

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 明

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

・ 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

・ 分担研究報告書

1. 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…………… 8

2. マラリア撲滅プログラムにおける G6PD 欠損症スクリーニング法改良の試み

研究代表者 金子 明
連携研究者 寺本(木俣) 勲 …… 19

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 ……………25

4. ヒト赤血球異常症

分担研究者 平山謙二……………27

5. アフリカ・マラリア対策史序説

分担研究者 脇村孝平 ……………28

6. 西ケニアにおける *K13-propeller* 遺伝子の多型解析

分担研究者 五十棲 理恵 ……… 33

・ 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 37

・ 研究成果の刊行物・別刷…………… 38

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者 金子 明 大阪市立大学大学院医学研究科 寄生虫学分野 教授

研究要旨

地球規模マラリア根絶は、今世紀人類が対峙する Global Health 上の優先課題である。国連開発ミレニアム目標 (MDGs) では患者および死者数を 2015 年までに 75% 減少させることが掲げられてきた。今般の対策法強化により感染者数の減少が流行地各地で報告されてきており、アジア・太平洋では究極の目標であるマラリア撲滅が見えてきた。しかし熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅は困難かつ重要な踏み石と考えられ、そのロードマップは未だ見えていない。本研究はポスト MDGs におけるこの課題に対して日中瑞および流行国ケニアの研究者が共同で挑戦する研究ベンチャーである。ビクトリア湖高度マラリア流行島嶼をモデルとしてマラリア撲滅に挑戦するものである。オコデ島全住民 (700 人) を対象にアルテミシニンとプリマキンによる集団治療と薬剤処理蚊帳配布を組み合わせた短期集約対策によりマラリア撲滅を試みる干涉研究の枠組みにそって、以下の個々の課題について検討を加えていく：(1) 地理的に連なる島嶼および内陸村住民集団においてマラリア感染に関する寄生虫学、血清分子疫学調査を、島嶼地域間・対策前後の比較において継続する。(2) プリマキン投与の安全性と関連する G6PD 欠損症をについて検討する。(3) 集団治療実施で用いる ACT と少量プリマキンの抗原虫生殖母体効果による伝播阻止作用を臨床薬理学的に検討する。(4) 住民主導の媒介蚊対策とサーベイランスによるマラリア撲滅長期的維持システムを構築し、社会経済学的開発の側面について検討する。本研究のチャレンジは**熱帯アフリカ高度マラリア流行地域**を対象としマラリア撲滅の可能性を検証することが本研究の最大の学術的挑戦である。島嶼は対策干涉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していくことが基盤となる戦略である。さらに**集団治療 (MDA: mass drug administration)** を干涉戦略の中心におく。当該干涉研究により、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 26 度は干涉実施に向けて準備を進めるとともに、撲滅干涉前マラリア調査を撲滅予定のオコデ島、対照とする近隣 3 島および内陸部ウンゴイ村で継続した。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検討を行ったので報告する。

**ビクトリア湖島嶼におけるマラリア原虫感染率
マラリア診断法の改良
G6PD 欠損症率モニタリング
原虫薬剤耐性分子マーカーの年次的推移**

分担研究者

皆川 昇 長崎大学熱帯医学研究所・
病害動物学分野・教授

平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所・
免疫遺伝学分野・教授

脇村 孝平 大阪市立大学・大学院経済
学研究科・教授

五十棲 理恵 大阪市立大学・大学院医学
研究科寄生虫学分野・病院講師

A．研究目的

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

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

島嶼マラリア撲滅：島嶼は干渉研究に対して自然の実験系を提供する。我々は1991

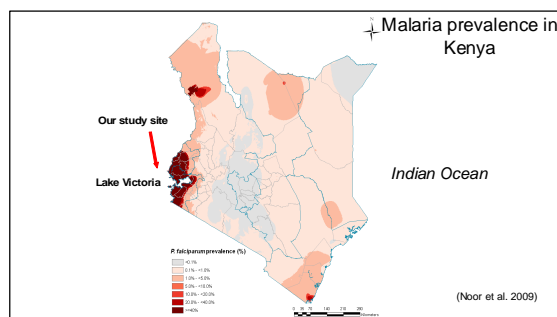
年以来ヴァヌアツ・アネイチウム島全人口700人を対象として、クロロキンとプリマキンによる集団治療とITNによりマラリア撲滅を達成し、住民主導によるITN使用とサーベイランスにより長期間マラリア撲滅を維持しうることを示してきた。このアネイチウムモデルをビクトリア湖島嶼へ応用する。

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

B．研究方法

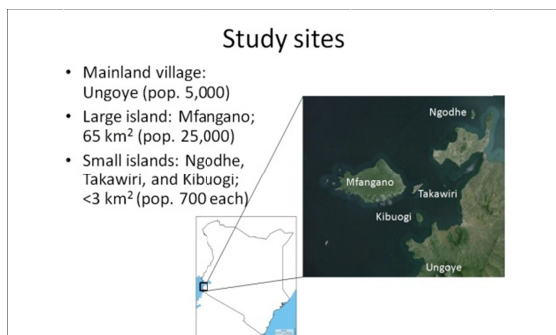
研究対象地域

本研究はケニア・ビクトリア湖スバ地区で実施される。当地では長崎大学熱帯医学研究所により2006年8月よりHDSSによる住民の移動、生死が把握されている。ムファンガノ島(人口約2万人)、オコデ、タカウリ、キプオギの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(図1)。



(図1)

本研究地域はケニア国内において、今般の ITN、ACT、RDT 等のマラリア対策法スケールアップにも関わらず高度マラリア流行が継続するホットスポットの中心に位置する(図2)



(図2)

撲滅干渉実施へ以下の研究段階を経て推進する。

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

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

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

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

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

解を出した。

(6) マラリア伝播モデル: 撲滅干渉効果について検討する。

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

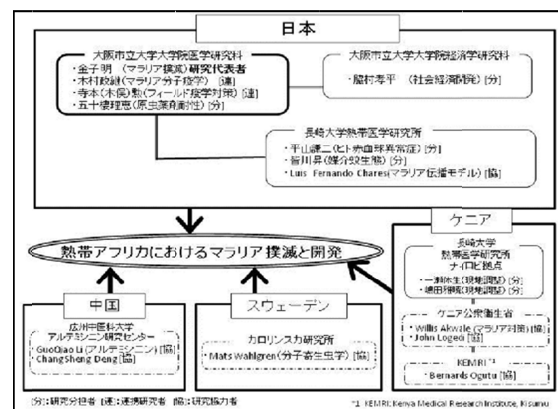
(8) 長期的マラリア撲滅維持: 住民主導の殺虫剤処理蚊帳使用とサーベイランス継続による。

(9) 社会経済学的インパクト: マラリア撲滅の影響評価。

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

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

これらの研究計画を推進するための体制を示す(図3)



(図3)

(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

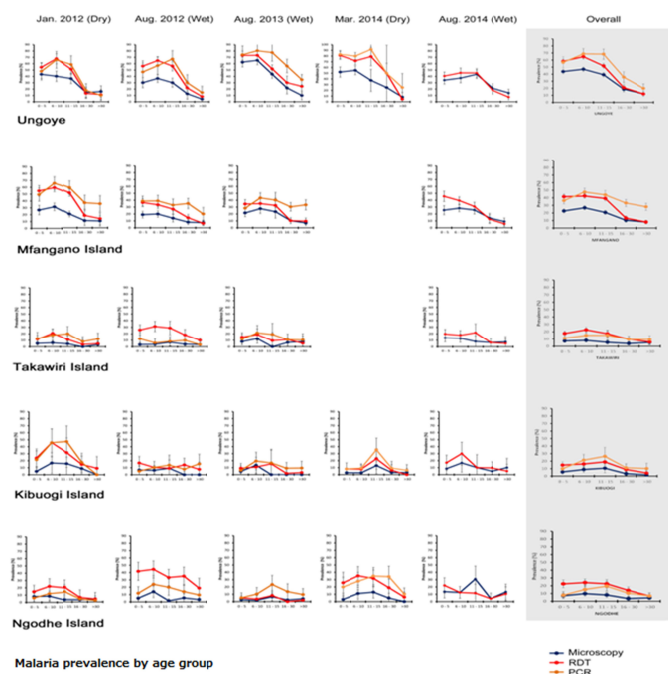
の対象となる。現地における被験者の研究調査への登録にあたっては、すくなくとも一人の当該被験者・保護者に口頭で研究目的・方法についての詳細な説明を行う。これらの過程を経た後で、被験者・保護者が同意した場合、書面にてインフォームドコンセントを得る。被験者・保護者の同意を得られなかった場合には、その理由を研究記録に記載する。

