

フィールド調査において、他の検査と並行して、熱帯熱マラリア感染の有無を、その場で調べることにより、我々の方法（改良AO法）の有効性を検討する。

### B-3 スライドの準備

患者からフィンガープリックで採取した5 $\mu$ Lの血液でスライドガラス上に薄層塗抹標本を作る。このとき、赤血球が互いに重ならないよう強めに引き、長めのスミアーを作るようにする。

薄層塗抹標本は、風乾した後、100%エタノールに浸して固定する（場合によりスプレーで吹き付ける方式もとった）。固定操作には通常メタノールが用いられるが、エタノールは毒性が低いほかに、メタノールよりも固定が弱いエタノールのほうがAO染色の際には良い傾向がある。

### B-4 AO染色液

AO粉末はあらかじめ、0.1%（1000 ppm）の濃度で純水に溶解し、これをフィルター（0.33 $\mu$ m）でろ過して高濃度ストック液とする。

この液を、トリスバッファ（5 mM EDTA, 20mM Tris pH 6.8）で10倍希釈して、AO染色のWorking Solution（100 ppm AO, pH 6.8）とする。

AO染色液が酵母などで汚染すると検査の大きな障害となるので、トリスバッファ及びEDTAの抗菌的性質は重要である。EDTAは、また、RNAの高次構造をほぐす働きがあるので、細胞質のRNAの染まりも良くなる。

### B-5 改良AO 染色法

図2に概要を示す。

① 机上の吸水紙の上に置いたカバーガラス（18 $\times$ 18 mm）に、15 $\mu$ LのAO染色液をスポットする。

② 薄層塗抹標本は裏返しにして上から

軽くAO染色液のスポットに触れさせる。その位置は、薄層塗抹の先端部が良い。

-----表面張力でAO染色液はカバーガラス全体に広がるが、このときAOは組織に少しずつ吸収されて広がり瞬時にAO濃度勾配がスミア（塗抹）の先端部からスミア開始部の方向にできると考えられる。

④ Option：ここで、図に示すような斜めのポジションで、1分ほど放置する場合もある。

-----その目的は、1分ほどの間は染色が進むが、その間スミア開始部の方向にわずかにAO液が移動し、AO濃度勾配がよりできやすくなるからと考えている。

⑤ スライドを上向きにし、顕微鏡観察に入る。ハロゲン光源の専用顕微鏡を用いるか、通常の双眼顕微鏡にLEDランプ光源を装着したものを使った。

AOの実質濃度はスポット部（スミアの先端部）で高く、スミア開始部の方向に低くなっているため、まず倍率100倍で、スポット部からスミア開始部の方向に視野を横方向に移動させながら白血球の染まり具合を見て行くと、はじめ白血球はオレンジ色に見えるだけであるが、白血球の核が黄色、細胞質がオレンジ色に見える領域に行き当たる。

その場所で、倍率を倍率400倍に上げ、今度は視野を上下に移動させて、白血球が染め分けられている視野で白血球周辺を調べる。原虫がいれば、そこで核と細胞質が染め分けられたマラリア原虫が見つかる（図3（a）参照）。

上下に視野を移動させつつ、少しずつスミア開始部方向にずらして観察を続けると、白血球の核だけが黄色く染まっている領域に次第に達する。その付近では、白血球は色素不足であっても、非常に小さいマラリア原虫は局所的に色素量が

足りて原虫がきれいに2色に染め分けられていることが多い。

——白血球がきれいに染め分けられている領域はスライドガラス上で5 mm程度の幅があり、その部分で染め分けられている白血球の周りを調べ、白血球200個あたりのマラリア原虫数を調べることができる。その場合は、図2 (b)のように視野を移動させる。

この方法で染色がうまくいかない理由のひとつに、薄層スメアが濃過ぎる場合がある。その場合、積み重なった赤血球などに吸収されて、AOが原虫に集まりにくくなるために、原虫RNAがうまく染まらなくなったり (図3 (b) 参照)、原虫が全く染色されない場合も起こりうるので注意が必要である。

#### B-6 蛍光光源のLED光源化

Kawamoto-AO法は、蛍光光源として水銀ランプでなくタングステンハロゲンランプを用いて普通の光学顕微鏡システムを蛍光顕微鏡として使用する方式である。ハロゲンランプをLED光源で置き換えるには、光源にAO励起波長成分が高強度で含まれるものを用い、AO発光波長と重なる成分はLow pass 干渉フィルターで取り除く必要がある。一方、顕微鏡の鏡筒内には励起光を完全に除去するためのHigh passフィルターが必要となる。

#### B-7 LED光源を用いたon-site AO法と改良AO法によるon-siteマラリア全数検査

B-5の方法を用い、400倍観察のとき図2 (b)のように、適正染色された帯状の領域 (幅~5 mm) の端でUターンを繰り返しながら、スライドの横縁の方へ少しずつ移動する方法をとった。顕微鏡観察中は白血球 (WBC) をカウントしながらマラリア原虫を数え、100 WBCあるいは原虫

5-10個をカウントしたら完了とした。通常は200 WBCまでカウントするところであるが、時間がかかり過ぎて全数検査をすることができなくなるためにスピード重視として100 WBCとした。on-site では、独立に熱帯熱マラリア原虫抗原のみをターゲットとするRDT (迅速診断テスト [Paracheck] : 以下、f RDTと略記) も行った。

比較のための厚層Giemsa法は後日、現地の熟練した複数のマイクロスコピストが時間をかけてWBC200個に対しカウントした。

#### B-8 PCR 診断

また、また全サンプルについてマラリア原虫ミトコンドリアDNAのcox III遺伝子をターゲットとする、この研究で開発した高感度nestedPCR法 (Isozumi et. al, Parasitol. Int. 64, 2015, 304) でPCR診断を行った。

#### 研究結果

##### C-1 AO染色液pHの検討

AO-Kawamoto法では、細胞質のオレンジ色が薄い傾向がある。一方、文献的にはpHが低いほど、AOはスタッキングしやすくなりオレンジ色が強く出る。

そこで、細胞質のオレンジ色を強くする目的で、pH4.0, pH5.2 (以上酢酸バッファ)、およびpH6.8, pH8.0, pH8.8 (以上トリスバッファ) の5通りのバッファで調べたところ、pH8.8ではオレンジの発色が少なく、一方、pH4では核も薄いオレンジ色になった (データ略)。一方、pH6.8では黄色とオレンジのバランスが良かった。pH6.8はトリスバッファとして最低のpHに近く、pH6.8でも十分赤色が発色していたので、これをAOバッファのpHとした。

