

20150300/A・B

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27年度 総括・分担研究報告書

平成25～27年度 総合研究報告書

研究代表者 金子 明

平成 28 (2016) 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27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 明

平成 28 (2016) 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. 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…………… 10

2. Acridine Orange 染色法の改良によるマラリア原虫血症の高感度迅速診断法の開発

研究代表者 金子 明

連携研究者 木村政継…………… 16

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…………… 30

4. ヒト赤血球異常症

分担研究者 平山謙二…………… 32

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

分担研究者 脇村孝平…………… 33

6. 西ケニアにおける熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性に関連する縦断的・網羅的遺伝子学的解析

分担研究者 五十棲 理恵…………… 39

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 42

IV. 総合研究報告書

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…………… 43

V. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 53

VI. 研究成果の刊行物・別刷…………… 55

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題解決推進のための行政施策に関する研究事業）
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。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。**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 27 度は、KNH/UON-ERC に提出した MDA 実施のための研究計画に対して primaquine の安全性等多くのコメントが寄せられたが、改訂した研究計画を再提出し承認された。承認を受けて、ビクトリア湖 Ngodhe 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 を今年度中に開始した。さらにビクトリア湖島嶼地域における島嶼から湖岸内陸部への MDA 実施地域拡大戦略策定のための日中瑞ケニアの研究協力体制構築を目指した。

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。

オコデ島におけるマラリア撲滅パッケージ導入

Acridine Orange 染色法の改良によるマラリア原虫血症の高感度迅速診断法の開発

G6PD 欠損症率モニタリング

G6PD 欠損症遺伝子解析

西ケニアにおける熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性に関連する縦断的・網羅的遺伝子学的解析

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

熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅のロードマップは未だ見えていない。本研究は、この命題に対してケニア・ビクトリア湖島嶼マラリア流行地より挑戦する。島嶼は干渉研究に対して自然の実験場を提供する。伝播阻止を目的としてプリマキンとアルテミシニン併用による島嶼住民に対する短期集団治療を試みる。それに先立ちプリマキン使用における抗熱帯熱マラリア生殖母体効果に関わる CYP2D6 多型および血管内容血リスクに関わる G6PD 欠損症について、研究対象地住民集団において疫学的検討を行い、さらに無症候性感染者に対する臨床投薬試験により、マラリア撲滅にむけたプリマキン使用集団治療の背景にある対象集団ヒト多型の意義を明らかにする。また集団治療により予想される地域原虫集団多型（薬剤耐性、抗原変異、マイクロサテライト）の変動を分子・血清疫学的に解析する。長期的撲滅維持に向けて住民主導によるサーベイランス・媒介蚊対策を組み合わせる。マラリア撲滅が島嶼社会を変容させうるか、医生物学・倫理学・社会経済学的にモニターしていく。究極的には熱帯アフリカにおけるモデルを提示したい。

B. 研究方法

研究対象とするビクトリア湖島嶼住民集団において、熱帯熱マラリア撲滅を目的としたプリマキン少量一回投与に関連するCYP2D6多型およびG6PD欠損症の分布を疫学的に調査し、さらに無症候性感染者に対する投薬試験によりそれぞれ抗生殖母体効果と血管内

溶血リスクへの関与を検討する。オコデ島全住民(700人)を対象にアルテミシニン・ピペラキンとプリマキンによる集団治療と殺虫剤処理マテリアル配布を組み合わせた短期集約対策によるマラリア撲滅を試みる。さらに住民主導の媒介蚊対策およびサーベイランスにより長期間撲滅維持可能性について検証する。集団治療がマラリア原虫集団および住民の年齢特異的抗原虫免疫をいかに変容させるかを原虫分子マーカー（薬剤耐性、抗原変異、マイクロサテライト）および血清抗体価の解析により明らかにし、薬剤耐性選択および再燃リスクとの関連を検討する。マラリア撲滅が島嶼コミュニティをいかに変容させるかについて貧困・開発といった観点からモニターしていく。これらの結果を総括し究極的に熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅モデルを提唱する。

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では 70%に達した。

(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。

C. D. 研究結果および考察

オコデ島におけるマラリア撲滅パッケージ導入

我々は、2012 年以来、6 回にわたって対象島嶼・地域において cross sectional マラリア調査を行ってきた。下図にその結果得られた年齢群別陽性率を示す。点線で症候性、実線で無症候性の原虫陽性率を、四角で PCR、横線で顕微鏡による原虫陽性率を表している。原虫陽性率は 11~15 歳で最高値を示し、高年齢群ほど低い傾向にある。また感染の多くは無症候性でかつ顕微鏡検出限界以下であることを示す。これらの感染者は保健医療施設を受診することはなく、全年齢、全住民を対象とした MDA の必要性を裏付けるものである。総じて原虫陽性率は内陸部で最も高く、小島では低く、大きな島ではそれらの中間であった。

