

Supplement 1

パラシテミア レベル	Sample No	場所 ¹	顕微鏡		PCR 法			RDT ³
			感染種 ²	パラシテミア (/200 WBC)	18S	<i>cytb</i>	<i>COX3</i>	
≥ 20	1	Kenya	FM	1140	F	F	F	Pos
	2	Van. Tanna	F	368	F	F	F	N.D
	3	Van. Tanna	V	220	V	V	V	N.D
	4	Van. Ambae	V	134	V	V	V	N.D
	5	Kenya	FM	122	FM	FM	FM	Pos
	6	Van. Ambae	F	120	F	-	F	N.D
	7	Kenya	M	117	F	FM	FM	Pos
	8	Van. Ambae	V	84	V	V	V	N.D
	9	Kenya	MO	80	F	FM	FM	Pos
	10	Van. Tanna	V	78	V	V	V	N.D
	11	Kenya	FM	73	FM	M	FM	Pos
	12	Van. Tanna	V	72	V	-	V	N.D
	13	Kenya	FM	57	FM	FM	FM	Pos
	14	Kenya	M	56	F	F	F	Pos
	15	Van. Ambae	F	44	F	F	F	N.D
	16	Van. Ambae	V	38	V	-	V	N.D
	17	Kenya	M	38	M	M	M	Neg
	18	Van. Tanna	V	36	V	V	V	N.D
	19	Van. Ambae	F	32	F	F	F	N.D
	20	Van. Ambae	V	32	F	F	F	N.D
	21	Van. Ambae	V	30	V	-	V	N.D
	22	Kenya	M	27	M	M	M	Pos
	23	Van. Ambae	V	24	V	-	V	N.D
	24	Van. Ambae	V	22	V	-	V	N.D
	25	Kenya	M	22	FM	FMO	FMO	Pos
	26	Van. Tanna	V	20	V	V	V	N.D
4 - 19	27	Kenya	O	19	FM	M	FM	Pos
	28	Van. Ambae	F	18	F	-	F	N.D
	29	Van. Ambae	M	18	M	-	M	N.D
	30	Van. Tanna	F	16	F	F	F	N.D
	31	Van. Ambae	V	16	V	V	V	N.D
	32	Kenya	M	15	M	M	M	Neg
	33	Van. Tanna	F	14	F	-	F	N.D
	34	Van. Ambae	F	12	F	-	F	N.D
	35	Van. Ambae	V	12	V	V	V	N.D
	36	Van. Tanna	F	12	F	-	F	N.D
	37	Kenya	M	12	FM	FM	FM	Pos
	38	Kenya	M	12	FMO	MO	FMO	Pos
	39	Kenya	M	12	FM	M	FM	Pos
	40	Kenya	M	11	F	F	FM	Pos
	41	Van. Tanna	F	10	F	F	FV	N.D
	42	Van. Ambae	M	8	M	M	M	N.D
	43	Van. Tanna	V	8	V	-	V	N.D
	44	Van. Tanna	V	8	V	V	V	N.D
	45	Van. Tanna	V	6	V	-	V	N.D
	46	Van. Tanna	F	6	F	-	FV	N.D
	47	Van. Ambae	V	4	FV	FV	FV	N.D
	48	Van. Ambae	V	4	-	-	-	N.D
	49	Van. Tanna	F	4	F	F	F	N.D
	50	Van. Tanna	F	4	F	-	FV	N.D
	51	Van. Tanna	V	4	-	V	V	N.D
	52	Van. Tanna	F	4	FV	-	FV	N.D
	53	Van. Tanna	V	4	V	V	V	N.D
	1 - 3	54	Van. Ambae	V	2	V	-	V
55		Van. Tanna	V	2	V	-	V	N.D
56		Kenya	F	2	-	-	-	Pos
57		Kenya	F	2	FM	-	FM	Pos
58		Kenya	F	2	F	-	F	Pos
59		Kenya	F	2	FM	-	FM	Pos
60		Kenya	F	2	FM	M	FM	Pos
61		Kenya	F	2	F	-	FM	Pos
62		Kenya	F	2	F	-	F	Neg
63		Kenya	F	2	-	-	-	Neg
64		Kenya	F	2	F	-	F	Neg

65	Kenya	F	2	-	-	-	Neg
66	Kenya	F	2	FM	M	FM	Pos
67	Kenya	F	2	F	FM	FM	Pos
68	Kenya	F	2	FM	M	FM	Pos
69	Kenya	F	2	F	-	F	Pos
70	Kenya	F	2	-	-	-	Neg
71	Kenya	F	2	F	F	F	Pos
72	Kenya	F	2	-	-	F	Pos
73	Kenya	F	2	F	F	F	Pos
74	Kenya	F	2	F	F	F	Pos
75	Kenya	F	2	F	F	F	Pos
76	Kenya	F	2	F	-	F	Pos
77	Kenya	F	2	F	-	FM	Pos
78	Kenya	F	2	F	-	F	Pos
79	Kenya	F	2	F	-	F	Pos
80	Kenya	F	1	F	-	F	Pos
81	Kenya	F	1	F	-	F	Pos
82	Kenya	F	1	FO	O	FMO	Pos
83	Kenya	F	1	F	-	F	Pos
84	Kenya	F	1	-	-	-	Neg
85	Kenya	F	1	F	-	F	Pos
86	Kenya	F	1	F	F	F	Pos
87	Kenya	F	1	F	F	F	Pos
88	Kenya	F	1	F	F	F	Pos
89	Kenya	F	1	-	-	-	Neg
90	Kenya	F	1	F	-	F	Pos
91	Van.Ambae	neg	0	V	-	V	N.D
92	Van.Ambae	neg	0	F	FV	FV	N.D
93	Van.Ambae	neg	0	V	FV	FV	N.D
94	Van.Ambae	neg	0	V	V	V	N.D
95	Van.Ambae	neg	0	F	-	FV	N.D
96	Van.Tanna	neg	0	V	-	V	N.D
97	Van.Tanna	neg	0	V	-	V	N.D
98	Van.Tanna	neg	0	V	-	V	N.D
99	Van.Tanna	neg	0	V	-	V	N.D
100	Van.Tanna	neg	0	F	-	F	N.D
101	Van.Tanna	neg	0	F	V	FV	N.D
102	Van.Tanna	neg	0	FV	-	FV	N.D
103	Van.Tanna	neg	0	V	-	V	N.D
104	Van.Tanna	neg	0	F	-	FV	N.D
105	Kenya	neg	0	F	-	F	Pos
106	Kenya	neg	0	F	-	F	Pos
107	Kenya	neg	0	FM	M	FM	Pos
108	Kenya	neg	0	FM	-	FM	Pos
109	Kenya	neg	0	F	-	F	Pos
110	Kenya	neg	0	F	-	FM	Neg
111	Kenya	neg	0	M	-	M	Neg
112	Kenya	neg	0	-	-	F	Pos
113	Kenya	neg	0	-	-	F	Pos
114	Van.Ambae	neg	0	-	-	M	N.D
115	Van.Ambae	neg	0	-	F	F	N.D
116	Van.Ambae	neg	0	-	-	F	N.D
117	Van.Ambae	neg	0	-	V	F	N.D
118	Van.Tanna	neg	0	-	-	V	N.D
119	Van.Ambae	neg	0	-	M	-	N.D
120	Kenya	neg	0	-	-	-	Pos
121	Kenya	neg	0	-	-	-	Pos
122	Kenya	neg	0	-	-	-	Pos
123	Kenya	neg	0	-	-	-	Pos
124	Kenya	neg	0	-	-	-	Pos
125	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
126	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
127	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
128	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
129	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
130	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
131	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
132	Van.Ambae	neg	0	-	-	-	N.D
133	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
134	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
135	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D

136	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
137	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
138	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
139	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
140	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
141	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
142	Van.Tanna	neg	0	-	-	-	N.D
143	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
144	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
145	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
146	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
147	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
148	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
149	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
150	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
151	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
152	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg
153	Kenya	neg	0	-	-	-	Neg

¹ Van. Ambae = バヌアツ国アンバエ島; Van. Tanna = 同タナ島

² F = 熱帯熱マラリア; M = 四日熱マラリア; 0 = 卵形マラリア; V = 三日熱マラリア

³ RDT はバヌアツ国では行っていない, N.D = 測定せず

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）

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
連携研究者 寺本(木俣) 勲 大阪市立大学大学院医学研究科 寄生虫学分野 講師

研究要旨

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 Takauwiri 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。

