

201303017A

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業
(H25-地球規模-一般-001)

ポスト国連開発ミレニアム開発目標における
熱帯アフリカマラリア根絶可能性に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 明

平成 26 (2014) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業
(H25－地球規模－一般－001)

ポスト国連開発ミレニアム開発目標における
熱帯アフリカマラリア根絶可能性に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 明

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書		
ポスト国連開発ミレニアム開発目標における熱帯アフリカマラリア根絶可能性に関する研究	研究代表者 金子 明	----- 1
II. 分担研究報告書		
1. ミトコンドリアCOXIII遺伝子をターゲットとする高感度マラリア患者検出法の開発	研究代表者 金子 明 連携研究者 木村政継	----- 8
2. マラリア撲滅プログラムにおける G6PD 欠損症スクリーニング法改良の試み	研究代表者 金子 明 連携研究者 寺本(木俣) 勲	--- 21
3. 集団治療によるマラリア撲滅活動に付随した媒介蚊コントロールとモニターリング	分担研究者 皆川 昇	----- 26
4. ヒト赤血球異常症	分担研究者 平山謙二	----- 30
5. Epidemic Malaria and ‘Colonial Development’ : Reconsidering the Cases of Northern and Eastern India	分担研究者 脇村孝平	----- 31
6. 集団治療実施に関連するヒト・熱帯熱マラリア原虫の分子疫学的研究 ～ビクトリア湖島嶼マラリア撲滅に向けて～	分担研究者 五十棲 理恵	----- 41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	44
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	45

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
総括研究報告書

ポスト国連開発ミレニアム開発目標における熱帯アフリカ
マラリア根絶可能性に関する研究

研究代表者 金子 明 大阪市立大学大学院医学研究科 寄生虫学分野 教授

研究要旨

地球規模マラリア根絶は、今世紀人類が対峙する Global Health 上の優先課題である。国連開発ミレニアム目標（MDGs）では患者および死者数を 2015 年までに 75%減少させることが掲げられてきた。今般の対策法強化により感染者数の減少が流行地各地で報告されてきており、アジア・太平洋では究極の目標であるマラリア撲滅が見えてきた。しかし熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅は困難かつ重要な踏み石と考えられ、そのロードマップは未だ見えていない。本研究はポスト MDGs におけるこの課題に対して日中瑞および流行国ケニアの研究者が共同で挑戦する研究ベンチャーである。ビクトリア湖高度マラリア流行島嶼をモデルとしてマラリア撲滅に挑戦するものである。オコデ島全住民(700 人)を対象にアルテミシニンとプリマキンによる集団治療と薬剤処理蚊帳配布を組み合わせた短期集約対策によりマラリア撲滅を試みる。地理的に連なる島嶼および内陸村住民集団においてマラリア感染に関する寄生虫学、血清分子疫学調査を、島嶼地域間・対策前後の比較において継続する。またヒト赤血球異常型について検討する。集団治療実施に先行し当該処方抗原虫生殖母体効果による伝播阻止作用を臨床薬理学的に検討する。さらに住民主導の媒介蚊対策とサーベイランスによるマラリア撲滅長期的維持システムを構築し、社会経済学的開発の側面について検討する。**熱帯アフリカ高度マラリア流行地域**を対象とすることが本研究の最大の学術的挑戦である。島嶼は対策干渉研究に対して自然の実験系を提供する。研究代表者は南太平洋ヴァヌアツ島嶼において過去 20 年間、島嶼マラリア撲滅維持モデルを構築してきた[Kaneko et al. Lancet 2000]。それをビクトリア湖島嶼に応用することが第 2 の特徴である。また**集団治療**によるマラリア撲滅を試みるのが第 3 の特徴である。研究島嶼においてマラリアを短期集約的に撲滅し維持しうることを示せば、熱帯アフリカ初の撲滅成功例となり国際的インパクトが期待される。熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅戦略を国際社会へ提示し、地球規模マラリア根絶に向けたわが国のイニシアチブに対する基盤とする。平成 25 度は撲滅干渉前マラリア調査を撲滅予定のオコデ島、対照とする近隣 3 島および内陸部ウンゴイ村で開始し実施した。

本報告書においては、特にマラリア撲滅介入研究実施にあたって必要な以下の課題について行った検討結果について記載する。

マラリア感染率モニタリング

ミトコンドリア DNA を標的とする 4 種のヒトマラリア原虫の PCR 鑑別

G6PD 欠損症率モニタリング

原虫薬剤耐性分子マーカーの年次的推移

分担研究者

皆川 昇 長崎大学熱帯医学研究所・
病害動物学分野・教授

平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所・
免疫遺伝学分野・教授

脇村 孝平 大阪市立大学・大学院経済学
研究科・教授

五十棲 理恵 大阪市立大学・大学院医学研
究科寄生虫学分野・病院講師

A. 研究目的

熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅は地球規模マラリア根絶にいたる困難かつ重要な踏み石である。本研究はこの課題にケニア・ビクトリア湖島嶼より挑戦する。**熱帯アフリカ高度マラリア流行地域**を対象とすることに最大の学術的特徴がある。**島嶼モデル**により挑戦することが第 2 の特徴である。**アルテミシニンによる集団治療**を応用することが第 3 の特徴である。

貧困とマラリア：2008 年ニューヨークにおける MDGs マラリアサミットで新たな地球規模マラリア根絶計画が公表された。1955 年開始の世界マラリア根絶計画は 1970 年台に頓挫したが、それは地域特性を無視したためと総括されている。Global Fund 等の資金投入による薬剤処理蚊帳(impregnated bed nets: ITN)やアルテミシニン基盤併用療法(Artemisinin-based combination therapy: ACT)等対策法強化により各地で感染減少が報告されてい。しかし熱帯アフリカに代表される高度流行地における撲滅可能性は残された課題である。マラリアが住民の生活を阻害し貧困をもたらし、貧困がさらにマラリア流行を増悪する悪性サイクルがアフリカにおける社会経済開発を妨げている。本研究においてはマラリア撲滅の悪性サイクルに対する効果も検証する。

島嶼マラリア撲滅：島嶼は干渉研究に対して自然の実験系を提供する。我々は 1991 年以来ヴァヌアツ・アネイチウム島全人口 700

人を対象として、クロロキンとプリマキンによる集団治療と ITN によりマラリア撲滅を達成し、住民主導による ITN 使用とサーベイランスにより長期間マラリア撲滅を維持しうることを示してきた。このアネイチウムモデルをビクトリア湖島嶼へ応用する。

アルテミシニンの出現：中国側研究協力者 Li は 1970 年代漢方薬からアルテミシニンを見出した。現在アルテミシニンは多剤耐性原虫に対する要であり、この業績はノーベル賞候補と目されている。近年 Li はアルテミシニンと少量プリマキン併用の抗生殖母体効果による伝播阻止を目指した集団治療を迅速マラリア撲滅 (Fast Elimination of Malaria by Source Eradication: FEMSE) として提唱している。本研究においては、FEMSE を応用する。