C . D . 研究結果および考察
マラリア感染率モニタリング :

ビクトリア島嶼人口のマラリア感染率

2012年1月以来、5回にわたって Mbita においてマラリア調査を行った。このうち4回の調査は Ngodhe, Kibuogi, Takawiri, Mfangano の4島および陸側 Ungoye 村の同様な人口を対象にした。このうち2014年8月調査のラボにおけるPCR解析は終了していない。1回の調査で総計約2500人全年齢を対象にし、サンプルの約半数が10歳以下の小児である。

マラリア原虫検査は、(1) microscopy, (2) RDT, 及び (3) PCR の3法で行われた。地域島別、年齢特異的陽性率について次の図に示す

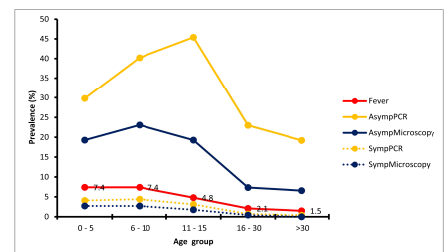


(図 4)

総じて原虫陽性率は Ungoye で最も高く、Takawiri, Kibuogi, Ngodhe の3小島では低く、Mfangano では中間であった。Ungoye では陽性率は10歳以下小児で高くその後加齢に従って減少していく高度伝播地域に特徴的なパターンが見られたのに対して、Takawiri, Kibuogi, Ngodhe の3小島ではこの年齢依存パターンははっきりしなかった。これらのデータは多くの原虫感染が submicroscopic であり、低い原虫カウントの感染者が伝播の継続に重要な役割を担っていることを示唆する(図4、5)

2014年8月の調査では、現地にてAO法で見出された高い原虫カウントの熱帯熱マラリア感染者静脈血より原虫培養株の確立が試みられている。さらに2014年2月調査のPf-PCR陽性サンプルについて gametocytes の検出がLSHTMとの共同研究で試みられている。

Symptomatic (fever, >37.5C) and asymptomatic malaria infections by age group (S1-S3)



(図 5)

G6PD 欠損症スクリーニング

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。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。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)。現在流行地現場において安全なプリマキン投与のための G6PD 欠損症スクリーニングを可能にする、迅速かつ安価な定量的 point-of-care テストが模索されている。

G6PD Assay Kit-WST (Dojindo)を流行地で実施する際、肉眼観察による誤診のリスク回避しまた女性ヘテロザイゴートにおける中間値判定の問題を解決するために、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吸光度を測定し、酵素反応量を WST の吸光度変化量として表す事で定量的な結果が得られる事を報告した。しかし、光電比色計の能力不足 (測定可能吸光度 0~2) のために、高濃度域で測定値に連続性が得られず、正常活性集団の分布が歪む可能性があった。そこで測定可能吸光度-0.200~3.000 の光電比色計を導入して再検討した。その結果、男性における陰性・陽性の分離は同等であったが、活性正常域の分布の対称性が改善された。

男性陰性者 (hemizygote) の閾値より推定される女性陰性者数は、予想される女性 homozygote 数より 3 倍ほど多く、女性 heterozygote の一部が関与していることが考えられた。現在これらの生化学的表現型パターンに対して遺伝子解析が進行している (平山研)

熱帯熱マラリア原虫アルテミシニン耐性モニタリング

近年、アルテミシニ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 Arieiry 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 (Kibuogi, 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 2012-2013 年にかけて展開しており、同時期に収集したサンプルを 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、今後予定される集団治療が地域原虫集団に与える変化を見極めるうえで重要な課題である。

E . 結論

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

集団治療実施

昨年 9 月に KNH/UON-ERC に提出した MDA 実施のための研究計画に対して 11 月に primaquine の安全性等多くのコメントが寄せられた。それらに基づき改訂した研究計画を 1 月に再提出し既に承認を得た。

MDA 実施の pilot study として 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 実施に向かう予定である。これとは別に中国側 Prof Li から Mfangano 島 (25,000 人)のMDA実施に対して、人的、資金的な全面協力の申し出があった。この拡大MDA 計画の妥当性をケニア側と話し合うため、Prof Li らの広州グループの参加を得てMDA セミナーを3月17-19日、ナイロビにてMOHと共同で開催し、本干渉研究推進についてケニア側の前向きな対応が得られている。

住民組織の確立

Ngodhe 島での集団治療実施、および community-directed surveillance 確立に必要な住民組織の確立を目指すための準備、住民側と綿密な話し合いを持つ。2015年3月に既にオコデ島においてマイクロスコプ コープ コープ を設置し community microscopist が住民側より選定されている。現在この人材に対して ICIPE において訓練が進む。



マラリア移入危険性モニター

オコデ島における人の移動とマラリア移入パターンを把握するための調査が2015年3月に実施され、現在解析が進む(図6)。これによりMDA実施後に懸念される他の

地域からのマラリア移入問題に対して具体的な方策を確立したい。

疫学調査

集団治療実施に先立つ 地理的に連なる島嶼および内陸湖岸村住民集団においてマラリア感染に関する寄生虫学、血清学、分子疫学的調査を島嶼地域間比較において継続していく。また熱帯熱マラリア培養株確立を調査と並行して進める(木村)。Pf 生殖母体分布について検討するための濾紙 RNA 採血を試み分子マーカーによる検討を LSHTM と共同で継続する。これまでに実施した疫学調査から得た濾紙採血サンプルにより血清疫学的検討をカロリンスカ研究所で着手する。また G6PD 欠損症の遺伝子型解析を継続する(平山研)。

F . 健康危険情報
なし

G . 研究発表

1. 論文発表

英文論文

- (1) Isozumi, R, Uemura H, Ichinose Y, Logedi J, Omar AH, Kaneko A. Novel Mutations in K13 Propeller Gene of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Emerg Infect Dis*, 2015 Mar;21(3):490-2. doi: 10.3201/eid2103.140898.
- (2) Chan CW, Sakihama N, Tachibana S, Lum JK, Tanabe K, Kaneko A. At the crossroads of exchange: *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gene flow among islands in Vanuatu and implications for malaria elimination strategies. *PloS One* 2015. Mar 20; 10(3):e0119475. doi: 10.1371/journal.pone.0119475. eCollection 2015.
- (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. Epub 2014 Sep 22.

- (4) Watanabe N, Kaneko A, Yamar S, Leodoro H, Taleo G, Tanihata T, Lum JK, Larson PS. Determinants of the use of insecticide-treated bed nets on islands of pre- and post-malaria elimination: an application of the health belief model in Vanuatu. Malaria Journal 2014 Nov 20;13:441. doi: 10.1186/1475-2875-13-441.

著書

- (5) 金子明、マラリア「midicina」 Vol.5 2 No.4増刊号2015、pp.603-606、医学書院(東京).

2. 学会発表

- (1) Kaneko A., Sustainable malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu, 1991 -2014. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 63rd Annual Meeting. 2nd-6th November 2014. New Orleans(USA).
- (2) 木村 政継、寺本 勲、五十棲 理恵、川本 文彦、金子 明. マラリア迅速診断法としての AO 染色の再評価. 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015 年 3 月 21 日(東京)
- (3) 木俣 勲、木村 正継、五十棲 理恵、Zulkarmain Md Idris、Chim W. Chan、James Kongere、Ahmedeen Omar、金子 明. 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). 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015 年 3 月 21 日(東京)
- (4) 五十棲 理恵、上村 春樹、木俣 勲、木村 政継、一瀬 休生、John Logedi、Ahmeddin H.Omar、金子 明. Novel point mutations were observed in the *Plasmodium falciparum* K13-propeller gene of an artemisinin-resistant candidate in western Kenya. 第 84 回日本寄生虫

学会大会、2015 年 3 月 21 日(東京).