上記の結果を背景に、2016 年 1 月 25 日からビクトリア湖 Ngodhe 島の全住民を対象に以下の投薬計画による集団投薬 (MDA) を開始した。

Treatment schedule (adult doses)

Round 1

Day1: Artequick 2 tablets + primaquine 8 mg

Day2: Artequick 2 tablets

Round 2

Same as above

* Artequick (artemisinin 62.5mg plus piperaquine 375mg)

** 妊娠第 1 期はアルテミシニン、Hb < 7 g/dl ではプリマキン除外

Round 1 に先立ち、HDSS から譲り受けたデータにより世帯および住人登録を行った。実際には登録漏れが散見され、MDA 実施中にそれらを補完する形になった。Ngodhe 島を 4 地域にわけ、臨床検査技師、看護師、village health worker それに学生よりなる MDA チームをそれぞれの地域に配置した。投薬と並行し、Day 1 (初回投薬開始直前)、Day 3 (初回投薬後 48 時間)、Day 8 で採血、ギムザ法、濾紙採血、Hb 値測定に回した。村長、教会、Beach Management Unit、clan elder らの協力を得て、各チームが朝、昼、晩の家庭訪問により、可能な限り多くの住民への投薬を目指した。小学校では、空腹を避けるために投薬直前、全学童へのポーリッジ給食を実施した。また連日、副作用の有無に

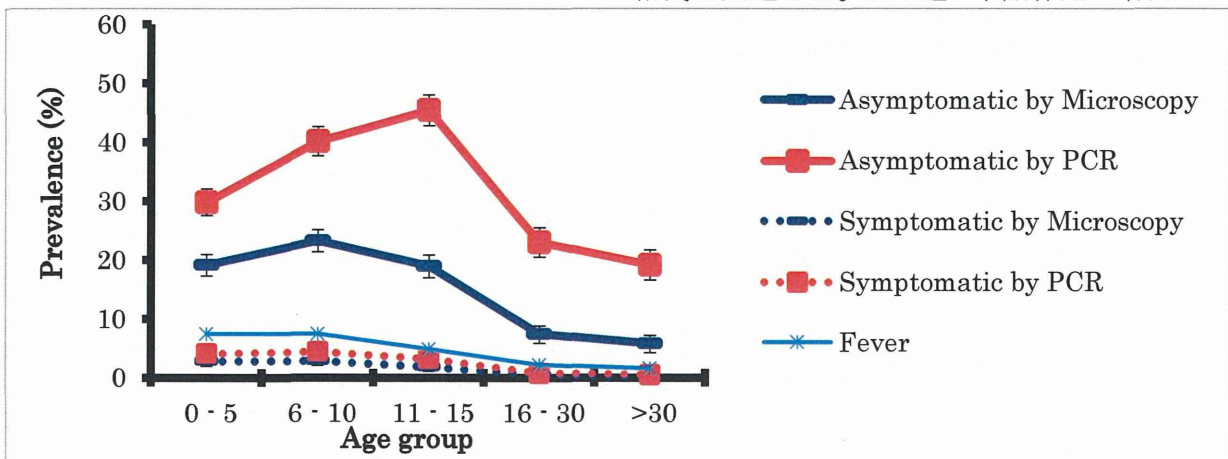


図. 年齢群、検出方法別の原虫陽性率 (ビクトリア湖周辺地域、13,000 人を対象)

について質問し、その結果を記載した。

Ngodhe 島において、Round 1 は 6 日間かけて行われ、計 149 世帯、579 人を登録した。うち 84 名は Round 1 期間中、島外に滞在していた。それらを除いた 495 名中 1 名は所在が確認できなかった。また 35 名は数回の話し合いにもかかわらず服薬を拒否した。残りの 459 名が MDA に参加し、うち 442 名は 2 日間の投薬を完遂した (89.5%)。なおすべての投薬は DOT 方式で行われた。副作用としては、dizziness (6), headache (5), abdominal symptoms (3), nausea (3), weakness (2) などが報告されたが、重篤なものではなかった。また以下の表に示すように G6PD の状態と Hb の変動の間に有意な相関は見られなかった。

	Day1~Day3		合計
	Hb 上昇数	Hb 下降数	
G6PD Normal	39	45	84
G6PD Deficiency	4	2	6
合計	43	47	90

ギムザ法によるマラリア原虫検査の結果を以下の表に示す。陽性はすべて熱帯熱マラリアである。これらすべての濾紙採血サンプル

Day	1	3	5	8
Positive/N	13/459	5/374	0/22	0/360
Prevalence	0.028	0.013	0	0

に対して今後 PCR による検査が行われる。Round 1 期間中、島外にいた住人の多くは本土の学校に寄宿する学生であり、帰島に際して原虫を持ち込む危険性がある。これを阻止するため、上陸点となるビーチに active surveillance を構築すべく BMU と話し合いがもたれている。

