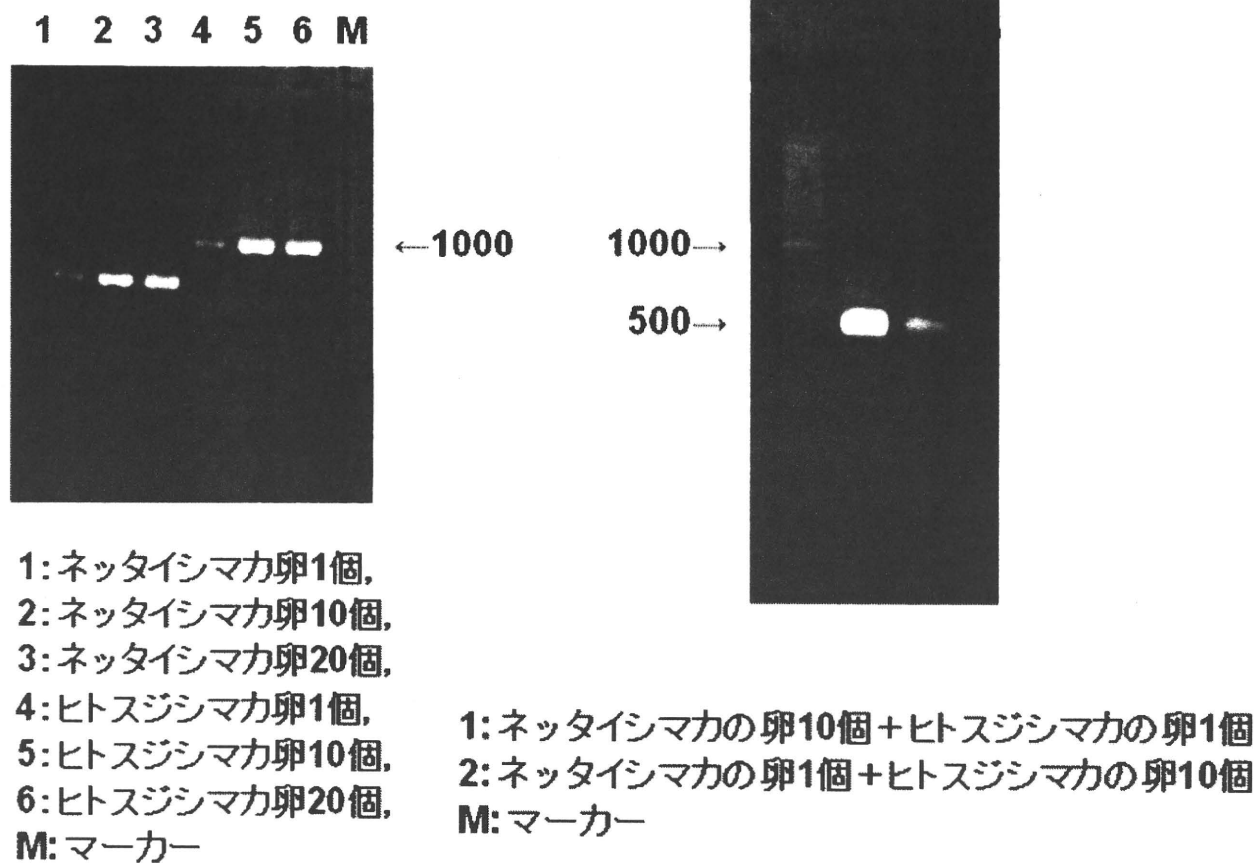


図3 ネットアイシマカとヒトスジシマカの卵を用いた種特異的な PCR 産物の増幅結果



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22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 和祐, 大阪大学微生物病研究所 招聘教授

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獲得免疫やワクチンの有効性と密接に関わる。 *P. falciparum* は地域集団においてその遺伝的多様性が異なるが、その多様性に影響を与える主要な要因についてはこれまで解析されてこなかった。この点について昨年度、世界各地の原虫集団についてハウスキーピング遺伝子 (*serca*, *ads1*) の塩基多様度を解析した結果、各地域の原虫集団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、 *P. falciparum* 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成績を得た。本年度は、この東アフリカからの地理的距離に依存した遺伝的多様性の低下がマラリアワクチン候補抗原についてもあてはまるかどうかを検討した。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、その塩基多様度を算出し、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。この結果は、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り、アジア、オセアニアではアフリカと比較して免疫学的なマラリアコントロールが容易であることを示唆する。