##### C-2 Giemsa法との定性的比較

2013年8月13日のビクトリア湖沿岸地域、Ungoyeでの調査でA Oの検出感度を他の方法と比較した。

その日は315人の来訪者中、脾臓肥大と判定された108人全員についてA O観察をon-siteで行った。on-siteでは同時にf RDTも行った。後に、厚層塗抹Giemsa染色法とPCR法(cox III法)による診断結果が得られたのでそれらも加えて比較した(表1)。

PCRでは108人中、3例だけが陰性であったが、この3例は他の3つの検出系でも全て陰性であった。そこで、PCR陽性の105個を真の陽性とする、擬陰性率は、RDT:14.3%(15/105)、A O法:26.7%(28/105)、厚層Giemsa法:39.0%(41/105)となり、A O法はスタンダードである厚層Giemsa染色法より偽陰性率がかなり低く、これは改良A O法が厚層Giemsa法より検出感度が高いことを示す。これまでのA O-Kawamoto法ではこれほどの良い結果は報告されていない。

なお、このA O観察は、染色操作から顕微鏡観察、記録までを、一人が5時間ほどで行ったものである。

### C-3 LED光源の製作

LED光源は、論文(Kawamoto F, Lancet)を参考に、市販の4.5V LED懐中電灯のランプ部分を青色LED(465-475 nm, 3W)で置き換え、490nmの干渉フィルターを光源前面に内蔵させた。初めは、従来のハロゲンランプ光源の方式と同様に、反射鏡で励起光を反射して試料を照らす方式としたが、反射鏡の調節が微妙であったので、試料直下据え置き型とすることにした。青色LEDを内蔵した懐中電灯をおよそ1/2の長さになるよう切断し、単3電池3個使用のスイッチ付き電池ボックスを接続して電源とした。電池分離方式なので大容量化は可能である。総使用時間は電池の回復を見込んで50-100時間程度と考

えている。この直下据え置き型方式の方が反射鏡を必要とせず、適合する顕微鏡が多い。スタンドを取り付けると反射鏡方式にも適合できる。

一方、顕微鏡の鏡筒内にはゼラチン製の520 nmハイパスフィルター(短波長カットフィルター)をはさみで適切な大きさに切って挿入した。予備的に正常血液の薄層塗抹標本を染色したところ、これまでの装置ではハロゲンランプ光源が弱いために、単眼の顕微鏡でしか原虫が観察できなかったが、複眼の顕微鏡でも鮮明にDNA、RNAの2色染め分けが確認できた。全般に明るいだけでなく、これまで弱かったRNAの赤色発色が強くなった。また、これまでは蛍光試料を入れなければ、画面が真っ暗になりフォーカシング調整ができなかったが、作成したものでは、LED光源が弱いながら見え、試料無しにフォーカシング調整が可能となった。これは本来の蛍光に対してノイズとなる可能性があるが、実際に使用してみると差し支えないレベルであったので、むしろ好ましい性質と考えている。

### C-4 LED光源を用いたon-site A O法とGiemsa法の定量的比較試験

複数のLED光源と現地調達した顕微鏡を使って、on-site A O法とGiemsa法の本格的な比較試験ができるようになった。

2015年8月6日-17日にかけて、ケニアビクトリア湖島嶼地域(Mfangano, Ngodhe, and Lemba islands)とその周辺(Ungoye district)で臨時調査所に集まった1018人を対象として、改良A O法によるon-siteマラリア全数検査を実施した。1018検体に10人日のマンパワーを使ったので、1日検査者一人あたりおよそ100検体をA O診断したことになる。診断に要する平均所要時間は、1検体あたり染色の手間の時間を含んで3分程度であったが、negativeが多いと長くなった。

全1018人のうち、A0陽性は148人、Giemsa陽性は145人と拮抗していた。このうち94人のみがA0、Giemsa両方とも陽性であった。それぞれの患者に対して、Giemsaパラシテミア (/WBC) に対してA0のパラシテミアをプロットすると、図4のようになった。すなわち、共陽性の94検体では、A0パラシテミアのほうがより値が大きい傾向があり、これら94検体について平均パラシテミアを計算すると、A0法平均値がGiemsa法のその4倍強の値 (0.2/WBC v. s. 0.043/WBC) となり、厚層Giemsa法ではA0法に比べておよそ3/4の原虫が流出等により観測できていないと推測された。

また、A0陰性でGiemsaの方だけ陽性の検体の最高パラシテミアは8.5% (= 8.5/100 WBC)であったのに対し、Giemsa陰性でA0陽性の検体のA0パラシテミアは最高560%と高く、8.5%以上に30検体もあった。これらはA0法はGiemsa法よりも見落としが少なくと解釈できる。

148検体のA0陽性のうち、89.9% (133個) はfRDT陽性であり、93.9% (139個) はPCR陽性であった。一方、145検体のGiemsa陽性のうちでは、fRDT陽性率は74.5% (108個) でPCR陽性率も80.7% (117個) となった。これはA0法の方がGiemsa法より正確性で優ることを示している。

PCR診断を確定診断とすると、A0法は19% (22/117) 多くの陽性を検出した。結論的には、改良A0診断は、迅速に診断できるだけでなく、Giemsa法よりも見落としが少なく、より正確でGiemsa法より感度良く診断できた。

ところで、「A0法は流行度が下がると感度が下がる」という報告が過去になされているので、その検討のために、流行度の大小で変わるかどうかを検討した。1018検体は流行度によって明確に2つのグループに分かれ、f RDT陽性率高い地域

は、Ugina (174人:陽性率30.5%)、Nyakweri (217人: 34.1%)、及びUngoye (153人: 42.2%)で、一方、流行度の低い地域は、Remba島 (141人: 10.6%)、Kibuogi島 (182人: 12.1%) 及びNgodhe島 (169人: 8.9%) であった。流行度が高い地域は、人口3万人と言われ大きな島であるMfangano島と大陸側の地域 (Ungoye) で、流行度が低いのは、小さな島々であった。そこで1018検体を流行度によって2つに分け、より詳細な比較をおこなった (表2)。

すると、高度流行地域においてはPCR診断を確定診断とする場合において、A0法はGiemsa法より2割以上感度が高いが低流行地域では、A0法はGiemsa法より僅かに感度が劣っていた。

流行度が低い地域でon-site スクリーニングを行うと、判定に長時間を要する陰性のケースが多くなって、検査の負担が増えるからであることが考えられるが、そのほかに、流行度が低い地域ではパラシテミアが低い場合が多いために、100 WBCしか参照しない方式では、200 WBCを参照するGiemsa法に劣ったのかもしれない。それを調べる目的で、1018検体のうちf RDT陰性の782検体について、陽性のものを表にしたのが表3である。