A. 研究目的

マラリア撲滅プログラムにおいて、抗三日熱マラリア肝休眠体薬あるいは抗熱帯熱マラリア生殖母体薬としてのプリマキンが見直されている。熱帯アフリカでのマラリア撲滅に際しては後者つまり熱帯熱マラリアの生殖母体を殺滅する事により蚊による伝搬を阻止でき、そのことがマラリア対策において、より効果的であると予想される。しかしプリマキン投与がグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)欠損症者において血管内溶血を誘発するリスクが問題となる。また、G6PD欠損症者は世界で4億人以上存在し、その地理的分布はマラリア流行地と重なる(マラリア仮説)ので、流行地現場において安全なプリマキン投与のためにはG6PD活性の的確な把握が必要となる

G6PDの測定を発展途上地域で実施するのに好適な試薬キットは室温反応・肉眼判定可

能な方法としてすでに報告されている。しかし、室温反応・肉眼判定であるが故に克服できない測定値の不安定さ、そして主観が介在するという問題点がある。この報告では最小限の機器を導入し正確、迅速、かつ安価なG6PD欠損症スクリーニング法の開発を試みるものである。

B. 研究方法

1) G6PD活性測定試薬キットおよび測定器具の選定：

川本らの開発によるG6PD Assay Kit-WST (Dojindo)を採用した。肉眼判定を補完する器具として光電光度計AP-1000M (APEL社)、恒温槽COOL/HEAT BLOCK NDC-100 (NISSIN社)を用いた。また、反応時間を一定にするためにデジタルダウンカウントタイマーを恒温槽に入る検体数だけ準備した。さらに、測定用の1cm角のプラスチックキュベットおよび溶血のための試薬としてNonidet P-40 (Sigma社)を用いた。

2) 測定方法についての予備実験：

試薬濃度、反応温度、反応時間、添加する血液量、および溶血のための試薬Nonidet P-40の添加量を検討した。

3) 調査対象

ケニア共和国ビクトリア湖島嶼住民のマラリア感染調査の際に、指頭穿刺によって得られた血液の5μlを用いてG6PD活性を測定した。

(倫理面への配慮)

ケニア共和国政府の倫理機関の承認の下に実施された。

C. 研究結果

1) G6PD活性測定試薬キットおよび測定器具の選定について：

G6PD Assay Kit-WST (Dojindo)は光に対する安定性がかなり高く、屋内で遮光下に試薬を扱うことで比較的安定した測定結果が得られたが、屋外で日差しの下での作業の場合は同程度の遮光でも試薬が徐々に発色してバックグラウンドが高くなった。

光電光度計については9Vの乾電池1個で5日間の使用に耐え、機器の大きさ・重さ、使用方法の簡便さの点では有利であった。恒温槽については酵素反応を同一条件で行うために必要な機器である。

2) 測定方法についての予備実験：

血液をディスポキュベットに準備した酵素反応試薬に添加し、直後の吸光度を測定し、続いて恒温槽に移した後一定時間毎に吸光度を測定したところ、図1. に示すように吸光度が時間と共に変化した。吸光度が最低値になった後に30℃で加温すると、時間と共に吸光度はほぼ直線的に上昇するので、酵素反応量としては血液添加直後の吸光度(1st OD)と一定温度・一定時間後の反応後の吸光度(2nd OD)の差分で表す方法を考えた。

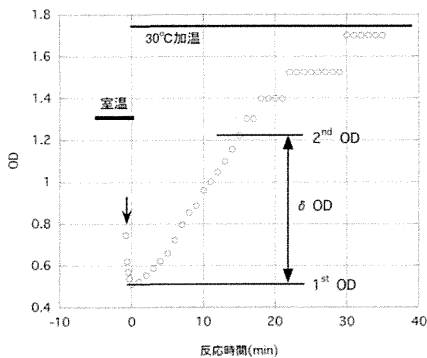


図1. 反応時間と吸光度変化

一方、図1. ↓で示す血液添加後約1分間に亘り吸光度が低下する事も判明した。測定に

際し、その時間を待つ必要があり、結果の不安定さを招く要因であると考えられた。この1分間に亘る吸光度の低下は濁った状態から透き通った状態に変化する事が肉眼でも観察出来た。その原因は添加した赤血球の溶血と関連がある事が判明した。つまり、未溶血の赤血球により光が散乱し吸光度が高くなり、溶血の進行に伴い吸光度が減少する。

速やかに溶血させる物質として非イオン性界面活性剤のNonidet P-40を選定した。これを生理食塩水に添加し、終濃度0.01%, 0.02%, 0.05%とした溶液1mlに血液5μlを加えて溶血の状況を確認したところ、0.01%では1分後でも溶血せず、0.02%では約20秒で溶血し、0.05%では瞬時に溶血した。次に0.05% Nonidet P-40添加が酵素反応に影響を及ぼすか否かを調べた。酵素反応試薬に終濃度0.05%添加・非添加、さらに酵素基質を添加しない条件を加えて、それぞれの条件で7回繰り返し測定の測定を実施したところ図2. の様な結果を得た。

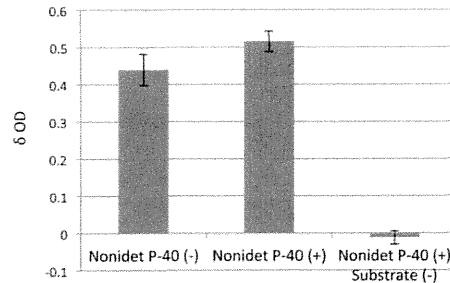


図2. Nonidet P-40 添加、非添加による酵素反応量 (δ OD) への影響

次に添加する血液量と酵素反応量 (δ OD) の関係を調べ、図3. に示した。この時用いた血液はヘモグロビン濃度14.5g/dlであった。血液添加量6μlまでは酵素反応量とほぼ直線関係にあった。

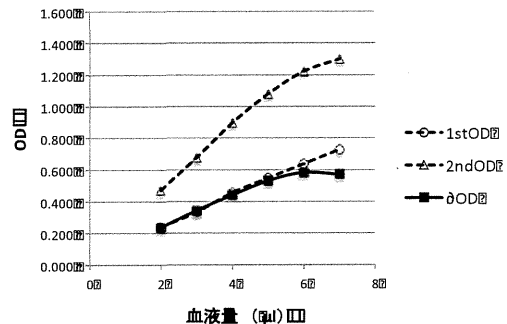


図3. 添加血液量と酵素反応量 (δ OD)

最終的な反応の条件は、調査日の朝に飲料用

ボトル水100mlにキットの基質液2mlとWST発色液2ml、および10% Nonidet P-40水溶液を0.5ml (終濃度0.05%) 加えた液を反応液とし、蓋付きディスプレイ角形キュベットに1mlずつ分注し、反応開始時まで室温で暗箱の中に保存した。被検査者の血液5 μ lをマイクロピペットで採り、反応キュベットの酵素反応液に添加し、直ちに良く攪拌 (3秒間) し反応の開始時の吸光度値 (1st OD) を測定した。その後直ちに30 $^{\circ}$ Cの恒温槽に移し、15分間反応させ、吸光度値 (2nd OD) を測定した。酵素反応量としては2nd ODから1st ODを引いた値 (δ OD) として求めた。

3) マラリア調査地区での住民のG6PD活性値を測定した。

3)-1. それぞれの地区を図4. で示した。測定を試みたうち、発電機のトラブルで温度の制御が出来なかった調査初日のデータは除き、その後測定し得た利用可能なデータ数は男性971人、女性1017人で、調査日付と地区名および男女別人数を表1. に示した。

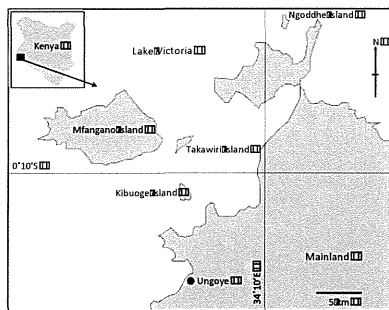


図4. ケニア共和国調査地域地図

表1. 調査日、調査地域と調査人数

調査日	調査地区	男性人数	女性人数	合計人数
130809	Ngodhe 2	55	49	104
130811	Kibuogi 1	50	50	100
130812	Ungoye_1	101	98	199
130813	Ungoye_2	110	148	258
130814	Kibuogi 2	46	54	100
130815	Ungoye_3	83	75	158
130817	Takawiri 1	90	85	175
130819	Mfangano (Gulwe)	63	71	134
130820	Mfangano (Ugina)	85	81	166
130821	Ringiti	157	141	298
130822	Mfangano (Wakula)	84	103	187
130826	Takawiri 2	47	62	109