Ngodhe 島の対照として、Kibuogi 島においてもマラリア調査が行われた。また両島において、ベクターチームによる世帯ごとの蚊帳調査が実施され、その結果に基づき ITN が各家屋に補てんされた。さらに全家屋に天井式蚊帳を取り付ける計画がある。

Acridine Orange 染色法の改良によるマラリア原虫血症の高感度迅速診断法の開発

1991 年 Kawamoto らにより、DNA と RNA を染め分けることのできる塩基性の蛍光色素 Acridine Orange (AO) を用いた血液塗抹標本の AO 迅速診断法 (以下、Kawamoto-AO 法) が発表されたが、適切な (実効) 濃度範囲が狭いために、核も RNA と同じオレンジ色になる染色過剰や、RNA が染まらない染色不足が発生し、マラリア原虫の同定がしばしば困難になる結果として、原虫感染率が高い場合の判定は容易であるが、感染 negative の判定が難しかった。染色失敗による再染色の問題もあったため、現在はあまり普及していない。

我々は、染色液と染色方法の改良で、確実に negative 判定ができる、改良 AO 法を確立し、ケニア国ビクトリア湖島嶼地域における point-of-care 診断に適用して、失敗なく染色し感染の有無を迅速に安定的に判定できることを示してきた。2015 年には、高価なハロゲンランプ光源に代わる安価な LED 光源を開発し、それを用いて通常の顕微鏡を AO 蛍光観察用に変身させることにより、on-site マラリア全数診断を実施した。評価方法は、WBC100 個を参照としてマラリア原虫数をカウントした。比較のための厚層 Giemsa 法は現地の熟練した複数のマイクロスコピストが後に時間をかけて WBC200 個を参照してカウントした。PCR マラリア診断を行い、これを感染の基本情報に用いた。1018 人の被検者対し改良 AO 法と Giemsa 法のマラリア陽性者はそれぞれ 148 例と 145 例であり差は無かったが、共通の陽性者 94 名で平均パラシテミア (/WBC) は、AO 法のほうが平均として Giemsa 法の 4 倍強の値 (0.043 vs. 0.200) となり、厚層 Giemsa 法では 3/4 が流出または観測できていないと推測された。

一方、AO 陽性者の 93.9% は PCR 診断陽性であったのに対し、Giemsa 陽性者の場合

は 80.7%に留まった。また、f RDT (熱帯熱マラリアのみの RDT[迅速診断テスト])陽性者との一致率も AO 陽性者の 89.9%に対し、Giemsa 陽性者の場合は 74.5%に留まり、AO 診断の方が正確性が高いと推測された。PCR 診断を reference としたとき、AO 法は 139 例 (13.7%) を検出したのに対し、Giemsa 法は 117 例 (11.5%)に留まった。AO 法は、Giemsa 法の半分の視野しかチェックせず、固定乾燥した薄層塗抹標本から診断完了まで 3 分以内という迅速診断でありながら、丁寧に行われた Giemsa 法より正確に感度良く測定することができた。

LED ランプを用いた改良 AO 法は、標準 Giemsa 法の設備があれば、従来の 1/10 程度の安い費用で観測系をセットアップできるランニングコストも安い。また、LED ランプは電池駆動であり、商業電力の不安定なアフリカ地域でも安定的に稼動する。ここで開発した改良 AO 法は、Giemsa 法を超えて標準法になる可能性を秘めている。これで point-of-care 診断をおこなえば、検査せず抗マラリア薬を投与することが減って、抗マラリア薬の濫用を減らし耐性マラリアの出現も遅らせることが期待される。

G6PD 欠損症モニタリング

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 WST の発色は反応系に添加した血液試料由来のヘモグロビン色と似通っており、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 おける中間値の判定も問題となった。この研究では、上記キットに対して光電光度計 (計測可能 OD: 0~3) とドライバスを用い、酵素反応の開始時と終了時の 2 回に吸光度を測定して、酵素反応量を WST の吸光度変化量として表し、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。この簡易迅速な測定法を用い

て 2013 年および 2014 年にケニア国ビクトリア湖島嶼ならびに湖岸地域でのマラリア調査と共に G6PD 活性測定を行なった。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、全測定値を集計すると吸光度差 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、比活性値とした。この比活性値分布の低値域に二つ目のピークがあり、この集団が欠損症と考えられた。陰性の基準は正常人の比活性値の 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 (平山) とともに、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。