低レベル熱帯熱マラリア (*P. falciparum*) 感染はf RDT陰性となる可能性がある。Giemsa法では26個の (低レベルの) 熱帯熱asexualステージが観察されたが、PCRでも確認されたものはただ4個にすぎなかった。PCRによる確認は完璧ではないが、正確性が表現されるので、低レベル熱帯熱マラリア感染の検出にGiemsa法は誤りが多いと思われる。一方、熱帯熱生殖母体を発見した場合はGiemsa法の陽性判定は正確であった。そして、検出した熱帯熱感染数でGiemsa法が優位になったほとんどはこの熱帯熱生殖母体を見出したことによるものであることが

分かった

熱帯熱以外の種の感染は、PCRで確認した数でみると、AO法が5個見出したのに対し、Giemsa法は3個しか見出せず、AO法のほうが優っていた。

即ち、AO法のほうが劣っていた理由は、ガマトサイト発見がGiemsa法の方が多かったからであり、これはAO法では参照する白血球の数がGiemsa法の半分ということの自然な結果と考えられ、200 WBCを参照すればGiemsa法と同程度以上の結果が低流行地においても期待できると考えられる。

#### D. 考察

AOは目的に応じてさまざまな濃度と pH で細胞染色に利用されてきた。その範囲は、濃度では、6 ppm から 1000 ppm に及び、pH は中性領域以外に低い pH (pH3.5) も使われている。染色時間に関しては1-2分間で済ます迅速染色から30分から数時間を要する緩慢染色まで幅広い。

それらのなかでも、比較的濃度の高いAOを用いる迅速染色として、Lauerら (J Clin Microbiol. 1981 Aug; 14(2): 201-205) は細菌汚染を調べる目的で、100 ppm, pH3.5のAO染色液を用い、グラム染色よりも感度良く微生物を検出したと報告している。彼らは、メタノール固定した血液標本を2分間つけた (flooded) 後、流水で洗って乾燥させ観察した。やや高めの pH (pH5) で、この方法による薄層塗抹標本の染色を試みたが、白血球はすべてオレンジに染まりマラリア原虫の良好な観察もできなかった。

また、Hayashiらの末梢血液の超生体染色 (supravital staining) では、1000 ppmの高濃度AO液をスライドに前もって塗って乾燥させておき、そのスライドに血液を1滴垂らしカバーガラスを当

てて、蛍光顕微鏡観察に持ち込むという方法がとられた (Mutation Research, 245 (1990) 245-249)。彼らの総括 (Mutation Res. 278 83-98, 1992) によると、この方法は PRBC の観察などに非常に便利であるが、欠点として次の2点を挙げている。

ひとつはAOを塗布したスライドは長持ちしないので要時調製しなければならないこと、もうひとつは染色ムラのために、観察に良い領域を捜す必要があることである。

我々の改良AO法では、2色に染め分けられた白血球の領域が帯状に現れ、その領域内で調べるので観察に良い領域を捜すのは容易である。また、蛍光の退色で保存性がないという問題は、カバーガラスをはずし、未染色領域を再染色するという方法をすでに確立している。

改良AO法はある程度のマラリア原虫がいればほとんど直ちに発見できるので、マラリア感染者が高率で存在する場合は、1検体あたりの検査速度が相対的にスピードアップされ検出が容易になる、染色から結果まで2-3分以内という迅速性は大きな利点である。

従来のハロゲンランプ光源から、光源をLEDランプに変える取り組みは、試行錯誤を繰り返して、最終的に元のハロゲンランプより、マラリア原虫が鮮やかに観察できるようになった。流行地には、小さなLEDランプ光源を持参して現地でGiemsa観察用の顕微鏡を一時的に借用してAO観察を行うことができるようになり、その効果を実証するために、ケニアビクトリア湖島嶼地域のフィールド調査のなかで改良AO診断を実施した。その結果は、流行度が高い地域で特にAO法がGiemsa法に対して優れているという結果になった。流行度が低い場合は、AO法の検出感度がGiemsa法より僅かに低かったが、これはGiemsa法の200 WBC参

照でなく100 WBC参照としたための結果であると考えられる。なぜなら、その差のほとんどは1-2個のガメトサイトだけが発見された場合であり、ガメトサイトはAOでもその特徴的形態から容易に同定できるので、200 WBC参照で丁寧に観察すれば同程度には発見できると考えられるからである。

一方、Giemsa法で目立ったのは、偽陽性の多さである。熟練したマイクロスコピストですらかなり誤診があるように見受けられる。それに対しAO法は正確であり、また原虫の判別がはるかに容易である。AO法は、もともとマラリア原虫が暗い視野のなかで明瞭に区別されて見え、低倍率（400倍）で観察可能という特長があった。このLEDランプを用いた改良AO法は、Giemsa法に代わる方法になる可能性があると考ええる。

#### E. 結論

我々は、Kawamotoらが開発したマラリア原虫のAO迅速染色法の細部を再検討することにより、迅速高感度を保持しつつ、安定的にマラリア原虫の存在／非存在を決定できるよう改良した。更に、ハロゲンランプを安価なLEDランプで置き換えて、電源が不安定なところでも安定的に且つ安価にAO染色によるマラリア診断が可能であることを示した。

これを用いれば、厚層Giemsa法より高い感度で原虫感染率を決定できる。アフリカ現地で診療にあるいはMDA（集団投薬治療）後のマラリア診断等で、検査手段として利用できると思われる。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
作成中

2. 学会発表  
2015年3月21日第84回日本寄生虫学

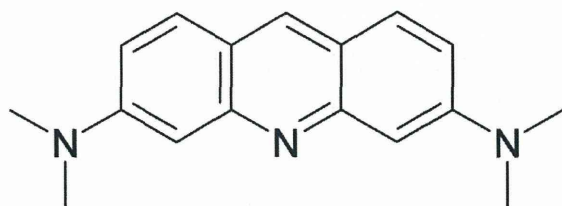
会大会、2015年12月6日第56回日本熱帯医学会大会及び2016年3月20日第85回日本寄生虫学会大会で発表