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

本プロジェクトのプロモーションを目的として、短編映画”THE MALARIA FIGHT”を作成した。以下のリンクから供覧できる。
<https://drive.google.com/open?id=0BzwXqXPg29thcU5FTlMzYTN0VFE&authuser=0>

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）

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 R I 実験施設 准教授

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：

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 (A O) 用いて 1994 年頃 Kawamoto らは薄層血液塗抹標本の A O 迅速染色法(以下、Kawamoto-A0 法) を開発し普及に努めてきたが、現在は忘れられかけている。良好な観察領域の見極めが難しいことやマラリア陰性の場合にその確信を得るのが難しいということなどがその理由であろう。また、記録性の悪さや再染色の問題などもあった。

我々は、Kawamoto-A0 法の、迅速かつ明瞭にマラリア原虫を観察できるという本来の利点を維持しつつ、種々の条件を再検討して、従来 of A O 法の不安定要因を解消した。そしてそれを、ケニアビクトリア湖畔のフィールドにおけるオンサイト調査に適用して、厚層ギムザ法をこえる高感度の検出率を達成した。現地の人々が一般的に使用できるようになるまでにはまだ改良の余地があるが、現在マラリアの迅速診断に使用されている RDT が原虫感染率が分からないのに対し、原虫感染率が分かる迅速診断法である改良 A O 法が今後活躍する余地は十分残されていると思われる。

A . 研究目的

Acridine Orange (A O) 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)。1990 年代半ば、川本 (F . Kawamoto) らは薄層血液塗抹標本を高濃度の A O 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 A O 迅速染色法 (以下、Kawamoto-A0 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-A0 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ューニ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、A O 染色液の pH の検討などを行って、核と細胞質の良好な染色が行えるよう改良し、また、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。そしてその方法をフィールドにおけるマスキューニングに適用し、他の方法と比較検討したので報告する。

B . 研究方法

B-1 A O 染色液組成の検討

A O 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、A O 染色液のバッファ組成や pH、A O 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、従来のもより原虫判別能力の高い A O 染色液組成を検討する。

B-2 フィールドオンサイト調査

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ィールド調査において、他の検査と平行して、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 A O 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 μ L の血液でスライドグラス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%エタノールを吹き付けて固定する。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 A O 染色の際には良いことが分かっている。

B-4 A O 染色液

A O 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 μ 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、A O 染色の Working Solution (100 ppm A O, pH 6.8) とする。

A O 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 A O 染色法

図 2 に概要を示す。

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

薄層塗抹標本は裏返しにして上から軽く A O 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 A O 染色液はカバーガラス全体に広がるが、このとき A O は組織に少しずつ吸収されて広がり瞬時に A O 濃度勾配が

スメア（塗抹）の先端部からスメア開始部の方向にできると考えられる。

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、その間スメア開始部の方向にわずかにA O液が移動し、A O濃度勾配がよりできやすくなるからと考えている。

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、または水銀ランプの蛍光顕微鏡を用いる。A Oの実質濃度はスポット部（スメアの先端部）が高く、スメア開始部の方向に低くなっているため、まず倍率100倍で、スポット部からスメ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、少しずつスメ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。

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、A O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ため注意が必要である。

研究結果

C-1 A O染色液pHの検討

A O-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、A Oはスタッキングしやすくなりオレンジ色が強く出るようである。

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、pH 8.0、pH 8.8（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、pH 8.8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A OバッファのpHとした。

C-2 他の方法との判定の比較

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観察をオンサイトで行った。オンサイトでは同時にRDT（Rapid Diagnostic Test:

マラリア原虫抗原を抗体で検出する方法)も行った。後に、厚層塗抹ギムザ染色法とPCR法(cox 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)、AO法:26.7%(28/105)、厚層ギムザ法:39.0%(41/105)となり、AO法はスタンダードである厚層ギムザ染色法より偽陰性率がかなり低く、これは改良AO法が厚層ギムザ法より検出感度が高いことを示す。これまでのAO-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AO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。

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、6ppmから1000ppm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、100ppm, 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、1000ppm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。

かれらが挙げた欠点はここでも当てはまるので注意が必要ではあるが、我々の改良AO法では、多数の2色に染め分けられた白血球の周りを調べるので問題にならないというのがこれまでの結論である。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法はある程度マラリア原虫がいればほとんど直ちに発見できるが、(顕微鏡レベルで)マラリア陰性の場合には、本当に陰性であることを確認するためには5分程度の時間は最低限必要と考えられる。マラリア感染者が高率で存在する今回のような場合は、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た側面はあるだろうが、1枚あたり、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。

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るため、低倍率(400倍)で十分観察が

可能という特長があった。この改良AO法によって、AO法を再評価してもらいたいものである。

なお、これまでは光源にハロゲンランプを使用してきたが、光源をLEDランプに変える取り組みを進めている。

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。これを用いれば迅速にオンサイトで、厚層ギムザ法より高い感度で原虫感染率を決定できる。将来は、RDTと組み合わせて、フィールド調査時だけでなく検疫などの輸入マラリアに対する検査手段として利用できることを想定し、更に簡便さを追及したい。

G．研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

2015年3月21日、第84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

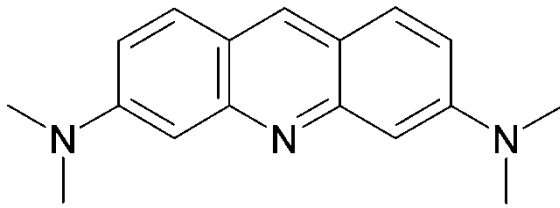
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図1 Acridine Orange 染色の原理
A O (Acridine Orange) の分子構造



DNA、RNA と結合性の塩基性蛍光色素である。

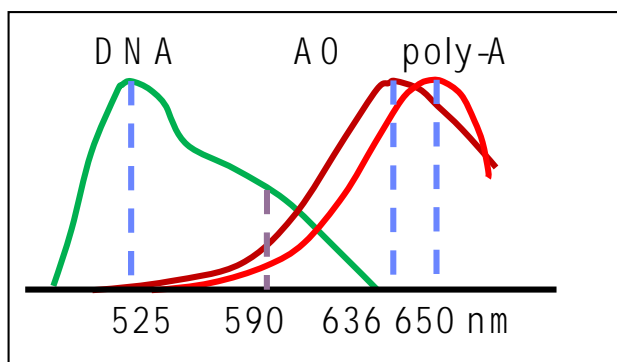
DNA、RNA との結合様式と蛍光波長

RNA に対しては、D/P 比が 1 : 1 になるほどにたくさんの A O が結合し、A O 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。

dsDNA に対しては、2 本鎖の間にインターカーレートし、各 A O 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。

dsDNA はしかし、高濃度の A O 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 A O 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 A O による 2 本鎖解離の二つの理論がある。

