
アジア太平洋島嶼マラリア地帯における人類および原虫多型と

抗マラリア剤治療効果

Human and malaria parasite diversities in relation to the therapeutic efficacy of antimalarials on islands in the Asia and Pacific

(課題番号 13576030)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金

基盤研究(B)(2) 研究成果報告書

平成16年3月



研究代表者 金子 明

(東京女子医科大学医学部・助教授)

AKIRA KANEKO, M.D., PH.D.
Tokyo Women's Medical University

目次

はしがき	1
研究組織	3
研究経費	3
研究発表リスト	4
(1) 原著論文	4
(2) 学会発表	5
(3) 出版物・総説	10
研究成果要約	11
(1) 和文要約	11
(2) Summary	13
(3) Future perspectives	14
(4) References	15
研究成果資料	17
(1) 論文	
(2) 新聞報道記事	

はしがき

島嶼マラリア:多様性と対策戦略

マラリアは今尚人類の主要な死因である。地球規模問題として様々な取り組みが進むが、その対策においては個々の流行地域の生物学的、生態疫学のおよび社会文化的特性に即した戦略が必要であろう。一方、マラリア伝播サイクルに関わる人間、原虫、および媒介蚊の多様性が明らかにされてきた。環境に応じ進化学的に変異してきた結果が、現在の地理的差異として認められ、対策要因に影響を及ぼしている。現人類の起源は、約 15 万年前のアフリカに遡れると推定されているが、この年代が現在の熱帯熱マラリア原虫の起源にも適応されることを最近のゲノム・ワイドな SNP およびマイクロサテライトの解析が示唆している。その起点から現在まで、およそ人類 7500 世代、マラリア原虫 45 万世代が経過したことになるが、この間に構築された様々な変異を我々は多様性として捉えている。

海洋に阻まれた島嶼は人類が最後に行き着いたところといえる。少なくとも 4 千年前まではポリネシアにはだれも住んでいなかった。現在の太平洋人類集団には顕著な dichotomy が認められ、その一方の典型はメラネシアのニューギニアである。4 万年前に基本的に大陸から徒歩で渡った (Near Oceania)、非オーストロネシア語 (パプア語) を話し、betel nuts を愛好する集団であり、マラリア感染をみる。もう一方がポリネシアで、3500 年前以降に東南アジア島嶼部から航海により出発した (Remote Oceania)、オーストロネシア語を話しラピタ土器を作った、kava を愛好する集団であり、マラリア感染はない。島嶼におけるマラリアの分布はアフリカからマダガスカル、インドネシア、フィリピン、ニューギニアを経てメラネシア島嶼に分布しヴァヌアツで終わる。太平洋においては Buxton 線 (東経 170 度、南緯 20 度) 南東のフィジー、ニューカレドニアおよびポリネシア全域にはハマダラカ属蚊が生息しない為にマラリア伝播はない。後続 Remote Oceania 集団が拡散してきたとき、先住 Near Oceania 集団とどの程度交わったかについて議論が続いているが (Express train vs. Entangled bank)、われわれが主要な研究対象とするヴァヌアツは上記 2 極形質がモザイク様構成を示し (メラネシア、Remote Oceania、オーストロネシア語、kava、マラリア流行)、島嶼への人類およびマラリア拡散のシナリオにおいて重要な位置を

占めるものと考えられる。

南西太平洋上約 80 の島嶼よりなるヴァヌアツは、人口 20 万に約 120 の言語が存在し、長期間にわたる島嶼コミュニティの孤立が示唆される。これまで我々はマラリア発症率の地理的差異、時間的変動、年齢依存性および原虫種による違いなど、不安定な島嶼マラリアとしての疫学的特徴を明らかにしてきた。さらに島嶼間でマラリアと G6PD 欠損症が相関することが見出され、マラリアによるこの形質の選択が示唆された。ひとつの仮説として、ヴァヌアツにおけるマラリアの非重症化傾向が提示されている。その背景として、1) 孤立 および不安定な伝播の結果、原虫抗原多型が限られ、免疫が形成・維持されやすい、2) 人間側の選択された抵抗性、3) 三日熱マラリアと熱帯熱マラリアの干渉を可能性として考える。