3)-2. 測定結果の妥当性を評価するために測定値の全てについて男女別に1st ODに対する δ OD値をプロットし、図5a, b. に示した。

3)-3. δ ODについて男女別に度数分布を図6a, b. に示した。男女で分布の違いは、男性では2峰性を示すのに対し女性では単峰

性の分布を示すことである。

3)-4. 男性で低値を示した集団を陰性集団と考え、その平均値 (0.068) と分散 $\times 3$ (3σ : 0.1736) より陰性の範囲を δ OD値0.242定め、活性陰性者の存在比率を求めた。各島嶼、地域の陰性率を図8. に示した。

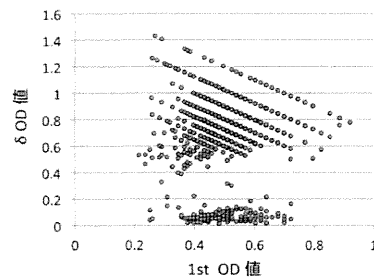


図5a. 男性測定結果の1st ODと δ OD相関図

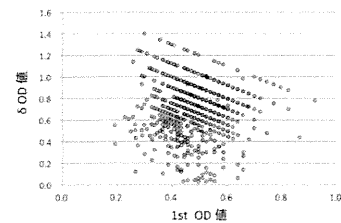


図5a. 女性測定結果の1st ODと δ OD相関図

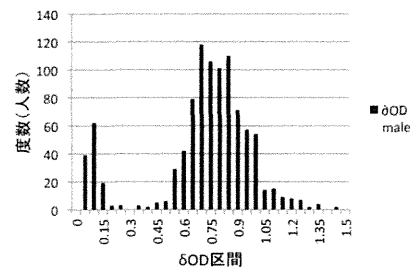


図6a. 男性 G6PD活性分布

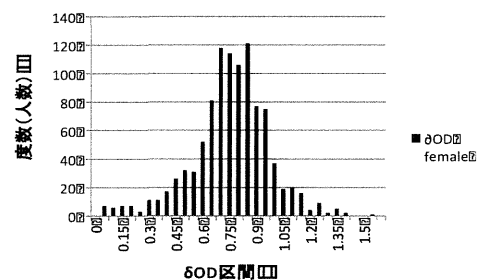


図6b. 女性 G6PD活性分布

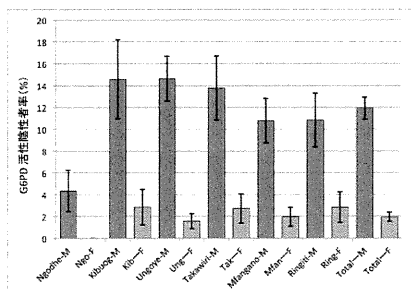


図7. 調査島嶼・地域のG6PD陰性者率
各調査地点について男女別表示
語差範囲は二項分布による
標準誤差を示す

D. 考察

プリマキン投与においてグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 欠損症者で血管内溶血を誘発するリスクが問題となることはよく知られている。一方、マラリア流行地域にG6PD欠損症者が多く分布することも言われている。マラリアの根絶を目指した治療計画でプリマキンの使用は重要な位置を占めるので、安全な投薬をするためにはG6PD活性の確認は欠かせない重要な作業である。

G6PD活性欠損の判定には川本らの報告にあるG6PD Assay Kit-WSTが肉眼でも判定可能で、電力等が整わない発展途上地域においても実施が容易なテストキットとして有用であり、多くの研究者により用いられている。しかし、肉眼判定可能であるのは事実としても、客観性のある正確な判定は困難である。また、女性では不十分な活性を示す、つまり正常活性の半分以下の活性を示す個体も存在し、これらを含めたG6PD活性の把握を正確迅速に行う必要がある。そのために光電比色計の導入は必要であった。

今回試用した光電比色計は乾電池で使用出来る簡易・軽量な機器であり、調査用としては携帯性や操作性において有利であった。また試薬キットに付いても何日かの冷蔵庫すら使用出来ない条件においても、遮光する事を守れば問題なく使用出来た。

測定条件に関して、予備試験で問題となったのは測定試薬に血液添加した後に溶血が1分以上かけて進行するという緩慢さであった。このことにより徐々に吸光度が減少する結果になり、酵素反応の開始時点が不明瞭となることから瞬時に溶血させることが必要と考えられた。そこで、非イオン性・非蛋白変性性の界面活性剤であるNonidet P-40を採用した。この薬剤を最終濃度0.05%混入する事で溶血は3秒程度の攪拌中に終了し、その後直ちに酵素反応の開始と見なすことが出来た。Nonidet P-40添加・非添加で反応量を比較したところ (図2.)、添加した方で約20%高い活性値が得られた。しかし、Nonidet P-40を添加しても酵素反応基質を含まな

い反応系では吸光度は上昇せず、酵素反応測定としては感度が良くなるものの、低活性を示す場合には問題ないと考えられた。

Nonidet P-40を0.05%添加した系で血液量と反応量 (δOD) を比較したところ、血液6 μ lまでほぼ直線関係が認められ (図3.)、調査地での測定系として成立すると考えられた。

調査実施地区は図4. に示した、ケニア共和国ビクトリア湖4島嶼および対象地域として湖畔のUngoyeで調査した。その調査各地域の人数を表1. に示し、総数は男女とも約1,000人であった。

調査地域住民でのG6PD活性測定結果の妥当性を確認するために反応初期吸光度 ($1^{st} OD$) 値と酵素活性値 (δOD) の関連を図5a, b. に示した。この図から、($1^{st} OD + \delta OD$) の値が1.0を越えると値が連続でなくなる事がわかる。この理由は光電比色計の測定可能な極限のOD値が1.7であり、その極限值に近づくると跳々の値を示すという性能上の問題によるものである。しかし($1^{st} OD + \delta OD$) の値が1.0以下の場合にはほぼ連続した数値を得ることが出来、測定値として有用性が示されていると考える。

以上の制限の下、酵素活性の測定値 (δOD 値) の分布をグラフに示した (図6a, b.)。男性での分布は2峰性を示し、女性では単峰性を示した。G6PD遺伝子がX染色体に乗っていることから、男性では表現型として明瞭なG6PD酵素活性の低下が見られる。それに対し女性ではX染色体が2本あり、遺伝子の変異がホモでない限り極端な酵素活性低下が認められない。従って、男性の活性の低い集団をG6PD酵素活性陰性集団と考えることが出来る。

男性の陰性集団についてその閾値を求めるには、男性の正常な活性を有する集団の平均値と標準偏差から求めるのが通常の手法であるが、今回の測定では正常値高値の測定値が比色計の限界から連続した値となっていないことから、そのデータを用いた推定は適当で無いと考えた。そこで活性値が陰性と考えられる集団の平均値0.0686と標準偏差0.0350より陰性の閾値として平均値プラス3 σ の0.242がえられた。

この値以下を欠損者として扱い、調査地域毎のG6PD欠損者を判定して図7. を得た。このグラフの中でRingitiはMfangano島の一集落である。いずれの地域でも男性の欠損者率が女性より高く、X染色体上の遺伝子の変異による事で説明出来る。男性の欠損者率はNgodhe島4.3%で、Kibuoqi, Takawiri島および大陸対照地Ungoye集落より有意に低値であった ($P < 0.02$)。

女性のG6PD分布 (図6b.) では単峰性を示し、男性の二峰性分布とは異なる事他に、

δ OD値が0.5以下、0.242以上の範囲で分布の度数が明らかに男性より多い。この領域は正常活性の50%以下の活性を有する領域と考えられ、比色計を導入することによりこの領域の存在が明らかになり、遺伝子変異と表現型の関連を調べるのに有用であると考えられる。

G6PDの測定に光電比色計を導入することにより、明瞭に低い活性を判定することが出来、さらに正常の50%以下の活性を持つ個体を判別出来、比色計を用いることの有用性が明らかとなった。しかし、活性が正常域の測定においては発色の濃度が濃くなり、活性値を正確に測定出来なかった。最も簡単な解決方法は添加する血液量を少なくする事であるが、血液量の正確さを保つことの困難さが問題となる。今ひとつ解決策として、比色計の性能の高いものを使用することが考えられる。しかし、高機能の測定器は精密さの度合いが高くなり、途上国の環境での運搬や取り扱いに耐えられるか否かが問題となる。今後より良き測定のためのシステムを考える必要がある。