A. 研究目的

2008年、マラリアは世界で2.4億人がかかり、90万人の命を奪っている。死亡例のほとんどは熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) による。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。

*P. falciparum* は地域集団においてその遺伝的多様性が異なるが、その多様性に影響を与える主要な要因についてはこれまで解析されてこなかった。この点について昨年度、世界各地の原虫集団についてハウスキーピング

遺伝子 (*serca*, *ads1*) の塩基多様度を解析した結果、各地域の原虫集団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、*P. falciparum* 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成績を得た。

本年度は、この東アフリカからの地理的距離に依存した *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性の低下が主要なマラリアワクチン候補抗原の遺伝的多様性についてもあてはまるかどうかを検討した。

## 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、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、1996年 (Sakihama et al., 2007)、ソロモン諸島ガダルカナル島、1996年 (Sakihama et al., 2006)。ガーナは西沿岸部 Winneba 付近、2004年、パプアニューギニア地区 Sepik 州 Wewak 地区、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 (Sakihama et al., 2001)。

塩基配列を決定したワクチン候補抗原遺伝子は、赤血球期の merozoite surface protein-1 (*msp1*, 約 5.0 kb)、及び、apical membrane antigen-1 (*ama1*, 約 1.9 kb)、スポロゾイト期の circumsporozoite protein (*csp*, 約 1.4 kb) である。PCRによる *msp1* 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。

塩基配列は Clustal W によって整列化を行い、配列中の認められた反復配列と挿入・欠失部分は解析対象から除外した。塩基多様度は、塩基サイト当たりの多型サイト数 ( $\theta_s$ ) を用いた。これは DnaSP version 4.5 によって算出した。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。

## C. 研究結果

遺伝子の全長塩基配列が得られたのは、*msp1* では 454 本、*ama1* では 505 本、*csp* では 550 本であった。SNP（単塩基多型）サイトの数は、*msp1* では 128 個、*ama1* では 96 個、*csp* では 37 個であった。

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。*msp1* の  $\theta_s$  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。*ama1* でも有意に高い負の相関 ( $R^2 = 0.69$ ,  $P = 0.02$ ) で東アフリカからの地理的距離に依存して  $\theta_s$  が減少していた。また、*csp* の  $\theta_s$  も、高い負の相関 ( $R^2 = 0.90$ ,  $P = 0.001$ ) 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。

## D. 考察

本研究において、*P. falciparum* 集団の抗原

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。調べた抗原遺伝子の種類によってこの負の相関は多少の相違があるが、相関の約7～9割が距離に依存している。

本発見はマラリア感染防御の獲得免疫や近い将来に開発されるであろうマラリアワクチンの効果に関し、重要な示唆を与える。アフリカに較べて、アジアやオセアニアでは抗原多様性が低かった。これは、マラリア獲得免疫の成立が地域によって異なることを示唆する。マラリア獲得免疫の成立には抗原多様性の他に、マラリア伝播度も影響する。東南アジアではほぼすべての熱帯熱マラリア感染ではマラリアを発症するが、これはマラリア伝播が非常に低く、年1回かそれ以下であるため、抗原多様性が低くても流行地住民は防御免疫の成立に必要な十分な抗原刺激に暴露されないためと考えられる。一方、パプアニューギニアやソロモン諸島ではマラリア感染が年数十回から多い場合では数百回になり、アフリカ並みに高い地域も存在する。しかも、オセアニアでは抗原多様性が低い。こうした流行地では低い抗原レパートリーの度重なる感染が予想され、防御免疫の獲得が比較的早期に成立することが推定できる。オセアニアではマラリア流行度が高い割に脳マラリアなどの重症マラリアが希で、この理由については解明されていなかった。Maitlandらはこのマラリア感染病態現象を Pacific enigma と読んでいる(Maitland et al., 1998)。本研究によって、Pacific enigma のマラリア