我々はこれら島嶼コミュニティにおける人、マラリア原虫および媒介蚊の様々な遺伝学的多型の分布動態について、founder effects, isolation, movement, selection 等を変数とした解析を進めてきた。具体的にはマラリア流行度、島嶼間距離、島の大きさ、言語距離や長短期の住民移動、栄養、治療政策などの因子を考慮した。それら多型のマラリア対策上の要因、つまり疾病重症化、化学療法剤治療効果および伝播効率などにおける意義について、「大陸」vs.「島嶼」、「サハラ以南アフリカ」vs.「メラネシア」等の構図において比較を試みてきた。これらの成果が究極的には島嶼マラリアの特性に適する対策戦略構築に貢献することを期待している。

東京女子医科大学
国際環境・熱帯医学教室
金子明

研究組織

研究代表者	金子 明	東京女子医科大学・医学部・助教授
研究分担者	石崎 高志	熊本大学・大学院・教授
研究分担者	小早川隆敏	東京女子医科大学・医学部・主任教授
研究分担者	江藤 秀顕	東京女子医科大学・医学部・講師
研究分担者	美田 敏宏	東京女子医科大学・医学部・助手
研究分担者	塚原 高広	東京女子医科大学・医学部・助手
研究協力者	Anders Björkman	スウェーデン Karolinska 研究所・教授
研究協力者	Jeffrey Kojiro Lum	アメリカ Binghamton 大学・助教授

研究経費

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	4,900		4,900
平成 14 年度	4,600		4,600
平成 15 年度	3,900		3,900
総計	13,400		13,400

研究発表リスト

(1) 原著論文

1. Kilenga N, Kato M, Manno S, Kaneko A, Takakuwa Y. Effect of wheat germ agglutinin (WGA) binding to erythrocyte on *Plasmodium falciparum* invasion. Membrane. In press.
2. Akhwale W, Lum J K, Kaneko A, Eto H, Obonyo C, Björkman A, Kobayakawa T. Anemia and unstable malaria at different altitudes in the western highlands of Kenya. Acta Trop. In press
3. Mita T, Kaneko A, Lum J K, Zungu I L, Tsukahara T, Eto H, Kobayakawa T, Björkman A, Tanabe K. Expansion of wild type allele rather than back mutation in *pfert* explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. Mol Biochem Parasitol In press.
4. Lum J K, Kaneko A, Tanabe K, Takahashi N, Björkman A, Kobayakawa T. Malaria dispersal among islands: human mediated *Plasmodium falciparum* gene flow in Vanuatu, Melanesia. Acta Trop 90: 181-185. 2004.
5. Masta A, Lum J K, Tsukahara T, Hwaihwanje I, Kaneko A, Paniu M M, Sapuri M, Takahashi N, Ishizaki T, Kobayakawa T, Hombhanje F W. Analysis of Sepik populations of Papua New Guinea suggests an increase of CYP2C19 null allele frequencies during the colonization of Melanesia. Pharmacogenetics 13: 697-700. 2003.
6. Tanabe K, Sakihama N, Kaneko A. Stable SNPs in Malaria Antigen Genes in Isolated Populations. Science 303(5657): 493. 2004.
7. Yusuf I, Djojosebroto MW, Ikawati R, Lum K, Kaneko A, Marzuki S. Ethnic and geographical distributions of CYP2C19 alleles in the populations of Southeast Asia. Adv Exp Med Biol 531: 37-46. 2003.
8. Bwijo B, Kaneko A, Takechi M, Zungu I L, Moriyama Y, Lum J K, Tsukahara T, Mita T, Takahashi N, Bergqvist Y, Björkman A, Kobayakawa T. High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in Plasmodium falciparum infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. Acta Trop 85: 363-373. 2003.
9. Bwijo B, Kaneko A, Lum J K, Zungu I L, Tsukahara T, Mita T, Kobayakawa T. Antimalarial drug efficacy in Plasmodium falciparum infections in Malawi, seven years after switching from chloroquine to sulfadoxine/pyrimethamine. J Tokyo Wom Med Univ 73: 1-13. 2003.

10. Mita T, Kaneko A, Lum J K, Bwijo B, Takechi M, Zungu I L, Tsukahara T, Kobayakawa T, Björkman A. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of PfCRT K76T in Plasmodium falciparum following withdrawal of chloroquine use in Malawi. Am J Trop Med Hyg 68: 413-415. 2003.
11. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira M U, Kho W G, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 locus. Proc Natl Acad Sci USA 99: 16348-16353. 2002.
12. Lindegardh N, Forslund M, Green M D, Kaneko A, Bergqvist Y. Automated solid-phase extraction method for the determination of amodiaquine, chloroquine and their metabolites in capillary blood applied onto sampling paper by high performance liquid chromatography. Chromatographia 55: 5-12. 2002.
13. Sakihama N, Kaneko A, Hattori T, Tanabe K. Limited recombination events in merozoite surface protein-1 alleles of Plasmodium falciparum on islands. Gene 279: 41-48. 2001.
14. Sakihama N, Mitamura T, Kaneko A, Horii T, Tanabe K. Long PCR amplification of Plasmodium falciparum DNA extracted from filter paper blots. Exp Parasitol 97: 50-54. 2001.
15. Kaneko A. [Comment to Terrel et al. Foregone Conclusions? : In search of “Papuan” and “Austronesians”. Current Anthropology 2001; 42: 97-124]. Current Anthropology 42: 115. 2001.

