

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 20～22 年度 総合分担研究報告書

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
狂犬病ウイルスに関する研究（狂犬病の免疫組織診断系の検証と確立）

分担研究者	朴 天鎬	北里大学・獣医病理学研究室
研究協力者	小嶋大亮	北里大学・獣医病理学研究室
	杉浦尚子	国立感染症研究所・獣医科学部
	井上謙一	京都大学霊長類研究所・統合脳システム分野
	高田昌彦	京都大学霊長類研究所・統合脳システム分野
	佐藤 豪	国立感染症研究所・獣医科学部
	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部
	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部

研究要旨

1 年目：実験株（CVS11 株）由来の組換え N 蛋白をウサギに免疫して得られた抗 N 蛋白 monospecific-polyclonal Abs (mpAbs) を利用して狂犬病ウイルスの迅速抗原検出法「DRIT 法 (a direct, rapid immunohistochemical test)」を確立した。ビオチン標識後、Streptavidin-Peroxidase と AEC 基質を用いてウイルス N 抗原の検出を行ったところ、市販の蛍光標識診断用抗体と遜色なく抗原を検出できることが示された。

2 年目：狂犬病の免疫組織診断系の検証と確立を目的に、ウサギとニワトリ卵黄で作製した抗狂犬病ウイルス蛋白抗体の特性等についてホルマリン固定材料を用いて比較検討した。その結果、最も染色感度が高いのはウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗 P 蛋白抗体であり、ニワトリ卵黄由来の P 抗体では非特異反応が殆どみられないことが明らかになった。

3 年目：2 年目に引き続き、免疫染色感度が比較的良好であったウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗 P、N 蛋白抗体を用いて、例数および検索部位を増やして染色感度を比較検証した。その結果、脊髄神経節、脊髄、延髄、中脳、海馬および大脳皮質に小型から大型なネグリ小体が多数観察された。また、接種経路や動物種に関わらずウサギおよびニワトリ N および P 抗体の有用性が示された。以上の結果より、野外毒狂犬病ウイルスの抗原分布が明らかとなり、ニワトリ卵黄由来の抗体が自然発症例においても十分応用できることが判明した。

A. 研究目的

本研究は狂犬病ウイルスの迅速診断法と免疫組織診断系の確立を目的に行われた。

B. 研究方法

迅速診断法：実験株 (CVS11 株) 由来の組織換え N 蛋白をウサギに免疫して得られた抗 N 蛋白 monospecific-polyclonal Abs (mpAbs) を利用して狂犬病ウイルスの迅速抗原検出法「DRIT 法 (a direct, rapid immunohistochemical test)」を確立した (mpAbs-DRIT 法)。検出用 mpAbs をビオチン標識後、Streptavidin-Peroxidase と AEC 基質による発色系で狂犬病ウイルス N 抗原の検出を行った。

免疫組織診断系：固定毒 CVS-11 由来の抗ウイルス血清 3 種類 (anti-N9-5, anti-P13-31, anti-G (pc DNA-G) および CVS-11 のリコンビナント核蛋白を大腸菌で発現させ、その蛋白を産卵ニワトリに免疫させて得られた抗ニワトリ抗体 5 種類 (anti-N9-5IgY, anti-P13-31 IgY, Vaccine IgY 9~10 IU/ml, Vaccine+Adjuvant IgY 0.5~1 IU/ml, anti-G-F2 IgY 3~4, 9~10 IU/ml) を使用した。

研究材料は固定毒 CVS-11 を感染させたマウスとサル、羊由来の野外毒 (P-18) およびコウモリ由来の野外毒 (MPIV) をマウスの脳内あるいは筋肉内接種し、感染例の脳脊髄のホルマリン固定材料を使用した。パラフィン包埋ブロックから 3

μm 厚の組織標本を作製し、様々なプロトコルを適用し、最良の免疫染色条件を決定した。

C. 研究結果

迅速診断法：狂犬病ウイルス感染マウス脳の塗沫標本を陽性検体として N 抗原の検出を mpAbs-DRIT 法で行ったところ、市販の蛍光標識診断用抗体と遜色なく抗原を検出できることが示された。