B. 研究方法

研究対象地域

本研究はケニア・ビクトリア湖スバ地区で実施される。当地では長崎大学熱帯医学研究所により 2006 年 8 月より HDSS による住民の移動、生死が把握されている。ムファンガノ島(人口約 2 万人)、オコデ、タカウリ、キブオギの 3 小島(各人口約 700 人)および内陸集落ウンゴイ(人口約 3 千人)を対象にする。2012 年 1-2 月の予備調査では計 2574 名を検査し、37% が原虫陽性、95% は *Plasmodium falciparum* (Pf) であった。各々の地域で年齢特異的変動を示し小児における陽性率は 70% に達した。撲滅干渉実施へ以下の研究段階を経て推進する。

(1) **マラリア感染率調査**：住民感染率変動を撲滅前後で検討。以下研究の為に血液を濾紙採血にて保存する。

(2) **原虫薬剤耐性**：Pf 薬剤感受性変動を評価。最近 Pf アルテミシニン耐性が示唆されている。その分子マーカーは依然不明だが *Pfmdr1* コピー数等の候補を検討する。最近アルテミシニン耐性マーカーとして報告さ

れた propellar gene 変異についても検討を行う。

(3) 赤血球異常症: G6PD 欠損症者は primaquine で血管内容血を起こすことがある。予備的に対象地域で 7-15% の G6PD 欠損症が見いだされた。HbS、タラセミアとともに検討する。

(4) 血清疫学: Pf に対する特異的抗体の年齢群別陽性率と種類の変動を集団治療実施前後で検討する。

(5) 薬剤投与試験: artemisinin + piperazine + 少量 primaquine (APP) 投薬について Pf 抗生殖母体効果および安全性 (特に G6PD 欠損症) を無症候性感染者で検討する。WHO は primaquine 15 mg が有効かつ G6PD 欠損症者にも安全との見解を出した。

(6) マラリア伝播モデル: 撲滅干渉効果について検討する。

(7) 短期的マラリア撲滅干渉: オコデ島でマラリア撲滅を目指す。集団治療は Li の FEMSE に従い、乾季に全住民を対象に 35 日間隔で APP 2 サイクル実施する。この処方では 3 つの効果を含む: artemisinin による急速原虫排除、piperazine による長期的予防、primaquine による生殖母体急速不活化。島嶼間移動による原虫移入に対するサーベイランスを構築する。また定期的全島民スクリーニングにより陽性者に APP を投薬する。

(8) 長期的マラリア撲滅維持: 住民主導の殺虫剤処理蚊帳使用とサーベイランス継続による。

(9) 社会経済学的インパクト: マラリア撲滅の影響評価。

(10) Feasibility study: 島嶼マラリア撲滅戦略のムファンガノ島への応用を検討。

(11) 熱帯アフリカマラリア撲滅モデルの提言: 国際ワークショップを企画。

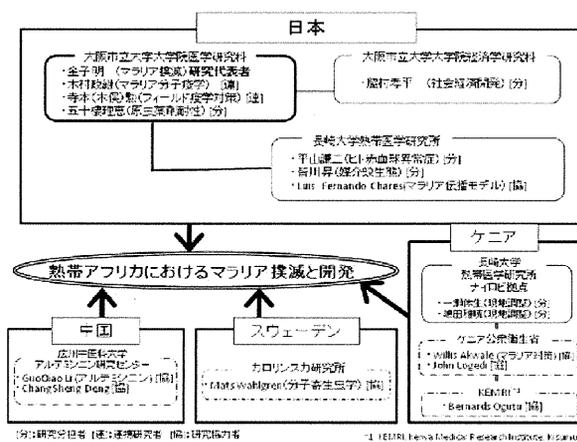
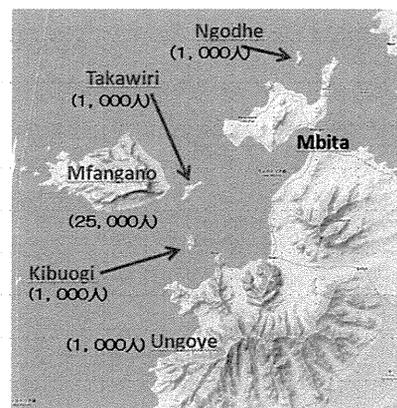
(倫理面への配慮)

本研究は人被験者に関する事項を含んでおり、大阪市立大学、長崎大学、ケニア保健省、カロリンスカ研究所による倫理審査の対

象となる。現地における被験者の研究調査への登録にあたっては、すくなくとも一人の当該被験者・保護者に口頭で研究目的・方法についての詳細な説明を行う。これらの過程を経た後で、被験者・保護者が同意した場合、書面にてインフォームドコンセントを得る。被験者・保護者の同意を得られなかった場合には、その理由を研究記録に記載する。

調査地点

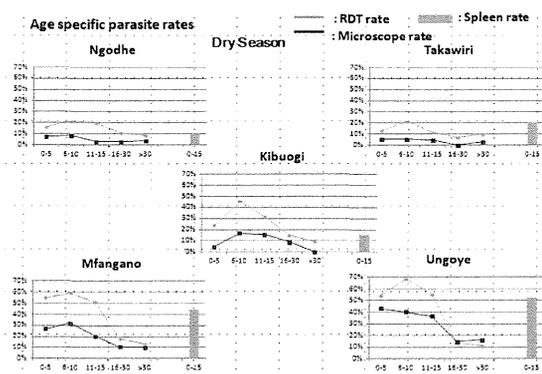
地名
(人口)



C. D. 研究結果および考察

マラリア感染率モニタリング: 現地島嶼マラリア撲滅計画の干渉前調査をスバ地区人口約 2 万 5 千人の Mfangano 島、各々約千人の Ngodhe、Takawiri、Kibuogi の 3 小島および内陸側 Ungoye 村で、2013 年 8 月に実施した。これは 2012 年乾季の 1-2 月および雨季 7-8 月の調査に引き続く第 3 回目の調査となる。総計 2251 名を調べマラリア原虫

陽性者は microscope にて 522 名(23.2%)、RDT にて 662 名(29.4%)であった。各島嶼で特徴的な年齢群特異的パターンが見られ、島毎の変異は 2012 年調査と同じ傾向があった。すなわち内陸部では乾季、雨季を通じて感染率が安定して高かった。島嶼部では島毎に感染率の変動がみられた。12 歳以下小児脾腫率、貧血率、発熱率はそれぞれ 38%、35%、5%であった。現在これらの調査からの濾紙採血サンプルによる PCR 診断を進めつつある(五十棲、木村)。