原虫の要因として抗原多様性の低さが強く示唆される。

#### E. 結論

本研究から、*P. falciparum* 集団の抗原多様性の約7～9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。アフリカから地理的に遠くなるほど *P. falciparum* の抗原多様性が低くなる。これは、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を示唆する。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Kenji Hikosaka, Yoh-ichi Watanabe, Fumie Kobayashi, Seiji Waki, Kiyoshi Kita, Kazuyuki Tanabe. (2011) Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. **Parasitol. Int.** (in press).
2. Mary Chiaka Oguike, Martha Betson, Debbie Nolder, J. Russell Stothard, Immo Kleinschmidt, Carla Proietti, Teun Bousema, Mathieu Ndounga, Kazuyuki Tanabe, Edward Ntege, Richard Culleton, Colin J. Sutherland. (2011) *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. **Int. J. Parasitol.** (in press).
3. Kenji Hikosaka, Yutaka Nakai, Yoh-ichi Watanabe, Shin-Ichiro Tachibana, Nobuko Arisue,

- Nirianne Marie Q. Palacpac, Tomoko Toyama, Hajime Honma, Toshihiro Horii, Kiyoshi Kita, Kazuyuki Tanabe. (2011) Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. **Mitochondrion** 11:273-278.
4. Kazuyuki Tanabe, Sedigheh Zakeri, Nirianne Marie Q. Palacpac, Manada Afsharpad, Milijaona Randrianarivelojosia, Akira Kaneko, Aung Swi Prue Marma, Toshihiro Horii and Toshihiro Mita. (2011) Spontaneous mutations in the *Plasmodium falciparum* sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (PfATP6) gene among wide geographical parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. **Antimicrob. Agents Chemother.** 55: 94-100.
5. Fadile Yildiz Zeyrek, Shin-Ichiro Tachibana, Fehmi Yuksel, Nebiye Doni, Nirianne Palacpac, Nobuko Arisue, Toshihiro Horii, Cevayir Coban and Kazuyuki Tanabe (2010) Limited polymorphism of the *Plasmodium vivax* msp1 gene (*pvmsp1*) in isolates from Turkey. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 83: 1230-1237.
6. Moritoshi Iwagami, Seung-Young Hwang, Megumi Fukumoto, Toshiyuki Hayakawa, Kazuyuki Tanabe, So-Hee Kim, Weon-Gyu Kho, Shigeyuki Kano. (2010) Geographical origin of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea: haplotype network analysis based on the parasite's mitochondrial genome. **Malaria J.** 9: 184.
7. Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Mita, Thibaut Jombart, Anders Eriksson, Shun Horibe, Nirianne Palacpac, Lisa Ranford-Cartwright, Hiromi Sawai, Naoko Sakihama, Hiroshi Ohmae, Masatoshi Nakamura, Marcelo U. Ferreira, Ananias A. Escalante, Franck Prugnolle, Anders Björkman, Anna Färnert, Akira Kaneko, Toshihiro Horii, Andrea Manica, Hirohisa Kishino, Francois Balloux. (2010) *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. **Curr. Biol.** 70: 1-7.
7. Hiroshi Iseki, Satoru Kawai, Nobuyuki Sakahashi, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi. (2010) Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method as a diagnostic tool of zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infection. **J. Clin. Microbiol.** 48: 2509-2514.
- 学会発表
1. Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Mita and Francois Balloux. Ancient out-of-Africa migration of *Plasmodium falciparum* along with modern humans. Parasites to Prevention. (Edinburgh) 2010.10.21.
2. S. B. A. Andrabi, 田原美智留, 青沼宏佳, 遠山知子, 田邊和祐, 野崎智義, 永宗喜三郎, トキソプラズマが産生する植物ホルモン, サイトカイニンの原虫増殖における影響, 第9回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, (長崎) 2010.10.9
3. 橘真一郎, 川合覚, 後藤直久, 中村昇太, 有末伸子, 片貝祐子, 本間一, Palacpac Nirianne, 澤井裕美, 東岸任弘, 北潔, 保富康宏, 堀井俊宏, 安永照雄, 田邊和祐. 次