E. 結論

G6PD Assay Kit-WST (同仁化学)を用い、簡易型光電比色計を導入してアフリカの調査地域でG6PD活性を測定するための条件等を検討した。

界面活性剤を添加する事で、30°Cで15分の反応で終了し、マラリア迅速検査とほぼ同時に結果が得られた。

ケニア国ビクトリア湖島嶼・湖畔の調査地域での男性のG6PD欠損者の割合は地域により異なり、低い地域で4.3%、高い地域で約13%であった。

同地域での女性では約1.9%であった。また女性では正常活性値の50%あるいはそれ以下の活性を示す個体が男性より多くあった。この付近の活性値の正確な測定・判定の可能性が示された。

今回使用した光電比色計の性能が不十分であったため、高活性試料での測定値において連続値を得られなかった。正常な活性値域の分布を把握するにはさらに性能の良い比色計の導入するか添加血液量を含む反応系の再検討が必要であった。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
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)

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

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）
分担研究報告書

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
長崎大学熱帯医学研究所 病害動物学分野 教授

研究要旨

集団治療によりマラリア撲滅を試みる前に、殺虫剤含浸の蚊帳を使ってある程度、マラリア媒介蚊の密度を下げ、感染を抑えておく必要がある。また、治療後も再感染を防ぐために蚊の密度を抑えておく必要がある。今回は、対象地域にある島で蚊帳がどの程度普及しているかを調査した。一方、撲滅後も島への原虫の移入や拡散に関与する媒介蚊をモニターする必要があるが、対象地域の蚊には殺虫剤抵抗性が広まっており、これまで広く使われてきた殺虫剤を使った採集法（スプレーキャッチ法）は効率がよくないと思われる。そこで、代替となりうるライトトラップ法とスプレーキャッチ法の採集効率性の比較を行なった。

調査の結果、島では、蚊帳は十分に普及していないことが明らかになった。よって、集団治療を実施する前に蚊帳を十分に配布し、感染をできるだけ下げる必要がある。蚊をモニターするためには、ライトとラップ法がより効率がよいことがわかった。しかし、通常、吸血または抱卵している個体の方がマラリア原虫保有率が高い傾向にあるため、蚊の原虫保有率のモニターリングを重視する場合には、PSCが適切である。

A. 研究目的

本プロジェクトが目標とする集団治療によりマラリア撲滅を試みる前に、他の既存の手法を使って、ある程度感染を抑えておくことが、実現の可能性を高める上でも望ましい。治療以外の手法としては、殺虫剤含浸の蚊帳を使ったベクターコントロールが広く使われており、本研究のもととなったアネチウム島でのマラリア撲滅プロジェクトでも、集団治療とともに併用されている[1]。蚊帳は、集団治療後、再感染を防ぐために、蚊の密度を抑えておくためにも有効である。25年度の活動では、対象地域にある島の1つにおいて蚊帳がどの程度普及しているかを調査した。

一方、媒介蚊は、原虫の移入や拡散に関与

しており、撲滅後も媒介蚊の密度の推移をモニターしておく必要がある。しかし、対象地域の蚊には殺虫剤抵抗性が広まっており[2, 3]、これまで広く使われてきた殺虫剤を使った採集法（スプレーキャッチ法）は効率がよくないと思われる。そこで、代替となりうる方法を考える必要があり、今回は、ライトトラップ法とスプレーキャッチ法(PSC)の採集効率性の比較を行なった。

B. 研究方法

蚊帳に関しては、対象地域にあるキブオギ島において、蚊帳の普及と使用具合の全島調査を実施した。各家庭を訪問し、常時居住する家族の数、年齢、性別、所有する蚊帳の数を確認し、前夜に蚊帳を使用したか否かを聞

き取りした。

媒介蚊の採集方法に関する研究は、島への本土からの蚊と原虫の移入、およびアクセスを考えて、対象となる島の対岸にある本土で実施した。小雨期の終わりにあたる12月末から1月にかけて、14の村または地域において、ビクトリア湖岸沿いに10軒の家を選び、早朝、PSC法で、屋内で休息している媒介蚊を採集した。家の選択の基準は、湖の岸から200m以内にある土壁の家に限定し、それぞれの家が少なくとも100m以上距離が離れていることとした。PSCで採集した同じ家に、翌日、夕方(17:30~18:30)、CDCライトトラップを屋内に設置した。トラップの高さは、床から1.5mに統一した。ライトトラップは、設置した日の夕方から翌朝(6:30~7:30)までに家に侵入した蚊を対象とするため、PSCで採集してから、1日半の間隔があくこととなり、PSCの影響は軽減できる。採集した蚊は、クーラーボックスでラボまで持ち帰り、顕微鏡下で媒介蚊であるガンビエ種群とフネスタス種群に分類するとともに、吸血または抱卵している蚊とそう出ない蚊に分けた。

(倫理面への配慮)

本研究はケニア中央医学研究所(承認番号2135)より承認を得て実施した。蚊帳関連のデータ収集時には、家長に調査目的および参加者の権利について口頭で説明し、同意書に署名を得た。同意の取り方については、署名が困難な場合は他の代筆もしくは参加者の拇印とした。また、対象者の個人情報厳重に管理し、調査員に情報の扱い方についてトレーニングを実施し、調査中も指導を行った。蚊の採集に関しては、口頭にて家長の承認を得た。

C. 研究結果

蚊帳の普及と使用状況

調査時、キブオギ島には、119世帯、475名(男224名、251名)が島に居住していた。そのうち77世帯(64.7%)が蚊帳を一つでも所有しており、合計129張りの蚊帳が認められた。よって、蚊帳を所持している世帯あたりの蚊帳の平均数は、1.7張りであり、蚊帳を所有していない世帯を合わせると世帯あたり、平均1.1張りであった。これを人口で割ると、1人あたり0.27張りであった。調査の前夜に蚊帳を使用した人は、193名(40.6%)であった。

ライトとラップとPSCの比較

採集法の比較においては、フネスタス種群のメスが1951頭、ガンビエ種群のメスが548頭採集され、両種群合わせて2463頭採集された。ライトトラップでは、フネスタス種群のメスが合計1487頭採集され、トラップ毎の平均は、10.6頭であった。PSCでは428頭のフネスタス種群のメスが採集され、平均値は3.1

頭で、違いは、統計的に有為であった($p < 0.001$) (Figure 1A)。

ガンビエ種群に関しては、ライトトラップで272頭、PSCでは276頭採集された。平均値はそれぞれ、ライトトラップの場合は1.9頭、PSCの場合は2.0頭であった。違いは、統計的に有為ではなかった($P = 0.98$) (Figure 1B)。

両種群合わせた場合は、ライトトラップで1759頭、PSCでは704頭採集された。平均値は、それぞれ、ライトトラップの場合は12.6頭、PSCの場合は5.0頭であった。違いは、統計的に有為であった($p < 0.001$) (Figure 1C)。

採集された蚊を吸血または抱卵している蚊だけにしぼって、両方の採集法を比較したところ、フネスタス種群に関しては、ライトトラップで124頭、PSCでは403頭採集され、それぞれの平均は、0.9頭と2.9頭であった。違いは統計的に有為であった($p < 0.001$) (Figure 2A)。

吸血または抱卵しているガンビエ種群に関しては、ライトトラップで62頭、PSCでは252頭採集され、それぞれの平均は、0.4頭と1.8頭であった。違いは統計的に有為であった($p < 0.001$) (Figure 2B)。

両種群を合わせた場合、ライトトラップで採集された吸血または抱卵している個体数は186頭、PSCでは655頭であった。そして、それぞれの平均値は、1.3頭と4.7頭であった。違いは、統計的に有為であった($p < 0.001$) (Figure 2C)。

D. 考察

蚊帳の普及と使用状況

約1/3の世帯が蚊帳を所持しておらず、所持している家屋でも2張未満、全体でも1人あたり0.27張りであり、WHOの最低でも2人に1枚(1人あたり0.5張り)という基準を大きく下回っている。島という環境で、蚊帳を配っている病院やNGOへのアクセスが限られていることが要因と考えられる。

ライトとラップとPSCの比較

従来使われてきたPSC法と比較して、ライトトラップでは、より多くのマラリア媒介蚊が採集された。特にフネスタス種群がより多く採集されている。これは、野外吸血性の種類が、屋根と壁の隙間から漏れているライトトラップの光に引き寄せられている可能性がある。また、フネスタス種群には、光により引き寄せられる傾向がある種が存在する可能性もある。

一方で、吸血または抱卵している媒介蚊に関しては、両種群ともPSCでより多くの個体が採集された。これは、家の中に入った蚊が人を吸血する前に、ライトトラップの光に引き寄せられ、早い時間帯からトラップされるためと考えられる。その点、PSCは、既に吸