免疫組織診断系：ウサギ血清 3 種類 (anti-N9-5, anti-P13-31, anti-G (pc DNA-G) およびニワトリ卵黄抗体 5 種類 (anti-N9-5IgY, anti-P13-31 IgY, Vaccine IgY 9~10 IU/ml, Vaccine+Adjuvant IgY 0.5~1 IU/ml, anti-G-F2 IgY 3~4, 9~10 IU/ml) のいずれも染色性が観察された。特に、ウサギ血清 (anti-N9-5, anti-P13-31) およびニワトリ抗体 (anti-N9-5IgY, anti-P13-31 IgY, Vaccine IgY 9~10 IU/ml, Vaccine+Adjuvant IgY 0.5~1 IU/ml) を用いた場合に染色感度が高かった。また、染色像が非特異反応ではないことを透過型電子顕微鏡観察でウイルスの蛋白とウイルス粒子の確認によって確かめた。

D. 考察

迅速診断法：mpAbs-DRIT 法は簡便且つ安価であり、アジア地域での狂犬病検査系として大変有効であると考えられた。今回、RITM への委託研究によって野外検体を用いた狂犬病ウイルス抗原検出においても既存の直接蛍光抗体法と同等また

はそれ以上の成績を得ている。今後は、フィリピンのRITM狂犬病診断チームと協同して野外の検体を利用した検査系の検証と普及が必要と考えられた。

免疫組織診断系：今回、狂犬病の免疫組織診断系の確立を目的に、各種一次抗体を用いて染色条件を検討した。今回の染色条件において、最も染色感度が高かった抗体はウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗 P 蛋白であることが示された。特に、ニワトリ卵黄由来の P 抗体では他の抗体に比べてバックグラウンドが出にくく、非特異反応も殆どみられないことから、今後、狂犬病ウイルスに感染した多種の動物の確定診断に充分応用できると思われた。

また、ウイルス株ごとの染色態度の違いについては、ヒツジ由来の野外毒に感染したマウスの脳脊髄において大型な封入体が観察されるのに対し、固定毒 CVS-11 やコウモリ由来株では比較的に小型なスポット状を呈しており、ヘマトキシリン・エオジン標本では観察困難であることが判明した。

今回用いた症例は全て実験動物（サル、マウス）の脳脊髄であり、自然発症例との間に染色感度の違いがあるかどうかについては不明な点があり、今後は自然発症例との比較検討が必要と思われる。

E. 結論

本研究は、アジアの CDC 機能を持つ国立の研究機関等との連携による狂犬病ラボラトリーネットワークの構築が到達目的である。

DRIT 法および免疫組織診断系ともに簡便かつ設備投資が殆ど必要ないため、アジア地域での狂犬病検査系として大変有効であると思われる。また、ニワトリ卵黄抗体は安価で大量生産が可能であり、狂犬病の多発地域であるアジア諸国において狂犬病の確定診断系として期待される。現在、RITM 狂犬病診断チームと協同して野外での使用に耐える mpAbs-DRIT 法の改良を行っており、他のアジアの CDC 機能を持つ国立の研究機関等に普及啓発して狂犬病ラボラトリーネットワークの構築に活用することが期待される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

(1) Kojima D, Park CH, Satoh Y, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T. Pathology of the spinal cord of C57BL/6J mice infected with rabies virus (CVS-11 strain). *J Vet Med Sci*. 71 (3) :319-324.

(2) Kojima D, Park CH, Tsujikawa S, Kohara K, Hatai H, Oyamada T, Noguchi A, Inoue S. Lesions of the Central Nervous System Induced by Intracerebral Inoculation of BALB/c Mice with Rabies Virus (CVS-11). *J. Vet. Med. Sci.* 72 (8) :1011-1016.

2 口頭発表

(1) 小嶋大亮, 朴天鎬, 小原慶子, 杉浦尚子, Boldbaatar Bazartseren, 佐藤豪, 野口章, 畑井仁, 小山田敏文, 井上智. 狂犬病ウイルス (CVS-11) を後肢筋肉内に接種した C57BL/6J およびヌードマウスの

脊髄に関する比較病理学的研究. 第148回
日本獣医学会学術集会。2009. 9. 25-27、
とりぎん文化会館、鳥取

p. 176. 2010. 9. 18, 帯広畜産大学

H. 知的財産権の出願・登録状況

(2) 小嶋 大亮, 朴 天鎬, 石田 誠,
小原 慶子, 井上 謙一, 畑井 仁, 小
山田敏文, 井上 智. 狂犬病ウイルス固
定株 (CVS-11) を脳内接種した Macaque
属サルの脳に関する病理学的研究. 第
150 回日本獣医学会学術集会講演要旨集

