

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

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 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光電光度計（計測加野 OD: 0~3）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

調査は 2013 年および 2014 年に行い、2013 年のデータについては 2014 年のデータと比較して同一人を排除し、地域の G6PD 欠損割合を求めた

男性の測定結果では、全測定値を集めると吸光度差 0.77 付近でピークとなり、これを正常人のピーク(100%)と見なして活性値を換算して比活性値とした。この比活性値の低値域に二つ目のピークが有り、この集団が欠損症と考えられた。陰性の基準は正常人の吸光度差の 21% 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ず、切れ目の無い 3 つのピークを認めた。それぞれ陰性、50%活性、正常の集団と考えられた。今回は男性と同じ基準を当てはめ、21%以下を暫定的に欠損症とした(homozygote)。

総計男性 1655 名を調べ、欠損者は 184 名(11.1%)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 11%から 19%と高く、Ngodhe 島では 5.3%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。

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・講師

A. 研究目的

マラリア撲滅プログラムにおいて、プリマキンが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見直されている。熱帯アフリカでのマラリア流行は主に熱帯熱マラリアであり、これの撲滅が重要である。その対策に際しては熱帯熱マラリア原虫の無性世代の原虫殺滅が一義的に重要であるが、抗無性世代駆虫薬の多くは生殖母体殺滅作用がなく、熱帯熱マラリア原虫では生殖母体が治療後に長く残るとされている。生殖母体が生き残る限り、蚊による伝搬が可能となりマラリアの流行を阻止できない。生殖母体殺滅がマラリア対策において重要であり、プリマキンを熱帯熱マラリア生殖母体殺滅薬として使用する事が有効な対策に結びつくと考えられている。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:

基本的には2013年度の報告と同様に、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PD-303S (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IGEPAL CA630(Nonidet P40同等品、Sigma社)を用いた。

2014年度では光電光度計を吸光度0~3を測定可能な機種(PD-303S(APEL社))とした。これは反応終了時の吸光度値が1を超える事例が多くあり、また吸光度高値の領域では光度計(AP-1000M:測定可能OD範囲0~2)の制限から連続値が得られなかったために機種を変更した。さらにNonidet P40が製造中止となり入手出来なくなったので同等品のIGEPAL CA630を用いた。

2) 測定方法についての再検討:

光電光度計を吸光度0~3を測定可能な機種に、界面活性剤をNonidet P40からIGEPAL CA630にそれぞれ変更後の測定結果が同等であるかを検討した。

3) 調査地でのG6PD活性の測定:

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5 μ l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を想定した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。よりいっそうの遮光に対する注意が求められ、試薬の入った測光セルの保存用器を黒色ラッカー塗布し、かつ少数のセル保存箱として光の暴露を小さくした。さらに反応保温装置の蓋にも着色して遮光した。

光電光度計については吸光度測定範囲0~3の製品は100V, 9Vの電源が必要となったが、保温装置の運転のためにすでにジェネレーターを使用しており、電力の供給には問題ない。

2) 測定方法についての再検討:

界面活性剤と光電光度計を変更したが、酵素反応の本質は変わらず、活性値としては血液添加直後の吸光度(1st OD)と30度・15分反応後の吸光度(2nd OD)の差分で表す方法とした。

一方、酵素反応液に血液添加後約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肉眼でも濁った状態から透き通った状態に変化する事が観察出来、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。瞬時に溶血させることが測定上必要であった。速やかに溶血をさせ、しかも酵素反

応に悪影響を及ぼさない物質としてNonidet P-40を選定したが、この試薬は今日入手出来なくなっており、今年度はこれに換わる同等品としてIGEPAL CA630を用いた。これを生理食塩水に加え、終濃度0.05%溶液としたもの1mlに血液5 μ lを加えて溶血の状況を確認したところ、瞬時に溶血した(図1)。

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5% IGEPAL CA630水溶液を1ml(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、反応開始時まで暗箱の中に室温で保存した。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)した後、反応の初期値(0分)の吸光度値(1st OD)を測定した。その後直ちに30 $^{\circ}$ Cの恒温槽に移してタイマーを作動させた。反応は15分間とし、反応終了時に吸光度値(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(OD)として求めた。