適切な A O 濃度の場合の、A O の蛍光スペクトル



高濃度の A O 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

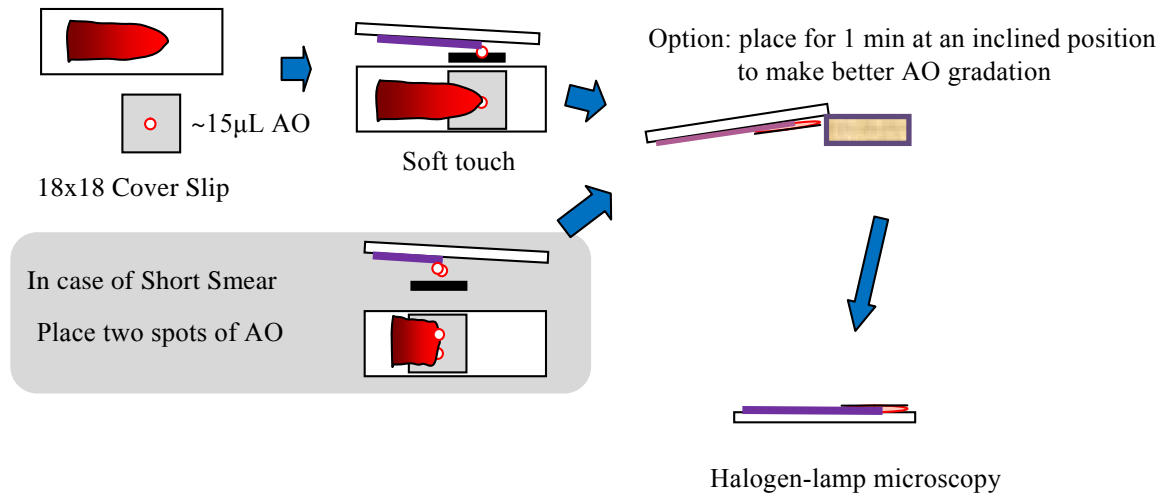
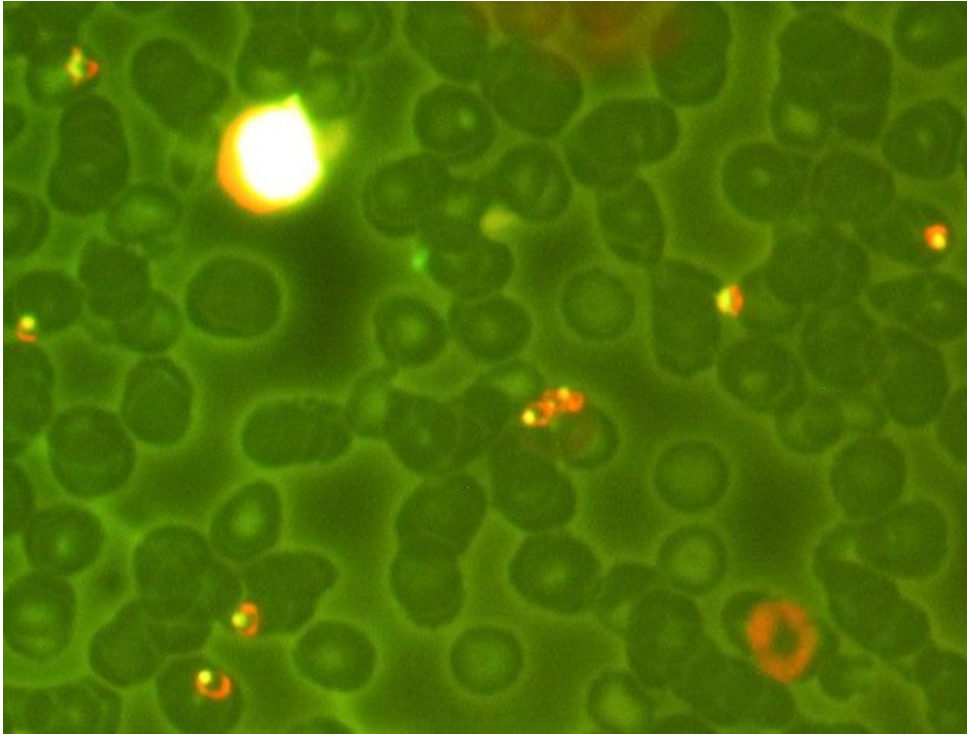


図3 A0 染色例

(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。

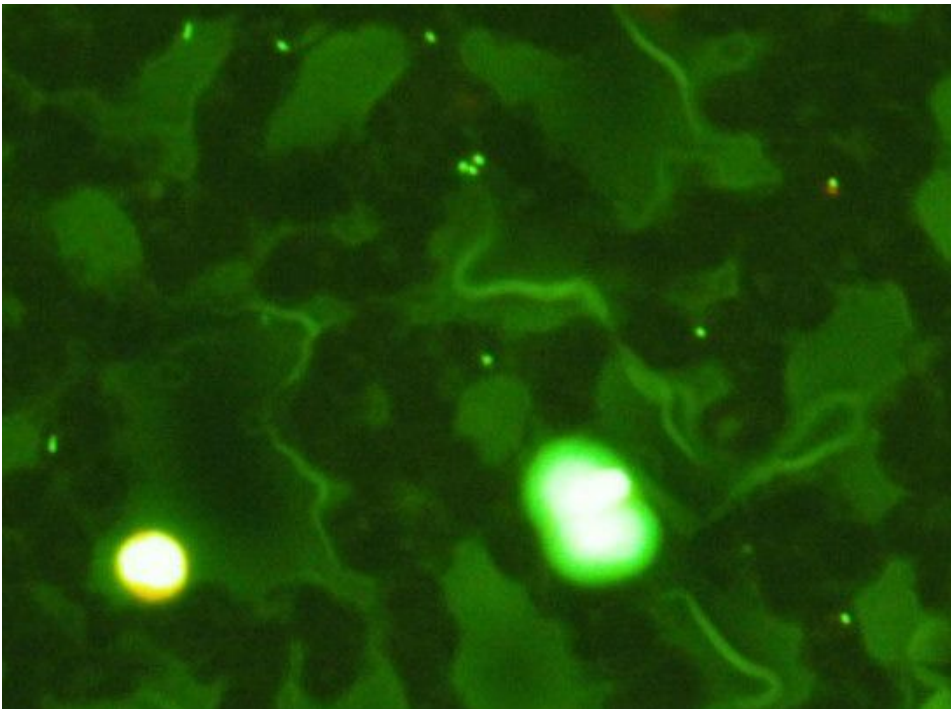


表 1 : 1 日の来訪者中、脾臓肥大と判定された 108 人全てについて A0 染色によるマラリア検査を実施し、他の検査データと比較した。PCR 陰性の 3 例は、他の検出系でも全て陰性であった。

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

この元データは次の Supplement 1 にある

Supplement 1

ビクトリア湖畔 Ungoye 地区の 108 人の患者について、A0 迅速診断法と他の検出法を比較した。このなかで、患者がいるところで迅速に結果が出たのは RDT 法（抗体による熱帯熱マラリア感染原虫検出）と A0 法だけである。

No	IDNo	PCR	RDT ¹	A0	Giemsa ²
1	20130813-1	-	-	-	-
2	20130813-2	FM	-	-	-
3	20130813-3	FM	Pos	1+	-
4	20130813-4	F	-	-	-
5	20130813-5	F	-	-	-
6	20130813-6	FMO	Pos	-	-
7	20130813-9	FMO	Pos	1+	-
8	20130813-10	F	Pos	-	-
9	20130813-11	F	Pos	-	-
10	20130813-16	FM	Pos	2+	F49
11	20130813-20	F	Pos	1+	-
12	20130813-25	FM	Pos	1+	-
13	20130813-27	FM	Pos	3+	F8
14	20130813-28	F	Pos	1+	-
15	20130813-36	FM	Pos	1+	-
16	20130813-37	F	Pos	-	-
17	20130813-39	FMO	-	1+	-
18	20130813-41	FMO	Pos	2+	F56
19	20130813-45	F	Pos	4+	F325
20	20130813-48	F	Pos	1+	-
21	20130813-49	F	Pos	2+	F24
22	20130813-51	FM	Pos	1+	F11
23	20130813-52	FM	Pos	1.5+	F5fg1
24	20130813-54	FMO	Pos	1+	F8
25	20130813-55	F	Pos	3+	F4
26	20130813-56	FMO	Pos	1+	-
27	20130813-57	FMO	Pos	2+	F56
28	20130813-59	FM	Pos	-	F19
29	20130813-61	FM	Pos	2+	F360
30	20130813-63	FM	Pos	2+	F20
31	20130813-65	FM	Pos	-	F2
32	20130813-68	F	Pos	3+	F150
33	20130813-70	FM	Pos	3+	F95
34	20130813-80	F	Pos	1+	F33
35	20130813-81	FM	Pos	-	-
36	20130813-82	FM	Pos	1.5+	F2

