

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	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

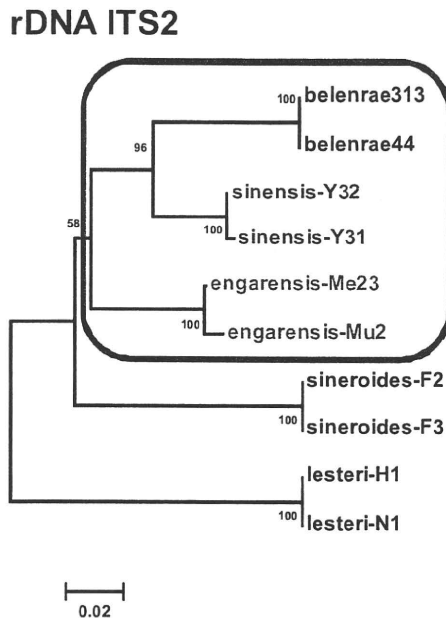


図2 ネットイシマカとヒトスジシマカの卵を用いた種特異的な PCR 産物の増幅結果

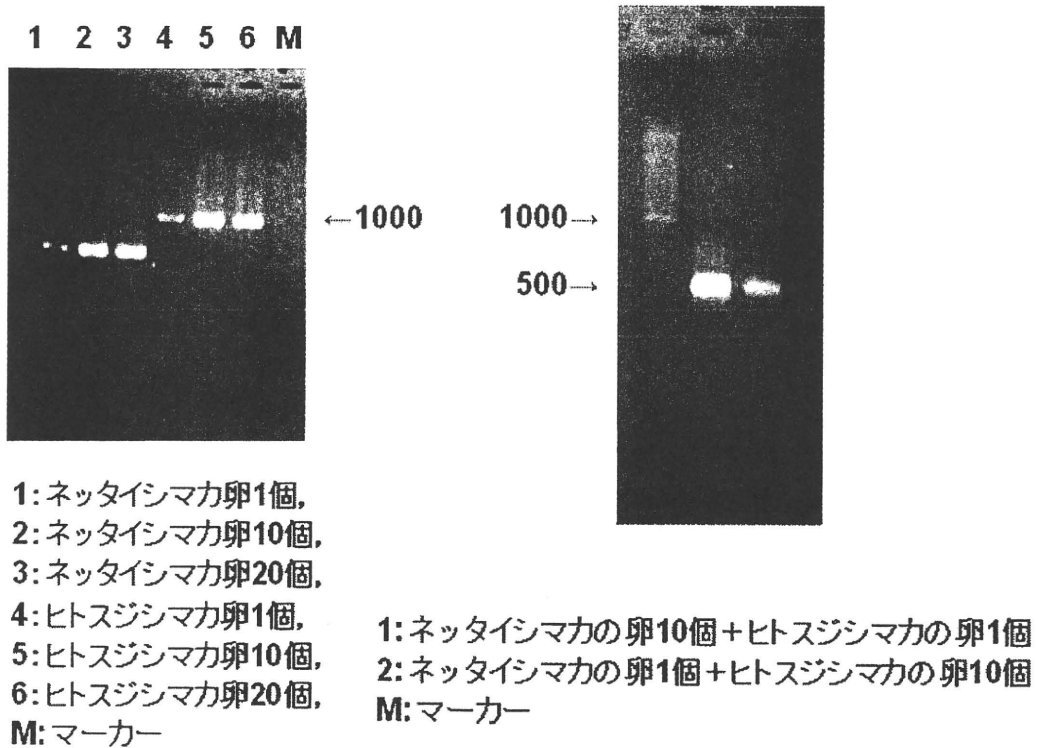
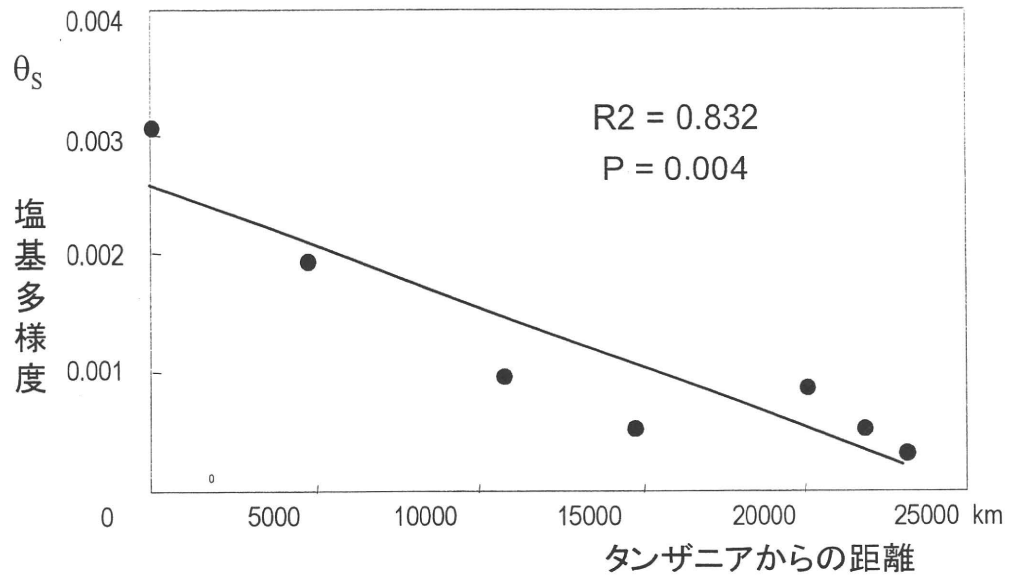


