

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05817

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリアに対するACTの有効性と薬剤耐性関連遺伝子多型の解析

研究課題名(英文) Efficiency of ACT on malaria treatments and analysis of polymorphisms in drug resistance genes of Plasmodium falciparum

研究代表者

上村 春樹 (UEMURA, Haruki)

長崎大学・熱帯医学研究所・客員准教授

研究者番号：60184975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルテミシニン耐性型マラリア原虫の報告がないインドネシアにおいて、フローレス島で調べた全てのマラリア感染者で、アルテミシニン併用療法(ACT)による治療の三日後には末梢血にマラリア原虫が検出されなくなること、様々な地域から集めた熱帯熱マラリア原虫のKelch13遺伝子に変異が認められないことを確認し、インドネシアではACTが有効であることを示した。今回のフィールドサンプルについて、簡便な方法でリアルタイムPCRによるマラリア原虫の検出と定量を行い、その有効性を示した。また、インドネシアに特徴的なpfdhpsの遺伝子型の広がりを調べ、薬剤耐性マラリア原虫の拡散を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルテミシニン併用療法(ACT)の導入によってインドネシアでも多くの地域でマラリア感染数が減少しており、今回の研究では治療にACTが有効であることを示すことが出来た。このような中でマラリア感染が残っているのは診療所から距離のある地区が大部分であり、そのような場所でも使用することの出来る、簡便で感度の高い方法として、リアルタイムPCRを用いたマラリア原虫の検出、定量、原虫種の同定の有用性を示した。持ち運びのできるリアルタイムPCRで薬剤耐性遺伝子の同定も可能であり、今後のマラリア対策に寄与することが出来ると考えている。

研究成果の概要(英文)：No artemisinin-resistant malaria parasites have been reported in Indonesia and we also have confirmed it in this research project. Study on efficacy of artemisinin combination therapy (ACT) was conducted with malaria patients in Flores Island and its efficacy was confirmed; no detectable malaria parasites remained in the patient peripheral blood on day 3 of ACT. In addition, no mutation were observed in the Kelch13 propeller region of Plasmodium falciparum isolates from several area of Indonesia.

We then developed a simple and reliable real-time PCR procedure for malaria parasite detection and quantitation with this Flores Island field samples.

Further analysis of polymorphisms in several drug resistant genes of Plasmodium falciparum revealed origins and spread of two unique K540T and I588F pfdhps genetic variants in Indonesia and alteration of pfcr1 genotype polymorphism in an East Kalimantan district after ACT introduction.

研究分野：原虫の生化学

キーワード：熱帯熱マラリア 薬剤耐性 アルテミシニン pfdhps遺伝子 インドネシア リアルタイムPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルテミシニン併用療法(ACT)の導入(マラリア簡易診断キットと媒介蚊対策を一緒に行う)によって、40以上の国でマラリア感染者の数を10年前の半分に減少させることが出来ていることが報告されている。このような中でアルテミシニンに対して感受性の低下したマラリア原虫の出現が報告され、ACT耐性の疑われる原虫を検出するシステムを構築して拡散を防ぐことが重要である。

アルテミシニン耐性に関連する遺伝子変異について、カンボジアの熱帯熱マラリア原虫においては、原虫の第13染色体上のK13-propellerタンパク質のC末端Kelchリピート領域の変異がアルテミシニンに対する感受性の低下と関連していることを示唆する論文が報告された。それに続いてアジア、アフリカ10ヶ国15地域の原虫株が調べられ、少なくとも東南アジア各国においてはKelchタンパク質(Kelch13)領域における変異がアルテミシニン感受性に関連していることが報告された。

インドネシアでは、2008年にマラリア治療の第一選択薬としてACTが使用されるようになったところで、耐性型原虫の報告はない。しかし、マラリア浸潤地域の一つであるパプア島において、ACTの一種であるジヒドロアルテミシニン-ピペラキンに対して治療効果の低下を示唆する症例が報告されており、アルテミシニン感受性を簡便にモニター出来る方法を確立することが重要となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マラリア浸潤地域におけるACTの治療効果、有効性を調べるとともに、アルテミシニン耐性に関連する遺伝子変異を現場に近い診療機関で検出する方法を確立すること、さらにマラリア原虫の薬剤耐性に関連する遺伝子を集団遺伝学的に解析して、アルテミシニン耐性型原虫の出現と拡散に対応できる基礎を提示することである。