ミトコンドリア DNA を標的とする 4 種のヒトマラリア原虫の PCR 鑑別:我々は、18S r DNA を標的遺伝子とする nested PCR 診断法 (Parasitol. Int., 1997) を既に開発し、ボーリング法による DNA 抽出液を用いて原虫種を判別してきたが、末梢血をブロットしたフィルタペーパーから丁寧に抽出した DNA 液に適用すると、最初の PCR でノイズが出た。一方、同じ遺伝子を標的とする Snounou の方法 (1993) は、最初の PCR (25 サイクル) では電気泳動のバンドが見えず nested PCR が必須となるため、非感染者が大多数のサンプルの場合に無駄が多い。マラリア原虫には、1 個のミトコンドリア (mt) 内に 6 kb のゲノム DNA (mtgDNA) がコンカテマー状態で複数個存在し、熱帯熱の場合で、mtgDNA は 1 原虫あたり 20-150 コピーあり 18SrDNA の 4-8 コピーと比べ多い。そこで mtgDNA を原虫種判別の標的遺伝子にして、これらを改善しようと試みた。

mtgDNA の SNP の割合は、3 日熱 (285 配列) で 0.9%、熱帯熱 (98) で 0.5%、4 日熱 (6) で 0.4%と小さく、種間でも良く保存され、原虫ミトコンドリア DNA を共通に増幅するプライマーは容易である一方、原虫種を区別できる配列領域は限られている。最終的に Cox3 遺伝子付近で 5 つのフルネストプライマーセット (4 種の判別用及び陽性判定用) を作成した。バヌアツとアフリカのサンプルで Snounou 法と比較し、それよりやや高い検出感度が得られ、また、マラリア陰性は容易に判別できた。結果が多重感染の場合には、偽陽性が混入する理論上の余地があり、アフリカのサンプルで検討した。

G6PD 欠損症率: 従来、川本らの開発による G6PD Assay Kit-WST (Dojindo) が流行地で実施可能な方法として使用されてきた。しかし血液のヘモグロビンの色と WST の発色が似通っていることから、肉眼観察による陰性の判定には誤診のリスクが存在した。また女性 heterozygote おける中間値判定も問題となった。今回、上記キットに対して簡易型光電比色計とドライバスを用い、反応の開始時と終了時の 2 回吸光度を測定して、酵素反応量を WST の吸光度変化量として表す事で、1) 確実な反応陰性者判定、2) 15 分での迅速判定、3) 50%付近の活性値判定を可能とする改良をおこなった。男性の測定結果では、全測定値を集めると吸光度差 0.78 付近でピークとなり、これを正常人のピークと見なした。この活性値の 20% 以下の所に二つ目のピークが有り、この集団が欠損症 (homozygote) と考えられる。従って、陰性の基準は吸光度差 0.156 以下とした。女性においては男性のごとき 2 つのピークはみられなかった。今回は男性と同じ基準を当てはめ、0.156 以下を暫定的に欠損症とした (homozygote)。総計男性 1518 名を調べ、欠損者は 189 名 (11.9%) であった。欠損症率は Kibuogi および Takawiri 島および内陸部 Ungoye で各々約 15% と高く、Ngodhe 島では 4% と低かった。Mfangano

島では 11%であった。女性総計 1637 名を調べ、欠損者は 29 名(1.8%)であった。現在解析中の男性 Hemizygote の遺伝子変異とともに(平山)、女性 Heterozygote の OD 値の分布について、今後遺伝子変異を明らかにした上で検討したい。これらの結果は熱帯熱マラリア抗生殖母体薬としてのプリマキンを含む集団治療による島嶼マラリア伝播阻止計画の基盤となる。

原虫薬剤耐性分子マーカーの年次的推移: 近年の ACT 導入に伴うクロロキン使用停止に連動して、熱帯熱マラリアクロロキン耐性マーカー変異率の顕著な減少が観察されている。Kibuogi、Takauwiri、Ngodhe の 3 小島においては、Pfprt-K76T が 2008 年、2012 年 1-2 月、2012 年 9 月において各々 82.2%(37/45)、42.2%(19/45)、16.7%(5/30) と減少した。内陸部 Ungoye においては 2008 年、2009 年、2012 年 1-2 月で各々 52.8%(28/53)、46.2%(30/65)、30%(18/60) であった。かようにこの減少は小島嶼で内陸部原虫集団より顕著であった。Pfmdr1-N86Y においても同様な傾向がみられた。しかしアルテミシニン耐性と関連すると報告されている Pfmdr1 においてはこの傾向はみられていない。

E. 結論

上記の結果をふまえ、来年度の集団治療による島嶼マラリア撲滅介入研究実施にむけて以下進めていく。

集団治療実施準備: ビクトリア湖 Kibuogi 島全住民(700 人)を対象にアルテミシニンとプリマキンによる集団治療をおよび薬剤処理蚊帳配布によりマラリア撲滅が達成できるかをみる feasibility study 実施に向けてケニア側研究者と実施計画について協議を進めている。特に MDA 実施についての ethical clearance を得るために慎重に準備を進めている。中国側 Prof Li からの MDA 実施に際しての技術的な支援を得るために協議を重ねていく。

住民組織の確立: Kibuogi 島での集団治療実施、および community-directed surveillance 確立に必要な住民組織の確立を目指す。住民側と綿密な話し合いを持つ。**疫学調査継続:** 撲滅実施に先立つ Kibuogi を含む地理的に連なる島嶼および内陸湖岸村住民集団においてマラリア感染に関する寄生虫学、血清学、分子疫学的調査を島嶼地域間比較において継続していく。また熱帯熱マラリア培養株確立を調査と並行して進める(木村、金子修)。Pf 生殖母体分布について検討するための濾紙 RNA 採血を試み分子マーカーによる検討を開始する。

実験室解析: これまでに実施した疫学調査から得た濾紙採血サンプルについて、熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性遺伝子、マイクロサテライト解析による原虫集団の動態、G6PD 欠損症の遺伝子型、原虫抗原多型変動解析の検討を進める。これら多角的な実験室解析は同一サンプルに対して行われるため、金子修が coordinator として subgroup 間の調整を図り、班会議および website において得られるデータの・連携・統合を図っていく。血清疫学的検討を LSHTN の Chris Drakeley と共同でカロリンスカ研究所で着手する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
- (1) Honjo K, Chaves LF, Satake A, Kaneko A, Minakawa N. When they don't bite, we smell money: understanding malaria bednet misuse. *Parasitology*. 2013 Apr;140(5):580-6. doi: 10.1017/S0031182012002077. Epub 2013 Jan 24. PubMed PMID: 23343880; PubMed Central PMCID: PMC3596778.
- (2) Kaneko A, Chaves LF, Taleo G, Kalloko M, Isozumi R, Wickremasinghe R, Perlmann H, Takeo S, Tsuboi T, Tachibana S, Kimura M, Björkman A, Troye-Blomberg M, Tanabe K, Drakeley C. Characteristic age distribution of Plasmodium vivax infections after malaria elimination on Ane

ityum Island, Vanuatu. Infect Immun. 2014 Jan;82(1):243-52. doi: 10.1128/IAI.00931-13. Epub 2013 Oct 28.

PubMed PMID:24166950; PubMed Central PMCID: PMC3911855.

- (3) Cavaco I, Hombhanje FW, Gil JP, Kaneko A. Frequency of the functionally relevant aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) Pro185Ala SNP in Papua New Guinea. Drug Metab Pharmacokinet. 2013;28(6):519-21. Epub 2013 May 7. PubMed PMID: 23648678.
- (4) Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved diagnosis of malaria cases in island settings by using PCR that targets *Plasmodium* mitochondrial DNA. Submitted.