図3 遺伝的多様度と東アフリカからの地理的距離の関係 (m_{sp-1})



厚生労働科学研究費補助金（平成 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 幾つかのマラリアの免疫診断法について、検査目的と疫学的状況の変化に応じた、新規検査法の開発と利用法の再検討を行った。マラリアの免疫診断法は、原虫抗原を検出する方法と抗体を検出する方法に大別されるが、即時診断の為には、原虫抗原を検出する迅速診断キットが開発されている。しかし、従来、熱帯熱マラリア以外のマラリアについては検査の信頼性に乏しいキットが多く、マラリア対策が進んだ地域でのニーズには必ずしも合わなかった。そこで、今回、最近市販された、マラリア原虫の Histidine rich protein-2 (HRP-2) と Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) の両方を検出するキットについて、ソロモン諸島のマラリア流行地で信頼性を検討した。Mal Pf/Pv antigen と Entave Malaria の 2 つの迅速診断キットは、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% 以下とあまり高くなかった。また、検出限界は、熱帯熱マラリアで原虫密度 $50/\mu\text{l}$ 以上、三日熱マラリアで原虫密度 $100/\mu\text{l}$ 以上と、従来のキットと大きな違いはなかった。

また、マラリア原虫の抗体を検出する検査診断法については、熱帯熱マラリア原虫に対する尿中抗体価測定の有用性について、同じソロモン諸島のマラリア流行地で検討した。1990 年代初めにはマラリア感染率が人口の 30~40% と同じだった 2 地域で、住民の尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の違いを比較したところ、1990 年代にマラリア対策が進んだ地域 A（ホニアラ市）では、B（ガダルカナル島北東岸、タシンボコ地域村落群）に比して、特に 20 歳以下の若年者で陽性率が低く抗体価も低い例が多くなった。また、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、熱帯熱マラリア原虫の尿中抗体価は 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。尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、年齢層毎に比較し経時的に変化をモニタリングすることにより、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果を確認する指標として利用できることがわかった。

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、原虫抗原を検出する迅速診断キットは、既に様々なタイプが実用化されている。しかし、最近、アジア・太平洋地域で相対的

に増えている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。従来の迅速診断キットは、マラリア原虫の Histidine rich protein-2 (HRP-2)、もしくは Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) のどちらか一方を検出するタイプが殆どだったが、最近、両方を検出するタイプも市販されている。そこで、新しい迅速診断キットについて検出限界を確認し、今後用途が拡大する可能性について検討した。

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

B. 研究方法

ソロモン諸島のガダルカナル島北東岸のマラリア浸淫地、タシンボコ村落群において、2008 年 9 月から 2010 年 9 月まで、約半年毎に、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、2010 年 9 月には、新しい迅速診断キット、Mal Pf/Pv antigen と Entave Malria の 2 つを並行して行い、各々のキットについて感度(sensitivity)と特異度(specificity)を求めた。

毎年 9 月の血液採取時には、あわせて尿も採取し、尿中のマラリア原虫に対する IgG 抗体価を計測した。また、2009 年 9 月には、1990 年代は多くのマラリア感染者がみられたが、現在はマラリア患者の報告が殆どないホニアラ市においても、同様な調査を行って尿を採取した。実際の尿中抗体の測定では、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、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。Cut off 値としては、日本人 40 人の抗体価の平均 + 3SD を用いた。