1 特許取得 なし

2 その他 なし

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 20－22 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・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研究ネットワークを形成する中で、病原体遺伝子情報の共有、検査法の開発・評価や標準化を目的とした研究を進めた。また、同地域におけるマラリア制圧に、大きな障害となってい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進めた。

実際の研究は、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、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、複数の原虫抗原を検出するマラリア迅速診断キットの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、信頼性は乏しかった。また、タイやマリ（アフリカ）のマラリア浸淫地で採取された血清の反応結果から、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）は、新規抗原タンパク質の網羅的検索に有用であることがわかった。

① 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

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種類確立も含めた、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。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 CO1 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可能性が示された。また、日本脳炎ウイルス媒介能を持つ *Cx. gelidus* subgroup 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開発した。

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、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、オセアニアの国々から得られた原虫集団で、複数のハウスキーピング遺伝子やワクチン候補蛋白の遺伝子の解析を行った。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、マラリアの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も示唆された。また、国内の輸入熱帯熱マラリア/アーカイブ標本での原虫遺伝子解析からは、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。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、従来の Roper ら (Science, 2004) の推測が正しくないことを示している。

A. 研究目的

マラリアは、エイズ・結核と並ぶ3大感染症の1つとして、今なお世界的に大きな公衆衛生上の問題である。アジアでも、熱帯地方を中心に、その高い感染率や死亡率が問題となってきた。現在、アジア・太平洋地域のマラリア流行地では、1990年代からのマラリア対策の進展で状況が改善し、マラリアの患者数死亡者数の減少など、大きな疫学的変化が起きている。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、三日熱マラリア感染者数の増加が報告される地域もある。一方、韓国や中国といった温帯の国々でも、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(Malaria elimination)を目指した野心的な試みも幾つかみられるようになってきている。ただ、マラリア低浸淫地となった地域においては、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的確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。

WHOなどの国際機関やアジア・太平洋地域の研究機関との関係強化を基礎に、上記のような課題の解決に寄与することは、本研究班の大きな目的である。その為には、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する中で、病原体遺伝子情報の共有、検査法の開発・評価や標準化などをはかっていかねばならない。そこで、今までの研究

組織の枠組みを生かし、以下のような観点でグループによる調査・研究を進めながら、国際会議を開いて、情報と経験の共有に努めた。

- ① 既存の検査方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。従来の疫学的指標や検査診断法・モニタリング手法を再評価するとともに、それらにかわる新しい方法の開発が不可欠である。
- 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である。形態学的分類の基礎に、分子生物学的な異同を確認した新しい分類法の提唱が必要である。
- 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。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。また、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もできることが期待される。

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、2種類の抗原を検出する迅速診断キットによる結果を、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。さらに、尿中の熱帯熱マラリア原虫に対する IgG 抗体の陽性率を、マラリアの過去の流行状況が異なる、同諸島の複数の地域で比較すると同時に、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。これらの蛋白質とマラリア流行国の住民から得た感染者血清を用い、本研究を通じて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反応を網羅的に検出した。

- 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）

まず、シナハマダラカを初めとする主要な感染症媒介蚊について、遺伝子分類が可能になるような、プライマーの作成と調整を行った。次に、国内の幾つかの地域で、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、ネッタイシマカを対象として、汎用性の高いプライマーを得た。

③ マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

分担： 田邊和裕， 中野由美子，
協力： 美田敏宏（東京女子医大）

熱帯熱マラリア原虫集団の遺伝的多様性とその分布の定量的解析を行うため、アジア・太平洋諸国にとどまらず、世界から得られた熱帯熱マラリア原虫株で、様々な非抗原タンパク遺伝子、表面抗原遺伝子のシーケンスを得て、集団遺伝学的解析を行った。また、日本の輸入熱帯熱マラリア症例におけるアーカイブ標本については、主としてアフリカでの感染が疑われた例で、薬剤耐性関連遺伝子に着目して分析した。

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（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の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。

また、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)
- d) Evaluation of malaria diagnostic in North Sumatra Province, Indonesia
インドネシア，北スマトラ州におけるマラリア診断の評価
Lambok Shiahaan (Dept of Parasitol, Faculty of Medicine, North Sumatera University, インドネシア)
- e) The contribution of relapses to the burden and complexity of *P. vivax* infection in PNG elementary school

