

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26360029

研究課題名(和文)なぜ特定の集団だけにサルマラリア感染を含めたマラリア感染が集中しているか

研究課題名(英文) Why malaria infections including non-human primate malaria infection occurred in specific group

研究代表者

前野 芳正 (Maeno, Yoshimasa)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：70131191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では特定の集団にマラリア感染が集中しているかを解析するため、媒介蚊とヒトとその行動を解析した。

伝播の中心である蚊の解析では、ヒトマラリアおよびサルマラリア原虫が検出された。検出された原虫は単種感染および2種類以上の混合感染が認められた。混合感染例ではヒトマラリアとサルマラリア原虫の混合感染も認められた。検出されたマラリア原虫を、ヒトサンプルから検出された原虫や住民の生活パターンと重ね合わせた結果、森林内で捕集された蚊と感染住民におけるマラリア原虫の遺伝的特徴が符合していた。また、森林内で活動を行う住民の生活様式が媒介蚊における感染実体が符合し、森林内での行動が問題であった。

研究成果の概要(英文)：Recent molecular epidemiological studies in Vietnam have reported cases of co-infection with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, and *P. knowlesi* in *An. dirus*. The commonly found macaques in the forest in the forested areas are suspected to be bitten by the same *An. dirus* population that bites humans. Our epidemiological study identified six species of malarial parasites in sporozoite-infected *An. dirus* using PCR, of which *P. vivax* was the most common, followed by *P. knowlesi*, *P. inui*, *P. cynomolgi*, *P. coatneyi*, and *P. falciparum*. Based on a gametocyte analysis, the same allelic gametocyte types were observed in both humans and mosquitoes at similar frequencies. These observations suggest that people who stay overnight in the forests are frequently infected with both human and non-human primate malarial parasites, leading to the emergence of novel zoonotic malaria. Moreover, it is suggested that mosquito vector populations should be controlled and monitored closely.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 住民 媒介蚊 サルマラリア 疫学調査 分子生物学 サルマラリア原虫 ベトナム

1. 研究開始当初の背景

東南アジアに広くみられる「森林マラリア」は、マラリア原虫を媒介する蚊がヒトの居住地に現れることなく森林に潜んでいることより、「都市マラリア」に対する対策と同様な対策を実施しても効果が希薄となっている。このことが東南アジアにおいてマラリアが根絶できない主要な要因となっている。このため新しいマラリア対策が求められている。かかる状況において、2004年より、顕微鏡などでは四日熱マラリア原虫のように見えるにもかかわらず、急激に血中の原虫数が増え、場合により死亡するような症例がインドネシアのボルネオ島をはじめ、東南アジア各国で見られるようになった。遺伝子診断の結果、驚くべきことに、これらは良性の四日熱マラリア原虫ではなく、普段はサルに感染しているサルマラリア原虫の一種である *Plasmodium knowlesi* のヒト自然感染というマラリア学の常識を変えるような事象であることが判明した。申請者らの研究組織もベトナムやラオスにおいて類似の事例を発見し、報告を行っている。このような獣共通感染性・サルマラリア原虫とヒトマラリア原虫の森林マラリアとしての様相は明らかになっていないため、有効なマラリア対策がなされていない。

2. 研究の目的

近年、新たに拡大が懸念されている人獣共通感染性・サルマラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi*) は東南アジアにおける新興感染症として注目をされ、マラリア根絶への障害となっている。また、*P. knowlesi* 以外のサルマラリア原虫においてもヒトへの自然感染の可能性が推測されている。かかる状況において「なぜ特定の集団だけにサルマラリア感染を含めたマラリア感染が集中しているか」を、人類学的および分子疫学的現地調査、すなわち住民および媒介蚊の行動とそれぞれの保有するマラリア原虫の調査を通し、森林型マラリアにおけるマラリア伝播の実態について科学的に理解を深め、「森林マラリア」に特化したマラリアコントロールの提案を目指す。