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

毎年 9 月の調査での Sentinel site のタシンボコ村落群でのマラリア感染率は、漸減傾向を示した。1996 年 9 月、2006 年 9 月、2008 年 9 月、2010 年 9 月の結果を比較すると、マラリア感染率は、約 30% から 10% へと減少したが、熱帯熱マラリア、三日熱マラリアごとに、年齢別感染率をみた場合も、大きな疫学的変化が確認された。熱帯熱マラリアがマラリア流行の中心だった 1996 年 9 月には、若年層ほど熱帯熱マラリア感染率が高くなる、マラリア高度浸淫地に典型的なパターンを示した (図 1)。しかし、2006 年以降、熱帯熱マラリア感染率は大きく減少すると同時に、三日熱マラリアが相対的に増加すると、熱帯熱マラリアでは、この年齢特性が消え、かわりに三日熱マラリアでは、若年層で感染率が高くなる傾向がみられた (図 2)。また、強い治療的介入が行われた後には、全年齢層で、熱帯熱マラリア、三日熱マラリアとも感染率が

低くなる傾向を示した（図 1, 2）。

今回検証したマラリア迅速診断キットは、特異度は高かったが、感度は原虫種や迅速診断キット違いによって、幅のある結果となった（表 1）。Mal Pf/Pv antigen は、先進国も含め、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かった。一方、Entave Malaria では、感度は、熱帯熱マラリア、三日熱マラリアともやや高いものの、Mal Pf/Pv antigen に比しやや偽陽性が多い傾向を示した。

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

マラリア対策の進展で、ソロモン諸島のガダルカナル北東岸では、1990 年代に流行の中心だった熱帯熱マラリアの感染率が急速に減少した。2000 年代になると、一時、三日熱マラリアの感染率が増加したが、最近では、全般的にマラリア感染率が減少している。このマラリア流行の交代と減少のパターンは、かつて、日本の八重山諸島での

マラリア対策や台湾、スリランカでのマラリア対策でもみられた減少であり、今後の対策の進捗によっては、ソロモン諸島におけるマラリア制圧も不可能ではないと考えられる。

しかし、マラリア対策の進展に伴い、相対的に増加する原虫密度の低い三日熱マラリアは、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を用いても、検出は困難であった。一方、マラリアの抗体検査は、血中抗体の場合、抗体の種類によっては感染後 5~10 年、高い抗体レベルが続き、現在の感染状況を把握することは、個人レベルでも集団レベルでもできない。しかし、今回の調査で、尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体は、3 年程度で陰性化する例が、70% 近くにはのぼることがわかった。尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、低年齢層で低くなり、高齢層で高くなるうえ、現在ほぼマラリアが制圧されている地域の若年者では、殆ど陽性者が認められなかった。尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できる可能性が示された。

E. 結論

ソロモン諸島、ガダルカナル島のマラリア流行状況は、かつての八重山諸島における制圧数年前の状況に近づいている。その状況の中で、相対的に増えている原虫密度の低い三日熱マラリアは、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、検出困難であった。また、マラリア対策の進捗状況が異なる 2 つの地域で、住民の尿中熱帯

熱マラリア原虫 IgG 抗体価を測定し、陰性化までの期間も推測した。その結果、尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できる可能性が示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Saito-Nakano Y, Tanabe K, Kamei K, Iwagami M, Komaki-Yasuda K, Kawazu S, Kano S, Ohmae H, Endo T. Genetic evidence for *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and pyrimethamine in Indochina and the Western Pacific between 1984 and 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 79(4): 613 -619, 2008
- (2) Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol* 121(2):144-150, 2009
- (3) Nakagawa Y, Ueki M, Fueda K, Ohmae H, Ishikawa H. Risk assessment of re-emerging *Plasmodium falciparum* on Ishigaki Island using a stochastic model. *Trop Med & Hlth* 37(3): 97-107, 2009.
- (4) 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.

Plasmodium falciparum accompanied the human expansion out of Africa
Curr Biol. 20(14):1283-9. 2010

- (5) Yamauchi T, Nakazawa M, Ohmae H, Kamei K, Sato K, Bakote'e B. Impact of ethnic conflict on the nutritional status and quality of life of suburban villages in the Solomon Islands
J Nutr Sci Vitaminol 56(4):227-34. 2010
- (6) 大前比呂思, 石川洋文. 気候変動と寄生虫症 資源環境対策 44(9):29-38, 2008.
- (7) 大前比呂思 マラリア 化学療法の領域 24(11): 69-75, 2008.