パプア・ニューギニアの小学校における、複雑な三日熱マラリア蔓延状況に対しマラリア再発が果たす役割

Ivo Mueller (Papua New Guinea institute of Medical Research, パプア・ニューギニア)

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

近年、対策が進んだソロモン諸島のマラリア浸淫地で調査を行った。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を再評価したところ、特異度に比して、感度は原虫種や迅速診断キット違いによる幅が大きく、原虫密度の低い三日熱マラリアでは概して低い結果となった(表1)。また、1990年代初めにはマラリア感染率がほぼ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、タシンゴコ地域村落群) 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(図1A, B)。さらに、尿中抗体価の陰性化した例は、3年間で68.4% (13/19) となった。

また、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、コドン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1700種を含むプロテインアレイの作製に成功した。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。さらにマリ共和国のマラリア流行地から得た10名の免疫血清との反応性を検討した結果、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が47種同定された。

海外委託研究は、主にインドネシアとカンボジアで行われた。三日熱マラリアが流行の中心となったインドネシア、スマトラ島では、原虫密度の低い感染例を見逃すことが多い迅速診断キットは、用途を考えて使用しないと誤診の原因となることが、ここでも確認された。また、カンボジアでの研究では、成人が流行の中心となる森林マラリアの場合、年少者や児童を対象とした従来の Rapid assessment 手法では、流行状況が把握できないこと。薬剤処理した蚊帳: Insecticide treated net (ITN) の使用に加え、野外でも実施可能な防除法の開発が必要なものもわかった。

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、釧路湿原で採集されたハマダラカで、rDNA の ITS2 領域の塩基配列を比較したところ、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)。

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

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、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、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、卵を利用した分子分類するためのプライマーを開発した。

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、アフリカを含む国々から原虫株を集め、多重感染を除いた株について、ワクチン候補の表面抗原蛋白の遺伝子やハウスキーピング遺伝子のシーケンスを得て解析した。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（図3）。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。

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。*pcfrt* 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 *pcfrt* 耐性型は、これまで最も古い年代である。また、ピリメサミン耐性遺伝子については、*dhfr* 耐性型を同じアーカイブ標本で調べたところ、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。

海外委託研究では、中国の雲南省と海南省で得られた熱帯熱マラリア原虫で、薬剤耐性と関連する遺伝子型の解析が行われた。雲南省と海南省では、クロロキンやピリメサミンが、マラリア治療薬の一次選択薬でなくなってから既に5年以上たつが、現在も80%以上の熱帯熱マラリア原虫が、クロロキンやピリメサミンに対する薬剤耐性遺伝子を持っていた。また、アルテスネートの耐性と関連すると言われる遺伝子型は、今年度の調査では検出されなかった。

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、海外委託研究によるフィールド調査でも、マラリア制圧に向かう中で、誤診が多くなる迅速診断キットの限界が示された。

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、マラリアの血清疫学マーカーやワクチンの候補蛋白などの網羅的

検索に着手できた。

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、北海道釧路湿原から得られたシナハマダラカ類似個体では、rDNA の ITS2 の塩基配列が韓国で 2005 年に新種として記載された *Ano. belenrae* と一致した。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おり、今後、釧路湿原に生息するハマダラカについて、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、ネツ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。ヒトスジシマカの分布拡大には、輸入された古タイヤに付着した卵が孵化する可能性も指摘されており、適切な防除に対する基礎的データを得る上でもシマカの遺伝子分類法の確立は有用である。

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した。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、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、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、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症例のアーカ

イブサンプルでの解析から、クロロキン耐性株とピリメサミン耐性株のアジアからアフリカへの流入は、独立して別の時期に起こったことが示唆された。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従来の Roper ら (Science, 2004) の推測を否定するものである。

E. 結論

マラリアの免疫診断については、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。一方、抗体を検出する検査では、再感染がなければ、3 年程度で陰性化することが多い尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価は、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、タイヤマリ (アフリカ) 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ブット抗原抗体反応スクリーニングによる、熱帯熱マラリア原虫の流行の新規抗原タンパク質のスクリーニングを開始した。