37	20130813-84	F	Pos	2+	F70
38	20130813-85	FO	Pos	1.5+	F18
39	20130813-86	F	Pos	2+	F18
40	20130813-87	F	Pos	1.5+	F5
41	20130813-88	FM	Pos	3+	F110
42	20130813-90	F	Pos	1+	F12
43	20130813-91	F	Pos	1+	-
44	20130813-92	FM	Pos	1+	F35
45	20130813-94	FM	-	-	-
46	20130813-96	FM	Pos	-	F17
47	20130813-97	F	Pos	4+	F600
48	20130813-100	F	Pos	-	F4
49	20130813-101	FM	Pos	-	F13
50	20130813-104	FM	-	-	-
51	20130813-106	F	-	1+	-
52	20130813-108	FM	Pos	-	-
53	20130813-110	F	Pos	1+	-
54	20130813-111	FM	Pos	1+	-
55	20130813-112	FM	-	-	-
56	20130813-113	FM	Pos	4+	F178
57	20130813-115	-	-	-	-
58	20130813-124	FMO	Pos	2+&PM	F18
59	20130813-128	FM	Pos	3+	F14
60	20130813-130	F	-	-	-
61	20130813-131	F	-	1+	-
62	20130813-133	FM	Pos	-	F17
63	20130813-136	FM	-	1+	-
64	20130813-139	F	Pos	1+	-
65	20130813-144	F	-	1+	F20
66	20130813-154	FM	-	-	F2
67	20130813-155	F	Pos	3+	F95
68	20130813-165	F	Pos	4+	F205
69	20130813-167	FMO	-	-	-
70	20130813-171	FM	Pos	2+	F36
71	20130813-175	FMO	Pos	1+	-
72	20130813-177	F	Pos	1.5+	-
73	20130813-178	F	Pos	1+	F25
74	20130813-181	-	-	-	-
75	20130813-183	F	Pos	1+	F18
76	20130813-184	F	Pos	1+	-
77	20130813-188	F	Pos	3+	F45
78	20130813-192	FM	Pos	-	F17
79	20130813-196	FMO	Pos	1+	F150
80	20130813-197	F	Pos	3+	F400
81	20130813-198	FO	Pos	-	F33
82	20130813-201	F	Pos	4+	F476
83	20130813-203	F	Pos	3+	F7
84	20130813-208	FM	Pos	2+ Fsch	FM121
85	20130813-209	FM	Pos	1+	-
86	20130813-211	F	Pos	-	-
87	20130813-216	F	Pos	1+	F30
88	20130813-217	F	Pos	1+	-
89	20130813-220	F	Pos	2+	F24
90	20130813-221	FM	Pos	1+	F14
91	20130813-222	F	-	1+	-
92	20130813-223	FM	Pos	-	-
93	20130813-229	F	Pos	1+	F6
94	20130813-232	FM	Pos	1+	-
95	20130813-233	F	Pos	1+	F12
96	20130813-234	F	Pos	-	-
97	20130813-235	F	Pos	2+	-
98	20130813-240	FM	Pos	2+	F17
99	20130813-245	FM	Pos	1+	F5

100	20130813-253	F	Pos	4+	F625
101	20130813-258	FM	Pos	1+	F140
102	20130813-274	F	Pos	1+	F20
103	20130813-275	FM	Pos	2+	F119
104	20130813-285	F	Pos	1.5+	F52
105	20130813-288	FM	Pos	1+	F25fg1
106	20130813-289	FM	Pos	2+	FM215
107	20130813-297	FMO	Pos	-	F7
108	20130813-307	FM	Pos	-	F3

¹ F = 熱帯熱マラリア; M = 四日熱マラリア; O = 卵形マラリア; V = 三日熱マラリア

² 末梢血厚層塗抹標本のギムザ染色。数値は 200W B C あたりの原虫数、数字の前の記号は、fg=熱帯熱マラリア原虫ガメトサイト、その他の文字は、注¹に同じ

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:

ケニア共和国ピ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

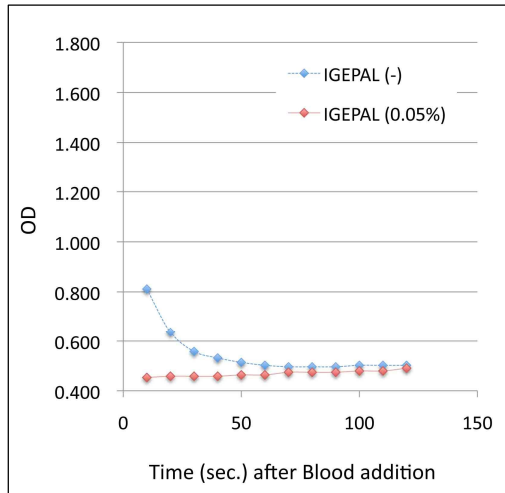


図1．血液添加後の吸光度変化

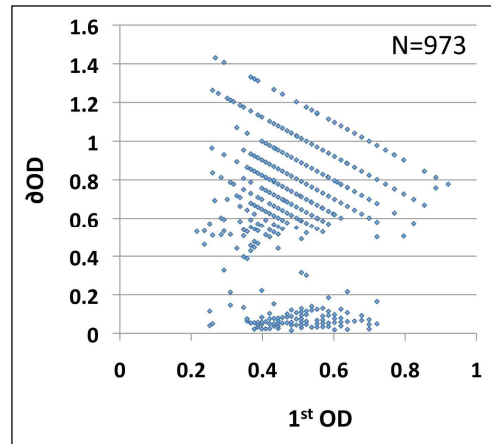


図 3-a. 光電光度計の測定範囲 0～2 による測定結果 (2013 年)

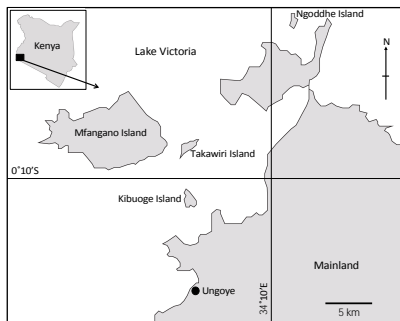


図2．ケニア共和国調査地地図

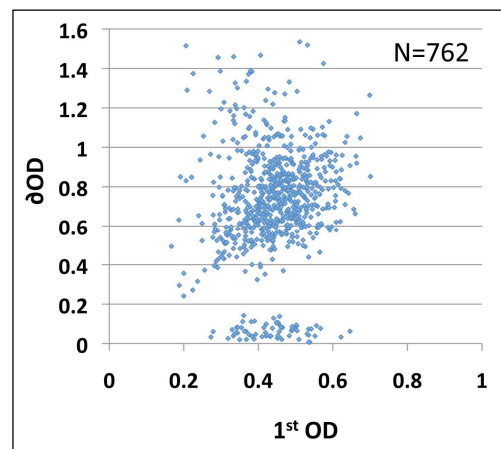


図 3-b. 光電光度計の測定範囲 0～3 による測定結果 (2014年)

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

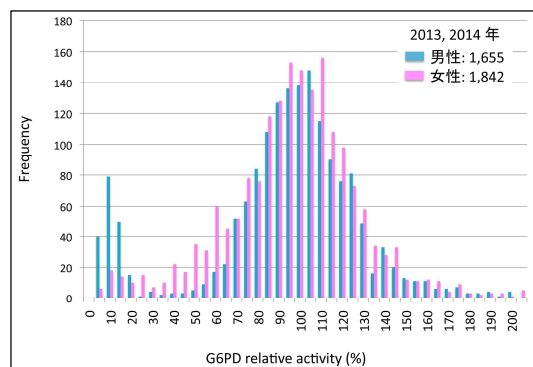


図4. G6PD活性分布 (男女別)