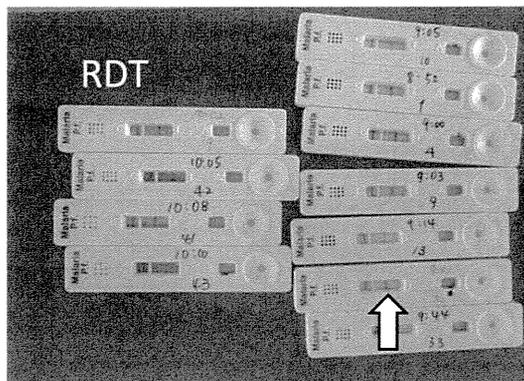
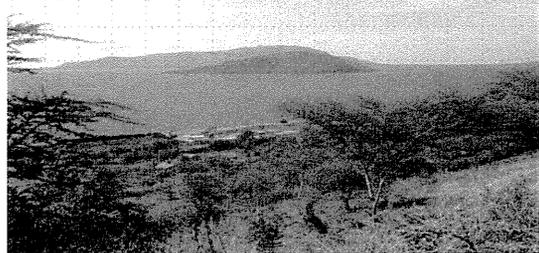
2. 学会発表

- (1) マラリア撲滅プログラムにおけるG6PD欠損症スクリーニング法改良の試み. 木俣 勲, 木村政継, 五十棲理恵, Md Idris Zulkarnain, Chan Chim Wai, Kongere James, Omar Ahmedeen, 金子 明. 第83回寄生虫学会大会 (松山)
- (2) Immune Protection after Malaria Ceased on Islands. Kaneko A. American Society of Tropical Medicine & Hygiene

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

ビクトリア湖島嶼は、アフリカ大陸マラリア撲滅のモデルと成り得るか？





DOJINDO G6PD Assay kit WST
(Tantular and Kawamoto , 2003)



マラリア脾腫を呈する小児



マラリア調査チーム

ミトコンドリア COXIII 遺伝子をターゲットとする高感度マラリア患者検出法の開発

研究代表者 金子 明 大阪市立大学大学院医学研究科 寄生虫学分野 教授
連携研究者 木村政継 大阪市立大学大学院医学研究科 R I 実験施設 准教授

研究要旨

ミトコンドリア DNA を標的とする 4 種のヒトマラリア原虫の PCR 鑑別：我々は、18S r DNA を標的遺伝子とする nested PCR 診断法（Parasitol. Int., 1997）を既に開発しボイリング法による DNA 抽出液を用いて原虫種を判別してきたが、末梢血をプロットしたフィルタペーパーから丁寧に抽出した DNA 液に適用すると、最初の PCR でノイズが出た。一方、同じ遺伝子を標的とする Snounou の方法（1993）は、最初の PCR（25 サイクル）では電気泳動のバンドが見えず nested PCR が必須となるため、非感染者が大多数のサンプルの場合に無駄が多い。マラリア原虫には、1 個のミトコンドリア（mt）内に 6 kb のゲノム DNA（mtgDNA）がコンカテマー状態で複数個存在し、熱帯熱の場合で、mtgDNA は 1 原虫あたり 20-150 コピーあり 18SrDNA の 4-8 コピーと比べ多い。そこで mtgDNA を原虫種判別の標的遺伝子にして、これらを改善しようと試みた。mtgDNA の SNP の割合は、3 日熱（285 配列）で 0.9%、熱帯熱（98）で 0.5%、4 日熱（6）で 0.4%と小さく、種間でも良く保存され、原虫ミトコンドリア DNA を共通に増幅するプライマーは容易である一方、原虫種を区別できる配列領域は限られている。最終的に Cox3 遺伝子付近で 5 つのフルネストプライマーセット（4 種の判別用及び陽性判定用）を作成した。バヌアツとアフリカのサンプルで Snounou 法と比較し、それよりやや高い検出感度が得られ、また、マラリア陰性は容易に判別できた。結果が多重感染の場合には、偽陽性が混入する理論上の余地があり、アフリカのサンプルで検討した。

A. 研究目的

マラリア流行地においてマラリア撲滅プロジェクトを遂行するような場合、マラリアの不顕性感染や再燃を早期に発見することがきわめて重要になる。標準的なマラリア感染の検出には依然として厚層塗抹標本を用いた顕微鏡観察が主流であるが、マラリア流行地においては顕微鏡で検出できない低レベルの原虫血症を示す多くのマラリア患者が存在し、プロジェクト遂行上のひとつの障害となっている。

血液中に溶出した原虫抗原を抗原特異的抗体で検出する RDT（Rapid Diagnostic Test）は、臨床的に用いられ、顕微鏡では検出できないレベルの原虫血症をよく検出するが、RDT は熱帯熱マラリア（*P. falciparum*）か *Plasmodium* 属を検出するのみでマラリア原

虫種の同定が不十分であり、また一方で、治療してマラリア原虫がいなくなった後もしばらく陽性反応が出るという偽陽性問題も有する。

マラリア原虫遺伝子の遺伝子増幅を利用するマラリア検出には、遺伝子増幅のしかたで、LAMP（Loop-mediated isothermal Amplification）法、NASBA（Nucleic Acid Sequence-Based Amplification）法、及び PCR（Polymerase Chain Reaction）法があるが、最も制御しやすく安定しているのは PCR である。例えば、LAMP 法は、6 種類のプライマーセットの設計が難しく十分な増幅倍率が得られないことがあるため、栄研化学で開発中のものでは、多数のプライマーセットの増幅テストを経て選抜されたプライマーセットを用い、熱帯熱マラリアの検出では十分な感度を有していると思われる一方、熱

帯熱マラリアは陽性なのに *Plasmodium* 属は陰性といった矛盾した結果が得られている (*Plasmodium* 属検出の感度不足)。また、LAMP 法で4種のヒトマラリア種を区別するプライマーは原理的に難しいと思われ、実際的にも報告はない。また NASBA 法は、RNA を直接増幅するものなので、保存時や増幅前の RNA の不安定性を考慮すると、DNA を増幅する PCR 法より有利とは思えない。そこで、PCR 法で顕微鏡検出限界以下のマラリア原虫感染の検出力の改善を考えることにした。

PCR 法のスタンダードは、Snounou らによって開発された (1993)、18S r RNA 遺伝子 (18S r DNA) を標的遺伝子とする nested PCR 診断法 (以下ではこれを 18S 法と略す) である。この方法は顕微鏡観察法より十分検出感度が高いが、二つの点で改善の余地があると考えられた。一つは、属特異的 primary PCR ではマラリア感染が判定できず、必ず四通りの nested PCR を行う必要があるため、作業の無駄が多いことである。マラリア撲滅プロジェクトを遂行する途上などで感染率が低い場合に大きな問題となる。これは属特異的プライマーセットのヒト 18S r DNA に対する特異性が十分でないことに由来するので、25 サイクルに限定されている primary PCR の増幅回数を 35-40 サイクルに増やしても、ゲル電気泳動に多数のノイズを含むバンドが現れるので、マラリア感染を判定できない。なお、Snounou らは 1999 年に改訂版を提案しているが、これはむしろ検出感度を下げており、また primary PCR の特異性も十分向上しているとは言い難い。