#### 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 Acridine Orange 染色の原理

■ AO (Acridine Orange) の分子構造

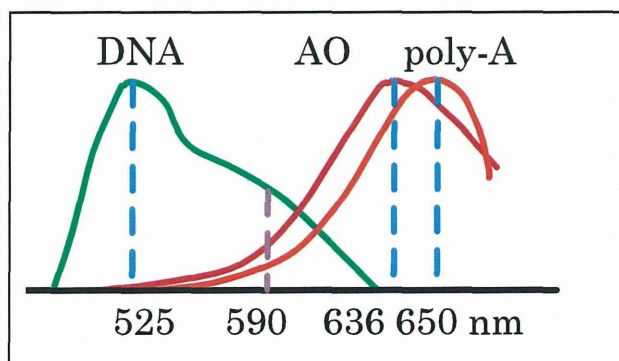


DNA、RNAと結合性の塩基性蛍光色素である。

■ DNA、RNAとの結合様式と蛍光波長

- ① RNAに対しては、D/P比が1:1になるほどにたくさんのAOが結合し、AO分子間でスタッキングを起こし、波長の長い赤色の蛍光を発する。
- ② dsDNA に対しては、2本鎖の間にインターカーレートし、各AO分子が、緑(525nm)～黄色(590nm)の蛍光を出す。インターカーレートはD/P比(染料 Dye と核酸・リン酸基 Phosphate の比)が約1/6で飽和する。
- ③ dsDNA はしかし、高濃度のAOの場合には、RNAと同様、D/P比が1:1になるほどにたくさんのAOが結合し赤色蛍光へシフトする。その理由としては、スタッキングとAOによる2本鎖解離の二つの理論がある。

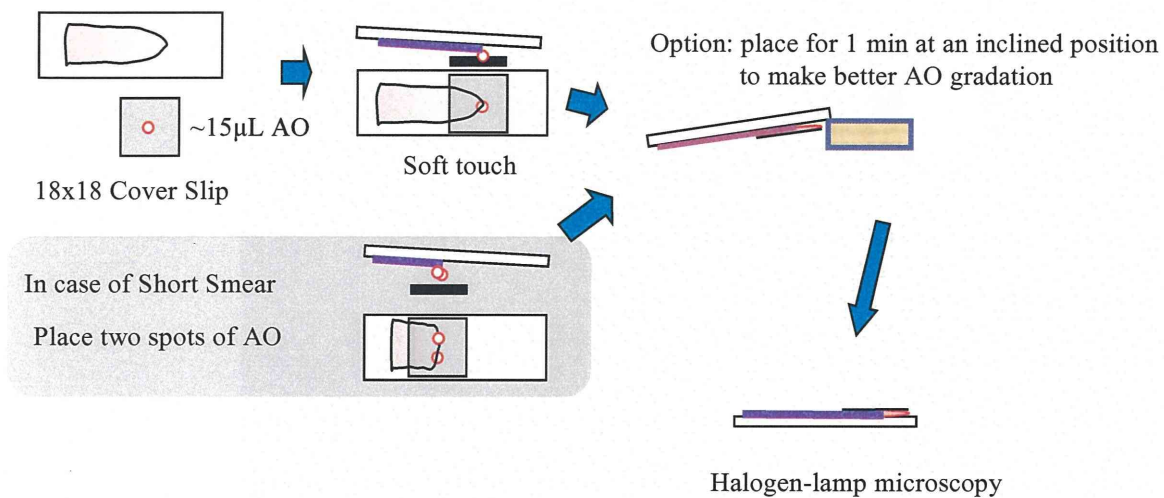
■ 適切なAO濃度の場合の、AOの蛍光スペクトル



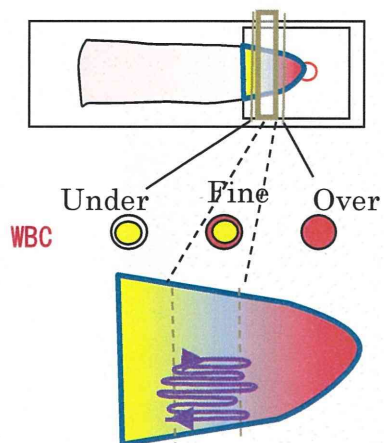
高濃度のAOでDNAが染まると、RNAのような蛍光スペクトルになる

図2 改良 AO 染色法の Scheme

(a) Staining process



(b) Observing

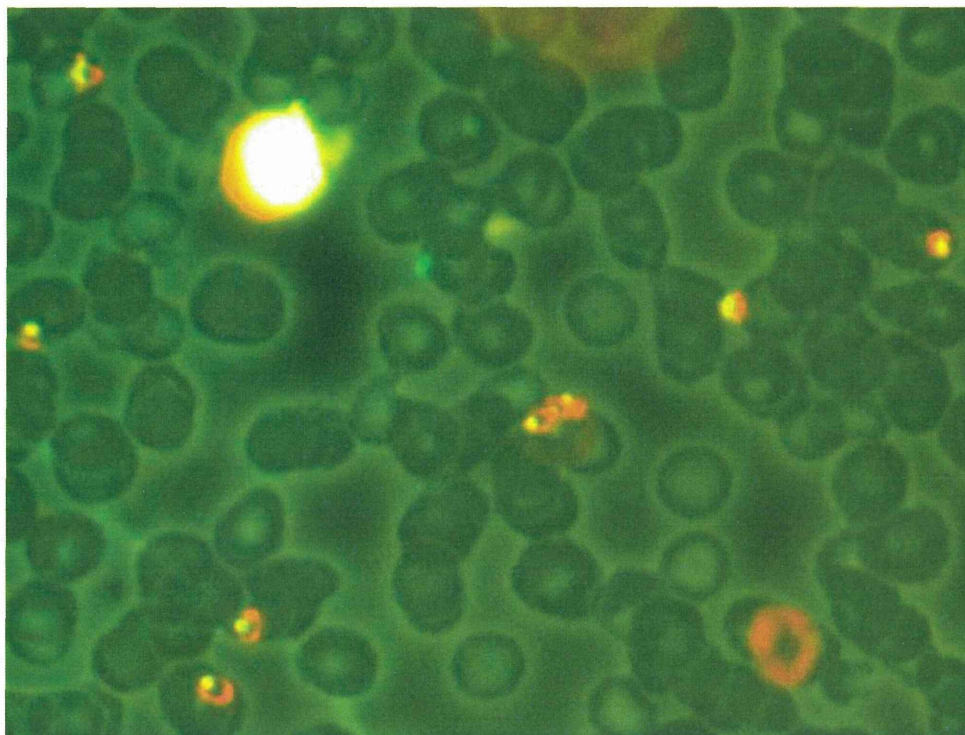


The AO droplet placed near the center of cover slip is touched at the position indicated (○). The meandering line indicated was enough to count 100 WBCs while counting parasites.