G6PD欠損症遺伝子解析

マラリア撲滅プログラムの妥当性を検討するために、熱帯熱マラリア生殖母体に使用する予定のプリマキンによる溶血反応を引き起こしやすいG6PD欠損症患者の遺伝子変異の解析を行った。本研究では2014年のマラリア検診時に行った末梢血のG6PD酵素活性測定法による測定結果を参考に、欠損症患者に特有な遺伝子変異の特徴をこれまでの報告を基に調べた。本疾患遺伝子の変異は

世界の人類集団において一定して観られるものではなく、酵素活性の低下についても遺伝子のアレルにより異なることが知られている。解析は遺伝子の変異が特にアフリカ地域で広く報告されている202G, 376Aの2つのSNPを対象とした。昨年度までのG6PD欠損症男性患者25名正常男性51名の解析に引き続き、本年度は男性2名女性12名の酵素欠損患者、および54名の健常女性住民の検体の解析を行った。

女性の酵素欠損者は7名がG6PD*A-アレル (202A/376G) の、また残りの3名はG6PD*Bアレル (202A/376A) のホモ接合体であった。これに対してG6PD活性の低下した女性では1名はG6PD*A-アレル (202A/376G) であったがもう一名はBあるいはそれ以外のアレルのホモであった。今回の女性の患者の解析からG6PD*A-アレルのホモ接合体が7割で残り3割はBアレルの可能性が高い。またBアレルのホモでも同等に低い酵素活性を呈することも示された。

熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性に関連する縦断的・網羅的遺伝子学的解析

ビクトリア湖島嶼マラリア撲滅に向けた集団治療に関連して熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性関連遺伝子の分子疫学的研究を行ってきた。今回、2012年1-2月、8月及び2013年8月に行ったフィールド調査で収集した血液濾紙サンプルを用いた *pfcr*, *pfmdr1*, *pfmrp1* 及び *K13-propeller* の多型を解析した。

薬剤耐性関連遺伝子 (*pfcr*, *pfmdr1*, *pfmrp1*) の多型解析: 薬剤耐性関連遺伝子の多型解析は現在進行中である。表1に示す結果は解析を終えたサンプルのうち、異なる遺伝子型を持つ混合感染例を除いたものである。また、2008及び2009年のデータは研究代表者らが過去に同じ地域で熱帯熱マラリア原虫の遺伝子解析したときのものである。*pfcr* は2008-9年に比べて2012年は野生株が増えている傾向が見える。今後、解析数を増やして、統計学的優位差を確認したい。

***K13-propeller* 遺伝子の解析:** 近年、アルテミシンに対する耐性原虫の出現・伝播がカンボジアを中心とする東南アジアで報告されていたが、2014年に *K13-propeller* 遺伝子とその耐性に関連していることが Arie らによって報告された。この報告により *K13-propeller* 遺伝子における点変異 (特に C580Y, R539T 及び Y439H) が *in vitro* での parasite survival rate や *in vivo* での parasite clearance rate に相関すること明らかとなった。私達はケニアのビクトリア湖の島々 (Kibugoi, Ngodhe, Takawiri 及び Mfangano 島) 及び湖畔の集落 (Ungoye) で、マラリアの分子疫学調査を2012年以降継続して1年に1-2回行っており、このうち2012-2013年に収集したサンプルの一部を retrospective に解析した。この解析では539サンプルの *K13-propeller* 遺伝子の塩基配列を同定することに成功し、4種類の非同義置換と5種類の同義置換を確認することができた。これらの変異は5か所の調査地域で共有されるものは認められなかったが、Mfangano 島で認められた A578S 変異は同地域で半年の時間的解離を認める複数のサンプルで確認できた。今後、経時的に *K13-propeller* 遺伝子のモニタリングを続けることはケニアでのアルテミシン耐性株の出現を早期に発見し、対策を講ずるために必要であると考えられる。

マラウィでの報告によるとマラリア原虫のクロロキン耐性株はクロロキンの使用を中止し薬剤圧をなくすことにより大幅に減少し、野生株の割合が増えたとある (*J Infect Dis* 2010, M.K.Laufer et al.)。現段階での解析結果では島嶼部で得られた2時点において特にクロロキン耐性と強い関連性が指摘される *pfcr*76T 及び *pfmdr1* 86Y の割合が大幅に低下していた。このことは、対象地域でクロロキンの消費が低下していることを示唆するものかもしれないが、季節 (雨季、乾季) の違いを反映している可能性もあり、今後の継続的な解析が待たれる。