二つめには、マラリア原虫の持つ遺伝子コピー数が 18S rRNA 遺伝子より原虫ミトコンドリア遺伝子の方が多いたことが判明し、もし、ターゲット遺伝子を変更することができれば、感度が上がる可能性があることである。遺伝子コピー数は、前者が 4-8 個に対し、ミトコンドリアゲノムは 20-150 と言われる。なお、全ミトコンドリアゲノムコピーは、原虫当たりただ一つの原虫ミトコンドリア中に複数本存在する線形ミトコンドリア DNA のなかで、ミトコンドリアゲノム DNA のコンカテマーとして存在する。

マラリア原虫ミトコンドリア遺伝子を用いたマラリア感染種の同定は、既に Putaporntip ら (2011) によって感度良くできたとする報告があったが、彼らが使用するプライマーセットの特異性を調べると、種の

同定に不十分さが残ると思われ、独立に検討する価値があると考えた。実際以下に記すように、最終的な結論として、比較実験によって、Putaporntip らの方法は Snounou らの標準法と比べても明らかに検出感度が低いことが判明している。

B. 研究方法

B-1 プライマーデザイン

ミトコンドリア塩基配列の安定性を調べる目的で、報告されているすべてのミトコンドリアゲノム配列の間で SNP (Single Nucleotide Polimorphism) を検討した。98 個の熱帯熱マラリア原虫、285 個の三日熱マラリア原虫、及び、7 個の 4 日熱マラリア原虫についてのミトコンドリアゲノム配列の間では、6 kb のミトコンドリアゲノム配列長は非常によく保存していた。インサート配列は、熱帯熱マラリア原虫の間では、2050 付近の 8T 配列が 9T 又は 10T になる場合と、4 日熱マラリア原虫の間で、700 付近で 5(AT) 配列が 7(AT) になる場合しかなかった。また、各コンセンサス配列 (このなかのインサート配列部は保存配列とみなされる) を作ると、SNP の割合は、熱帯熱で 0.52%、三日熱で 0.92% しかなく、配列安定性はプライマー設計をするのに十分であることを確認した。卵形マラリア配列については、データベース上の 2 つの配列は同一であった。この研究中に、*P. ovale walikili* 株の配列が報告されたが、未定配列を含み、コンセンサスと著しく異なる配列が見られるなどの点で疑問があり、この配列を考慮しなかった。

これらのコンセンサス配列を使って、Cox III 遺伝子のところで、ヒト感染 *Plasmodium* 属特異的な primary PCR のプライマーと 4 種のヒトマラリア原虫種特異的な nested PCR 用のプライマーを設計した。

Oligo Analyzer 1.5 ソフトウェア (www.genelink.com) を用いてプライマーの構造を調べ、Tm 計算値は NN 法を用いた。primary PCR プライマーでは、ヒトのミトコンドリア遺伝子とはほとんど類似性がないように特に注意した。nested PCR プライマーは、C 末端付近で少なくとも 7 塩基以上の種特異性を持たせた。また、*Plasmodium* 属検出の感度を調べるために、属検出用の nested PCR プライマーも設計した (図 1)。

B-2 フィールドサンプル

サンプルは、2002年にバヌアツ国、Ambae 島 (malaria mesoendemic) と Tanna 島 (hyppoendemic) で採取したもの、それぞれ 37 個と 40 個、及び 2011 年に Epi 島 (hyppoendemic) で採取したもの 40 個のほか、2012 年にケニア共和国のビクトリア湖島嶼地域 (malaria hyperendemic) で採取したものの 76 個を用いた。採取の仕方は、Finger Pricked 血液を短冊状のワットマン 31ET Chr フィルターペーパー (Whatman, Maidstone, UK) にスポット状に採り、プラスチックバッグに詰め乾燥保管した。

また別に、厚層血液塗抹標本を用いた顕微鏡観察により、白血球 200 個 (ケニア) または 100 個 (バヌアツ) あたりの原虫数としてパラシテミアを決定した。また、ケニア国においては熱帯熱マラリア感染の有無を Paracheck Pf® (Orchid, Goa, India) を使ったオンサイト RDT により調べた。

B-3 DNA抽出

DNAは、フィルターペーパーに固定した血液サンプルから直径6ミリの3つのディスクを切りとり、キット (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen 51306, CA, USA) を用いて抽出し、150 μ L の抽出液とした。PCR反応にはこのうちの6 μ L を用いた。

B-4 PCR反応

我々の PCR 法においては、primary PCR は、上記のテンプレート DNA 6 μ L に 4 μ L のプライマープレミックス (それぞれ最終 0.2 μ M) と 10 μ L の PrimeSTARMax (Takara R045A, Kyoto, Japan) を加えた反応液を、PCR 装置 (Applied Biosystems 2720, Life Techs., CA, USA) で反応させた。PrimeSTARMax はホットスタート酵素であるため操作は室温で行い、PCR 反応条件は、96°C/1 分の後、96°C/10 秒と 63°C/1 分を 40 サイクル、そして最後に 63°C/5 分とした。5 μ L を 0.8% アガロースでゲル電気泳動して、予想される 940 bp のバンドがあるかどうか調べた。

nested PCR では primary PCR プロダクトの水による 50 倍希釈液 2 μ L と 4 μ L のプライマープレミックス (それぞれ最終 0.4 μ M) 及び 4 μ L の dNTP ミックス (最終 125 μ M) および、2 倍の酵素バッファ液に入った 10 μ L の Vent⁺ DNA ポリメラーゼ希釈液 (0.5 unit with final 2 mM Mg²⁺) で総量 20 μ L の反応液

を作り、96°C/1 分のと、96°C/10 秒と 56°C/90 秒を 20 サイクル、最後に 56°C/5 分という条件で PCR 反応を行った。最初の PCR プロダクトを希釈してテンプレート DNA としたのは、プライマー残渣に由来するノイズバンドを消すためである。なお、nested PCR 反応では原液が 500 倍に希釈されており、20 サイクルの nested PCR で計算上は最大 2000 倍の増幅になる。

B-5 Snounou ら及び Putaporntip らの nested PCR 法

検出感度の比較のために、Snounou らの 18S rRNA 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法 (以下、18S 法) と、Putaporntip らのミトコンドリア・cytochrome b オキシダーゼ遺伝子をターゲットとした nested PCR 法 (以下、cytb 法) でも感染種の同定を行った。これらは、できるだけ元論文に忠実なやりかたで実施した。以下では、ミトコンドリアの CoxIII 遺伝子付近をターゲットとする我々の方法は、COX3 法と略す。

18S 法においては、すべてのプライマー配列は論文と同じ (図 1 (b)) で、primary PCR は COX3 法と同じ反応液で、PCR 条件を

95°C/1 分の後、94°C/30 秒と 57°C/2 分 30 秒) を 30 サイクル、最後が 63°C/5 分とした。オリジナルはアニーリング温度が 58°C、サイクル数は 25 回であるので、それよりも増幅されやすい条件にした。これは、特に rPLU6 プライマーの T_m 値が 48.5°C (by Nearest Neighbor method of Oligo Analyzer -1.5) とやや低すぎるからである。