(2) 学会発表

[特別講演]

1. Kaneko A. Malaria on Islands: Human and Parasite Diversities and Implications for Malaria Control in Vanuatu. The 22nd Seminar of Tropical Medicine; Seoul, Korea, 2002.
2. Kaneko A. Malaria on Islands: Human and Parasite Diversities and Implications for Malaria Control. The 17th Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology; Taichung, Republic of China (Taiwan), 2001.

[シンポジウム / ワークショップ]

1. 金子明. 島嶼マラリアー多様性と対策戦略ー. 地域研究企画交流センターシンポジウム, 京都, 日本, 2004.

2. Kaneko A. Genetic differences in metabolism of anti-malarial drugs: CYP2C19-related poor metabolizers on malarious islands in Melanesia. [Symposium/Invited Lecture] U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Parasitic Diseases Panel Annual Meeting; Charlottesville, Virginia, 2003.
3. Kaneko A, Amos M, Kalkoa M, Perlmann H, Perlmann P, Osawa H, Kobayakawa T, Björkman A. Malaria Eradication from a Small Island in Vanuatu: Herd Immunity and a New Outbreak. The 7th Meeting of The Hirosaki International Forum of Medical Science; Hirosaki, Japan, 2003.
4. 金子明. マラリア:現状と対策; 平成 14 年度日本獣医公衆衛生学会, 沖縄, 日本, 2003.
5. Lum J K, Kaneko A, Tanabe K, Takahashi N, Björkman A, Kobayakawa T. Human and Plasmodium falciparum gene flow: Correlations among populations but contrasts within islands. Japan Association for International Health the 17th Annual Meeting; Kobe, Japan, 2002.
6. Tanabe K, Kaneko A. The genetic diversity of natural populations of Plasmodium falciparum on islands and continents inferred from polymorphism of the MSP-1 gene. Japan Association for International Health the 17th Annual Meeting; Kobe, Japan, 2002.
7. Akhwale W, Lum J K, Kaneko A, Eto H, Kobayakawa T. Anemia and unstable P. falciparum malaria endemicity in Kisii District of the western highlands of Kenya. Japan Association for International Health the 17th Annual Meeting; Kobe, Japan, 2002.
8. Bwijo B, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Zungu I L, Moriyama Y, Lum J K, Kobayakawa T. Changing patterns of antimalarial drug resistance in Plasmodium falciparum mirror the change of the national malaria treatment policy in Malawi. Japan Association for International Health the 17th Annual Meeting; Kobe, Japan, 2002.
9. Kaneko A. Malaria: islands vs continents. Japan Association for International Health the 17th Annual Meeting; Kobe, Japan, 2002.
10. 美田敏宏, 金子明, Lum J K, 塚原高広, 武地美保, Bwijo B, Zungu I L. マラウイにおけるクロロキン耐性関連遺伝子の分子論的検討; 第 43 回日本熱帯医学大会, 高知, 2002
11. Hombhanje F, Tsukahara T, Hwaihwanje I, Masta A, Kaneko A, Eto H, Suguri S, Ikeshoji T, Sapri M, Kobayakawa T. ICRMC Project: Preliminary results of malaria epidemiology and vector distribution in East Sepik Province. PNG Medical Society Symposium 38th Medical Symposium; Alotau, Milne Bay Province, 2002.