E. 結論

このマラリア撲滅パッケージ実施時の問題点として以下の課題が残されている。

—住民参加をいかに確実にし、MDAの十分なコンプライアンス（90%以上）を確保するか？

—投与薬剤の副作用をいかに監視し、さらに安全性を向上させるか？

—住民の移動による原虫再移入をいかに監視し、マラリア再燃を防ぐか？

—住民主導の持続的な媒介蚊対策をいかに確実にし、残存媒介蚊を抑止できるか？

—顕微鏡検出限界以下の感染をいかに末端地域保健医療施設で診断するか？

—原虫薬剤耐性をいかに監視し出現、拡散を防ぐか？

今後、これらの課題をクリアし、ケニアが新たに掲げる“*Malaria free Kenya*”という国家目標に対し具体的な戦略を提示していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Mita T, Culleton R, Takahashi N, Nakamura M, Tsukahara T, Hunja CW, Win ZZ, Htike WW, Marma AS, Dysoley L, Ndounga M, Dzodzomenyo M, Akhwale WS, Kobayashi J, Uemura H, Kaneko A, Hombhanje F, Ferreira MU, Björkman A, Endo H, Ohashi J. Little polymorphism at the K13 propeller locus in worldwide *Plasmodium falciparum* populations prior to the introduction of artemisinin combination therapies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 in press.
- (2) Watanabe N, Kaneko A, Yamar S, Taleo G, Tanihata T, Lum JK, Larson PS, Shearer NBC. A prescription for sustaining community engagement in malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu: an application of Health

Empowerment Theory. *Malar J*. 2015 Jul 31;14:291. doi: 10.1186/s12936-015-0779-z.

- (3) Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. *Parasitol Int*. 2015 Jun;64(3):304-8. doi: 10.1016/j.parint.2014.09.006.
2. 学会発表
- (1) 熱帯アフリカのマラリア根絶は可能か—集団投薬の役割. 金子 明. 第56回日本熱帯医学会大会. 2015年12月5日(大阪).
- (2) LED光源を用いた、改良AO染色法によるマラリア迅速診断. 木村 政継, 寺本 勲, チムW チャン, 川本 文彦, 朝田 良子, 金子 明. 第85回寄生虫学会大会. 2016年3月20日(宮崎).
- (3) Mass Drug administration targets high prevalence of asymptomatic and submicroscopic malaria infections in the Lake Victoria region of Kenya. 金子 明, Md Idris Zulkarnain, Chan Chim W, 五十棲 理恵, 寺本 勲, 木村 政継, Kongere James, Gitaka Jesse, Logedi John, Omar Ahmedeen. 第85回寄生虫学会大会. 2016年3月20日(宮崎)

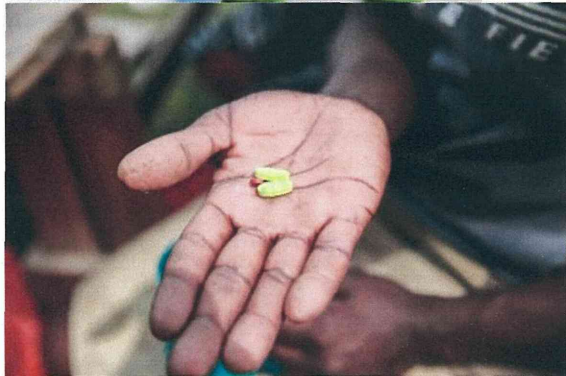
H. 知的財産権の出願・登録状況

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

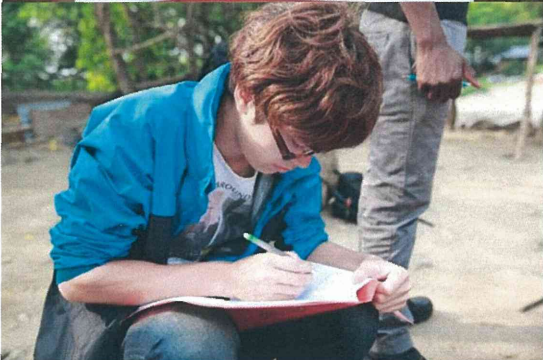
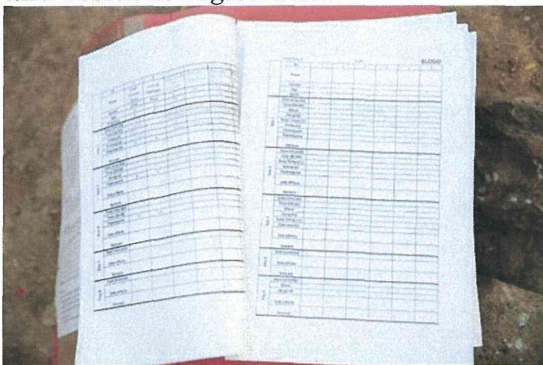
Mass drug administration on Ngodhe Island in Lake Victoria, January – March 2016: Community engagement meeting