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、これまで日本では生息が確認されていない、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、北海道で生息している可能性が示された。また、日本脳炎ウイルス媒介能を持つ *Cx. gelidus* subgroup の分子分類のためのプライマーを作成し、ヤブカ類 (特に Dengue 熱媒介蚊、チクングニヤ熱媒介蚊) では、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。

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。さらに、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、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。

国際的なネットワークを生かした情報交換については、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焦点を絞った。アジア諸国の研究機関との連携強化を目指し、2010年1月に、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。

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	%	
MaI 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	6	62	
	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	

図1A 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)

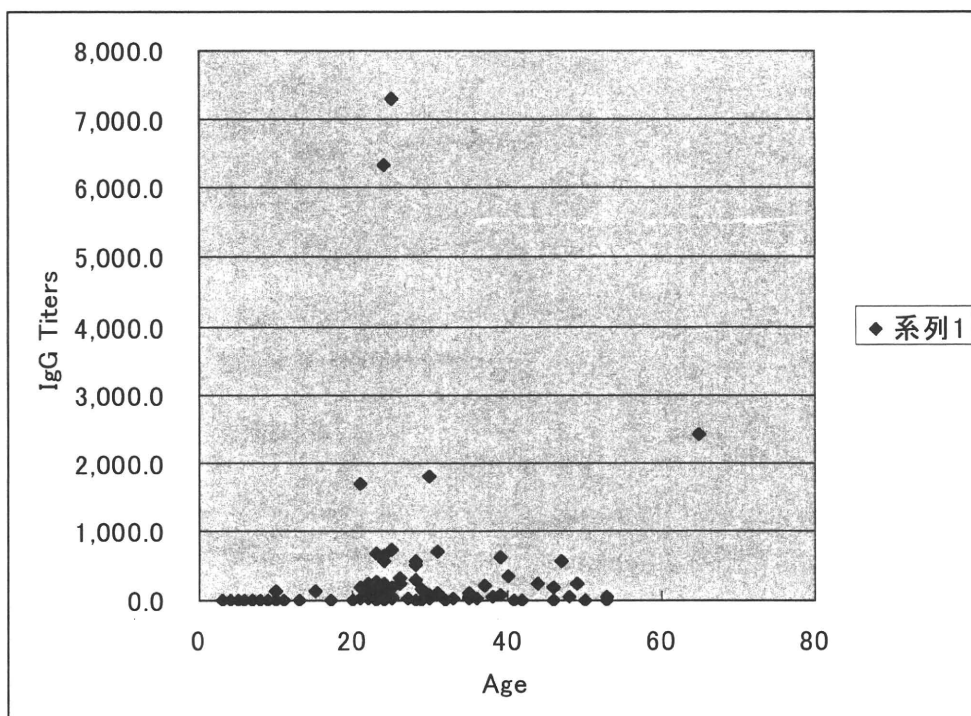


図1B ガダルカナル北東岸、タシンボコ地域の村落群における住民の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価 (2009年調査)