3) マラリア調査地区での住民のG6PD活性を測定した。

3)-1. 調査地区を図2.に示した。また、G6PD活性を測定した人数については、2014年度の人数に加え2013年度に測定された被検査者について2014年度被検者との個人重複を除外し、両年度で調査し得た

人数を地区別に示した表1。

3)-2. 2014年度の測定値と2013年度の測定値を評価するために測定値について男性の値について、1st ODに対する OD値(吸光度差値)をプロットし、図3a, bに示した。

3)-3. 2013年、2014年で、男性の活性が正常な群について、ODの平均値を比較すると双方とも0.77であったので、両年度のデータを集め、ODが0.77を示すものを100%活性として換算した。同様に女性についても100%換算した。男女別に度数分布を図4に示した。

3)-4. 一般にG6PD活性値の表現においては赤血球数あるいはヘモグロビン濃度で補正し、単位赤血球数当たりあるいは単位ヘモグロビン当たりで表現される。本調査においても同時にHEMOCUE(アムコ、東京)を用いてヘモグロビン値を測定している。一方今回の測定法では試薬に血液を添加し、直後の吸光度(1st OD)を測定しているため、この値はヘモグロビン量と関連があると考えられる。そこで2014年度男性のデータで1st ODとヘモグロビン値の関係を図5に示し、さらにG6PD活性値を1st OD値で補正し図6に示した。

3)-5. 男性で低値を示した集団を陰性集団と考え、その平均値(8.67%)と分散 $\times 3$ (3 : 12.53%)より陰性の範囲を%OD値21.20%以下と定め、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7に示した。

D. 考察

測定法に関しては、試薬の光による発色の問題があるが、可能な限り遮光する事により試薬調整直後の吸光度0.04から調査終了の午後1時頃の吸光度0.07程度であり、大きな問題とはならなかった。また反応の最初と終点の吸光度を測定しており、その吸光度差は反応産物(Zymodem)の生成量を現している。吸光度差を得るには2回の測定が必要となるが、酵素活性による変化量を得るには有効な方法である。また、界面活性剤による強制的な溶血は血球膜による光の散乱を素早く最小化する事により1st OD測定値が信頼できる値となり図1、同時に赤血球内に存在する酵素蛋白を反応系に素早く拡散させる効果があり、反応の開始がスムーズになると考えられ、測定系に有利に作用する。

2013年度と2014年度のマラリア調査時に検査に訪れた住民からの採血時に5 μ lの血液を採取してG6PD酵素活性を測定した。2014年度の測定データを全て採用し、2013年度の測定データの内同一人の年度間重複を除外した結果、男性1655人、女性1842人で、地域別に表1のごとくであった。

光電光度計の性能差による分布の違いを図3 a, bに示している。2013年度の測定では2nd OD値(=1st OD+ PD)が1.0を超える辺りから測定値の連続性が無くなり、飛び値となった。これは吸光度計の測定限界に近い濃い濃度領域で飛び値を表示した結果による。高濃度領域の測定結果の信頼性に欠ける結果である。それに比較して2014年度の測定結果では分布全体が連続値に近い状況であり、きれいな分布となった。しかし、分布の概観は似ており、特に低活性の測定値(OD値)は両年共に同様の分布が得られたと考える。また、正常域の活性値の平均値も同等であったので、2013年、2014年度のデータを総合して示すことにした。

一方で、一般に行われているG6PD酵素活性値のヘモグロビン補正について検討した。我々の定量的測定法では1st OD値はヘモグロビン濃度を反映していると考えられるので、まずその散布図を示した図5。相関は見られた($r=0.6$)。が、ヘモグロビンの測定が正しいとすると、グラフの上方に広がったポイントはピペットで血液5 μ lを採取出来ず、血液量が少なかった事を意味すると考える。調査現場で指頭の少量の血液溜まりから正確に採取する事は、困難な場合があり、またピペットチップ内で凝血するケースもあり、血液採取量の誤差は少なからず起こりうる。今回はヘモグロビン値による補正と同等な手法として1st OD値による補正を試みた。その結果は図6のごとくである。1st OD低値では補正後活性は高く変移し、1st OD高値では補正後活性値は低く変移する。しかし、陰性集団では補正後の変移がほとんど見られない。調査現場での活性陰性者を見いだす目的において