2 口頭発表

- (1) Nakazawa M, Ohmae H, Kamei K, Yamauchi T, Frusawa T, Kawabata M, Utusmi T, Bakote'e B. Continuous urinalyses clarified that urine pH reflected the changes of dietary habits and that urobilinogen reflected *falciparum* malaria in Solomon Islands. International Congress of Tropical Medicine and Malaria Nov 1-3, Cheju, Korea 2008
- (2) Ohmae H. Limitation of clinical diagnosis and evaluation of rapid diagnostic tests to detect vivax malaria in the field
The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area.

January, 2010, Shanghai

- (3) Sawabe K, Tsuda Y, Ohmae H.
Current distribution and molecular
identification of anopheline
mosquitoes in Japan
The 2nd international conference
on vivax malaria in Asia and
Pacific area.

January, 2010, Shanghai

- (4) Ohmae H, Ishikawa H, Fueda T,
Ono M, Tnag L, Gu Z,
Basic analysis to estimate
relationship between climate change
and emerging of vivax malaria.
The 2nd international conference
on vivax malaria in Asia and
Pacific area.

- (5) 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

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

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

- (7) 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

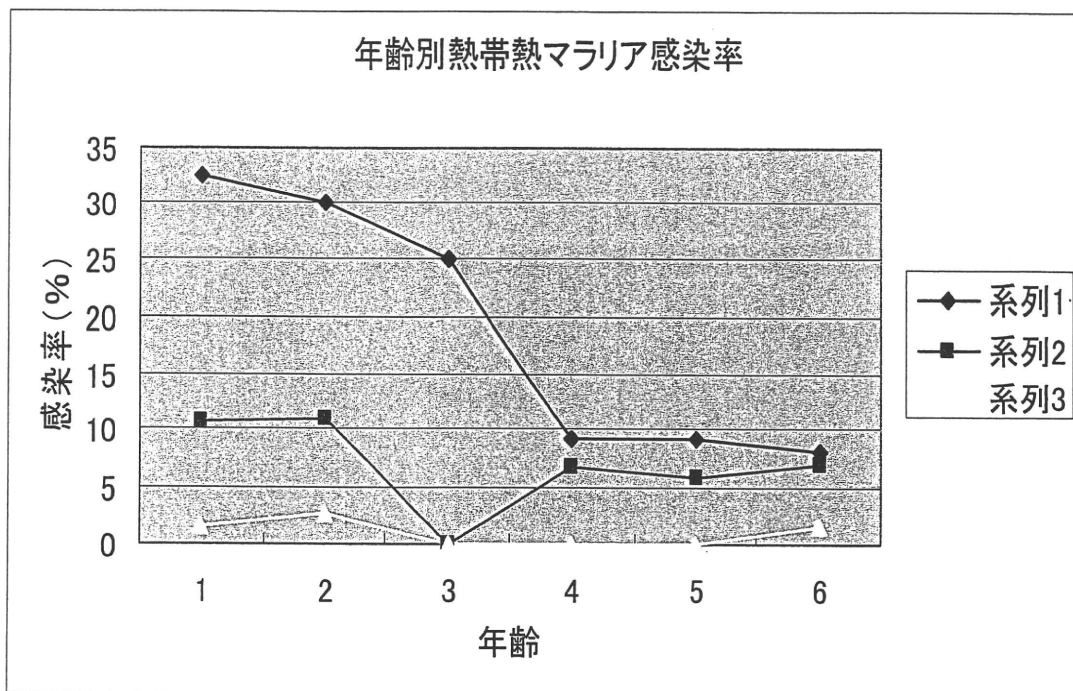
表1 原虫密度の低いマラリアに対する迅速診断キットの信頼性
(ソロモン諸島における調査, 2010年)

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)