3. 研究の方法

調査研究期間を段階的に分け、分子疫学的調査(ヒトおよび媒介蚊のマラリア原虫感染各種調査、生殖母体の解析調査)と住民の各種行動などの調査を同時並行して行った。

最初は Active case detection (ACD) と Passive case detection (PCD) によって全体像を把握した。得られた結果から頻回に感染する集団とそうでない集団に分け、相違点の把握を行った。この解析結果を研究集会で発表し、各種専門家の意見を聴取し、目的に沿ったデータ取得を行うべく修正した。

次に、全体像の把握から修正された方法に沿い、標的とすべき集団の絞り込みを行い、

より綿密な行動調査、分子疫学的調査を行った。調査結果をまとめ、修正を行い、前年と同様な工程を経て調査を進め、複雑な多角的な科学的データを理解、解析を行った。

4. 研究成果

ヒトの行動調査

調査対象地区住民の日常の行動調査を行った。その結果、住民は大きく分け、村の中に定住し、森林地域で作業をしない集団と森林内及びその周辺で耕作や採集作業を行う集団の2つの集団に分けられた。森林地域で作業を行わない集団ではマラリア感染はなく、森林地域で作業を行う集団にマラリア感染が認められた。

森林周辺で作業を行い、かつマラリア感染が認められた住民は、家族あるいは少人数で森林内に簡易施設(図1)で宿泊を伴う作業に従事していることが行動調査によって判明し、主な感染、伝播の場所は森林地域であり、そこでのヒトの行動に起因していることが推測された。



図1

媒介蚊 (*Anopheles dirus*) の感染状況解析

媒介蚊の検討を行った。調査地におけるマラリア媒介蚊は *Anopheles dirus* であった(図2)。

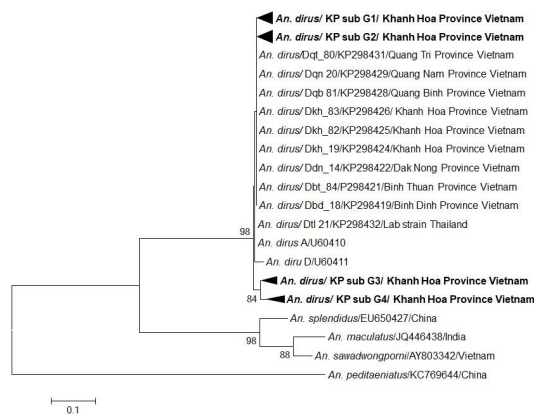


図2. 調査地で捕集した媒介蚊の種の解析結果。

蚊からのスポロゾイトの検出率(感染率)は1.5%であった。この感染率は調査地と同じベトナム中部の隣接地区あるいは他地域と比べると高値であった。

スポロゾイト陽性120検体中71検体が1種類のサルマラリア原虫単独感染であり、44検体が2種類以上の混合感染であった。サルマラリア原虫感染が認められた59検体中25検体が1種類のサルマラリア原虫単独感染であり、その他は混合感染であった。その中でも、三日熱マラリア原虫との混合感染は29

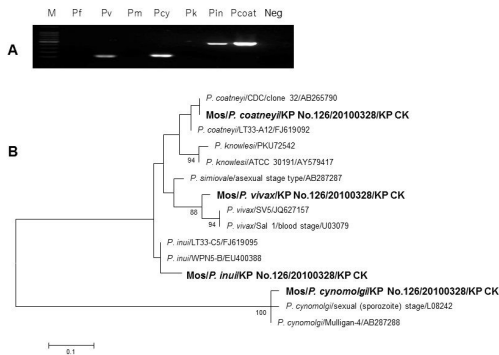


図 3. 調査地域で採集された 1 匹の *Anopheles dirus* より検出されたマラリア原虫 (三日熱マラリア原虫、*Plasmodium coatneyi*, *P. inui* および *P. cynomolgi*) の混合感染例。A は PCR 産物のアガロース電気泳動解析結果。B は PCR 産物の塩基配列系統樹解析結果。