なお、サイクル数を 35 回にあげると共通して多数のノイズバンドが電気泳動で出現しはじめたので、これも 30 回に制限した理由である。

18S 法の nested PCR は primary PCR プロダクト 1 μ L と 4 μ L のプライマープレミックス (それぞれ最終 0.4 μ M) 及び 4 μ L の dNTP ミックス (最終 125 μ M) および、2 倍の酵素バッファ液に入った 10 μ L の Vent⁺ DNA ポリメラーゼ希釈液 (0.5 unit with final 2 mM Mg²⁺) で総量 20 μ L の反応液を作り、PCR 条件はサイクル数を 20 回とする以外は 18S 法の primary PCR の条件と同じとした。

Putaporntip らの cytb 法は、彼らの論文に従ってプライマー (図 1 (c)) を作成し、DNA 合成酵素を rTaq でなく Go Taq (Promega

KK, Tokyo, Japan)を用いることと、初めてのテンプレートDNA量を6 μ Lとすること以外は、原論文に従って行った。

C. 研究結果

C-1 PCR産物のゲル電気泳動例

Ambae 島で採取されたフィールドサンプル 37 個について、primary PCR 後の電気泳動結果、及び一部のサンプルについての nested PCR の結果を図 2 に例示する。図から明らかなように、940 bp の単一陽性バンドが primary PCR 後の電気泳動で見られるかどうかで、マラリア陽性/陰性の判断は容易にできる。

一方、黄金標準となっている 18S 法で、primary PCR を DNA バンドが見えるように過剰におこなった場合に、陽性/陰性の判断を下すことは困難である (図 2 (c))。

C-2 COX3 法と 18S 法の判定の比較

COX3 法で primary PCR でゲル電気泳動から陰性と判定されたものは、nested PCR 後でも確かに陰性になるかどうかを確かめるために、詳細な判定試験を Epi 島の 40 サンプルについて、さらに、やや簡易の判定試験を、Ambae の 37 サンプルについて行った (表 1)。

Epi 島の 40 サンプルで複数回の Primary PCR を行ったところ、トライアルによって陽性になったり陰性になったりするサンプルがでた。COX3 法は 3 回のトライアルで 9 例のマラリア陽性を見出したが、3 回とも共通に検出されたのは 4 例に止まった。18S 法ではマラリア陽性は 2 回のトライアル共に 2 例であったが、全体では 3 例が陽性と判定された。18S 法で陽性とされた 3 例全ては、COX3 法では常にマラリア陽性となった。COX3 法の nested PCR は第 3 トライアルについてのみおこなったが、18S 法で検出された 3 例とも全てが COX3 法では検出されただけでなく、更に 2 例の 3 日熱感染例を見出した。

Ambae 島の 37 サンプルに対しても、COX3 法で 2 回の primary PCR のトライアルを行うと、陽性は 29 例と 27 例で、2 例は 1 回しか陽性とならなかった。2 回目のトライアルについて、Plasmodium 属特異的 nested PCR を全 37 サンプルについて行っても新たにマラリア陽性は現れなかった。即ち、Epi 島と Ambae 島の合計 77 サンプル (陽性 32 例と陰性 45 例) で、例外なく primary PCR で陽性/

陰性を判定できた。

COX3 法の 2 回目のトライアルについて種の同定を行うと、マラリア感染 27 例マラリア原虫種 32 種を検出した。一方、18S 法では感染 23 例マラリア原虫種 24 種しか検出されず、それらは全て COX3 法で検出したものに含まれていた。

即ち、① primary PCR で陽性 (陰性) だったものは nested PCR 後でも矛盾なく陽性 (陰性) であり、primary PCR 陰性で nested PCR 陽性になるものは無かった。② 18S 法で陽性のものすべては、COX3 陽性であり、COX3 法は 18S 法より多くのマラリア感染と感染種を同定できた。そして、①の結果から、primary PCR でマラリア感染の判別を行っても十分に判定した。

「primary PCR で陽性となるもののなかには、トライアルによって陽性になったり陰性になったりするものがある」という結果は、既に、“all or none detection” (Snounou ら、1993) として良く知られており、検出系が不安定であることを意味するわけではない。そこで、以後の解析では、1 回だけの解析結果で COX3 法と他の方法との比較を行った。

C-3 COX3 法と 18S 法及び cytb 法との総合比較

先の Ambae の 37 サンプルに、Tanna 島の 40 サンプル及び Kenya の 76 サンプル系 153 サンプルを比較解析した最終結果を Supplement 1 にまとめた (Epi の 40 サンプルは一部のデータが不十分のためここでは除いた)。マラリアミトコンドリア DNA をターゲットとしている Cytb 法の解析を追加し、更に、Kenya の 76 サンプルについては Pf-RDT の結果も追加し、さらにパラシテミアの高い順に並べ替えたものである。なお、バヌアツ国のパラシテミアデータは白血球 100 個観測時の実測値が元データであり、これを 2 倍した値を Supplement 1 で表示している。

3 つの PCR 法の感染種データの間には明らかな矛盾は見出されなかったため、以下では、個別のサンプルのデータにはあまり触れずに総合的な解析結果を示す。

18S 法を基準に、COX3 法と cytb 法とで各種マラリア原虫種の検出数を比較すると表 2 のようになった。熱帯熱マラリアの検出数では、18S 法が 69 (基準) に対し cytb 法が 28 (0.406 倍)、COX3 法が 76 (1.101 倍) で、

COX3 法が優れているほか、cytb 法が低いのが目立った。cytb 法は検出例の少ない四日熱マラリアと卵形マラリアは比較的良く検出しているが、全般的には 18S 法の半分ほどしか検出できなかった。それに対し、COX3 法は 4 種全てで検出効率が 1 以上と高かった。即ち、我々の COX3 法は 18S 法よりマラリア感染検出感度が優れていることが分かった。

さらに、顕微鏡パラシテミアレベルで分けると、COX3 法はどのパラシテミアレベルでも 18S 法を上回る検出効率を示すのに対し、cytb 法は、熱帯熱マラリアと 3 日熱マラリアで低いパラシテミアレベルのときの検出感度が特に低いという結果になった。

submicroscopic レベルのマラリア感染を検出することが本来の目的である。顕微鏡で非感染とされたサンプルからの原虫種検出数をみると、COX3 法は 37 種で 18S 法の 24 種の 1.54 倍を検出した。cytb 法はわずか 0.42 倍で、この点でも 18S 法に著しく劣っていた。

顕微鏡法と PCR 法との個別データの比較では、Supplement 1 のデータで 48 番がパラシテミアが 4 (/200 WBC) であったのに PCR 陰性となったが、これは、実際の原虫観測数は 2 (バヌアツのデータは 100 WBC で測定) であった。顕微鏡陽性かつ PCR 陰性は、実際のところ原虫実測数が 2 または 1 のときにのみしか出ておらず、これは顕微鏡法の判定誤りがこのレベルのパラシテミアで起こりうることを示していると思われた。