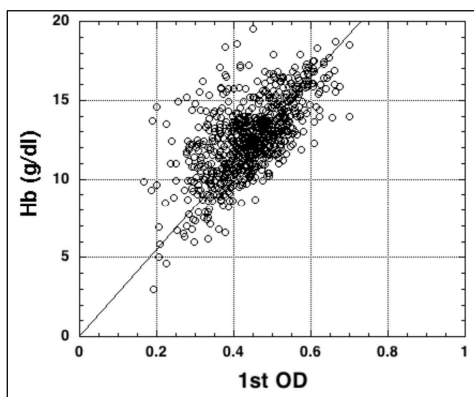


図5. G6PD測定における1st OD値とHb(HemoCue)値の関連

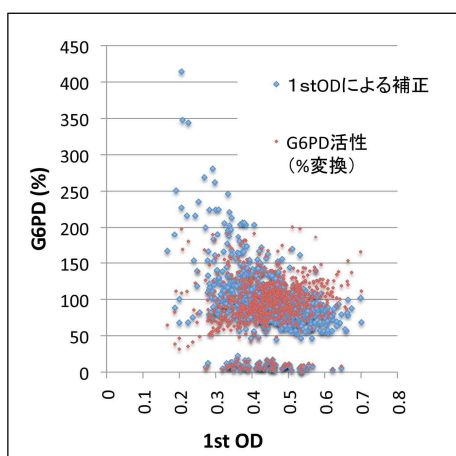


図6. G6PD活性の1st OD値による補正は必要か？(2014年データ)

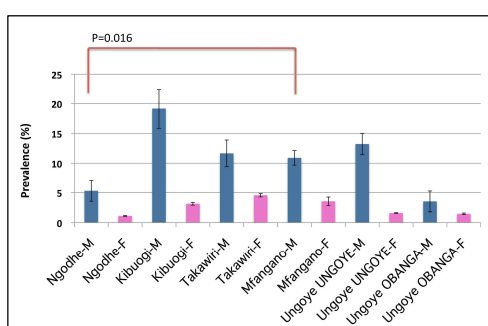


図7. 調査地域別G6PD欠損者の割合

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

前年度採集したマラリア媒介蚊をPCR法で種まで同定し、種によってライトトラップ法とスプレーキャッチ法に違いがあるかを明らかにすることを目的とした。両手法で採集されたガンビエ種群のほとんどが野外指向性が比較的強いと言われている*Anopheles arabiensis*で、*Anopheles gambiae s.s.*はほんのわずかであった。一方、フネスタス種群では、*Anopheles funestus s.s.*と*Anopheles rivulorum*がほぼ同数採集されていた。よって、ライトトラップ法は、野外指向性が比較的強いといわれているアラビエンシスとリブローラムのモニターリングにも有効であることがわかった。

が採集され、2頭のガンビエが採集されて

A. 研究目的

媒介蚊は、原虫の移入や拡散に関与しており、集団治療による撲滅後も媒介蚊のポピュレーション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[1,2]、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、ライトトラップ法(LT)とスプレーキャッチ法(PSC)の採集効率性の比較を前年度に実施した。今年度は、前年度採集したマラリア媒介蚊をPCR法で種まで同定し、種によってLTとPSCに違いがあるかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

25年度にLTとPSCによって採集されたフネスタス種群のメス1951頭、ガンビエ種群のメス586頭のうち、ガンビエ種群は全個体、フネスタス種群は、1935個体のうち時間の関係からLTで採集された540個体のみのPCRによる種同定を試みた[3,4]。現在残りの個体をPCRにより同定中である。

C. 研究結果

ガンビエ種群においては、586頭のうち563頭(96.1%)が*Anopheles arabiensis*(アラビエンシス)で、6頭(1.0%)のみが*Anopheles gambiae s.s.*(ガンビエ)、17頭(2.9%)は、同定不能であった。そのうち、LTでは、292頭のアラビエンシスと4頭のガンビエが採集されていた。一方、PSCでは、271頭のアラビエンシス

いた。

LTで採集されたフネスタス種群540頭のうち、232頭(43.0%)が*Anopheles funestus s.s.*(フネスタス)で、237頭(43.9%)が*Anopheles rivulorum*(リブローラム)、71頭(13.1%)は、種同定ができなかった。

D. 考察

LTとPSCで採集されたガンビエ種群のほとんどがアラビエンシスで、ガンビエはほんのわずかであった。両採集法とも結果がほぼ同じであったことから、この両種に関しては、採集法によって、どちらかが多く採集されやすくなるということはないようである。しかし、ガンビエの数が極端に少ないため、ガンビエの多い場所で再検証をする必要はある。一方、野外指向性が比較的強いと言われているアラビエンシスがどちらの手法でも屋内で多く採集されていることから[5]、これらの採集法はサーベイランスに十分有効であることが示された。

フネスタス種群については、LTで採集された一部の個体しか種同定が終わっておらず、PSCとの比較はできないが、アラビエンシス同様に野外指向性がフネスタスよりも比較的強いと言われているリブローラムが多く採集されていた[6]。LTも、リブローラムにも有効であることが示された。

このように野外指向性が強いと言われているアラビエンシスとリブローラムが多くLTで採集されていることから、単にこの地域に両種が多く生息しているということも考

えられるが[7]、LTのライトが外にいる個体を誘引している可能性もある。フネスタス種群に関しては、フネスタスの個体数も多いので、PSCで採集された個体の同定が終われば、この推測が正しいか検証が可能である。

結論として、LTは、野外指向性が強いといわれているアラビエンシスとリブローラムのモニターリングにも有効である。

- F. 研究発表
- 1. 論文発表
該当なし
- 2. 学会発表
該当なし

文献

[1] 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.

[2] Kawada H, Dida GO, Sonye G, Njenga SM, 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.

[3] Scott JA, Brogdon WG and Collins FH. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Hyg. 49: 520-529.

[4] Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH and Coetzee M. 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. Am J Trop Med Hyg. 66: 4-11.

[5] Githeko, AK, Service MW, Mbogo CM and Atieli FK. 1996. Resting behaviour, ecology and genetics of malaria vectors in large scale agricultural areas of Western Kenya. Parasitologia. 38: 481-489.

[6] Kamau L, Munyekenye GO, Koekemoer LL, Hunt RH and Coetzee M. 2003. A survey of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group of mosquitoes from 10 sites in Kenya with special emphasis on population genetic based on chromosomal inversion karyotypes. J. Med Entomol. 40: 664-671.

[7] Futami K, Dida GO, Sonye GO, Lutiali PA, Mwanja MS, Wagalla S, Lumumba J, Kongere JO, Njenga SM, Minakawa N. 2014. Impacts of insecticide treated bed nets on *Anopheles gambiae* s.l. populations in Mbita District and Suba District, western Kenya. Parasit Vectors. 7:63.