12. Kaneko A. Malaria on islands: Evolutionary Approaches to Control. The 10th International Congress on Infectious Diseases; Singapore, 2002.
13. Kaneko A. Vanuatu: The southwestern limits of Island Malaria. 2nd International Eijkman Symposium ; Bogor, Indonesia, 2001.
14. 金子明. マラリア対策における infection と disease. 第 70 回日本寄生虫学会・第 53 回日本衛生動物学会合同大会; 山形, 2001.
15. 金子 明. アジア・太平洋島嶼のマラリア問題. 第 16 回日本国際保健医療学会総会; 東京, 2001.
16. Bwijo B, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Zungu I, Moriyama Y, Lum J K, Kobayakawa T. Changing patterns of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* reflect the change of the national treatment policy in Malawi. The 42nd Annual Meeting of Japanese Society of Tropical medicine ; Tokyo, Japan, 2001.
17. Lum J K, Kaneko A, Mita T, Takahashi N, Syafruddin D, Marzuki S, Kobayakawa T. Genetic Relationships among Asian and Pacific human populations and their malarial parasites. Japan Association for International Health the 16th Annual Meeting; Tokyo, Japan, 2001.
18. Tanabe K, Sakihama N, Kaneko A. Molecular population genetic characterization of *Plasmodium falciparum* in Vanuatu. Japan Association for International Health the 16th Annual Meeting; Tokyo, Japan, 2001.
19. Kaneko A, Lum J K, Takahashi N, Kalkoa M, Taleo G, Bergqvist Y, Kobayakawa T, Björkman A. Antimalarial proguanil and poor metabolizers in the Pacific. Japan Association for International Health the 16th Annual Meeting; Tokyo, Japan, 2001.

[口頭 / ポスター]

1. Hombhanje F W, Masta A, Lum J K, Tsukahara T, Hwaihwanje I, Paniu M, Sapuri M, Takahashi N, Ishizaki T, Kobayakawa T, Kaneko A. CYP2C19 Polimorphisms in three Sepik populations of Papua New Guinea and medical consequences in antimalarial proguanil metabolism; The 52nd Annual Meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, Philadelphia, U S A, 2003.
2. Tsukahara T, Hwaihwanje I, Hombhanje F W, Suguri S, Osawa H, Eto H, Masta A, Lum J K, Sapuri M, Kobayakawa T, Kaneko A. Malaria epidemiology in different ecological zones in East Sepik Province, Papua New Guinea; The 52nd Annual Meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, Philadelphia, U S A, 2003.

3. Suwanabun N, Tsuboi T, Kaneko O, Kaneko A, Herrera S, Sattabongkot J, Torii M. Stage specific expression and genetic polymorphism of gametocyte surface proteins, Pvs47 and Pvs48/45 that are novel transmission-blocking vaccine candidates of *Plasmodium vivax* ; The 52nd Annual Meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, Philadelphia, U S A, 2003.
4. Akhwale W, Lum J K, Kaneko A, Eto H, Obonyo C, Kobayakawa T. Anemia and unstable malaria at different altitude in Kisii District of the western highlands of Kenya; The 72nd Annual Meeting of The Japanese Society of Parasitology, Kurume, Japan, 2003.
5. 金子明, Bwijo B, 武地美保, Zung I L, Lum J K, 塚原高広, 美田敏宏, 高橋延之, Björkman A, 小早川隆敏. Sulfadoxine/Pyrimethamine 導入 7 年後のマラウイにおける熱帯熱マラリア dhps/dhfr 遺伝子 5 重変異; 第 72 回日本寄生虫学会大会, 久留米, 2003.
6. 先濱直子, 金子明, 田辺和祐, 熱帯熱マラリア原虫 MSP-1 遺伝子多型の保存性; 第 72 回日本寄生虫学会大会, 久留米, 2003.
7. 金子明, 島嶼マラリア根絶可能性と残存免疫; 平成 14 年度医学協力研究会国内会議, 名古屋, 2003.
8. Akhwale W, Kaneko A, Lum J K, Eto H, Kobayakawa T. Outcome of Blood Transfusion in the Management of Severe Anemia in Kisii District Hospital, Kenya; The 13th Annual Meeting of Japanese Society of Clinical Parasitology. Chiba, Japan, 2002.
9. 田辺和祐, 先濱直子, 金子明. マラウイにおける熱帯熱マラリア原虫抗原多型の保存性; 第 58 回日本寄生虫学会西日本支部大会、第 57 回日本衛生動物学会西日本支部大会、第 1 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 愛媛, 2002.
10. 塚原高広, 池庄司敏明, 金子明, Hombhanje F, Hwaihwanje I, 小早川隆敏. 自然環境および文化的多様性に富むパプア・ニューギニアのマラリア疫学; 第71回日本寄生虫学会大会, 神奈川, 2002.
11. Bwijo B, Kaneko A, Lum J K, Moriyama Y, Kobayakawa T, Takechi M, Tsukahara T, Zungu I. Changing Patterns of Antimalarial Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* Mirror the Change of the National Malaria Treatment Policy in Malawi; The 3rd MIM Pan- African Malaria Conference, Arusha, Tanzania, 2002.
12. Akhwale W, Lum J K, Kaneko A. Anemia and Unstable *P. falciparum* Malaria Endemicity in Kisii District of the Western Highlands of Kenya; The 3rd MIM Pan- African Malaria Conference, Arusha, Tanzania, 2002.