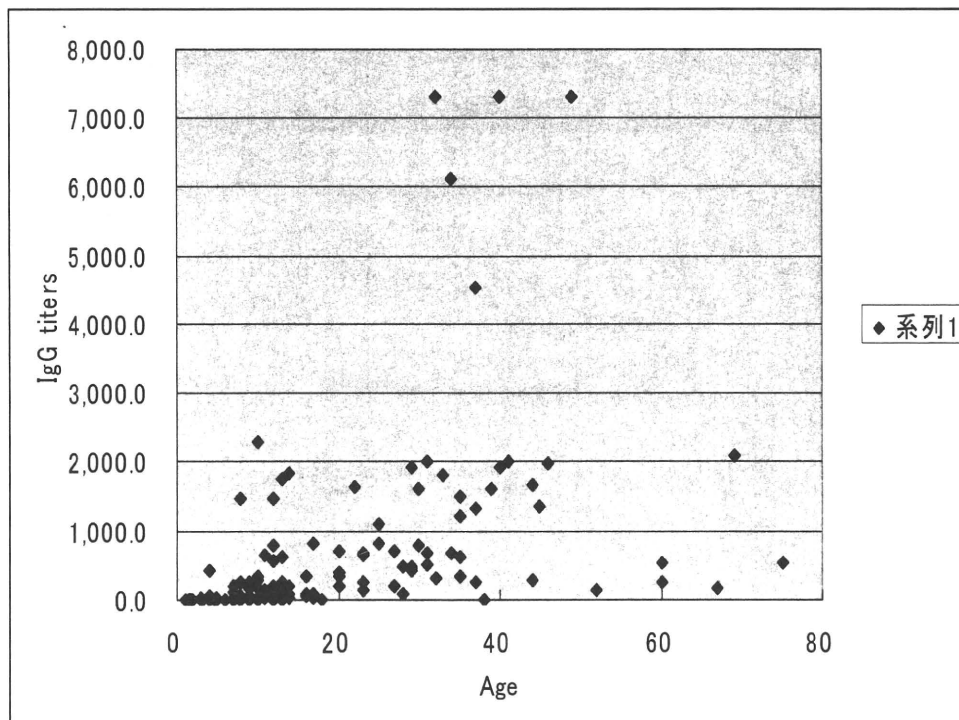


図2 rDNA・ITS2領域の塩基配列の類似度に基づいて描いた北海道産ハマダラカの樹状図

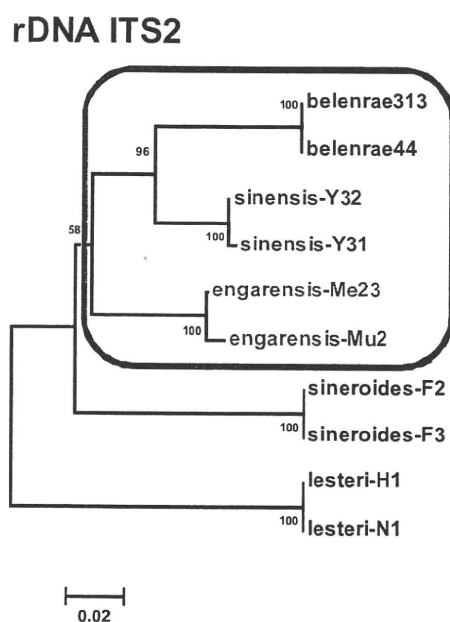
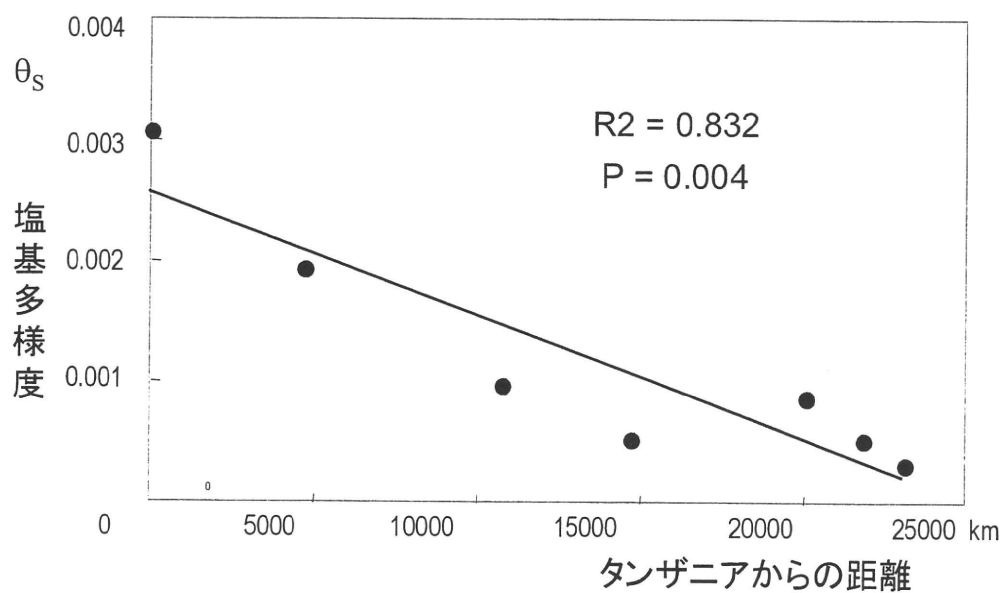


図3 遺伝的多様度と東アフリカからの地理的距離の関係 (m_{sp-1})



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 CO1 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 *pfCRT* 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 *pfCRT* 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反応を検出した。

- 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、ネツタ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、ハイスルーブ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

釧路湿原の湿地・池から採集されたハマダラカ幼虫を、室温 20°C 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。*pcfrt* 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 *pcfrt* 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% 近くにのぼり、