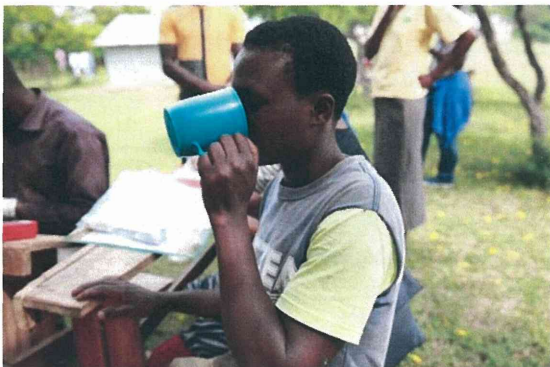
MDA drugs Artequick and primaquine tablets: feeding school children before drug administration



MDA operation: Health and Demographic Surveillance System (HDSS), household and resident registration



MDA operation: four mobile drug distribution teams: house-to-house visits





Malaria elimination package: insecticide-treated bed nets distribution and case surveillance for arrivals in the main beach on Ngodhe island



厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題解決推進のための行政施策に関する研究事業）
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 WST の発色は反応系に添加した血液試料由来のヘモグロビン色と似通っており、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 おける中間値の判定も問題となった。この研究では、上記キットに対して光電光度計（計測可能 OD: 0~3）とドライバスを用い、酵素反応の開始時と終了時の 2 回に吸光度を測定して、酵素反応量を WST の吸光度変化量として表し、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。この簡易迅速な測定法を用いて 2013 年および 2014 年にケニア国ビクトリア湖島嶼ならびに湖岸地域でのマラリア調査と共に G6PD 活性測定を行なった。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、全測定値を集計すると吸光度差 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、比活性値とした。この比活性値分布の低値域に二つ目のピークがあり、この集団が欠損症と考えられた。陰性の基準は正常人の比活性値の 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（平山）とともに、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、蚊による伝播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容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、流行地での治療活動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て正確、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)を使用した。肉眼判定を補完する測定器として光電光度計PD-303S (APEL社)、反応系を安定させる機器として恒温槽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の数だけ準備した。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。

2) 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, 9W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:

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% IGE PAL CA630水溶液を1ml (終濃度0.05%) 加えた液を反応液とし、蓋付きディスポーザブル角形キュベットに1mlずつ分注して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 (約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°Cの恒温反応槽に移してタイマーを作動させた。反応時間は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 (Δ OD) として求めた。

3) マラリア調査地区での住民のG6PD活性測定:

3)-1. 調査地区を図1.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年度被検査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 Δ OD値(吸光度差値)をプロットし、図2a, 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、 Δ 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、 Δ 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3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。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4に示し、さらにG6PD活性値を1st OD値で補正し図5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 $\times 3$ (3σ :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、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2a, bに示している。2013年度の測定では2nd OD値(=1st OD+ Δ 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、特に低活性域の測定値(低 Δ 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4)。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、血液採取料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5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3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6に示した。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。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。男性の欠損者率はNgodhe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。

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、良好な結果が得られることが判明した。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°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 1.9%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

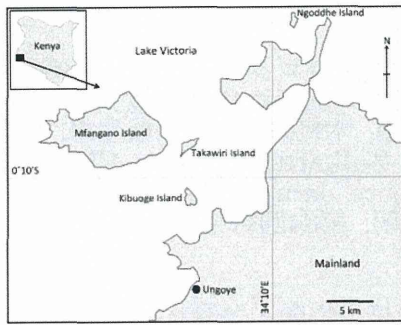


図 1. ケニア共和国調査地地図

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

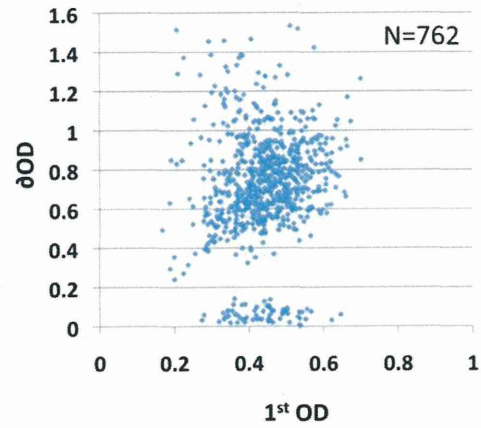


図 2-b. 光電光度計の測定範囲0~3による測定結果(2014年)

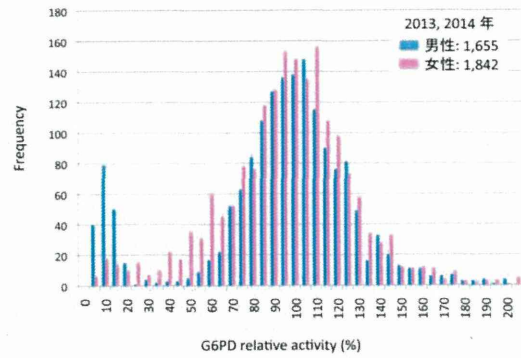


図 3. G6PD活性分布 (男女別)