表 1. PCR 解析による媒介蚊 (*Anopheles dirus*) のマラリア原虫感染結果。

Infection	<i>Plasmodium</i> spp.	No. of mosquitoes infected
Single (71)	Pf	15
	Pv	34
	Pk	4
	Pct	7
	Pcy	6
	Pin	5
Double (30)	Pf, Pv	5
	Pf, Pin	1
	Pv, Pk	15
	Pv, Pcy	3
	Pv, Pin	3
	Pk, Pin	3
Triple (13)	Pf, Pv, Pk	6
	Pf, Pv, Pin	1
	Pv, Pk, Pcy	1
	Pv, Pk, Pin	2
	Pv, Pct, Pin	1
Quadruple	Pv, Pct, Pcy, Pin	1
No. of PCR-positive		115
No. of PCR-negative		5
Total no. of examined sporozoite-positive		120

Pf = *P. falciparum*, Pv = *P. vivax*, Pk = *P. knowlesi*, Pct = *P. coatneyi*, Pcy = *P. cynomolgi*, Pin = *P. inui*

検体、9 検体は熱帯熱マラリア原虫が認められた (図 3、表 1)。

・媒介蚊の活動時間の調査結果

調査区の媒介蚊 (*Anopheles dirus*) の活動時間を解析した。その結果としてとして 2 峰性 (午後 10 時 ~ 11 時の間、午前 0 時 ~ 2 時の間に) のピークを認めた (図 4)。この結果とヒトの行動様式とを合わせると、森林内における夜間の行動様式において活発な時間及び就寝後のヒトの睡眠様式と一致する傾向が認められ、ヒトの主な感染時間は日没

直後から始まり、就寝するまでの間であることが示唆された。

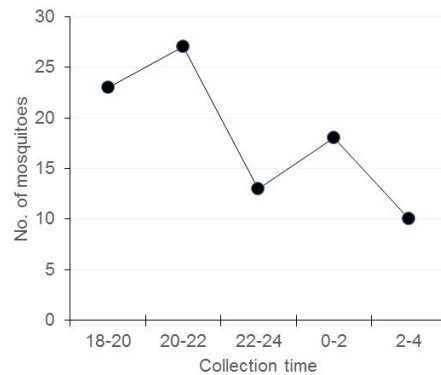


図 4. 森林内で捕集された媒介蚊の活動状況。

ヒトに感染しているマラリア原虫生殖母体特異遺伝子 mRNA の発言と多型の解析、および媒介蚊におけるそれらとの相違に関する解析結果。

・*P. knowlesi* 生殖母体特異 mRNA (*pks25*) 検出のための基礎的検討：

ニホンザルの *P. knowlesi* H strain (ATCC No. 30158) 感染血液を材料として *pks25* mRNA の検出感度と特異性を評価した。RT-PCR から nested RT-PCR へ測定系を改変したことにより、1 μ l 中数個のガメトサイトまで検出でき、特異性も高い測定系の構築ができた。

ヒト血液サンプルの解析結果：

・マラリア原虫の感染種の解析
調査地区では、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、*P. knowlesi* および少数の四日熱マラリア原虫の単感染あるいは混合感染が検出されたが、卵形マラリア原虫は検出されなかった。また、*P. knowlesi* 単感染は認められなかった。

・マラリア原虫伝播の指標としての生殖母体の特異 mRNA 解析

感染実験材料から *pks25* mRNA の特異的検出が可能となったので、フィールド材料の解析を進めた。

熱帯熱マラリア原虫感染ヒト血液サンプル中 36%、三日熱マラリア原虫 62%、*P. knowlesi* 47% にガメトサイト特異 mRNA の発現を認めた。この結果から、*P. knowlesi* の感染が、サルからヒトへの感染の他、ヒト集団内でヒト-ヒト感染も起きていることが推測された。