はヘモグロビン（1st OD）での補正は必要ないと考えた。

男女別のG6PD活性値の度数分布を図4に示した。男性では明な2峰性の分布となり、低値の集団が活性陰性集団と考えられた。活性値正常集団と陰性集団の間には明確な谷が見られる。女性での分布は男性の陰性集団に相当するところに小さな山、正常集団の大きな山の麓に小さなブロードな山が認められ、それぞれの集団は分離しなかった。

G6PD遺伝子がX染色体上にあることから、男性では表現型として明瞭なG6PD酵素活性の低い集団が見られる。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。ヘテロの場合、中庸度の活性低下が認められ明らかな陰性・陽性の間の集団が認められた。

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、調査地区ごとの陰性者の出現割合を求め図7に示した。いずれの地域でも男性の欠損率が女性より高く、X染色体上の遺伝子の変異による事で説明出来る。しかし、その割合は男性の欠損割合から計算される予測値より高かった。男性の欠損率はN godhe島4.3%で、Kibuogi, Takawiri島および大陸対照地Ungoye集落より有意に低値であった（ $P < 0.016$ ）。Ungoyeについては2014年に湖畔の調査地に加え、比較的近接した山間部の集落Obangaについても調査した。欠損者の割合は湖畔地区より低かったが、調査人数が少なく統計処理はしなかった。

今年度の調査では酵素活性値を正確に求めるために光電光度計の性能を高めて行い、良好な結果を得た。しかし、計測器の性能にかかわらず高度活性低値者の判定と正常活性値の平均値は共に同等であったことから、低機能の光電光度計の活用も再考する必要がある。特に計測系の吸光度を低くすることにより低機能な機器の利用が容易になると考えられ、そのためには測定に用いる血液量を可能な限り少量化する事が必要となる。この点を含め、機器や機材の簡素化のために反応系の改善を図る必要がある。

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秒で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19%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。

今年度は光電比色計の性能を高めて行い、良い結果を得た。しかし、比色計の性能に関わらず活性低値の割合や女性の50%活性の存在等が同等であった。添加血液量を含む反応系の再検討することで、適用範囲が広がると考える。

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）
- (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(2)
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84回寄生虫学会大会（三鷹）

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

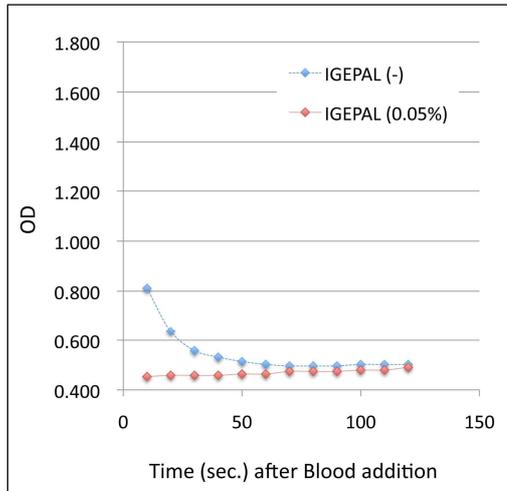


図1．血液添加後の吸光度変化

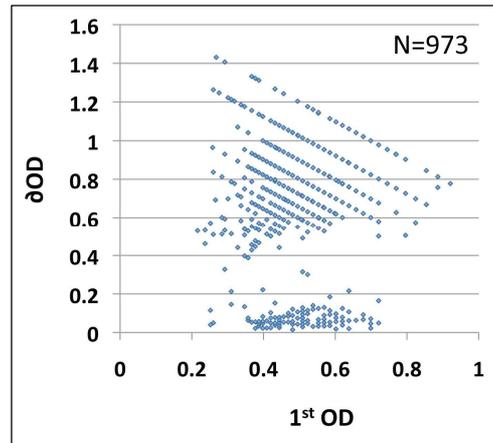


図 3-a. 光電光度計の測定範囲 0～2 による測定結果 (2013 年)