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を行った。本研究は対象地域住民のマラリア検診時に行ったX連鎖伴性劣性遺伝様式の遺伝疾患グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)欠損症の血液検査の結果を参考に、患者に特有な遺伝子変異の解析を行っている。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、酵素活性もタイプ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。昨年度のG6PD欠損症患者検体に続いて、現在は98名の酵素欠損患者、252名の正常住民の検体の解析をおこなっている。本年度はこのうち男性検体（酵素欠損患者25名、正常住民51名）の解析結果について報告する。

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ストレス防御反応において、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これしかいないため、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

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

G6PD*A-タイプの変異(202G/376A)がほぼすべての異常症患者で認められた。これに対してG6PD活性が正常な男性では大部分が、変異の無いG6PD*Bタイプ(202A/376G)であった。しかしそれぞれ5-10%のこれに該当しない症例が存在していた。

D．考察

G6PD*A-は202A,376Gの2か所に変異が認められるタイプであり、酵素活性が8-20%に低下し欠損症を呈すると考えられている。しかし今回5.9%(51例中3例)の症例で活性の75%以上が維持されていた。またG6PD*Bタイプの12%(25例中3例)の症例がG6PD活性の著しい低下を認めた。この結果は202A,376G以外にG6PD活性に重要なSNPが存在する可能性を示唆するものである。

E．結論

G6PD活性がどの程度202A/376Gにより規定されるか、またその他のSNPの関与について、更なる検討を行う必要が有る。その際、Heterozygousが存在する女性サンプル用いてより詳細な検討を行う予定である。

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：アフリカ・マラリア対策史序説

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

20世紀後半のアフリカにおけるマラリア対策史の検討が、プロジェクト全体の中で私に与えられた課題である。本研究では、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を持った点にある。

A．研究目的

20世紀後半のアフリカにおけるマラリア対策の変遷を、歴史的に考察することが中期的な研究課題であるが、今回は、主に1950年代の前半に焦点を合わせて、サブサハラ・アフリカにおけるマラリア対策と、WHOが1955年に開始した「世界マラリア撲滅計画（Global Malaria Eradication Programme）」との関連を明らかにしようとした。

B．研究方法

主に、WHO関連の文書と二次資料（研究書）を使う文献研究。

（倫理面への配慮）
必要なし。

C．研究結果

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を持った点にある。

D．考察

こうした研究結果に、サブサハラ・アフリカにおけるマラリア対策の困難性が現れている。

E．結論

今後、1960年代以降のアフリカにおけるマラリア対策の変遷を、WHOの文書を資料として、検討する必要がある。

F．研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

マラリア対策とアフリカ - 「マラリア撲滅計画」開始前後（1955年）まで

脇村孝平（大阪市立大学）

目次

1. はじめに
2. アフリカとマラリア
3. マラリア対策の方法
4. アノフェレス・ファクターとヒューマン・ファクター
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
8. 補論：Mass Drug Administration の起源

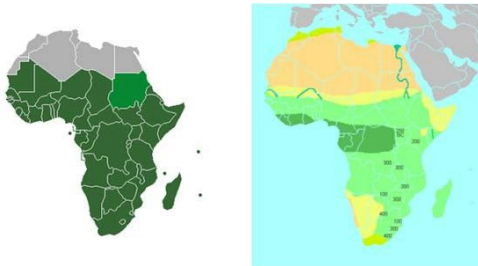
はじめに

- 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。
- かかる二つのアプローチは、単なる技術的な方法の違いだけではなく、マラリア対策が有する社会に対する姿勢の違いを反映している。
- マラリア撲滅計画（1955-1969）は、アフリカとどのように関わったのか？

アフリカとマラリア

- 2012年で、世界のマラリア罹患患者（約2億700万人）のうち、80%がアフリカから、また世界のマラリアによる死者のうち、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。
 - 金子明先生の取り組み。
- 以上は、WHOのHPより

サブサハラ・アフリカ 気候帯



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)
 - DDT, BHC etc.
 - bed net
 - ITN (insecticide-treated bed net)
 - LLIN (long-lasting insecticide-treated bed net)

マラリア対策の方法

- 寄生虫（原虫）への対策
 - ・ quinine
 - ・ chloroquine
 - ・ pyrimethamine
 - ・ primaquine
 - etc
 - ・ artemisininine
 - ・ artemisininine combination therapy (ACT)
 - ・ Mass Drug Administration, MDA（大規模薬剤投与）
 - ・ ワクチン
- 検査法
 - ・ Rapid Diagnostic Test (RDT)

アノフェレス・ファクターとヒューマン・ファクター

アノフェレス・ファクター重視

- ロナルド・ロス
- 媒介生物（アノフェレス）への対策
- 'Mosquito Brigade'

ヒューマン・ファクター重視

- S.W.W. スティーブンス、S.R. クリストファズ、S.P. ジェームズ
- 寄生虫（マラリア原虫）への対策
- 隔離（Segregation）
あるいは
キニーネ投与

アノフェレス・ファクターとヒューマン・ファクター

- ロスの「発見」以降、病因論において媒介生物＝アノフェレスの存在が重視されるようになった。
- インドのみならず、英領植民地全般に言えることだが、現地社会への介入を好まない傾向もあって、イギリスの熱帯医学は媒介生物の研究に傾く傾向があった。ただし、その実践が成功した例があるかと言えば、英領マレーを除くとほとんどなかった。



ロス夫妻、カルカッタにて(1898年)

アノフェレス・ファクターとヒューマン・ファクター

- ローベルト・コッホ (1899-1900 - 独領ニューギニア)
 - ドイツ人ローベルト・コッホのマラリア研究に端を発している。彼は、人間の体内にあるマラリア原虫に注目し、血液検査による患者の発見とキニーネの投与による治療を重視した。媒介生物の駆除より人間の治療に専念するという方法論に帰結した。コッホは、独領ニューギニアでこの方法を実践した。
- S.W.W. スティーブンスと S.R. クリストファーズ (1899-1900)
 - 20世紀初頭の西アフリカで、S.W.W. スティーブンスと S.R. クリストファーズが採った立場。彼らは、アノフェレスの生態に関する昆虫学的な研究を深化させて、アノフェレスの幼虫の処理はそれほど容易ではないと考えるに至った。むしろ人間の側の条件における変化、すなわち隔離もしくはキニーネによる治療にマラリア対策の可能性を求めた。このうち隔離は、実際に英領西アフリカにおいて実践された。しかし、キニーネによる治療は、財政的な問題や現地社会への介入を忌避する傾向もあって実効をあげたとは言えない。
 - 隔離を主張したのは、「原住民の子供たち (native children)」が感染源であるとしたのである。他方、成人からは原虫が発見されなかった。事実上、獲得免疫 (acquired immunity) の問題に突き当たっていたのである。この問題は、後で敷衍したい。



コッホ、ニューギニアにて(1900年)

アノフェレス・ファクターとヒューマン・ファクター

国際連盟保健機構・マラリア委員会

- ・ヒューマン・ファクター
- ・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。

ロックフェラー財団

- ・アノフェレス・ファクター
- ・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）。

14

マラリア撲滅計画

- ・ GMEP (Global Malaria Eradication Programme) 期 (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) : アノフェレス・ファクター対策中心
- ・ 垂直的 (vertical) アプローチ

15

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
- ・ しかし、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』）

16

マラリア撲滅計画とアフリカ

- ・ 1950 年 第一回アフリカ・マラリア会議 (Kampala) : WHO and The Commission for Technical Cooperation in Africa South of the Sahara
- ・ 論争的な状況（特に、農村の状況をめぐって）
 - ・ 介入（この場合、主たる手段は IRS ではあるが）が中途半端であれば、獲得免疫 (acquired immunity) を喪失させて、逆にマラリア罹患を悪化させる。
 - ・ 子供の罹患のコストは無視しえない。
 - ・ 疫病的なマラリア（特に、高地で起こりやすい）に対する介入には、異論は無かったが、'holoendemic' な地域に関して、意見の対立があった。
 - ・ 都市のマラリアに関して、IRS による介入の効果（特に経済的効果）に異論は少なかった。

17

マラリア撲滅計画とアフリカ

- ・ 1955 年 第二回アフリカ・マラリア会議 (Lagos, Nigeria)
- ・ サブサハラ・アフリカでは、いわゆる GMEP (Global Malaria Eradication Programme) に加わらないことを示唆。
- ・ This conference considered that 'the physical, economic and developmental difficulties in Africa, combined with the high endemicity and prolonged transmission, justify the temporary exclusion of African south of the Sahara from the general proposals on the eradication of malaria made by the eight World Health Assembly' (Report of the Second African Malaria Conference, 1956)

18

おわりに

- ・ 「マラリア撲滅計画」期の熱帯アフリカにおける教訓
 - ・ 垂直的アプローチの限界
 - ・ 現地社会の協力の不足
 - ・ 労働移動の影響
 - ・ 獲得免疫の問題
 - ・ 薬物耐性の問題
 - ・ 社会的アプローチの必要性
 - ・ 「健康の社会的決定要因 (social determinants of health) 」
- ・ アフリカにおける Mass Drug Administration の散発的な試み
 - ・ 失敗