13. Kaneko A. Eradication of malaria from small islands; 13th South-west Pacific Malaria Meeting – Roll Back Malaria in the Pacific, Brisbane, Australia, 2002.
14. Kaneko A, Morris A, Taleo G, Perlmann H, Kobayakawa T, Björkman A. A preliminary report of an epidemic and immunity in a population living in an island where malaria was eliminated for 10 years. The third European congress on tropical medicine and international health; Lisbon, Portugal, 2002.
15. Lum J K, Kaneko A, Tanabe K, Takahashi N, Björkman A, Kobayakawa T. Human and *plasmodium falciparum* gene flow: correlations among populations but contrasts within islands. The third European congress on tropical medicine and international health; Lisbon, Portugal, 2002.
16. 金子明. アジア・太平洋島嶼マalaria問題; 第 16 回日本国際保健医療学会総会, 東京, 2001.
17. 美田敏宏, 金子明, Bwijo A, 塚原高広, 小早川隆敏, 武地美保. Malawi における熱帯熱マalaria原虫クロロキン耐性遺伝子 Pfert および Pfmdr1 多型の検討; 第 42 回日本熱帯医学会大会, 東京, 2001.
18. 美田敏宏, 金子明, 塚原高広, 武地美保, Bwijo B, Zungu I L, 小早川隆敏. Malawi における熱帯熱マalaria原虫クロロキン耐性遺伝子 Pfert および Pfmdr1 多型の検討; 第 12 回日本臨床寄生虫学会, 東京, 2001.
19. Bwijo B, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Lum J K, Kobayakawa T. Findings of decreased chloroquine resistance in Plasmodium falciparum isolates of Malawi; The 12th Annual Meeting of the Japanese Society of Clinical Parasitology, Tokyo, Japan, 2001.
20. 美田敏宏, 金子明, 塚原高広, 武地美保, Bwijo B, Zungu I L, 小早川隆敏. フィールドサンプルにおける熱帯熱マalaria原虫クロロキン耐性遺伝子 Pfert 多型の検討; 第 70 回日本寄生虫学会・第 53 回日本衛生動物学会合同大会, 山形, 2001.
21. 塚原高広, 金子明, Bwijo B, Zungu I L, 武地美保, 小早川隆敏. マラウイ国サリマでの抗マalaria薬 in vivo 感受性試験予報 – クロロキン感受性は回復したか?; 第 70 回日本寄生虫学会・第 53 回日本衛生動物学会合同大会, 山形, 2001.

(3) 出版物・総説

[著書]

1. 金子明. マラリアとその対策. アジア旅行者のための感染症対策, 本田徹, 金子明編. P.73-93. 東京: 連合出版. 2003.
2. 江藤秀顕, 岡部信彦, 賀来満夫, 金子明, 倉根一郎, 佐藤猛, 武田直和, 戸塚恭一, 永森静志, 牧野正彦, 増田和茂, 宮村達男, 山本直樹, 四方啓裕, 渡辺伸一郎. 新版・感染症マニュアル, 小早川隆敏編. 972 頁. 東京: スパイラル出版. 2002.

[総説]

1. Kaneko A. Hypothesis: malaria biodiversity and control on island Melanesia. International Congress Series 1267 (Hirosaki Forum). Elsevier B.V. 2003. In press.
2. Kaneko A. Field blood sampling. In: Ljunström, I. et al. (eds.) Methods in Malaria Research 4th ed. p.181-186. Virginia: MR4/ATCC. 2003.
3. Kaneko A. Malaria on islands. Human and parasite diversities and implications for malaria control in Vanuatu. Adv Exp Med Biol 531:71-82. 2003.
4. Kaneko A. Nishiyama T. Drugs and parasites. In: Page, C.V. et al. (eds.) Integrated Pharmacology 2nd ed. p.145-162. London: Mosby. 2002.
5. Kaneko A. [Comment to Terrel et al. Foregone Conclusions? : In search of “Papuan” and “Austronesians”. Current Anthropology 2001; 42: 97-124]. Current Anthropology 42: 115. 2001.