D. 考察

我々の COX3 法は、フィールドサンプルの解析に対し、18S 法で検出できたマラリア原虫種は全て観測できた。COX3 法の検出効率がどの程度改善されているかを見積もる目的で、18S 法の方が良く検出した 16 サンプルについて、テンプレート DNA 量を 1/3 または 1/10 にして COX3 法を行ったところ 1/3 量ではまだ COX3 法の方が検出が良く、1/10 量で [一致] 10、[より良い] 3、[より悪い] 3 となり、検出種合計数も等しくなった (not shown)。そこで、恐らく COX3 法の検出感度は 18S 法の 3 倍から 10 倍の範囲であろうと推測された。

ここでは、第 5 のヒト感染マラリアである *P. knoulesi* を含めなかった。これは我々が当面の問題としている地域では存在しなかつ

たからである。*P. knoulesi* のミトコンドリア DNA 配列は三日熱マラリアと酷似しているが、すでにプライマーは検討しており、今後、サンプルが入り次第、継続的にその有効性を検討して行くつもりである。

E. 結論

我々は、Gold Standard とされてきた 18S 法より検出感度が高く、マラリア感染陰性を primary PCR だけで決定できる nested PCR マラリア感染検出法を開発した。これは特に、マラリア根絶プログラムとのかかわりの中で、マラリアの不顕性感染を早期に発見する場合などに有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表
(1) この研究は *Parasitology International* に投稿中である。

2. 学会発表
該当なし

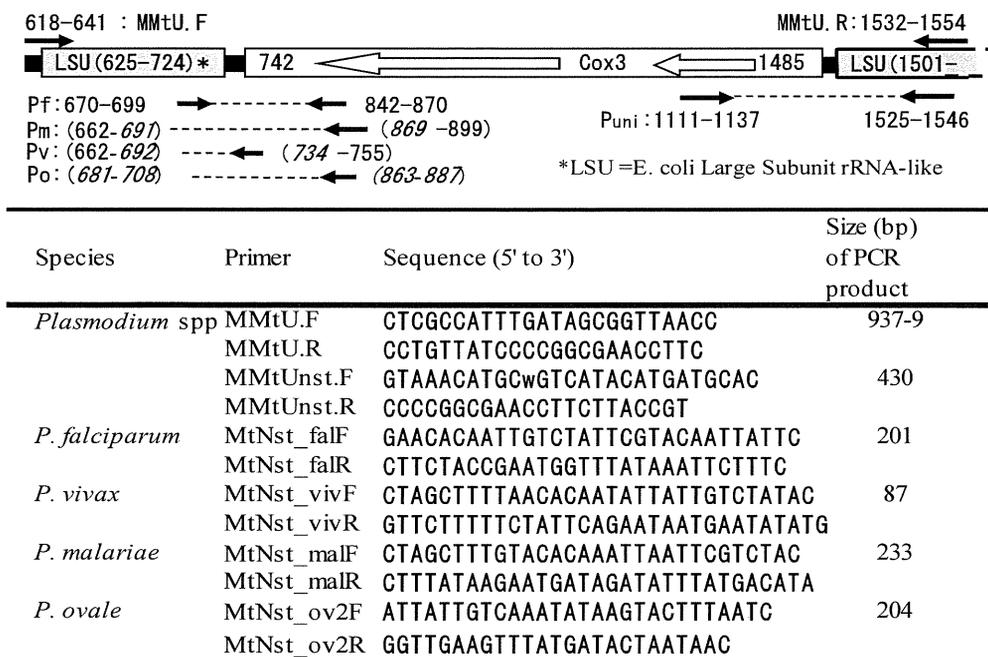
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

図 1 (a) ミトコンドリア DNA をターゲットとするプライマーの位置と配列



番号付は熱帯熱マラリア *P. falciparum* ミトコンドリアゲノム配列 (M76611: Feagin et al. 1992) に従った。熱帯熱マラリア以外の種については、対応する番号を括弧内に記載し、対応が完全でない場合はイタリックで記した。黒矢印はプライマーを示し、nested PCR 領域は破線で示されている。Pf (熱帯熱マラリア *P. falciparum*)、Pm (四日熱マラリア *P. malariae*)、Pv (三日熱マラリア *P. vivax*)、Po (卵形マラリア *P. ovale*)、そして、Puni は、MMtUnst.F (1111-1137) and MMtUnst.R (1546-1525) プライマーを使った属検出用の full nested PCR を示す。

(b) 18S 法 (Snounou ら、1993) のプライマーと増幅産物のサイズ

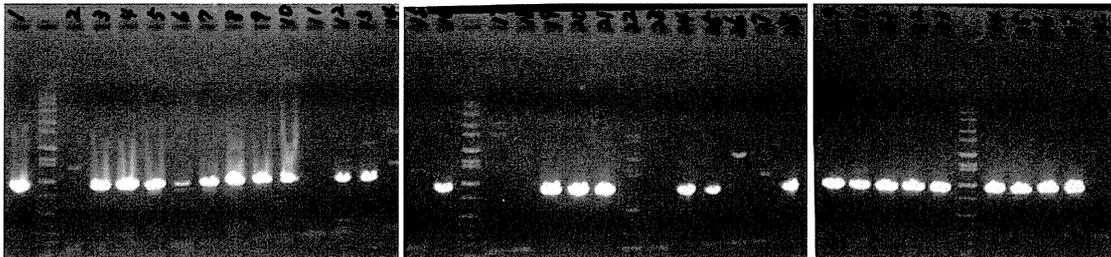
特異性	名称	配列	増幅産物のサイズ
<i>Plasmodium</i>	rPLU 6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	1200 bp
	rPLU 5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	
---Secondary PCR ---			
<i>P. falciparum</i>	rFAL 1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	120 bp
	rFAL 2	ACACAATGAACCTCAATCATGACTACCGTGC	
<i>P. vivax</i>	VIV-1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	144 bp
	VIV-2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	
<i>P. malariae</i>	MAL-1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	205 bp
	MAL-2	AAAATTCCTCATGCATAAAAAATTATACAAA	
<i>P. ovale</i>	OV-1	ATCTCTTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA	800 bp
	OV-2	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG	

(C) Cytb 法 (Putaporntip ら、2011) のプライマーと増幅産物のサイズ

特異性	名称	配列	増幅産物のサイズ
<i>Plasmodium</i>	PCBF	:ATGCTTTATTATGGATTGGATGTC	
	PCBR	:CAGACCGTAAGGTTATAAATTATGT	
---Secondary PCR ---			
<i>P. falciparum</i>	PFCBF	: ATTATTTATTGTATTATTTTTCTG	148 bp
	PFCBR	: GTATTGAGCGGAACAAATC	
<i>P. vivax</i>	PVCBF	: AGTTACCACAAGATATTTTT	181 bp
	PVCBR	: TTGAGCAGAACAATACAG	
<i>P. malariae</i>	PMCBF	: ATATCATTCTTTTCTAGTGGT	138 bp
	PMCBR	: CTGTGCAGAACAATACAG	
<i>P. ovale</i>	POCBF	: ATATCATTTTTCTCCAGTGGG	137 bp
	POCBR	: ATGAGCAGAACAATACAG	