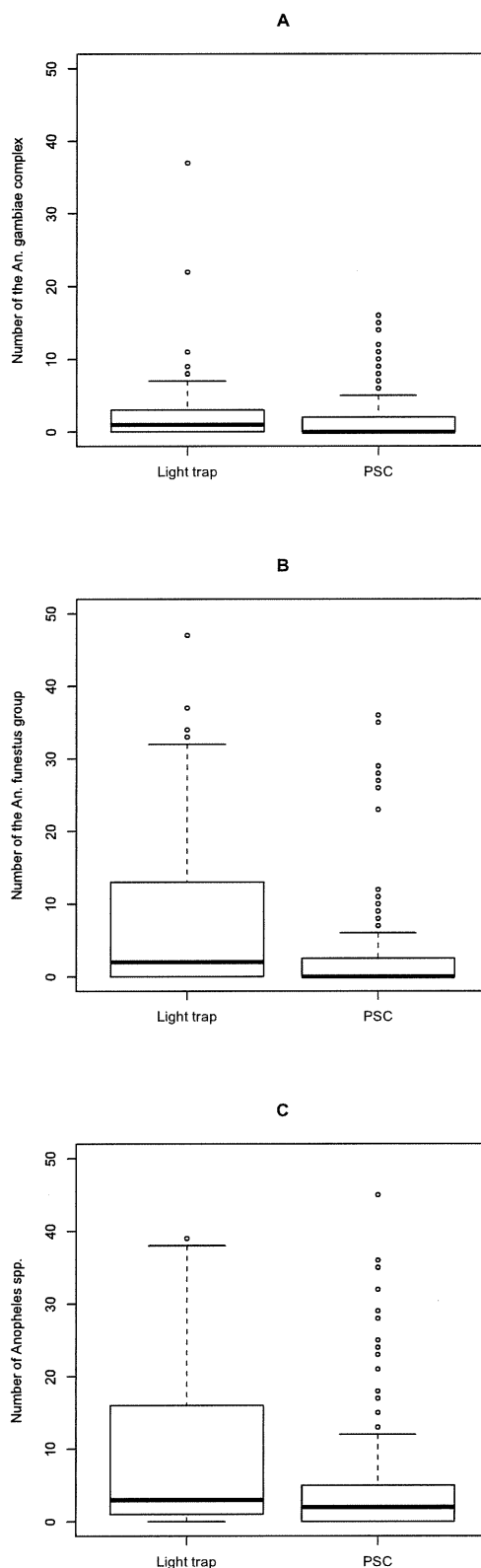
血を終えて、休息している蚊が多い早朝に行なうために、必然的に吸血している個体、または血を消化し、卵の発達した個体が多く採集されるためである。

E. 結論

キブオギ島には、蚊帳は十分に普及しておらず、集団治療を実施する前に蚊帳を十分に配布し、感染をできるだけ下げることが必要である。媒介蚊のモニターリングに関しては、蚊の密度を優先させる場合、特に蚊の密度が低い時は、ライトトラップ法がより効果的である。しかし、通常、吸血または抱卵している個体の方がマラリア原虫保有率が高い傾向にあるため[5]、蚊の原虫保有率のモニターリングを重視する場合には、PSCが適切である。

文献

- [1] Kaneko A, Taleo G, Kalkoa M, Yamar S, Kobayakawa T, Bjorkman A. 2000. Malaria eradication on islands. *Lancet*. 356:1560-1564.
- [2] Kawada H, Futami K, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Sonye G, Mwatele C, Njenga SM, Mwandawiro C, Minakawa N, Takagi M. 2011. Distribution of a Knockdown Resistance Mutation (L1014S) in *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* in Western and Southern Kenya. *PLoS ONE*. 6:e24323
- [3] Kawada H, Dida GO, Ohashi K, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Sonye G, Maekawa Y, Mwatele C, Njenga SM, Mwandawiro C, Minakawa N and Takagi M. 2011. Multimodal pyrethroid resistance in malaria vectors, *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus* s.s. in Western Kenya. *PLoS ONE*. 6:e22574.
- [4] Kawada H, Dida GO, Sonye G, Njenga S M, Mwandawiro C, Minakawa N. 2012. Reconsideration of *Anopheles rivulorum* as a vector of *Plasmodium falciparum* in western Kenya: some evidence from biting time, blood preference, sporozoite positive rate, and pyrethroid resistance. *Parasit Vectors*. 5:230.
- [5] Davis JR, Hall T, Chee EM, Majala A, Minjas J, Shiff CJ. 1995. Comparison of sampling anopheline mosquitoes by light-trap and human-bait collections indoors at Bagamoyo, Tanzania. *Med Vet Entomol*. 9:249-255.



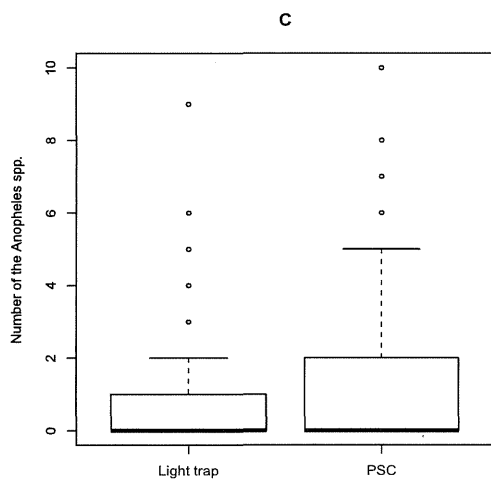
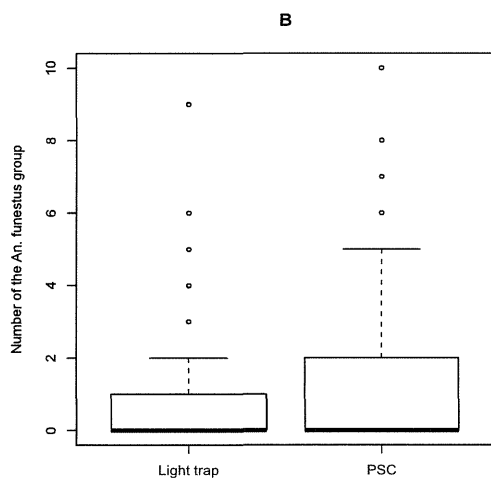
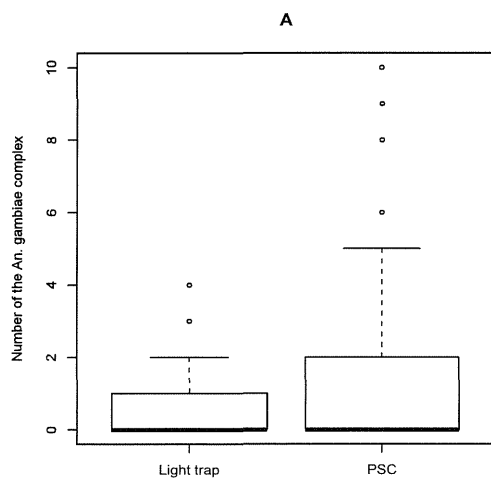


Figure1. ライトトラップとPSCによって採

集されたA フネスタス種群、B ガンビエ種群、C および両種群合計の個体数。

Figure 2. ライトトラップとPSCによって採集された吸血または抱卵している A フネスタス種群、B.ガンビエ種群、C および両種群合計の個体数。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

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）
分担研究報告書

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

研究項目：ヒト赤血球異常症

分担研究者 平山謙二
長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野 教授

研究要旨

アフリカケニア共和国ニャンザ県の島嶼地区におけるマラリア撲滅のためのプログラムの妥当性を検討するために、対象地域での遺伝背景の解析に着手した。今年度は対象地域住民のマラリア検診時に行ったグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)欠損症の血液検査の結果をもとに、患者に特有な遺伝子変異の解析を実施した。遺伝子はX連鎖伴性劣性遺伝様式の遺伝疾患であるが、疾患遺伝子の変異は人類集団において一定したものではなく、酵素活性についてもタイプにより異なることが知られている。調べたのは遺伝子の変異が報告されている、G6PD*B, G6PD*A および G6PD*A-の3つの遺伝子型で、現在122名の酵素欠損患者男性、24名の正常住民男性の遺伝子頻度やその他の変異を解析している。