研究成果要約

Human and malaria parasite diversities in relation to the therapeutic efficacy of antimalarials on islands in the Asia and Pacific

(1) 和文要約

我々は様々なマラリア流行地における人およびマラリア原虫の遺伝学的多型の分布動態について解析を進めてきた。その際マラリア流行度、島嶼間距離、島の大きさ、言語距離や長短期の住民移動、栄養、治療政策などの因子を考慮し、疾病重症化、化学療法剤治療効果および伝播効率などにおけるそれら多型の意義について、「大陸」vs.「島嶼」、「サハラ以南アフリカ」vs.「メラネシア」等の比較において解析を試みた。

I. ヴァヌアツ島嶼における獲得免疫形成に関与する原虫多様性: 熱帯熱マラリア原虫 merozoite surface protein 1 (MSP1) のヴァヌアツ4島嶼における地理的および時間的変異動態について、クロロキン耐性候補遺伝子変異 (K76T in *pfert*) との比較において検討した。少なくとも過去 30 年間はあらたな SNPs は発生しておらず、SNPs が抗原遺伝子においてはそれほど急速に発生するものでないことが示唆された (Tanabe 2004)。この結果は今後のマラリアワクチン開発およびその有効性に重要な意義を持つと考えられた。

II. パプア・ニューギニア (PNG) における CYP2C19 多型: 肝 cytochrome P450 (CYP) 2C19 は、多くの薬剤代謝に関与し多型がある。poor metabolizer (PM) は白人およびアフリカ人では 3-6%、アジア人では 13-23% と報告されている。ヴァヌアツにおいて、この PM 遺伝子型の頻度が、71% と極めて高いことを既に報告した (Kaneko 1997, 1999)。またこの PM 遺伝子型は、PNG においてはヴァヌアツよりもその頻度が高いかもしれないことを予測していた。今回、PNG の East Sepik の住民 401 人を対象として調査した結果、CYP2C19-PM 遺伝子型頻度は 36% であり、東南アジアとヴァヌアツ島嶼の中間に位置した (Masta 2003)。これら結果はヴァヌアツ島嶼住民集団における高頻度の PM は、約 3,500 年前最初に東南アジア島嶼より定住した住民による founder's effect およびその後の孤立による genetic drift によることを示唆する。

III. マラウイにおける熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性の分子疫学: マラウイは、熱帯熱マラリア患者の chloroquine 治療失敗例の増加に伴い 1993 年から sulfadoxine/ pyrimethamine (SP) を代りに 1 次治療として導入した。この変更から 7 年後、我々は熱帯熱マラリア原虫クロロキンおよび SP 感受性を分子疫学的に検討した。クロロキンから SP への治療政策変更 7 年後のマラウイにおいてはクロロキン耐性分子マーカー(K76T in *pfprt*)の低変異率、および高率の SP 耐性マーカー(*dhfr/dhps*)5 重変異が認められた (Bwijo 2003; Mita 2003)。更にその分子メカニズムは、back mutation でなくクロロキン感受性原虫集団の expansion であることが *pfprt* ハプロタイプ解析から示唆された(Mita in press)。

IV. ケニア西部高地境界地域におけるマラリア性貧血: サハラ以南アフリカの重症マラリア性貧血は、重要な合併症であり死亡原因となる。治療法は抗マラリア剤投与とともに輸血であり、高い HIV 感染率がこの問題を複雑にする。マラリア流行が繰り返されているケニア西部高地境界地域において個々の村落における 5 歳以下小児の貧血率は 1, 440m における 57% から 2, 040m の 11% へ推移し、高度と負の相関が認められた($r=-0.88$, $p<0.05$)。同様に熱帯熱マラリア感染率は 31% から 0% へ推移した($r=-0.93$, $p<0.01$)。低高度村落において貧血は 5 歳以下小児に最も高率に認められ(34%)、出産可能年齢女性がこれに続いた(16%)。重症貧血($Hb<8g/dl$)は調査住民の 1.5% に認められ、この内 90% は低高度村落居住者、70% は 5 歳以下小児しかるに 20% は出産可能年齢女性であった。これら重症貧血群においては Hb 濃度の低栄養による更なる減少が認められた (Akwale, in press)。