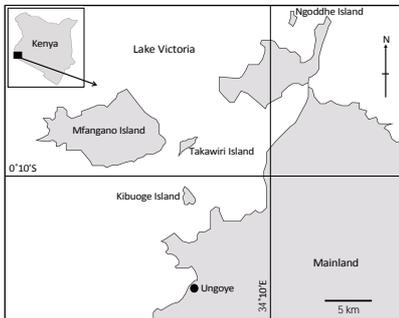


図2．ケニア共和国調査地地図

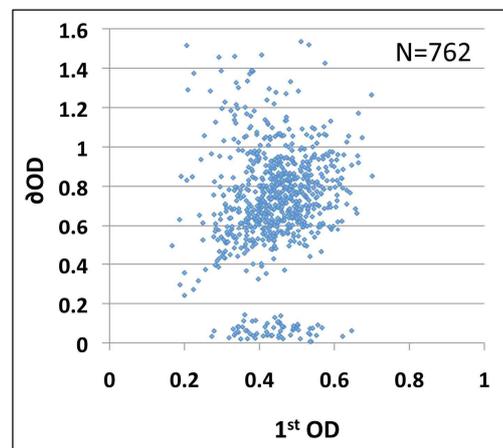


図 3-b. 光電光度計の測定範囲 0～3 による測定結果 (2014年)

表 1 調査地域と調査人数 (2014, 2013年)

調査地域	Male	Female
Ngodhe	171	181
Kibuogi	141	160
Takawiri	206	243
Mfangano	652	680
Ungoye	371	441
Ungoye Obanga	114	137
Total	1655	1842

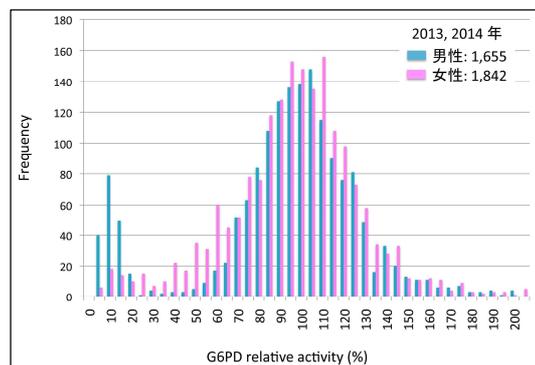


図4. G6PD活性分布 (男女別)

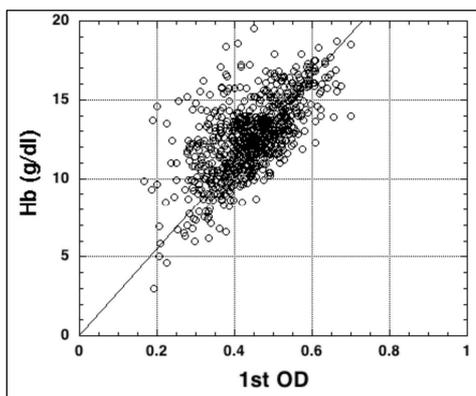


図5. G6PD測定における1st OD値とHb(HemoCue)値の関連

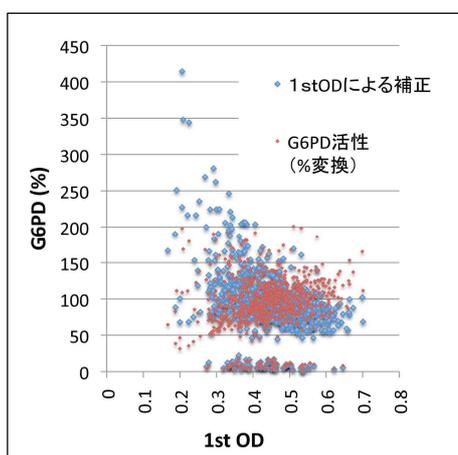


図6. G6PD活性の1st OD値による補正は必要か？(2014年データ)

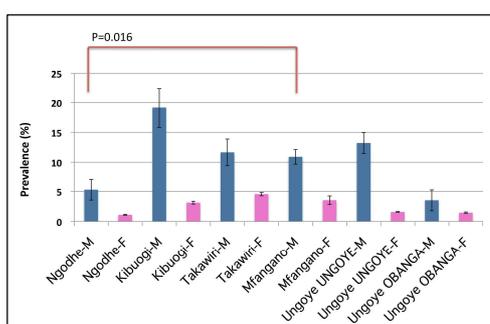


図7. 調査地域別G6PD欠損者の割合