補論：Mass Drug Administration の起源

- 20 世紀前半のイタリアの事例があるが、ここでは省略する。
- 台湾
 - 「对人的防遏法」：コッホの方法の踏襲。
 - 1905 年（明治 38 年）、台湾南部の甲仙埔にて実験的に導入。コッホ氏の「グラム予防法」、同地住民 3500 人を対象
 - 1909 年（明治 42 年）、台北府北投にて、約 1600 人の検血および脾腫検査。判明したマラリア患者に、キニーネの投与
 - 1911 年（明治 44 年）、総督府は、对人的防遏法の全面的採用を決定。台湾各地の流行地域（北投、花蓮港、璞石閣、鳳山街、阿緜）で開始

補論：Mass Drug Administration の起源

- 台湾（続き）
 - 1913 年（大正 2 年） 「マラリア防遏規則」
 - 警察の関与と保甲制度の利用（マラリア流行地域と指定された場合、警察官と保・甲の役員は、住民をして検血とキニーネの服用を受けさせるために、大きな役割を果たした）
 - 実績
 - マラリア防遏地域：1913 年（大正 2 年） 118 箇所
1941 年（昭和 16 年） 216 箇所
 - 一年間の検血延人数：1941 年 360 万人
 - マラリアによる死亡率（1 万人当たり）：1916 年（大正 5 年） 32.3 1927 年（昭和 2 年） 12.0

参考文献

- 脇村孝平「アノフェレス・ファクターとヒューマン・ファクター - 植民地統治下のマラリア防遏:インドと台湾」見市雅俊他編『疾病・開発・帝国医療 - アジアにおける病気と医療の歴史学』東京大学出版会、2001 年。
- WHO, *Eliminating Malaria: Learning from the Past, Looking Ahead*, Progress & Impact Series, Number 8, 2011.
- José A. Nájera, Matiana González-Silva and Pedro L. Alonso, 'Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969)', *PLoS MEDICINE*, Vol. 8, I. 1, 2011.
- James L.A. Webb, Jr., *The Long Struggle against Malaria in Tropical Africa*, New York: Cambridge University Press, 2014.

分担研究報告書

西ケニアにおける *K13-propeller* 遺伝子の多型解析

分担研究者：五十棲 理恵 大阪市立大学

研究要旨

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 Arieley らによって報告された。この報告を受けて私達は西ケニアで熱帯熱マラリア原虫 *K13-propeller* 遺伝子多型解析を行い 4 種の非同義置換と 5 種と同義置換を確認した。

A. 研究目的

本研究の研究代表者が計画するピクトリア湖島嶼マラリア撲滅に向けた集団治療という介入に関連して、対象地域のマラリア原虫の薬剤耐性関連遺伝子の変遷を観察、解析するという目的を有する。ケニアでは 2004 年から Artemisinin-based-combination therapies (ACTs) が熱帯熱マラリアを治療する際、第一選択薬として推奨されている。しかしながら、近年、カンボジアでは ACTs の感受性低下を示す症例が多数報告されており、*K-13 propeller* の遺伝子変異との関連が指摘された (*N Engl J Med* 2009, A.M.Dondorp et al., *Nature* 2014, F. Arieley et al.)。現段階でケニアにおける明らかなアルテミシニン耐性株の分離はなされていないが、今後の出現に備えて、分子疫学的な評価を行う必要があると考える。

B. 研究方法

[研究材料]

- a. 研究フィールド：ケニアのピクトリア湖島嶼及び沿岸 (Ngodhe 島、Kibuogi 島、Takawiri 島、Mfangano 島及び沿岸の村落 Ungoye)
- b. 期間：2012 年 1-2 月、8 月、2013 年 8 月、2014 年 3 月、8 月、以後も年 2 回で行う予定

[方法]

対象地域の住民にマラリア調査を行うことを周知し、参加希望者にはインフォームドコンセントを行い、同意を得て濾紙採血、G6PD Assay Kit-WST 検査を行った。

血液濾紙は後日まとめて DNA 抽出を行った (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN)。加えて、マラリア原虫の有無と種の同定を行うためマラリア原虫 MtDNA の検出を PCR 法で行った。

K13-propeller 遺伝子の多型解析は サンガー法を用いて決定した。
同遺伝子の 440 位以降の塩基配列を

C. 研究結果

Table 1. The prevalence of *Plasmodium falciparum* as determined by PCR and analyzed number of the K-13 propeller gene in Mbita district, Kenya, 2012-2013.

time	place	total , no.	PCR positive, no (%)*	K-13 propeller gene analyzed, no.
February 2012	Kibuogi	130	34 (26.2)	21
	Ngodhe	250	18 (7.2)	5
	Takawiri	250	34 (13.6)	19
	Mfangano	427	202 (47.3)	138
	Ungoye	250	96 (38.4)	69
August 2012	Kibuogi	195	17 (8.7)	10
	Ngodhe	232	36 (15.5)	18
	Takawiri	230	15 (6.5)	9
	Mfangano	706	222 (31.4)	145
	Ungoye	248	104 (41.9)	65
August 2013	Ungoye	250	160 (64)	40

*PCR detected *Plasmodium falciparum* only.

Table 2. Observed mutations in the K-13 propeller gene in *Plasmodium falciparum* from Mbita district, Kenya, 2012-2013.

	amino acid change location	and genetic change	time		
			February 2012 Site (no. isolates)	August 2012 Site (no. isolates)	August 2013 Site (no. isolates)
Non synonymous mutations	M442V	atg gtg		Mfangano (1)	
	N554S	aat agt	Ungoye (1)		
	A569S	gca tca			Ungoye (1)
	A578S	gct tct	Mfangano (4)	Mfangano (1)	
Synonymous mutations	C439C	tgc tgt	Ungoye (2)		
	S477S	tct tcg	Takawiri (1)		
	Y500Y	tat tac		Mfangano (1)	
	N531N	aat aac			Ungoye (1)
	G538G	ggt gga	Mfangano (3)		

D. 考察

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遺伝子はその耐性に関連していることがAriey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（Kibuogi, 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2012-2013年にかけて展開しており、同時期に収集したサンプルを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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Isozumi, R.; Uemura, H.; Kimata, I.; Ichinose, Y.; Logedi, J.; Omar, A. H.; Kaneko, A., Novel mutations in K13 propeller gene of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Emerg Infect Dis* **2015**, *21*, (3), 490-2.

2. Isozumi, R.; Fukui, M.; Kaneko, A.; Chan, C. W.; 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* **2014**.

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-2)」

木俣勲、木村 政継、五十棲 理恵、Md Idris Zulkarmain、Chan Chim W、Kongere James、Omar Ahmedeen、金子明。

第84回日本寄生虫学会総会

2. 「Novel point mutations were observed in the *Plasmodium falciparum* K13-propeller gene of an artemisinin-resistant candidate in western Kenya.」

Rie Isozumi, Haruki Uemura, Isao Kimata, Masatsugu Kimura, Yoshio Ichinose, John Logedi, Ahmeddin H. Omar, Akira Kaneko

第84回日本寄生虫学会総会

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Isozumi R, Uemura H, Kimata I, Ichinose Y, Logedi J, Omar AH, Kaneko A.	Novel mutations in K13 propeller gene of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum.	Emerging Infectious Diseases	21(3)	490-2	2015
Chan CW, Sakihama N, Tachibana S, Lum JK, Tanabe K, Kaneko A.	Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum at the Crossroads of Exchange among Islands in Vanuatu: Implications for Malaria Elimination Strategies.	PLos One	10(3)	e0119475	2015
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.	Parasitology international	64(3)	304-8	2015
Watanabe N, Kaneko A, Yamar S, Leodoro H, Taleo G, Tanihata T, Lum JK, Larson PS.	Determinants of the use of insecticide-treated bed nets on islands of pre- and post-malaria elimination: an application of the health belief model in Vanuatu.	Malaria Journal	13	411	2014