### 図3 A0 染色例

(a) 適切に染色されている場合：白血球（左上）が2色に染め分けられている周辺を観察する。8この原虫が明瞭に識別できる。右下は網状赤血球。



(b) 不適切な染色例：恐らく赤血球が積み重なっている影響で、マラリア原虫は核しか染まっていない。今の場合には多数あるためマラリア原虫と判別できたが、通常は判別不能。

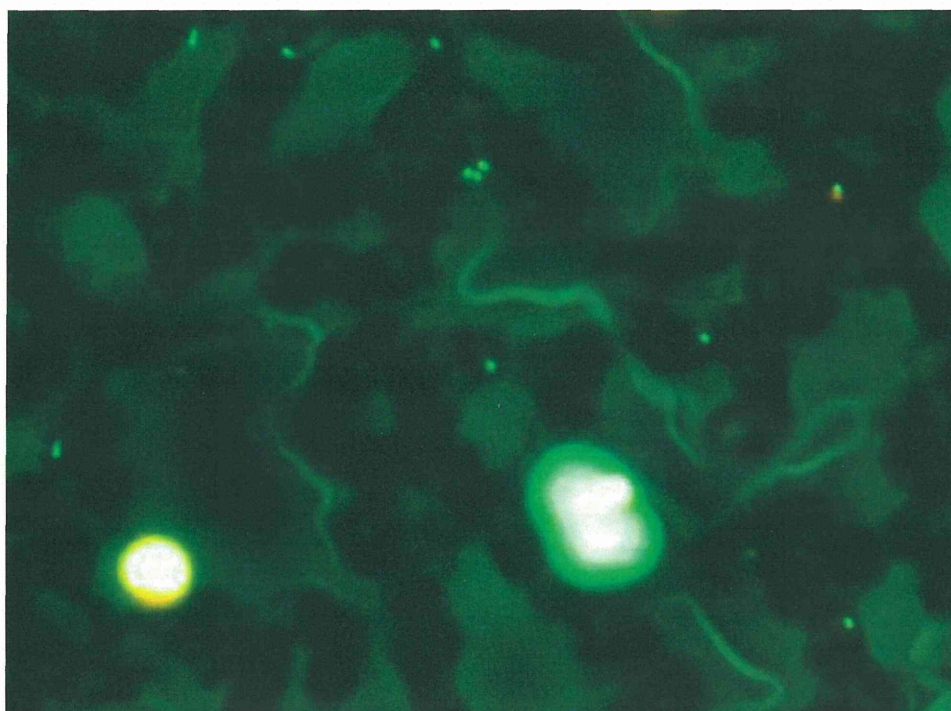
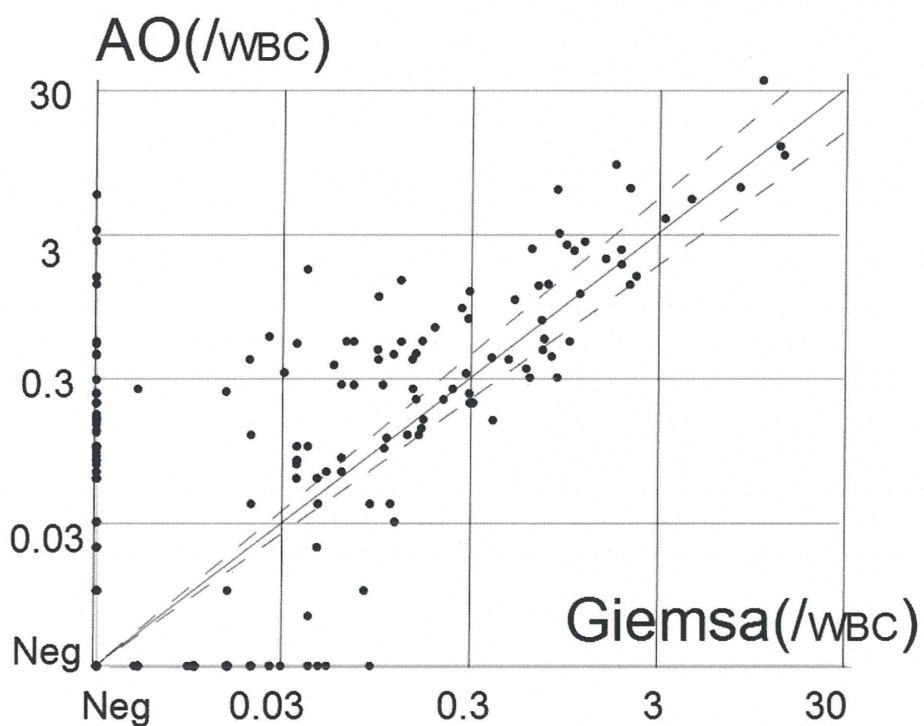


図4 顕微鏡に装着したLED光源



図5 Giemsa パラシテミアと AO パラシテミア比較



Scatter diagram of AO and Giemsa parasitemias of each patient. The straight line indicates a 1:1 ratio which is most expected. Two broken lines indicate a 2:1 ratio and a 1:2 ratio between the two parasitemias.

表 1 : 1 日の来訪者中、脾臓肥大と判定された 108 人全てについて A0 染色によるマラリア診断と他の診断法との比較

Sample	PCR	RDT	A0	Giemsa
PCR-positive	105	90	77	64
Pos. Rate	97.2%	83.3%	71.3 %	59.3%

なお、PCR 陰性の 3 例は、他の検出系でも全て陰性であった。

表 2 : on-site での改良 A0 法 (100WBC カウントあたりのマラリア原虫数) と実験室での厚層 Giemsa 法 (200WBC カウントあたりのマラリア原虫数) の陽性率

Name fRDT(+) rates	persons	AO(+)	Gm(+)	(+)&(+) )
<b>High</b>	526	24.1%	20.7%	14.6%
		(22.4%)	(17.5%)	(13.9%)
<b>Low</b>	492	4.3%	7.3%	3.5%
		(4.3%)	(5.1%)	(3.5%)
<b>Total</b>	1018	14.5%	14.2%	9.2%
		(13.7%)	(11.5%)	(8.9%)

.Positive rates of AO and Giemsa methods in two endemicity categories of High and Low. "Gm" means Giemsa. Positiveness is indicated by "(+)" like "fRDT(+)". "(+)&(+)" = **both positive**. Positive rates using positives verified with PCR diagnosis are indicated in parentheses.

表 3 : f RDT 陰性の 782 人に関する各診断の陽性者数 (after PCR とは AO 又は Giemsa 陽性のものを PCR で確認した場合の陽性者数)

AO(+)	after PCR	Gm(+)	after PCR
3Fg	F	6Fg	6F
11Fa	3F,3M,O	26Fa	4F
M	M	4M	2M, O
-	-	O	neg
15	(9)	37	(13)

Positive numbers and their species of AO/Giemsa method before/after PCR verification. Total PCR-verified numbers are in parentheses. "Fg" = gametocyte of *P. falciparum*, "Fa" = asexual form of *P. falciparum*. "M" = *P. malariae*, "O" = *P. ovale*. "neg" = negative. Positive numbers are indicated like 3F. In case of two species found by PCR, a spp. different from the first diagnosis was neglected. Others are indicated in Table 1.