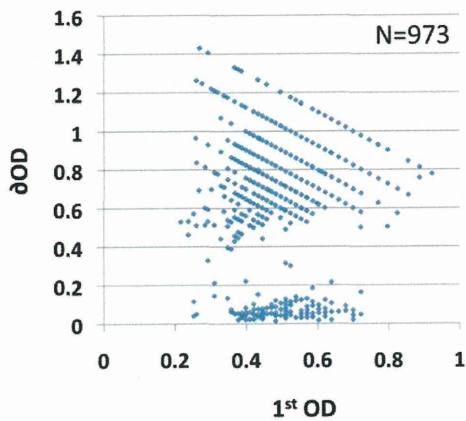


図 2-a. 光電光度計の測定範囲0~2による測定結果(2013年)

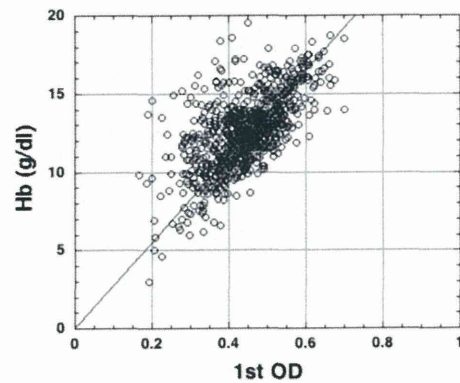


図 4. G6PD測定における1st OD値とHb(HemoCue)値の関連

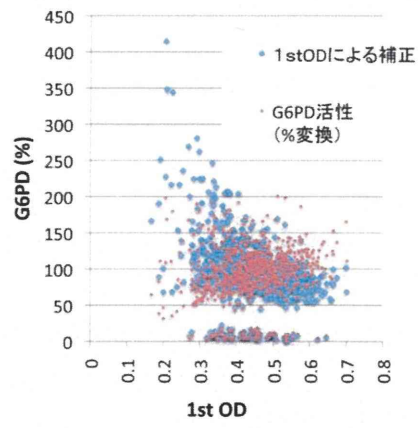


図 5. G6PD活性の1st OD値による補正は必要か？(2014年データ)

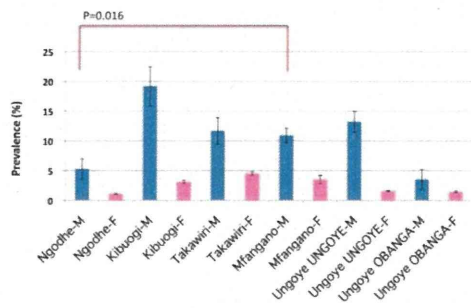


図 6. 調査地域別G6PD欠損者の割合

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題解決推進のための行政施策に関する研究事業）

Acridine Orange 染色法の改良によるマラリア原虫血症の高感度迅速診断法の開発

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 RI 実験施設 特任教授

研究要旨

Acridine Orange 染色法の改良によるマラリア原虫血症の高感度迅速診断法の開発：

1991年 Kawamoto らにより、DNA と RNA を染め分けることのできる塩基性の蛍光色素 Acridine Orange (AO) を用いた血液塗抹標本の AO 迅速診断法（以下、Kawamoto-AO 法）が発表されたが、適切な（実効）濃度範囲が狭いために、核も RNA と同じオレンジ色になる染色過剰や、RNA が染まらない染色不足が発生し、マラリア原虫の同定がしばしば困難になる結果として、原虫感染率が高い場合の判定は容易であるが、感染 negative の判定が難しかった。染色失敗による再染色の問題もあったため、現在はあまり普及していない。

我々は、染色液と染色方法の改良で、確実に negative 判定ができる、改良 AO 法を確立し、ケニア国ビクトリア湖島嶼地域における point-of-care 診断に適用して、失敗なく染色し感染の有無を迅速に安定的に判定できることを示してきた。2015 年には、高価なハロゲンランプ光源に代わる安価な LED 光源を開発し、それを用いて通常の顕微鏡を AO 蛍光観察用に変身させることにより、on-site マラリア全数診断を実施した。評価方法は、WBC100 個を参照としてマラリア原虫数をカウントした。比較のための厚層 Giemsa 法は現地の熟練した複数のマイクロスコピストが後に時間をかけて WBC200 個を参照してカウントした。PCR マラリア診断を行い、これを感染の基本情報に用いた。1018 人の被検者対し改良 AO 法と Giemsa 法のマラリア陽性者はそれぞれ 148 例と 145 例であり差は無かったが、共通の陽性者 94 名で平均パラシテミア (/WBC) は、AO 法のほうが平均として Giemsa 法の 4 倍強の値 (0.043 vs. 0.200) となり、厚層 Giemsa 法では 3/4 が流出または観測できていないと推測された。