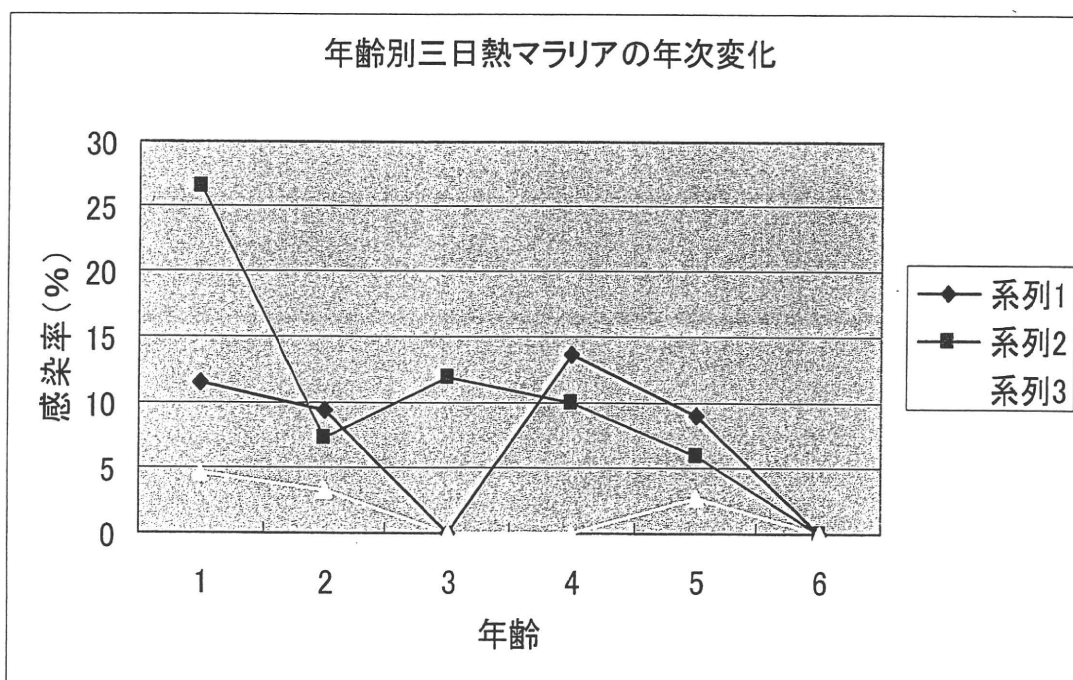
年齢	最近のマラリア感染歴								尿中抗体価の変化		
	2007年		2008年		2009年		2010年		2008年	2009年	2010年
	2月	9月	2月	9月	2月	9月	2月	9月	9月	9月	9月
8	Pf	Pv	-	Pv	-	-	-	-	+	-	-
15	-	Pf	Pv	-	-	-	-	-	+	+	-
21	Pv	Pf	-	-	-	-	-	-	+	-	-
24	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
33	-	Pf	Pv	-	-	-	-	-	+	-	-
40	Pf	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
49	-	Pf	-	-	-	-	-	-	+	+	-
58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