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

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

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。よって、本年度の活動では、蚊帳配布前にプロジェクトの対象としているキブオギ島と対象地域であるオゴデ島において蚊帳の普及と使用状況を掌握した。キブオギ島においては、約1/3の家で、オゴデ島では、約1/4の家で、蚊帳を1枚も所有していなかった。オゴデ島では、57.4%の住民が蚊帳を使用していたが、キブオギ島では、使用率はより少なく、49.3%であった。両島における蚊帳の普及度と使用率の違いは、統計的に有意であった。両島において、蚊帳は十分に普及していないことが明らかになったため、調査後、島民全員が蚊帳にアクセスできるように、十分な蚊帳を配布した。

A. 研究目的

集団治療によるマラリア撲滅を試みるとともに、他の既存の手法を使って、ある程度感染を抑えておく必要がある。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]。よって、本年度の活動では、プロジェクトの対象としているキブオギ島とオゴデ島において蚊帳の普及と使用状況を掌握した。そして、結果をもとに両島の全住人が蚊帳にアクセスできるように、殺虫剤含浸の蚊帳を配布した。

B. 研究方法

両島にある各家を訪問し、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。

（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捺印とした。また、対象者の個人情報には厳重に管理し、調査員に情報の扱い方についてトレーニングを実施

施し、調査中も指導を行った。

### C. 研究結果

キブオギ島においては、149軒の家で住民の居住が確認できた。そのうち96軒(64, 4%)で少なくとも1枚の蚊帳を所有しており、残りの53軒においては1枚も所有していなかった。蚊帳の総数は、132枚で、1軒が所有している蚊帳の数の中央値は1、最大3枚の蚊帳を所有していた(図1)。すべて殺虫剤含浸の蚊帳であった。

同島の調査において対象となった住民の総数は、478人(男243名、女235名)で、蚊帳の使用に関して情報が得られた469名のうち231名(49. 3%)が調査の前夜に蚊帳を使用していた。1人に対する蚊帳の数は、0. 28枚であった。

オゴデ島では、148軒のうち、112軒(75. 7%)において、少なくとも1枚の蚊帳を所有していた。蚊帳の総数は、175枚で、1軒に対する蚊帳の数の中央値は1で、最大値は、9であった(図1)。すべて殺虫剤含浸の蚊帳であった。

同島の住民の数は、529名(男263名、女266名)で、情報が得られた528名のうち303名(57, 4%)が調査の前夜に蚊帳を使用していた。1人に対する蚊帳の数は、0. 33枚であった。

1軒が所有する蚊帳の数は、統計的にオゴデ島のほうが有意に高かった( $P=0. 012$ )。また、蚊帳の使用もオゴデ島の住民のほうが有意に高かった ( $P=0. 01$ , オッズ比 1. 39)。

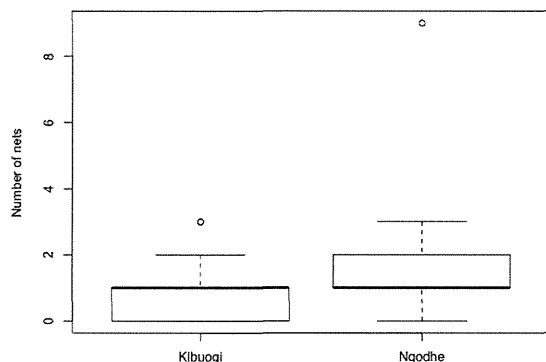


図1. 両島における1軒あたりの蚊帳の数。

### D. 考察

オゴデ島の方が1軒あたりの蚊帳の数が有意に多かったが、それでも1/4の家屋で蚊帳を所有しておらず、1人あたりでも0. 33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。キブオギ島では、さらに基準を大きく下

回っており、前回の調査時とほぼ同じであった。また、蚊帳の普及の違いが、そのまま、両島での蚊帳に使用の違いに現れており、オゴデ島がやや多いに過ぎない。大陸にある村と比較すると蚊帳の普及は非常に劣っている[2]。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。

### E. 結論

両島で、蚊帳は十分に普及しておらず、蚊帳を十分に配布する必要性が明らかになった、よて、結果をもとに、島民全員が蚊帳にアクセスできるように、十分な蚊帳を配布した。

### 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] Larson PS, Minakawa N, Dida GO, Njenga SM, Ionides EL, Wilson ML. 2014. Insecticide-treated net use before and after mass distribution in a fishing community along Lake Victoria, Kenya: successes and unavoidable pitfalls. *Malaria Journal*. Nov 28. 13: 466.

### 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

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

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プログラムの妥当性を検討するために、休眠期マラリア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グルコース 6 リン酸脱水素酵素(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。

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、マラリア抵抗性との関連が指摘されている。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防御反応において、その還元作用という重要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他になく、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ことが知られている。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。したがって事前に各個人のリスクを正しく調査する必要があり、そのための基礎的な情報として、本遺伝子異常に関する集団での頻度や特徴を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

島嶼地区におけるマラリア撲滅プログラムの対象者のマラリア検診時に、血液サンプルから検査キットを用いてG6PD活性を測定した住民のうち、本年度は特に女性の酵素欠損者10名及びマイルドな酵素活性の低下の見られる女性2名及び正常女性54名を対象とし、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) 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承認を得ている。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

女性の欠損症患者の情報が遺伝子解析に有用であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

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

研究項目：マラリアとアフリカー獲得免疫の問題を中心として

分担研究者 脇村孝平

大阪市立大学大学院経済学研究科 教授

研究要旨

本研究は、熱帯アフリカにおけるマラリアの様相が他の地域（大陸）の場合とは如何に異なるか、を考えることによって、現代のアフリカにおけるマラリア対策に一定の示唆を与えることを目的としている。第一の研究課題は、人類史的な視野で熱帯アフリカのマラリアを捉えることにある。アフリカに存在するマラリアが専ら熱帯熱マラリアであるという事実は何を意味するのかを究明した。第二の研究課題は、1950年代に遡って、WHOが開始した「世界マラリア撲滅計画」において、熱帯アフリカのマラリア対策がどのように捉えられていたのかを究明した。本研究の焦点は、獲得免疫の問題に合わせられている。

A. 研究目的

本研究で、いわゆる「サブサハラ」、サハラ砂漠以南のアフリカ、特に熱帯アフリカにおけるマラリアの特質を考察する。2012年で、世界のマラリア罹患者（約2億700万人）のうち、80%がアフリカから出ている。また、世界のマラリアによる死者（65万人～120万人）のうち、90%がアフリカから出ているのである（なお、マラリアによる死者のうち、85%は5歳以下の子供から発生している）。このように、現代の世界において、マラリアの被害はほぼアフリカに集中している。そこで問われるのは、「なぜマラリアの深刻な被害がアフリカにのみ限定されているのか」という点である。