A. 研究目的

グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)欠損症は世界的に頻度の高い遺伝病で、マラリア抵抗性と関係していると考えられている。酵素自体はペントースリン酸経路の第一酵素でオキシダントやグルタチオンによる酸化的なストレスに防御的な機能を有している。赤血球内では抗酸化作用を有する経路はこれしかないので、G6PD欠損症では種々のストレスで重篤な溶血を引き起こす。特に抗マラリア薬であり今回のプログラムで用いられる予定のプリマキンに対する耐容性が低く用量によっては重篤な溶血反応を引き起こすことが知られている。そこでこの遺伝子異常の頻度を事前に調査することが治療プログラム策定に必要である。

B. 研究方法

オコデ島は人口約1000人であるが、そのほぼすべての住民を対象にマラリア検診を施行している。この際血液サンプルから検査キットを用いてG6PD活性を測定し低値を示した住民のうちX染色体を一本持つ男性を対象にDNAを抽出し、PCR法により既に報告のある遺伝子領域のDNA断片を増幅し、制限酵素多型解析法(RFLP)により変異の有無を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究についてはすでにケニア中央医学研究所(保健省)および長崎大学熱帯医学研究所の倫理委員会での審査を受け、承認を得ている。

C. 研究結果

ほぼすべての異常症患者で376番の変異を確認したが、202番についてはすべて正常型であった。さらに解析を続けている。

D. 考察

G6PD*Bは酵素活性に異常はなくアフリカで一般的にみられる。G6PD*Aは376番目の核酸がA→Gに変異したタイプだが活性は90%保たれている。G6PD*A-はさらに202番がG→Aに変異しておりこのタイプでは酵素活性が8-20%に低下しいわゆる欠損症を呈する。アフリカではこの変異以外に542 G→T, 680 G→T や 968 T→Cなどの変異が報告されている。

E. 結論

集団治療プログラムの策定に際し遺伝的な背景をある程度把握していることが安全上必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

Epidemic Malaria and ‘Colonial Development’: Reconsidering the Cases of Northern and Eastern India

Kohei Wakimura
Graduate School of Economics, Professor

1. Introduction

When we examine the population statistics for British India from the beginning of the 1870s, we see that there was a sudden change in the population growth rate in the 1920s. Until the 1920s the population growth rate remained at a very low level, then increased to a level of more than 1%. The low population growth rate in the first period was determined by the high mortality rate resulting from numerous famines and epidemics (smallpox, cholera, plague, malaria, influenza etc.).¹ The links between famines and epidemics, particularly between famine and malaria, was most operative in pushing up mortality.² This paper suggests that epidemic malaria was an especially important factor in this low population growth regime. In addition, studying epidemic malaria will improve our understanding of the impact of colonial development on population change and the well-being of the people.

The period from the middle of 19th century to the First World War saw significant socio-economic changes in British India. The improvement of transportation measures, the development of infrastructure, and the incorporation of the territory into the world economy promoted the export of agricultural products and the commercialization of agriculture. This process generated income growth in many rural areas. Therefore, this period was not economically stagnant, although income distribution was possibly becoming more unequal and the standard of living of the lower strata was becoming unstable. Why, then, despite modest growth, did this period see many famines and epidemics? This is certainly a paradoxical situation.

It is no easy task to explain why many famines and epidemics occurred in this period, but we suggest that an analytical approach can provide some important insights. First, we need to examine changes in the vulnerability of

the lower classes to famines. Although agricultural growth occurred, the food entitlement of the agricultural laborers and rural artisans may have become unstable during this period. Second, we need to examine changes in the disease environment in general. The various by-products of the development process, including the greater mobility of people, the deterioration of living conditions in urban areas, and the spread of waterlogged land, increase the likelihood of epidemics.

We will only briefly touch upon the first point in this paper. We will mainly focus on the second one. We take epidemic malaria as one of the cases of ‘developo-genic disease’, the term coined by C.C. Hughes and J.M. Hunter in a celebrated paper about 30 years ago. The ‘developo-genic diseases’ consisted ‘in those pathological conditions which can realistically be interpreted as (usually unanticipated) consequences of the implementation of developmental schemes’.³

We will pay special attention to the following three factors that were concerned with amplification of the damage of epidemic malaria: **poverty** or **malnutrition**, **migration**, and **environmental change**. Epidemic malaria was a notorious killer in Punjab and the western United Provinces, but in fact it was a danger well beyond this region. Epidemic malaria was also widespread in Bengal in the second half of the 19th century, where it was generally called the ‘Burdwan Fever’. It was also prevalent in tea plantation areas, such as the Duars in northern Bengal.

Although this paper relies heavily on historic studies by British malariologists⁴ during the first half of 20th century, it surveys recent studies, synthesizes them and assesses the role of epidemic malaria in the demographic and disease history.

2. The Cases of Northern India

Epidemic malaria took thousands of lives during the period from the late 19th century to the early 20th century in northern India. This scourge came almost periodically, often in combination with famine. Some recent studies on Indian famines have observed the demographic impact of epidemic malaria during famines.⁵ This section starts from S.R. Christophers’ celebrated work, then proceeds to a survey of recent studies.

(1) Epidemic Malaria and Famine

S.R. Christophers for the first time consciously analyzed the relationship between famine and epidemic malaria in his famous report on the 1908 Punjab malaria epidemic.⁶ But this study has been neglected until recently.

After a detailed examination of this epidemic, Christophers wrote a report in 1911, in which he said that while the danger of the anopheles mosquito could not be ignored, since flooding caused by excessive rain left the area waterlogged, more importance should be placed on human factors. He claimed that the most important factor causing malaria epidemics was the economic condition of the people. To begin with, he examined the relationship between mortality rates and social status, and then studied the relationship between the prevalence of epidemic malaria and scarcity of food. Concerning the latter relationship, he pointed out that epidemic malaria had often broken out in the year following a famine. Epidemic malaria did not occur during the year of the famine itself, because there was little rainfall. If excessive rainfall occurred during the year just after the famine, the anopheles factor would become tied up with the human factor, the deterioration of nutritional conditions.

There seems very little doubt that the two factors, rainfall and scarcity, are the determining causes of the epidemic malaria seen in the Punjab. Broadly speaking until plague appeared malaria must have been the main agent which brought to a head in actual mortality the effects produced by the great economic stresses. Just as in famines malaria cannot act until nature is about to bring them to an end, so there can be little doubt that the effects of scarcity are to a large extent held over until the appearance of the first heavy monsoon. Then though the effect of the rain is to reap a harvest of deaths the period of stress is brought to an end.⁷

Epidemic malaria was closely connected with famine in other parts of northern India. For example, in the United Provinces this situation had occurred before 1908 in the years 1860-61, 1868-69, 1877-78,

1895-96 and 1899-1900.⁸

Arup Maharatna's historical study of famines during the British period gives us very insightful analysis of epidemic malaria. He analyzed four major famines in 1876-8, 1896-7, 1899-1900, and 1907-8, which covered the Bombay Presidency, Berar, Punjab, and the United Provinces. Then he tried to examine the existing hypotheses:

- (a) A relatively low incidence of malaria owing to dryness during the drought year reduces the population's immunity level; this enhances the chances of a malaria epidemic when the rains resume in the following year.
- (b) Since a fever mortality peak appears to have often occurred after the resumption of rains, along with an improvement in nutritional levels, it may result from the 'refeeding of malaria'.
- (c) In view of a strong correlation found (historically) between food scarcity and fever (or malaria) mortality in parts of the Indian subcontinent, the occurrence of malaria epidemics in the wake of famines may be related to acute nutritional stress and its debilitating effects.⁹

Maharatna attaches greater importance to acute nutritional deficiency than any factors, then basically supporting (c) hypothesis. Now we will examine the relevance of each hypothesis.

The (a) hypothesis takes immunity more seriously than any other factors. According to I. Stone, who emphasized the immunity factor, there were two types of malaria in the western United Provinces during this period: endemic 'benign malaria' and epidemic 'malignant malaria'. The endemic 'benign malaria' was due to *Plasmodium vivax*, which often caused relapses but also maintained the immunity of the infected persons. When a relapse occurred, the infected person suffered from high fever, but did not become seriously ill, except for small children and infants, whose severe conditions could not be treated. On the other hand, the 'malignant malaria', which was due to *Plasmodium falciparum*, became epidemic malaria in this region. People who contracted 'malignant malaria' did not suffer relapses, and so did not maintain their immunity. Therefore the epidemic 'malignant malaria' periodically

devastated the region, killing many people. The immunity factor explains these periodic outbreaks of malaria epidemic. But this factor does not explain the famine-malaria nexus itself.