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



系列1 1996年, 系列2 2006年, 系列3 2008年

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



系列1 1996年, 系列2 2006年, 系列3 2008年

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

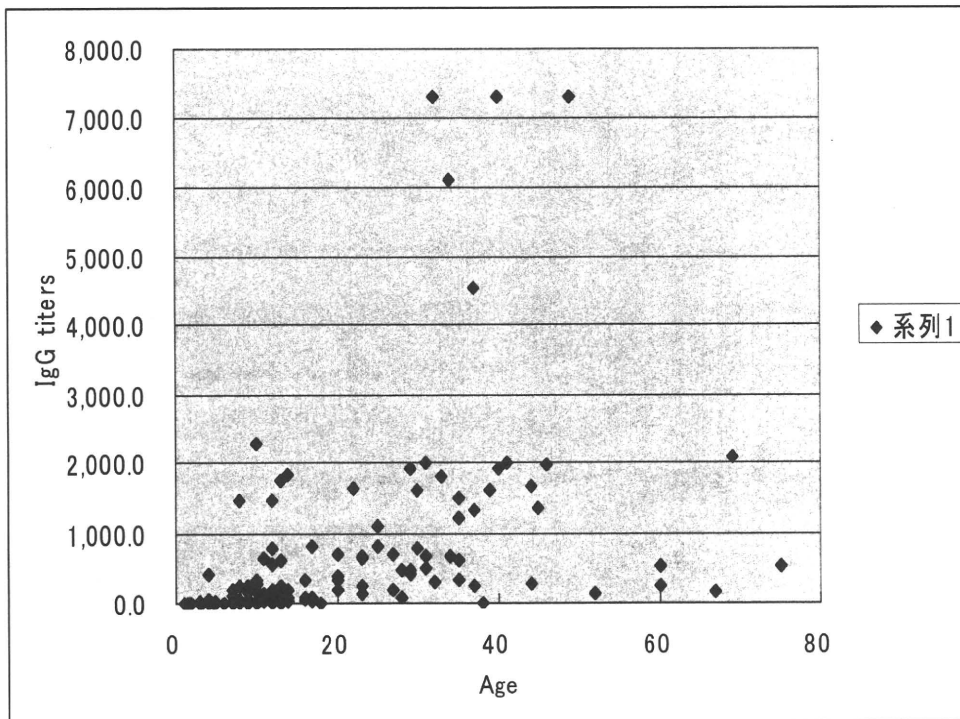
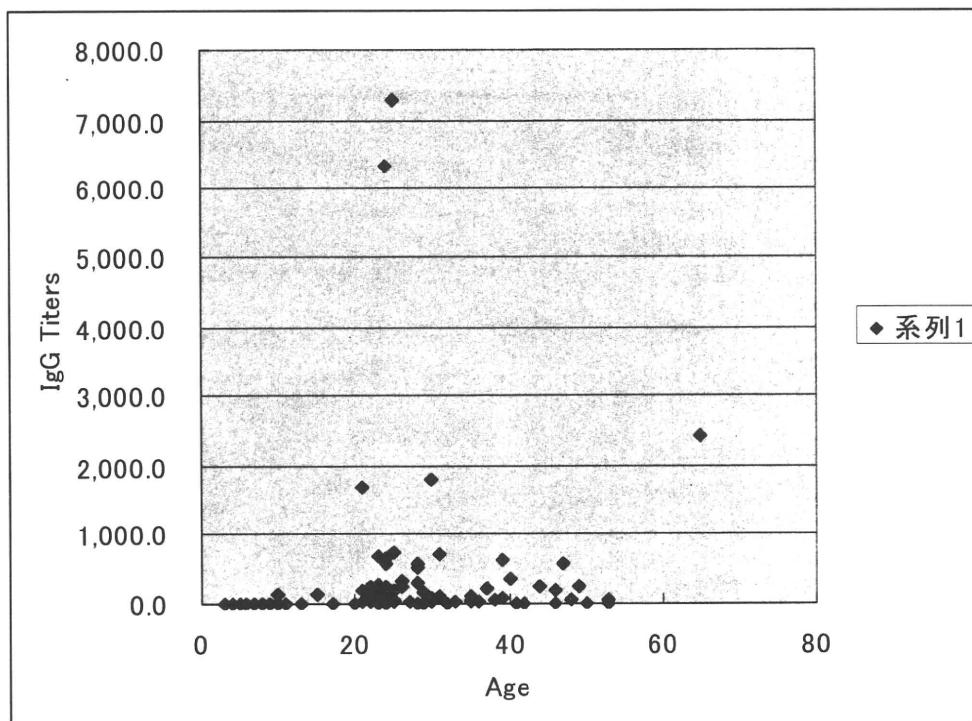


図4 ガダルカナル北東岸、ホニアラ市における住民の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価 (2009年調査)



厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成20～22年度 総合分担研究報告書

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：

東南アジアからアフリカへの薬剤耐性の移入

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。また、1960年代に出現したピリメサミン（Pyr）耐性マラリアもアフリカに移入したことが報告されている。アジアで出現した薬剤耐性のアフリカへの広がりを遺伝学的に証明するために、アーカイブサンプルからのCQ耐性を付与する *pfcr1* 変異とPyr耐性を付与する *dhfr* 変異を同定した。その結果、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 *pfcr1* 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 *pfcr1* 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理由により、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。

本研究では、*dhfr* 変異と *pfcr* 変異をアフリカのアーカイブサンプルから同定することにより、薬剤耐性が移入した年代を遺伝学的に明らかにすることを試みた。

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* ならびに *pfcr* 変異を含む 190 bp の DNA 断片は Phusion polymease (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 *pfcr* の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。*Dhfr* の配列決定には (i) アミノ酸 51、59 番を含む 190bp の増幅には 21F (5' -GCC ATA TGT GCA TGT

TGT AAG GTT GAA AGC-3') と 22R (5' -CTT ATA TTT CAA TTT TTC ATA TTT TGA TTC-3') を outer primers とし、23F (5' -TGT TGT AAG GTT GAA AGC AAA AAT GAG GGG-3') と 24R (5' -TTT TTC ATA TTT TGA TTC ATT CAC ATA TGT-3') を inner primers とした; (ii) アミノ酸 108 番を含む 190bp の増幅には 25F (5' -TGT AAA TAT TTA AAC AAA GAA ACT GTG GAT-3') と 26R (5' -TTC ATC AAA ATC TTC TTT TTT TAA GGT TCT-3') を outer primers とし、27F (5' -GAA ACT GTG GAT AAT GTA AAT GAT ATG CCT-3') と 28R (5' -TTC TTT TTT TAA GGT TCT AGA CAA TAT AAC-3') を inner primers とした; (iii) アミノ酸 164 番を含む 190bp の増幅には 29F (5' -GAA GAT TTT GAT GAA GAT GTT TAT ATC ATT-3') と 33R (5' -AAA TAC ATC ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT-3') を outer primers とし、31F (5' -GTT TAT ATC ATT AAC AAA GTT GAA GAT CTA-3') と 34R (5' -ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT TCT AGT AAA-3') を inner primers とした。PCR 産物の配列決定は、オペロンバイオテクノロジー (株) に外部委託した。