この問題を解き明かすためには、第一に、アフリカにおけるマラリアという疾病の特質を、人類史的な視野で把握する必要が生じる。もっぱら James L.A. Webb, Jr.の研究に依拠して、この問題を考えてみる。第二

に、アフリカにおけるマラリア問題の特質を、1950年代に WHO が熱帯アフリカにおけるマラリア問題をどのように捉えていたかという点を検討して、明らかにしたい。ここでは、当時、世界的に展開された「世界マラリア撲滅計画」（Global Malaria Eradication Programme）の熱帯アフリカとの関わりという点に着目する。

B. 研究方法

本研究は、主に WHO 関連の文書と二次資料（研究書）を使う文献研究のスタイルで行われる。本研究で焦点を合わせるのは、熱帯アフリカでしばしば見られた獲得免疫（acquired immunity）の問題である。熱帯アフリカにおけるマラリアの高侵淫性（hyper-endemic）地域では、成人は熱帯熱マラリアに対して抵抗力を持つようになるが、この現象が獲得免疫であり、「世界マラリア撲滅計画」が熱帯アフリカに導入されようとする時点において論争の係争



点となった。第一の研究課題に関しては、二次資料、第二の研究課題に関しては、一次資料を使用する。

(倫理面への配慮) 必要なし。

### C. 研究結果

第一の研究課題に関しては、以下の通りである。熱帯アフリカにおけるマラリア被害のほぼ大半は、熱帯熱マラリア (*P. falciparum*) によるものであるという基本的な事実である。周知のように、熱帯アフリカの住民の大半は「ダフィー陰性」(Duffy negativity) であり、三日熱マラリア (*P. vivax*) には罹らないのである。ちなみに、このような事実から、三日熱マラリアは、アフリカ起源であり、非常に早い時代 (10 万年前頃) に感染の蔓延という現象の果てにダフィー陰性が現れたのではないかとする説がある。James L.A. Webb, Jr. は、この説を採用するが、近年の遺伝子学的な研究によると、三日熱マラリアの東南アジア起源説の方が有力となっており、アフリカ起源ではない可能性が高い。ここでは、三日熱マラリアが如何なる経緯でアフリカに伝わったかなど、難問ともいふべき問題はとりあえず不問に付すことにしよう。重要なのは次の点である。熱帯アフリカの主たるマラリア感染が熱帯熱マラリアによるものであり、この疾病こそまさにアフリカ起源であるという点である。熱帯熱マラリアの感染の蔓延は、1 万年～1 万 5 千年前頃と推定されており、熱帯雨林地帯の周辺で、ヤムイモの農耕が始まった頃と一致するのではないかとされている。鎌形赤血球症の出現は、このような蔓延の果てに出現したと推定されるのである。このような農耕を行った民族として、いわゆる「バントゥー系民族」が鎌形赤血球症を多く有した民族となり、他の民族に対して疫学的に優位であるがゆえに、熱帯アフリカに広く分布するようになったと推定されている。

第二の研究課題に関しては、1950 年代前半に開催された第一回アフリカ・マラリア会議 (1950 年) と第二回アフリカ・マラリア会議 (1955 年) に焦点を合わせて、WHO が

1955 年に開始した「世界マラリア撲滅計画 (Global Malaria Eradication Programme)」において、なぜサブサハラ・アフリカがその実施対象にならなかったのかを考察した。最大の理由は、この地域のうち児童の罹患率が極度に高く死亡率も高い地域 (holoendemic area) では、獲得免疫 (acquired immunity) によって一定の安定を得ている成人が、介入 (この場合、主に DDT の散布) によって、むしろ免疫を失う可能性があるとする主張が一定の影響力を持った点にある。結局、獲得免疫をめぐる意見の対立が、「世界マラリア撲滅計画」の熱帯アフリカへの波及を妨げたのである。

マラリアとアフリカー獲得免疫の問題を中心として

脇村孝平 (大阪市立大学)

## アフリカとマラリア

うち、80%がアフリカから、また世界のマラリアによる死者 (65 万人~120 万人) のうち、90%が同じくアフリカから発生していると見られている。

- ・ なお、マラリアによる死者のうち、85%は5歳以下の子供から発生している。
- ・ 過去10年間のアフリカにおけるマラリア対策は、著しい進展を見た。
  - ・ 2000年から2012年にかけて、5歳以下の子供の死亡率は、54%低下した。

## 目次

1. はじめに
2. アフリカとマラリア
3. 人類史/アフリカ/マラリア
4. マラリア対策の方法
5. WHOのマラリア撲滅計画
6. マラリア撲滅計画とアフリカ
7. おわりにー獲得免疫の問題

## アフリカとマラリア

- ・ マラリアは、アフリカの歴史を大きく左右した。
  - ・ 伝統的に、王権の形成がなされたのは、サバンナ地帯であり、熱帯雨林地帯ではなかった。なぜだろうか。
  - ・ ヨーロッパ人は、16世紀以来、奴隷貿易などで、アフリカに関わったが、一部の海岸地帯を除くと、ほとんど内陸へ入り込むことは稀であった。本格的に内陸を開発するようになるのは、19世紀後半のことである。南アメリカの場合と比較すると、その大きな違いに驚く。