図2 primary PCR の電気泳動、及び nested PCR 後の電気泳動例

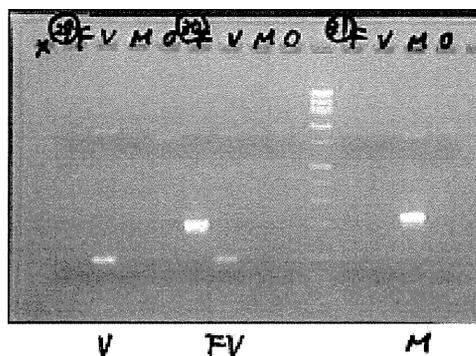
(a) primary PCR 後



2002年バヌアツ・Ambae島の37個の試料の primary PCR 後の0.8%アガロース電気泳動結果である。マーカースバンドの750 bpと1000 bpの間に陽性バンド(計算値940 bp)が見える。判定は2, 11, 15, 17, 18, 23, 26, 27の8個は陰性、その他は陽性。一部のレーンではDNA産物があふれたスミアーが見られるが判定には影響しない。

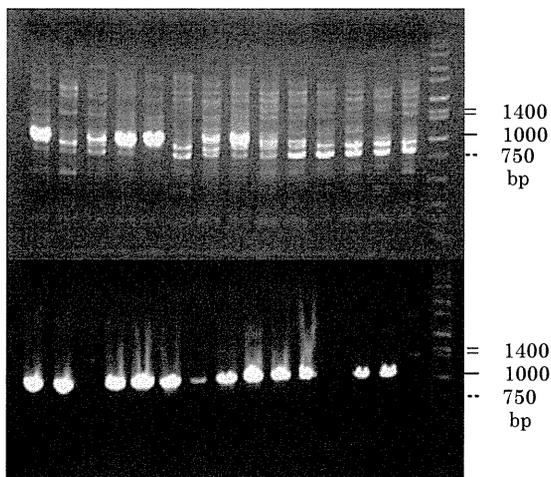
(b) nested PCR 例

上の primary PCR 試料の内、29, 30, 31番の nested PCR 産物の電気泳動(2%アガロースゲル)を例示する。結果は、29番:V(*vivax*), 30番:F(*falciparum*)とV, 31番:M(*malariae*)。マーカースは下から、50 bp, 100 bp, 200 bpで、V(計算値87 bp)、F(計算値201 bp)、M(計算値233 bp)。900 bp付近に薄く見えるバンドは primary PCR の増幅産物。



(c) 18S法の primary PCR との比較

No.1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



上段は、18S法の primary PCR を過剰(40 サイクル)に行ったもの。下段は、比較のため、同じサンプルの、COX3法の結果((a)図の1-14番写真)を再掲している。

18S法の primary PCR では、1, 4, 5, 8など明確な positive と言えるものもあるが、3番や11番は陰性とは言い切れない(結果的には、3と11は陰性)。

表 1 COX3 法と 18S 法の判定の比較

(a) Epi 島の 40 サンプルの解析

Trial	COX3					18S	
	1	2	3			1	2
	Prm -1	Prm -2	Prm -3	+Nested Uni spp		Prm +Nst	Prm +Ns
8	+	+	+	+	V	-	V
9	-	-	+	+	V	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	F	F	F
22	+	+	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	V	V	-
31	+	+	+	+	V	-	-
33	-	+	-	-	-	-	-
38	+	-	-	-	-	-	-
Rest	-	-	-	-	-	-	-
Tot	7	6	5	5	5	2	2

("Rest": except the shown Nos among Nos. 1-40.)

Epi 島の 40 サンプルの解析では、primary PCR(1st)を3回繰り返すと、陽性は7-5個となった。第3トライアルについては、全 primary 産物を属特異的及び種特異的両方の nested PCR を行い、primary PCR で陽性(陰性)を判定して良い(nestedの結果と矛盾しない)ことが分かった。また、18S法の2回のトライアルでは3サンプルまでしか陽性とならなかった。

(b) Ambae 島の 37 サンプルの解析

Trial	COX3				18S
	1	2			
	Prm -1	Prm -2	+Nested Gen spp		
1	+	+	+	V	V
3	+	+	+	V	V
4	+	+	+	V	V
5	+	+	+	F	F
6	+	+	+	M	-
7	+	+	+	FV	F
8	+	+	+	FV	FV
9	+	+	+	FV	V
10	+	+	+	V	V
12	+	+	+	F	-
13	+	+	+	F	-
16	+	+	+	V	V
17	+	-	-	*	-
19	+	+	+	V	V
20	+	+	+	F	F
21	+	+	+	F	F
23	+	-	-	*	-
24	+	+	+	V	V
25	+	+	+	F	-
28	+	+	+	V	V
29	+	+	+	V	V
30	+	+	+	FV	F
31	+	+	+	M	M
32	+	+	+	V	V
33	+	+	+	V	V
34	+	+	+	F	F
35	+	+	+	M	M
36	+	+	+	F	F
37	+	+	+	F	F
Rest	-	-	-	*	-
Tot	29	27	27	27/32	23/24

* not tested

("Rest": except the shown Nos among Nos. 1-40.)

Ambae 島 (malaria mesoendemic) の 37 サンプルの 2 回目の全 primary PCR 産物を属特異的 nested PCR を行い primary PCR の陽性・陰性の判定と nested PCR の判定が同じであることを確認した。種の同定は primary PCR 陽性サンプルだけで行い、合計 32 種 27 人の陽性者を見出した。一方、18S法は 24 種 23 人の陽性者に止まったが、18S法陽性の種は全て COX3 法で検出された。

表 2. *cytb* 法と *COX3* 法の検出感度比較

	18S 法	<i>cytb</i> 法	検出効率 (18S=1)	<i>COX3</i> 法	検出効率 (18S=1)
熱帯熱マラリア	69	28	0.406	76	1.101
四日熱マラリア	21	20	0.952	30	1.429
卵形マラリア	2	3	1.500	3	1.500
三日熱マラリア	30	17	0.567	39	1.300
合計	122	68	0.557	148	1.213
2 種感染例	18	10	0.556	31	1.722
3 種感染例	1	1	1.000	3	3.000

表 3. パラシテミアレベルで分けた *cytb* 法と *COX3* 法の検出感度比較

	方法	パラシテミア (parasites/200 WBC)				全て
		≥ 20	4-19	1-3	0	
熱帯熱マラリア	<i>cytb</i>	0.85	0.38	0.29	0.25	0.41
	<i>COX3</i>	1.00	1.00	1.04	1.50	1.10
四日熱マラリア	<i>cytb</i>	1.33	0.86	0.80	0.67	0.95
	<i>COX3</i>	1.33	1.14	1.80	1.67	1.43
卵形マラリア	<i>cytb</i>	N/D	1.00	1.00	N/D	1.50
	<i>COX3</i>	N/D	1.00	1.00	N/D	1.50
三日熱マラリア	<i>cytb</i>	0.55	0.75	0.00	0.56	0.57
	<i>COX3</i>	1.00	1.50	1.00	1.56	1.30
4 種全て	<i>cytb</i>	0.87	0.59	0.36	0.42	0.56
	<i>COX3</i>	1.10	1.16	1.14	1.54	1.21

N/D : not determined. パラシテミア ≥ 20 又はパラシテミア 0 では、18S 法で卵形マラリアは検出されなかったため割る数が 0 となり値が決定できなかった。