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 *pfcr* locus の増幅が可能であった。*Dhfr* においては 62 サンプルが DNA の回収と *dhfr* locus の増幅が可能であった。サンプルはアフリカ東部と西部に集中しており、その内訳は、東部アフリカが 48 サンプル (ケニア、タンザニア、ウガンダ、ルワンダ、ザンビア、マラウイ、ジンバブエ、南アフリカ、マダガスカル)、中央アフリカが 7 サンプル (コンゴ、ガボ

ン、カメルーン)、西部アフリカが 62 サンプル (ガーナ、ナイジェリア、コートジボワール、ブルキナファソ、ギニア、ガンビア、セネガル)、サハラ砂漠近郊の北部アフリカが 11 サンプル (モーリタニア、マリ、ニジェール、チャド) であった。ダイレクトシークエンスの結果では、東南アジアの株は 1 種のシークエンスの波長として結果が得られていたが、アフリカのサンプルは *pfcr* のうち 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。*Dhfr* では 42 サンプル (全体の 67%) が混合感染であった。*Pfcr* では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 *pfcr* 耐性型の検出はこれまで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。

Dhfr では 1984 年以降に、薬剤感受性 *NRSI*, *ICSI* が検出された。これらの変異は現在でも非常にわずかながらフィールドで単離されている (Mockenhaupt, 2001, Kyabayinze, 2003 AJTMH)。このような遺伝子型は東南アジアでは同定されず、アフリカ独自の多型だと考えられる。三重変異の最も古い同定年代は 1991 年になった。マラウイでは 1993 年より Pyr を第一次選択薬として大量に使用したが、それ以前に三重変異がアフリカに存在していたことを示す。また、アフリカを起源とする *NRNI*, *ICNI* 二重変異も 1991 年以降に検出された。このことは 90

年代での Pyr アフリカでの使用の拡大に伴い、三重変異の移入と二重変異の発生をもたらしたと考えられる。

D. 考察

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, Saito-Nakano, Y., Kamei, K., Iwagami, M., Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S., Kano, S., Tanabe, K., Ohmae, H., Endo, T. (2007) Genetic polymorphisms of drug resistant gene in Southeast Asia through imported isolates of *Plasmodium falciparum*. The 1st Thailand-Japan Joint Form of Infectious Diseases. Jun 29-30, Bangkok, Invited speaker.

2, 中野由美子, 美田敏宏, 中曾根英子,

田邊和祐 (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.

Plasmodium falciparum using archive blood smears. The 7th Taiwan-Japan Symposium on Immunization and Travel Medicine. Taiwan, Taipei, Sep 9-10

3. Yumiko Saito-Nakano (2010) Genetic identification of drug resistance in

厚生労働科学研究費補助金(新興再興研究事業)
H20~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 近年、朝鮮半島で三日熱マラリアの大流行が続いており、主要媒介蚊とされているシナハマダラカの分子分類学的検討が行われた。その結果 2 種の同胞種が発見されるなど、シナハマダラカの属する *hycanus* グループの分類には再検討が必要になってきた。そこで我が国産のハマダラカ類に関しても、分子分類学的手法を確立し分布の現状を調査した。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。

疾病媒介蚊の分子分類システムは、マラリア媒介蚊だけでなく日本脳炎媒介蚊やデング熱媒介蚊など、他の疾病媒介蚊の海外からの侵入を監視する上でも有用である。イエカ属 7 種類、ヤブカ属 5 種類を対象として、rDNA・ITS 領域の塩基配列を比較分析し種特異的なプライマーを試作した。

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分類学的な再検討が行われた。その結果、形態的には区別できない、いわゆる sibling species が混棲していることが明らかとなり、2005 年に 2 種類が新種として記載された。また、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 DNA 分析に基

づいた分子生物学的な再検討を行う必要が出てきた。

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。2001 年から 2005 年に成田空港の国際線航空機を対象として実施された衛生昆虫の調査では、調査した 2,161 機の 1.2% で蚊成虫が採集されている(長谷山ら、2007)。これらのサンプルは種類同定の後、さらに病原体を保有しているかどうかをチェックしている。種類同定は形態的特徴によって行われているが、サンプルによっては損傷が激しく正確に種類を同定できないことが多い。成田空港の場合、採集された