V. ヴェヌアツにおける島嶼マラリア根絶可能性と残存免疫: 1991 年開始のアネイチュウム島における対策とその後 9 年間の調査は、島嶼マラリア根絶可能性を示した (Kaneko 2000)。Malaria-free は 2001 年まで維持されたが、しかし 2002 年三日熱マラリアの集団発生が現地より報告され、我々は新たな臨床寄生虫学的調査を行うとともに、住民の免疫状態について評価を行った。アネイチュウム島における 1998 年の *P. falciparum* 粗抗原に対する住民 IgG 抗体調査は過去 7 年間感染暴露がない成人における抗体価残存を示した。2002 年全住民 760 名中 22 名の *P. vivax* 感染者を見出した。陽性者はすべて 17 歳以下で加齢に従う陽性率低下を認めた。この結果は、Malaria-free が 10 年間維持されたにも関わらず、成人に認められた残存する免疫が防御的であることを示唆する。

(2) Summary

We do the studies of malaria in isolated areas on Island Melanesia in comparison with Sub-Saharan Africa to investigate the interactions among diversities of humans, parasites, mosquitoes and environment to understand relations among transmission, immunity and disease. Previous main research accomplishments of the applicant are summarized as follows:

- A) Our studies on merozoite surface protein-1 alleles of *P. falciparum* (Sakihama 2001) and *P. vivax* (Putaporntip 2002) suggested generally limited and stable genetic diversity on islands and a high degree of isolation between the islands, implying that malaria vaccines will be more effective where there is a limited gene pool, as in isolated populations (Tanabe 2004) and raising the hypothesis of a low degree of diversity in parasites as a possible mean for anecdotally reported low malaria mortality in Vanuatu.
- B) The frequencies of the CYP2C19 mutant alleles are uniformly greater in populations of Vanuatu than in previous populations surveyed (Kaneko 1997). However there are differences between populations from different islands. Comparisons of genetic, linguistic and geographic patterns suggest that short range gene flow is largely responsible for the current distribution of *CYP2C19* alleles in Vanuatu. Together with previous studies of nuclear genetic loci of Pacific island populations, these data predict that the poor metabolizer (PM) genotype is common throughout Polynesia and Micronesia and may be even more prevalent in western Melanesia than in Vanuatu (Kaneko 1999a). However we found the East Sepik populations of PNG showed a moderate prevalence of CYP2C19-related poor metabolizer (PM), between Island Southeast Asia and Vanuatu, suggesting genetic drift is a main factor of the high prevalence of PM in the Pacific islands (Masta 2003). These results suggest that the majority of Pacific Islanders metabolize a wide variety of clinically important drugs to a significantly lower degree than other geographical populations, e.g. the average Europeans, who have been subject to most studies on the pharmacological properties of modern drugs.
- C) Our studies in Malawi on drug resistance in *P. falciparum* (*pfprt/pfmdr1*

for chloroquine, CHL and *dhps/dhfr* for sulfadoxine/pyrimethamine, SP) suggested the switching from CHL to SP in 1993 resulted in a high prevalence rate (78%) of parasites with double *dhps* and triple *dhfr* (quintuple) mutations (Bwijo 2003) and a reduction in the prevalence of *pfprt* K76T (2%) with the recovery of CHL efficacy in 2000 (Mita 2003). A haplotype analysis revealed that an expansion of wild *pfprt* allele is the primary genetic mechanism for the recent recovery of the CHL sensitivity (Mita, in press).

- D) During the malaria epidemics of 1998/1999 in the highland fringe of Western Kenya, high case fatality (5.5%) and blood transfusion (43%) rates were recorded in the Kisii District Hospital. Our village survey showed that anemia was most common in children ≤ 5 years of age (34%) followed by women of childbearing age (16%) in the lowland villages. In children ≤ 5 years, both anemia (ranged from 57% at 1440m to 11% at 2040m) and *P. falciparum* (from 31% to 0%) prevalence significantly correlated with altitude, suggesting malaria is also the main cause of anemia in the highland fringe areas. Measures that reduce the prevalence of malaria will consequently reduce anemia and the need for blood transfusions associated with the risk of HIV transmission (Akwale in press).
- E) On Aneityum island with low-to-moderate transmission, we have most probably interrupted transmission by combining MDA with impregnated bed nets and achieved sustained and significant gains (Kaneko 2000). The seroepidemiological results suggest that without antigenic stimulation immunologic memory will still remain for many years in adults previously repeatedly exposed to malaria (Kaneko in manuscript).
- F) We have improved the methods more effectively to extract DNA from blood samples spotted on filter papers, particularly suitable for long PCR amplification of malaria parasite DNA (Sakihama 2001)

(3) Future perspectives

- A) We further hypothesize as follows: 1) Clinical manifestations of *P. falciparum* malaria are limited in severity on islands in Vanuatu; and 2)

On an isolated island where malaria was temporarily eliminated for many years, immunologic memory still remains without antigenic stimulation for many years especially in adults previously repeatedly exposed to malaria. Behind these phenotypes we consider the following common mechanisms: a) Possible restricted diversity of parasites; b) Immunogenetic host and vector properties; and c) Interactions between *P. vivax* and *P. falciparum* (Kaneko, in press).