検出された生殖母体特異 mRNA の塩基配列解析から *pfg377* と *pvs25* においてはそれぞれ 2 種のアレルが認められたが、*pks25* では複数のアレルを認めなかった。検出された *pfg377* および *pvs25* のアレルの種は、我々のこれまでのタイ、ベトナムにおける調査や、他地域の報告に比べ、かなり少なく、また同一家族内においても、検出され

たアレルの種は限定的であった。

検出されたアレルの解析より、調査地区であるカンホア省・カンフー行政区における“森林マラリア”の特徴は、森林辺縁でマラリアに感染する機会より森林の奥で感染する機会の方が高い傾向が認められた(図5)。これは地域住民が村内ではマラリア感染をしないというこれまでの解析結果、森林内で作業をするヒトは家族単位で長期間森林内に留まるといったヒトの行動様式と一致していた。

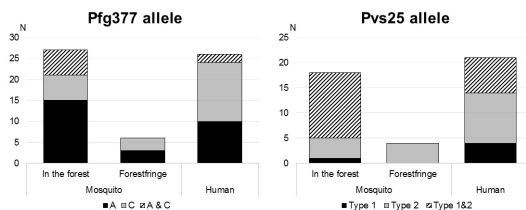


図5. ヒトおよび媒介蚊から検出された生殖母体の多型の比較。

上記の結果は、現在東南アジアにおいて問題となっている薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性を示す該当遺伝子の変異を解析しても同様な結果を得た。

これらの結果より、調査地では媒介蚊より *P. knowlesi* 以外のサルマラリア原虫とヒトマラリア原虫との混合感染を認めた。このため、サルマラリア原虫のヒト-サル間での感染が起こる可能性が考えられた。

調査地を含めた東南アジアにみられる「森林マラリア」は以下のヒトの行動様式が本研究課題の解析結果より示唆された。最も感染リスクが示唆されたヒトの行動様式は、村内での行動様式ではなく、森林内あるいは森林周辺で耕作や森林作業を行うため、作業地において簡易宿泊施設で宿泊をすることが感染・伝播の危険因子として考えられた。殊に、宿泊を伴う森林内での活動を行う家族や少人数グループがマラリアの供給者となっていることが明らかとなった。また、森林内での宿泊を伴う活動において、蚊に対する防衛策が不完全な状況であること。森林内(あるいは周辺)での宿泊を伴う作業の期間の長さが感染率と相関していた。

本研究課題の「なぜ特定の集団だけにサルマラリア感染を含めたマラリア感染が集中しているか」の結論として、主に家族を中心とした特定の集団内で伝播が成立していた。これは、宿泊を伴う森林内(あるいは周辺)での作業というヒトの行動様式に起因していることが示唆された。

また、マラリア伝播において、ヒト-サル間だけで完結しているのか、サル-ヒト-サル間やヒト-ヒト間など伝播サイクルが成

立するののかによって感染拡大の状況の影響が懸念され、流行拡大の防止のために自然界における伝播サイクルを明らかにしていく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Maeno Y. Molecular epidemiology of mosquitoes for the transmission of forest malaria in south-central Vietnam. *Trop Med Health.* 2017; 45:27. (査読有)
doi:10.1186/s41182-017-0065-6

Maeno Y., Quang NT, Culleton R, Kawai S, Masuda G, Hori K, Nakazawa S., Marchand RP. Detection of the *Plasmodium falciparum* Kelch-13 gene P553L mutation in sporozoites isolated from mosquito salivary glands in South-Central Vietnam. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):308. (査読有)
doi: 10.1186/s13071-017-2247-9.