一方、AO 陽性者の 93.9% は PCR 診断陽性であったのに対し、Giemsa 陽性者の場合は 80.7% に留まった。また、f RDT (熱帯熱マラリアのみの RDT [迅速診断テスト]) 陽性者との一致率も AO 陽性者の 89.9% に対し、Giemsa 陽性者の場合は 74.5% に留まり、AO 診断の方が正確性が高いと推測された。PCR 診断を reference としたとき、AO 法は 139 例 (13.7%) を検出したのに対し、Giemsa 法は 117 例 (11.5%) に留まった。AO 法は、Giemsa 法の半分の視野しかチェックせず、固定乾燥した薄層塗抹標本から診断完了まで 3 分以内という迅速診断でありながら、丁寧に行われた Giemsa 法より正確に感度良く測定することができた。

LED ランプを用いた改良 AO 法は、標準 Giemsa 法の設備があれば、従来の 1/10 程度の安い費用で観測系をセットアップできランニングコストも安い。また、LED ランプは電池駆動であり、商業電力の不安定なアフリカ地域でも安定的に稼動する。ここで開発した改良 AO 法は、Giemsa 法を超えて標準法になる可能性を秘めている。これで point-of-care 診断をおこなえば、検査せず抗マラリア薬を投与することが減って、抗マラリア薬の濫用を減らし耐性マラリアの出現も遅らせることが期待され

る。

A. 研究目的

Acridine Orange (AO) は一色素で DNA と RNA を染め分けることのできる塩基性の蛍光色素である (図 1 参照)。1991 年、川本 (F. Kawamoto) らは薄層血液塗抹標本を高濃度の AO で染め、日光またはハロゲンランプを光源として、低倍率 (400 倍) でマラリア原虫を検出する AO 迅速染色法 (以下、Kawamoto-AO 法) を開発した。迅速で高感度であることをセールスポイントとして、東南アジアやアフリカ (タンザニア) などに、専用のハロゲンランプと顕微鏡が配布され、その普及がはかられてきたが、現在ではあまり使われていない。日本国内においてすら、これを日常的に用いている大学や研究機関は少なくなっているのが現状である。

このように使われなくなってきたのには専用の装置が必要なほかに種々の理由が考えられる。Kawamoto-AO 法では、適切な染色領域を探し出す必要があり、初心者にはこれがかなり手間であった。適切な染色領域ではマラリア原虫の核が黄色に染まり、原虫細胞質がオレンジに染まって、マラリア原虫の独特の形が蛍光観察され原虫感染率が分かるが、実際操作で困った点のひとつは、染色操作の微妙な違いで、全体が過剰に染色 (原虫や白血球が全てオレンジに染まる) されてしまうことがしばしば起こったことである。この場合再染色の必要があるが、同じ場所は使えないために、予備の薄層標本が必要になる。また、染色ムラが発生し、ある領域では原虫が良く見えるがすぐ近くでは全く原虫が観察されないなどと染色ムラがあった。これらの結果として、マラリアを疑われる患者を

調べて、感染無しと思われる場合に、その人が確実にマラリアネガティブであるか確信が持てなかった。このことが最大の欠点であり、フィールドでのマスキングの際には有効かもしれないが、マラリアの疑いでまれにやってくる日本人の患者に対して、検査の第一選択とはなりにくかった。これらが使用が廃れてきた要因であるように思われる。

我々は、AO 染色液と染色法を工夫して、マラリアネガティブと判定する場合に、確実にネガティブであると判定できるよう改善した。さらに、高価なハロゲンランプが停電などでしばしばトラブルを引き起こすことに鑑み、これを電池駆動の安価なランプで置き換えることに成功した。この設備と方法をフィールドにおける on-site マスキングに適用し、Giemsa 法と比較した。

B. 研究方法

B-1 AO 染色液組成の検討

AO の化学的性質や、過去の血液標本の染色応用例などを調べ、AO 染色液のバッファ組成や pH、AO 濃度などをより適切にする条件を探す。これと実験との組み合わせにより、従来のものより原虫判別能力の高い AO 染色液組成を検討する。

B-2 フィールド on-site 調査

方法等の事前の検討は、正常末梢血やマウスマラリア感染マウス末梢血を用いてある程度実施できるが、実際にマラリア流行地域の患者血液サンプルで調べるのとでは大きな違いがある。そこで、ケニア国、ビクトリア湖島嶼地域でのフ