## はじめに

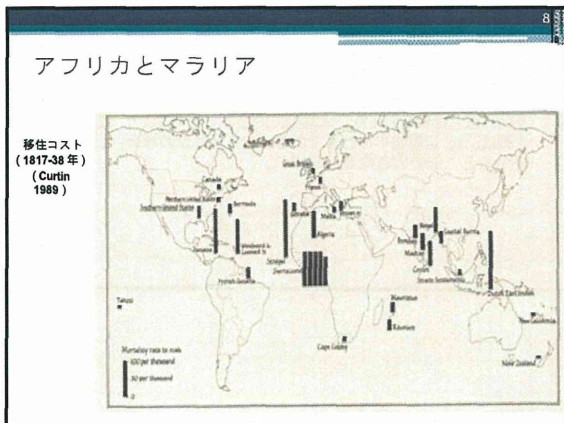
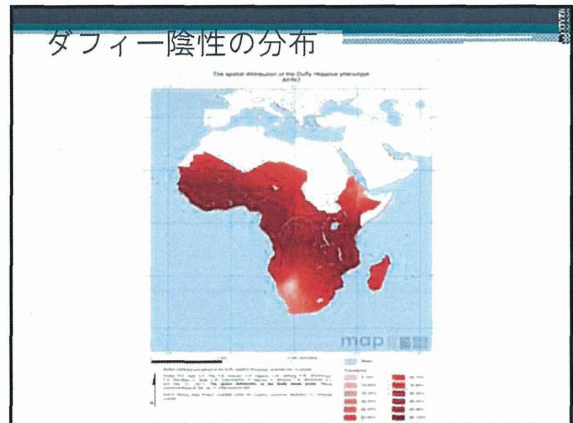
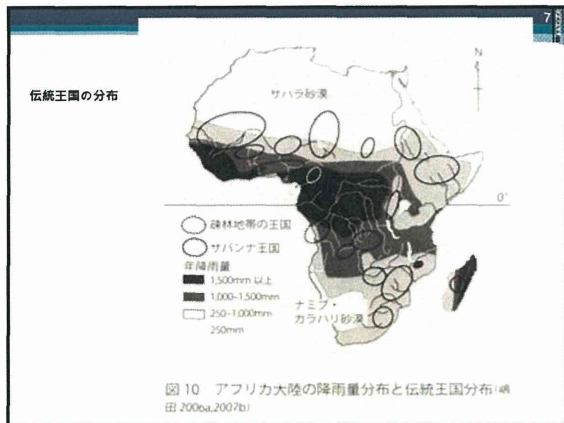
- ・ アフリカ (サブサハラ・アフリカ) とマラリア
  - ・ マラリア (三日熱マラリア) は、人類史の初期 (200~300 万年前) に、アフリカで生まれた感染症である。
  - ・ しかし、今日、アフリカの主たるマラリアは、熱帯熱マラリアである。
- ・ マラリア対策には、どのような方法があるのか?
  - ・ 大きく、媒介生物 (蚊) に対する方法と寄生虫 (原虫) に対する方法の二つのアプローチがある。それらは、どのように変化してきたのか?
- ・ マラリア撲滅計画は、アフリカとどのように関わったのか?
- ・ 獲得免疫の問題

## アフリカとマラリア

アフリカ大陸の植生



図 アフリカ大陸の植生と獲得免疫地図

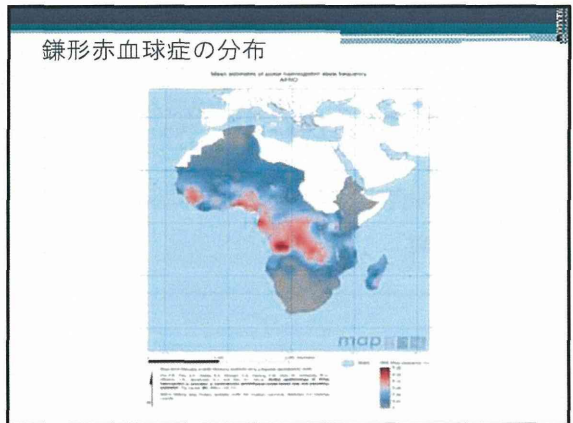


人類史／アフリカ／マラリア

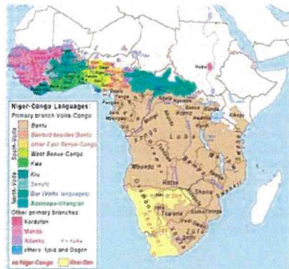
- ・ 鎌状赤血球症 (Sickle-cell disease)
  - ・ 熱帯アフリカの主たるマラリア感染は、熱帯熱マラリア (*P. falciparum*) によるものである。
  - ・ 鎌状赤血球症の出現は、熱帯熱マラリアの感染の蔓延は、1万年～1万5千年前頃と推定されており、熱帯雨林地帯の周辺で、ヤムイモの農耕が始まった頃と一致する。
  - ・ バントゥー系民族が、熱帯アフリカで広く分布しているのは、鎌状赤血球症を多く有した民族として、優位に立ったからとされている。

人類史／アフリカ／マラリア

- ・ ダフィー陰性 (Duffy negativity)
  - ・ 熱帯アフリカの住民の大半は、ダフィー陰性である。したがって、三日熱マラリアはほぼ問題にならない。
  - ・ 10万年前頃、既にダフィー陰性が現れた可能性がある。これは、農業が始まるはるか以前の狩猟採集時代に、漁業などのための一時的な定住化が、三日熱マラリアの感染をもたらした、非常に長い時間の経過の中で、アフリカ大陸に後半に拡がるダフィー陰性をもたらした。



## バントゥー系民族の分布



## マラリア対策の方法

### 両大戦間期

国際連盟保健機構・マラリア委員会

ロックフェラー財団

- ・ 原虫対策重視
- ・ ヨーロッパの経験（特に、イタリア）
- ・ 英領インドからのマラリア学者(S.P. ジェームズ)
- ・ 第二次世界大戦後、忘却される。
- ・ 媒介生物対策重視
- ・ アメリカの経験（パナマ、キューバにおける黄熱病対策の成功）
- ・ 第二次世界大戦後、DDT使用の成功によって、このアプローチが主流となる（垂直的アプローチ）。

## マラリア対策の方法

- ・ 媒介生物(蚊) への対策
  - ・ 幼虫対策（20世紀前半）
    - ・ 油、Paris Green
  - ・ 成虫対策（20世紀後半以後）
    - ・ IRS (indoor residual spraying) (20世紀後半)
      - ・ DDT, BHC etc.
    - ・ bed net (特に、21世紀)
      - ・ ITN (insecticide-treated bed net)
      - ・ LLIN (long-lasting insecticide-treated bed net)

## WHOのマラリア撲滅計画

- ・ GMEP (Global Malaria Eradication Programme) (1955-1969)
  - ・ 第二次世界大戦中に、DDTが開発され、実用化されていた。
  - ・ 1955年の第8回 WHA(World Health Assembly)で宣言
  - ・ IRS (indoor residual spraying) が中心
  - ・ 垂直的 (vertical) アプローチ

## マラリア対策の方法

- ・ 寄生虫 (原虫) への対策
  - ・ 薬剤
    - ・ quinine
    - ・ chloroquine (1950年代から1960年代)
    - ・ pyrimethamine
    - ・ primaquine
    - etc
    - ・ artemisinin (現在)
      - ・ artemisinin combination therapy (ACT)
  - ・ Mass Drug Administration, MDA
  - ・ ワクチン
- ・ 検査法
  - ・ Rapid Diagnostic Test (RDT)

## WHOのマラリア撲滅計画

- ・ 各地で、DDT使用によるマラリア対策の成功（ヨーロッパ、中央アメリカ、アジアの諸国）
  - ・ (例) インド
    - ・ 1950年代初頭 マラリア患者 約7500万人
    - ・ 1960年代初頭 約10万人
  - ・ アノフェレス対策への楽観
- ・ 主に、温帯もしくは亜熱帯。熱帯アフリカは対象外。
- ・ なお、1960年代に、DDTの限界が露呈。マラリア撲滅計画は、頓挫
  - ・ アノフェレスのDDTへの耐性
  - ・ DDT使用の問題（レイチェル・カーソン『沈黙の春』）