The second (b) hypothesis denies the close relationship between nutritional deficiency and epidemic malaria. This hypothesis claims that nutritional recovery (refeeding) coincided with the appearance of epidemic malaria. T. Dyson and E. Whitcombe emphasize the famine and epidemic malaria nexus, but they seem to deny that nutritional deficiency is a causal factor. They claim that nutritional deficiency protects people from being susceptible to malaria. Moreover, Whitcombe notes that 're-feeding may enhance susceptibility to malaria'. In any case the main causal factor for epidemic malaria is as follows:

In the famine years of greatest mortality, the association of prodigiously high temperatures with 'unseasonable' rain greatly increased the level of atmospheric humidity and prolonged it, creating the optimal conditions for a massive proliferation of vectors and an uncommon increase in their longevity Proliferation of anophelines on such a scale favoured an increase in infectivity sufficient to destabilise the precarious equilibrium between infection and immunity which obtained in areas where malaria was endemic in 'normal' years.¹⁰

This hypothesis assumed the following causation. The anopheles factor collaborated coincided with the re-feeding process, and then resulted in an increase in the infection rate.

The (c) hypothesis emphasized the existence of a close causal relationship between famine or malnutrition and epidemic malaria. This relationship has been recognized by A. Maharatna, K. Wakimura and S. Zurbrigg in the 1990s. Zurbrigg's argument is the best articulated. She applied regression analysis to the correlation between malaria mortality index and the food price index.¹¹ She pointed out that 'acute hunger' or 'frank starvation' was important in explaining the causation of epidemic malaria. 'Acute hunger' or 'frank starvation' means that nutritional intake decreases drastically. Her subsequent

finding is that the number of casualties in epidemic malaria was determined not by the incidence of infection but by the case mortality. The following question was posed: why did the victims of epidemic malaria diminish after the 1908 epidemic? Her answer was: 'What appears to have changed after 1908 is not so much the incidence of infection—numbers of persons infected during the post-monsoon period—but lethality of malaria infection, the proportion of infected people dying of disease'.¹² Stark malnutrition determined the lethality of malaria infection. After the 1908 malaria epidemic, 'the frequency and prevalence of overt starvation clearly declined'¹³ in Punjab and elsewhere. This is not an issue of exposure to the pathogens, but an issue of case mortality, though information on the latter is usually absent. The reason for the case mortality increase must have been the reduced nutritional intake.

We again return to Zurbrigg's second question. Why did the damage caused by epidemic malaria decline after 1908? S. Guha presented almost the same explanation as Zurbrigg. He referred to S.R. Sen's comparison of agricultural stability between two periods.

Comparing the period 1900-1 to 1923-24 with 1924-25 to 1950-1, he [S.R. Sen] observed that while foodgrain output was rising in the first period yet the divergence between peaks and troughs of output was also increasing. On the other hand, the second quarter-century saw a stagnation in output accompanied by a convergence between peaks and troughs, so that agriculture was stagnant but stable.¹⁴

He attributed the decline in mortality after the 1920s to the stability of agricultural production. Although he does not mention epidemic malaria, he seems to pay great attention to the famine-induced epidemic malaria.

We can add that the food entitlement of the lower social strata (agricultural labourers and artisans) in rural areas must have become very unstable in the process of commercialization during the period 1900-1 to 1923-24.

(2) Epidemic Malaria and Canal Irrigation

Christophers denied the role of canal irrigation in increasing the numbers of victims

of epidemic malaria. But the causal relationship between the introduction of canal irrigation and the prevalence of epidemic malaria has been pointed out in many cases. The reason why Christophers denied it was that epidemic malaria did not occur in the western Punjab where canal irrigation was most developed during the period. Instead, the areas often affected by epidemic malaria were the submontane northern and the southeast parts of Punjab, where there was relatively little canal irrigation.¹⁵ There is now a strong criticism against Christophers' argument about the influence of canal irrigation. S. Watts emphasized that Christophers' view was derived from his subordination to 'gentlemanly investors in irrigation'. Therefore, Watt claimed, Christophers deliberately avoided this question.

Though admitting that 'the exact mechanics of epidemic malaria is still unknown', he left readers with the impression that in the Punjab epidemics were caused by *natural forces*—heavy rains, floods, excessive heat and resulting famines—and that they were in no way brought about by the irrigation practices of British engineers. This impression was later openly confirmed by an official on the governor-general's council. Speaking early in 1914, the head of the Department of Education and Sanitation put it on record that Christophers' malaria survey of the Punjab had 'demonstrated...a most important point ...that irrigation has no special relation to the distribution of mortality in these epidemics...and that the great exciting causes of these epidemics are floods'.¹⁶

But I think that Watts presents little evidence to support his claim in the paper.

Christophers was not alone in his claim. According to C.A. Gill's study in 1929, canal irrigation had no significant impact on the level of damage caused by epidemic malaria. He agreed with Christophers' views on epidemic malaria. He stated, '(c)anal irrigation is not a factor of any importance in determining the incidence or severity of epidemics of malaria'. But, as far as endemic malaria is concerned, its influence should not be neglected. He continued,

As a partial exception to the general rule it is certain that whenever canal irrigation gives to water-logging a vicious circle is set up in which endemic malaria leads to bad health, bad health to economic stress and economic stress to further privation and more sickness, and, finally, as the combined result of a high death rate, a low birth rate and emigration, to the depopulation of the affected tract.¹⁷

This distinction between endemic malaria and epidemic malaria probably corresponds with Stones' distinction between endemic 'benign malaria' and epidemic 'malignant malaria'.

On the contrary, the recent study by E. Whitcombe did not distinguish endemic malaria from epidemic malaria in terms of the adverse influence of canal irrigation, arguing instead that both could be aggravated by the introduction of canal irrigation. In the monsoon season, '(t)he climatic characteristics of the third quarter, annually, in the semi-arid zone, the persistence of high temperatures in conjunction with maximum precipitation, drove atmospheric humidity in 'normal' years to well above this threshold, prolonging the longevity of anophelines and thereby intensifying their breeding capacity'. Whitcombe stated,

Incidence was highest where atmospheric humidity was highest: in submontane tracts, and in waterlogged areas of the plains. This 'stable' pattern in the incidence of malaria could be destabilized by excessive rainfall, a major determinant of the incidence of epidemic malaria. Here too, incidence was inevitably highest in tracts waterlogged naturally, or as a consequence of irrigation.

Stone gave us very useful information concerning the ecology of anopheles. In the western United Provinces the main malaria carrier, *Anopheles culifacies*, was so zoophilous and short-lived that the probability of transmission was relatively low. For that reason only when the numbers of this species of anopheles increased significantly for some reason did the possibility of transmission increase. Needless to say, the usual reason was a heavy rain that increased the breeding places of anopheles and created atmospheric humidity in the monsoon season. Stone recognized that in any case incidences of both endemic malaria

and epidemic malaria were intensified by the waterlogging caused by canal irrigation, though he claimed that the total economic benefit of canal irrigation substantially exceeded the environmental costs.

Now we should interpret the difference of views on the influence of canal irrigation. Christophers and Gill took the western Punjab as a typical irrigated area, pointed out that epidemic malaria rarely occurred there and concluded that there was no relation between canal irrigation and epidemic malaria. But the claims by Whitcombe and Stone were based upon the cases of irrigated areas in the western United Provinces. Here, since the second half of the 19th century victims of epidemic malaria have often been concentrated in the Doab irrigated area.¹⁸ I would guess that this difference of case area has a strong effect on the differential assessment of canal irrigation.

Therefore, we need to situate this difference in the wider geographical configuration. Following the study of Christophers and Sinton, Learmonth once pointed out that there was 'the 40-inch isohyet as a crucial divide, a line on the map familiar to geographers as roughly dividing humid (rice-eating) India from arid and semi-arid (wheat and millet-eating) India: here it is similarly taken as the malariological divide between humid and endemic India as against arid and semi-arid epidemic India'.¹⁹ According to Learmonth, the epidemic area can be divided into two parts. One was 'area(s) liable to fulminant epidemicity (diluvial) malaria'.²⁰ Another was the drier area where modest epidemic malaria occurred. The western United Provinces and northern and southeastern Punjab are located in the former area. If we look at a map indicating average annual precipitation, we find this area inside of the 20-40 inches precipitation region. On the other hand, the western Punjab is located in the latter area, where average annual precipitation is under 20 inches. We can conclude that fulminant epidemic malaria often occurred in the western United Provinces but rather rarely in the western Punjab, *though this is still a highly speculative observation.