Maeno Y., Culleton R, Quang NT, Kawai S, Marchand RP, Nakazawa S. *Plasmodium knowlesi* and human malaria parasites in Khan Phu, Vietnam: Gametocyte production in humans, and frequent co-infection of mosquitoes. *Parasitology.* 144(4): 527-535. 2016. (査読有)
doi:10.1017/S0031182016002110.

Maeno Y., Quang NT, Culleton R, Kawai S, Masuda G, Nakazawa S., Marchand RP. Humans frequently exposed to a range of non-human primate malaria parasite species through the bites of *Anopheles dirus* mosquitoes in South-central Vietnam. *Parasit Vectors.* 8:376. (査読有)
doi: 10.1186/s13071-015-0995-y. 2015.

Kawai S, Sato M, Kato-Hayashi N, Kishi H, Huffman MA, Maeno Y., Culleton R, Nakazawa S. Detection of *Plasmodium knowlesi* DNA in the urine and faeces of a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. *Malar J.* 13:373. (査読有)
doi: 10.1186/1475-2875-13-373. 2014.

Abkallo HM, Liu W, Hokama S, Ferreira PE, Nakazawa S., Maeno Y., Quang NT, Kobayashi N, Kaneko O, Huffman MA, Kawai S, Marchand RP, Carter R, Hahn BH, Culleton R. DNA from pre-erythrocytic stage malaria parasites is detectable by PCR in the faeces and blood of hosts. *Int J Parasitol.* 44:467-473. 2014. (査読有)

doi: 10.1016/j.ijpara.2014.03.002.

〔学会発表〕(計 6 件)

前野芳正, 媒介蚊から見た森林マラリア伝播の分子疫学的研究. 第 57 回日本熱帯医学会大会、2016、東京.

前野芳正, Richard Cullenton, Nguuyen Tuyen Quang, 川合 覚, 伊藤 誠, Ron P. Marchand, 中澤秀介. ベトナム南部における媒介蚊から見た森林マラリア伝播の分子疫学的研究. 第 84 回日本寄生虫学会大会、2015、東京.

前野 芳正, Cullenton Richard, Quang Nguuyen Tuyen, 川合 覚, 伊藤 誠, Marchand Ron P, 中澤 秀介. ベトナム南部におけるスポロゾイトから見た森林マラリア伝播の分子疫学的研究 第 83 回日本寄生虫学会大会、2014、愛媛県

Abkallo HM, Liu W, Hokama S, Ferreira PE, Nakazawa S, Maeno Y, Quang NT, Kaneko O, Huffman MA, Kawai S, Marchand RP, Carter R, Hahn BH, Culleton R. DNA from pre-erythrocytic stage malaria parasites is detectable by PCR in the faeces and blood of hosts. 第 83 回日本寄生虫学会大会、2014、愛媛県

Kawai S, Sato M, Maeno Y, Nakazawa S, Xangsayarath P, Pongvongsa T, Mori Y, Moji K, Kano S. Performance of a New LAMP Kit in Community-wide Screening of Asymptomatic Malaria. The 8th National Health Research Forum; Vientiane, Lao PDR. 2014.

Huffman MA, Satou M, Kawai S, Maeno Y, Kawamoto Y, Quang NT, Nakazawa S, Marchand RP. The Current Situation of Monkey Malaria (*Plasmodium knowlesi*) in Khanh Phu, Vietnam. The XXV congress of the International Primatological Society; Hanoi, Vietnam. 2014.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前野 芳正 (MAENO, Yoshimasa)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：70131191

(2)研究分担者

中澤 秀介 (NAKAZAWA, Shusuke)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：20180268

高木 秀和 (TAKAGI, Hidekazu)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号：90288522

(3)連携研究者

(4)研究協力者

川合 覚 (KAWAI Satoru)
益田 岳 (MASUDA Gaku)
新江 利彦 (SHINE Toshihiko)
Nguuyen Tuyen Quang
Richard Culleton
Ron P. Marchand
Michael Alan Huffman
Vu Duc Chinh
Vu Viet Hung