蚊成虫の 46%は種類を特定できなかった。損傷が激しい個体であっても媒介蚊の種類を特定し、合わせてその個体が病原体を保持しているかどうかをチェックするためには、機内より採集された蚊の体の一部から抽出した DNA を用いた分子生物学的分類方法の開発が必要である。

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分子分類学的な再検討を行うこと、さら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

我が国の様々な地域より得られたハマダラカ類サンプルに基づいて分類の再検討を行った。形態的な分類が難しい *hyrcanus* グループのサンプルは、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。これまで我が国で分布が報告されていないハマダラカの生息を確認するため、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て室内分析用のサンプルとした。

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*, さらにに我国産シマカ 3 種を対象として、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、卵サンプルに対しても感度の高いプライマーの製作を試

みた。

イエカ類の中で医学的重要度の高い日本脳炎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。

C.研究結果

これまで調査した我が国産ハマダラカ類の分布を図 1 に示した。採集されたハマダラカは、形態的特徴によって以下の 7 種類に分類された; シナハマダラカ、エンガルハマダラカ、オオツルハマダラカ、エセシナハマダラカ、チョウセンハマダラカ、ヤマトハマダラカ、コガタハマダラカ。八重山地方に生息しているコガタハマダラカは、大陸のコガタハマダラカとの形態比較、交雑実験、分子生物学的検討によって大陸の種類とは異なる種類であることが明らかになり、正式に *Anopheles yaeyamaensis* と命名された。

釧路湿原に点在する湿地・池の中から 6 水域を選び調査したところ、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。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)。この種類は 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わかった。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。

表 1 に示したシマカ類 5 種 14 系統を用いて、分子分類のためのプライマーを作成し、

種特異的な PCR 産物が増幅されることを確認した (図 3)。また、ネッタイシマカと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でも、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 4)。

イエカ類の研究対象としたのは日本脳炎媒介蚊 6 種 (コガタアカイエカ、*Culex tritaeniorhynchus*、シロハシイエカ、*Culex pseudovishnui*、オビナシイエカ、*Culex fuscocephala*、ヨツホシイエカ、*Culex sitiens*、*Culex vishnui*、*Culex gelidus*) と熱帯・亜熱帯に広く分布するフィラリア媒介蚊 (ネッタイイエカ、*Culex quinquefasciatus*) の計 7 種類である。rDNA・ITS 領域の塩基配列の解析結果に基づいてプライマーを設計し、検出感度の検討を行った。その結果、検討した 7 種それぞれに特異的な PCR 産物が増幅されることがわかった (表 2)。

D. 考察

我が国産ハマダラカの中でマラリア媒介能を有する種類として特に重要なのは、シナハマダラカ、オオツルハマダラカ、コガタハマダラカの 3 種類である。コガタハマダラカは八重山諸島以南に生息しており、同所的に生息する他のハマダラカ類との間には、はっきりした形態的違いがある。これに対してシナハマダラカとオオツルハマダラカの場合、形態的特徴に重なりがあるため、形態分類によって 100% 確実に種類を同定することは難しい。実際、本研究でシナハマダラカとオオツルハマダラカの形態分類結果と分子分類の結果にはかなりの不一致がみられた。図 1 は分子分類学的手法によって種類同定した結果を示しており、現時点でもっとも信頼度の高いハマダラカ

の分布状況を示していると考えられる。

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。

日本脳炎ウイルスの媒介蚊には形態的に類似した種類が多く、サンプルが損傷している場合には正確な種類同定はほとんど不可能である。そのため、特に同定が難しい 3 種類を *vishnui* グループとしてまとめて扱っている研究が多い。しかし、形態的な違いがはっきりしている幼虫を対象とした調査結果によれば、*vishnui* グループの種類構成には場所により、また調査時期によっても大きな変異があることが知られている。したがって、これらの種類の成虫を確実に同定することは、日本脳炎の疫学や感染リスク評価を行う上で非常に重要な課題であった。本研究で分析した 7 種類に関しては、種特異的なプライマーを作成できたので、この成果は疫学的研究や検疫におけるイエカ類の種同定技術の向上に大きく寄与すると期待される。

ネッタイシマカやヒトスジシマカなどが属するシマカ類は昼間吸血性で、ヒトが吸血されるリスクが非常に高い蚊である。シマカ類の形態分類は主として体表面に付着する鱗片の色や形状に基づいているが、鱗