In any case contemporary evidence often shows that the introduction of canal irrigation amplifies the damage of malaria in India still now. For example, an outbreak of epidemic malaria occurred in the western

Rajasthan in the 1990s. The cause of epidemic malaria is said to be the introduction of canal irrigation.²¹

3. The Cases of Eastern India

Since the middle of the 19th century intense malaria epidemics, called 'Burdwan Fever', struck central and western Bengal.²² This epidemic malaria started from the Jessore district in 1847-48, proceeded to Nadia and 24-Parganas in 1857, spread to the Burdwan district in 1868, and then penetrated Birbhum, Midnapur and Howrah. The 'Burdwan Fever' changed central and western Bengal from a rather healthy region into a very malarious one. For example, according to the dispensary's record in the city of Burdwan, the fever rate, the proportion of malarial patients among total admissions, increased from 10.58% in 1865 to 23.81% in 1868 and to 39.5% in 1870-71.²³

During the period a series of malaria epidemics affected population change in this region. The rate of population increase from 1901 to 1911 was 2.8% in the western Bengal and 5.1% in the central Bengal, while the rate was 12.0% in the eastern Bengal. The low rate of population growth in the former regions was certainly due to these malaria epidemics.²⁴

The following section tries to identify the causal factors for this series of outbreaks of epidemic malaria that is called 'Burdwan Fever', basically relying on the work of malariologists' conducted at that time.²⁵

(1) Epidemic Malaria and Labour Migration

S.R. Christophers and C.A. Bentley presented a paper entitled 'Human Factor' to the Bombay Medical Congress in 1909.²⁶ They tried to clarify the causes of heightened malaria prevalence in particular areas. They pointed out that previous research had attributed high malaria prevalence only to the anopheles factor and claimed that human factors were more important in certain situations. Whenever some virulent malaria prevalence occurred, it probably arose from a situation that could be called 'tropical aggregation of labour', referring to places, such as plantations or railway construction sites, where large numbers of labourers lived and congregated. Continuous 'non-immune immigration' and 'physiological poverty and hardship' in these places increased infection

rates. This cause of intensified malaria prevalence was thought to be applicable to wider areas. Thus Christophers and Bentley listed three human factors believed to provoke epidemics: 'tropical aggregation of labour', 'non-immune immigration', and 'factor of residual infection'.

It was commonly believed that 'the factor producing these epidemics has been a change in the natural drainage of the country'. In short, either 'water-logging of the soil' or 'an increase of anopheles mosquitoes' was cited as the main culprit.²⁷ However, Christophers and Bentley denied this simple causation theory. They attached more importance to the vicinity of Calcutta, because many labourers went there to work in railway construction, road construction, and factories. They argued that the 'tropical aggregation of labour' had been created over this wide area.

Prior to 1860 there is little evidence of the existence in this area of anything like the modern movement towards the immense industrial expansion of recent times; but from about this date commences a period of phenomenal activity and commercial enterprise and an era which saw the inauguration and completion of enormous public works. Within a decade three great canal systems, the great railways, a vast network of important roads, together with huge industries like that of coal, cotton, jute and tea, sprang into existence and underwent extraordinary development. Calcutta, the primary centre of this new movement, rapidly increased in size extending in every direction under the stimulus of a growing commercial activity, which necessitated the establishment of docks and the expansion of harbourage, and led to the erection of vast blocks of new buildings both within the city and throughout its widening suburbs.²⁸

They concluded that tropical labour aggregation was the main factor causing epidemics of malaria.

Tropical labour aggregation appeared quite typically on the tea plantations of northern Bengal. The Duars was a portion of the 'terai' land that stretched along the eastern Himalayas. This was a 'hyper-endemic' area, meaning that people living there had often suffered from malaria from infancy and had

acquired certain degrees of immunity. The problem in this area was not malaria among the indigenous people who had lived there for generations, but rather severe infection among the immigrants to the tea plantations. Intense malaria epidemics sometimes attacked this area, a problem, according to Christophers and Bentley, that resulted from the continuous entry of non-immune immigrants into the tea estates and their poor living conditions.²⁹ During the early decades of the 20th century in India, there was an appreciable increase of labour mobility and a rise in wages, which was brought about by industrial development and migration. More attention was paid to the availability of labour than ever before; and therefore malaria on tea plantations should be understood within such a context. They argued that this rising demand for labor was the main factor in the high rate of malaria on tea plantations.

The immigrants came from Chota Nagpur and the Santal Pargannas in Bihar, and also from Nepal and the Darjeeling Hills. The labour population in the tea plantations of the Duars was estimated to be 150,000 in the early 20th century, annually receiving approximately 30,000 newcomers. Some of the Duars' newly hired workers were free from malaria but others were infected.

Most of the recruiting localities, if we may judge by the coolies coming from them to the Duars, are comparatively healthy; others are more or less malarious, and some even apparently intensely so. Thus in the Duars malaria carriers from malarious districts and susceptible people from healthy areas are mingled; and, in the presence of anopheles, we have ready the constituents for an explosion of epidemic malaria.³⁰

The prevalence of malaria outbreaks resulting largely from labour migration can be found in contemporary evidence. The phenomenon called 'migration malaria' is taken seriously in India today. For example, outbreaks of malaria sometimes occurred near the sites of construction projects in cities because seasonal migrant labourers came from malaria endemic areas and lived in impoverished, unsanitary housing. This situation was further aggravated by the proliferation of anopheles in the construction

sites. Not only construction labourers but also inhabitants in the neighbourhood often became infected with malaria.³¹

The same phenomenon can be seen in Africa as well. One Africanist wrote a monograph entitled *Migrants and Malaria* in 1965. The author emphasized that labour mobility aggravated malaria problems in Sudan, the Horn of Africa, East and South-West Africa, West Africa and Morocco.³²

(2) Epidemic Malaria and Poverty

In addition to the labour migration factor, we need to take into account the poor living conditions of labourers in tea plantations. The labour conditions in tea plantations of Duars were bad, and nutritional deficiency among labourers was common. 'An inadequate dietary in the case of new coolies leading to the vicious cycle of --- inadequate diet --- physiological poverty --- increased liability to sickness especially to malaria --- less wages earned --- increased hardship and privation with still less adequate diet, and so on' were pointed out in the report on Duars. Not only nutritional conditions, but also housing and sanitary situations were hopeless. These notorious conditions were led to by the 'sardari' labour system. In any way these disadvantaged economic conditions among labourers were closely connected with epidemic malaria.³³

The theory of vicious circle between disadvantaged economic conditions and epidemic malaria was applied to a much wider area by Bentley. He developed his human factor approach by analyzing malaria prevalence in Bengal, which was 'Burdwan Fever'. He explained this situation in terms of 'agricultural deterioration'.

The epidemic malaria of the Punjab is regarded therefore as arising from the conjunction of conditions favouring an increase of anopheles mosquitoes and the consequent spread of malarial infection with a period of serious scarcity of food among certain classes of the population. And in Bengal epidemic malaria can likewise be shown to be due to the action of the same factors. But unlike the Punjab, which is naturally a dry and comparatively well drained country in which abnormally heavy

rainfall encourages the multiplication of anopheles, scanty rain and diminished flooding favours the increase of these mosquitoes in Bengal. And allowing for this difference, the epidemic malaria of the latter province is seen to be due to the operation of causes fundamentally similar to those responsible for its occurrence in the Punjab, viz., an increase of facilities for the spread of malarial infection on the one hand together with abnormal economic stress on the other. In the delta tracts of Bengal short rainfall and scanty inundation favour anopheles mosquitoes, and lead at the same time to agricultural deterioration and poor harvests, the immediate result of this combination of factors being a great intensification of malarial infection, which manifests itself either in the form of acute epidemic outbreaks of the disease or by the more gradual depopulation of the areas affected.³⁴

What caused this 'agricultural deterioration' in central and western Bengal? According to Bentley, river inundations had given deltaic Bengal a highly fertile soil; but when railways or roads were constructed, the embankments disturbed river inundation, preventing proper silt accumulation. From the middle of the 19th century to the early 20th century, the 'proportion of current fallow and cultivable waste to net cropped area' had increased in central and western Bengal, and the 'percentage by which the outturn of principal food crops fell short of the normal' had also risen.³⁵ On the other hand, in eastern Bengal agricultural growth was very prominent. This is a very clear contrast.

During the same period, as already mentioned, population growth was stagnant in central and western India. Sometimes population declined due to both malarial impact and outmigration. S. Bose indicated in his recent book:

Population density in Burdwan fell back from over 700 to under 550 per square during the 1860s and 1870s. The population of Hooghly was said to have been halved between the late 1850s and the late 1870s. In the malaria-infected parts of Midnapur population declined by nearly a third in the latter half of nineteenth century. Local