- B) Human, parasite and mosquito co-evolution on Island Melanesia:** Data from the studies will aim at a better understanding on how human, parasite and mosquito populations have evolved in these isolated areas (Lum, 2004). To approach this we will develop a novel mathematical model through the extension of existing models on transmission dynamics and population genetics. Acknowledge will have impact on future malaria interventions.

(4) References

1. Sakihama N, Kaneko A, Hattori T, Tanabe K. Limited recombination events in merozoite surface protein-1 alleles of *Plasmodium falciparum* on islands. *Gene* 2001; 279: 41-48. (*)
2. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira M U, Kho W G, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16348-16353. (*)
3. Tanabe K, Sakihama N, Kaneko A. Stable SNPs in malaria antigen genes in isolated populations. *Science* 2004; 303: 493. (*)
4. Kaneko A, Kaneko O, Taleo G, Björkman A, Kobayakawa T. High frequencies of *CYP2C19* mutations and poor metabolism of proguanil in Vanuatu. *Lancet* 1997;349: 921-922.
5. Kaneko A, Lum JK, Yaviong J, Takahashi N, Ishizaki T, Bertilson L, Kobabayakawa T, Björkman A. High and variable frequencies of *CYP2C19* mutations: medical consequences of poor drug metabolism in Vanuatu and other Pacific islands. *Pharmacogenetics* 1999a; 9: 581-590.
6. Masta A, Lum JK, Tsukahara T, Hwaihwanje I, Kaneko A, Paniu MM, Sapuri M, Takahashi N, Ishizaki T, Kobayakawa T, Hombhanje FW. Analysis of

Sepik populations of Papua New Guinea suggests an increase of CYP2C19 null allele frequencies during the colonization of Melanesia.

Pharmacogenetics 2003; 13: 697-700. (*)

7. Bwijo B, Kaneko A, Takechi M, Zungu I L, Moriyama Y, Lum J K, Tsukahara T, Mita T, Takahashi N, Bergqvist Y, Björkman A, Kobayakawa T. High prevalence of quintuple mutant *dhps/dhfr* genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop* 2003; 85: 363-373. (*)
8. Mita T, Kaneko A, Lum J K, Bwijo B, Takechi M, Zungu I L, Tsukahara T, Kobayakawa T, Björkman A. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of *Pfprt* K76T in *Plasmodium falciparum* following withdrawal of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 413-415. (*)
9. Mita T, Kaneko A, Lum J K, Zungu I L, Tsukahara T, Eto H, Kobayakawa T, Björkman A, Tanabe K. Expansion of wild type allele rather than back mutation in *pfprt* explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol* 2004; in press. (*)
10. Kaneko A, Taleo G, Kalkoa M, Yamar S, Kobayakawa T, Björkman A. Malaria eradication on islands. *Lancet* 2000; 356: 1560-1564.
11. Akhwale W, Lum J K, Kaneko A, Eto H, Obonyo C, Björkman A, Kobayakawa T. Anemia and unstable malaria at different altitudes in the western highlands of Kenya. *Acta Trop* 2004; in press. (*)
12. Lum JK, Kaneko A, Tanabe K, Takahashi N, Björkman A, Kobayakawa T. Malaria dispersal among islands: human mediated *Plasmodium falciparum* gene flow in Vanuatu, Melanesia. *Acta Trop* 2004; 90: 181-185. (*)
13. Kaneko A. Hypothesis: malaria biodiversity and control on island Melanesia. *International Congress Series* 1267 (Hirosaki Forum). Elsevier B.V. 2003. In press. (*)
14. Sakihama N, Mitamura T, Kaneko A, Horii T, Tanabe K. Long PCR amplification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from filter paper blots. *Exp Parasitol* 2001; 97: 50-54. (*)

研究成果資料

(1) 主要成果 — 論文・総説 —

英文要約 Reference list のうち(*)マークのものを掲載

(2) 新聞報道記事

- a. Weekender, Papua New Guinea, 2003, 8, 13.
- b. Vanuatu Daily Post, Vanuatu, 2003, 7, 9.
- c. 日本経済新聞, 2004, 1, 23.