私たちは、マラリア原虫の薬剤耐性関連遺伝子の多型解析を行って、インドネシアでは東南アジアで報告されているものとは異なる幾つかの遺伝子型が検出されること、それぞれの地域に特徴的な遺伝子多型が認められることを確認している。ACTによって薬剤耐性遺伝子にどのような変化が認められるかを調べ、原虫の拡散についての情報を得ることを計画した。

3. 研究の方法

(1)インドネシアにおけるマラリアの現状とマラリア治療薬ACTの有効性調査

インドネシア・アイルランガ大学・熱帯病研究所 Dr. Sukmawati Basuki の協力を得て、インドネシアのマラリア原虫の収集、治療薬ACTの有効性を調べた。インドネシアは多くの島々からなる東西に広い国で、大部分の島でマラリアの感染が問題となっていたが、近年、多くの地域でマラリア感染者数は減少してきている。現在もマラリアが問題となっているフローレス島において、ACTで治療した後のフォローアップを行って治療効果の調査を行い、パプア島においては、マラリア罹患率を調べるとともに原虫遺伝子の解析を行った。

(2)リアルタイムPCRによるマラリア原虫感染率の定量化

マラリア原虫の感染率は末梢血をギムザ染色して感染赤血球をカウントすることで行っているが、感染者の血液から抽出したDNA溶液中におけるマラリア原虫遺伝子とヒト遺伝子の相対比率を出すことで定量化が可能である。ヒトの塩基配列、ヒトに感染する5種類のマラリア原虫に広く保存されている遺伝子配列、熱帯熱マラリア原虫に特異的な塩基配列を基にして、リアルタイムPCRを用いたマラリア原虫の検出と定量、熱帯熱マラリアの鑑別を行った。

(3)アルテミシニン感受性と関連するKelch13遺伝子領域の多型解析

今回収集したマラリア原虫サンプル、これまでに収集しているインドネシア各地域のマラリア患者から得た原虫DNAのKelch13遺伝子領域をPCRで増幅して塩基配列を解析した。

(4)熱帯熱マラリア原虫の *pfprt*、*pfmdr-1*、*pfdhfr*、*pfdhps*遺伝子解析

ACTの有効性を維持するには、アルテミシニンに対する有効性をモニターするとともに、効果のある抗マラリア薬をアルテミシニンと併用することが重要である。アルテミシニンと併用されている抗マラリア薬、アモディアキン、ピペラキン、メフロキン、ルメファントリンと関連する

pfprt、*pfmdr1*遺伝子、ファンシダールに関連する

pfdhfr+*pfdhps*遺伝子を解析することは、使用してきたACTによってどの遺伝子型が選択されてきているかを明らかにし、極端な場合耐性型が過度に選択されている状況、異なるACTに変更することが推奨される状況にあることも知ることが可能である。

4. 研究成果

(1)インドネシア・フローレス島・シッカ地区におけるマラリア治療薬ACTの有効性

マラリア感染を疑って地域の診療所を訪れた患者について、ACTを用いた治療後のフォローアップを行って有効性を調べた。すべての感染者で三日後には末梢血中にマラリア原虫が検出されなくなり、この地域でマラリアの治療にアルテミシニン併用療法が有効であることを確認した。さらに、血液塗沫標本の作製と同じ時に濾紙にスポットして保存した末梢血を用いて、リアルタイムPCRによるマラリア原虫の検出と定量を行い、その有用性を確認した。原虫DNAの増幅を基にした検出の問題点の一つは前処理に時間がかかることであるが、簡便なDNA抽出の方法を用いた場合でも、血液塗沫のギムザ染色以上の感度、定量性を示すことが出来た。

(2)アルテミシニン感受性と関連する Kelch13 遺伝子領域の解析

ACT の導入によってインドネシアの多くの地域でマラリアの感染率を減少させることが出来ており、2017 年には感染者の数を 10 年前の 1/3 に減少させることが出来たと報告されている。アルテミシニンに対する感受性の低下した熱帯熱マラリア原虫においては、Kelch13 遺伝子領域に変異が認められることが報告されており、インドネシア各地域の原虫サンプルについて Kelch13 遺伝子領域の塩基配列を調べた。今回の研究期間中に収集したフローレス島・シッカ地区、パプア島・ソロン地区のサンプルとともに、2010 年以降のパプア島、カリマンタン島、ロンボク島の熱帯熱マラリア原虫で Kelch13 遺伝子領域への変異は検出されず、インドネシアではアルテミシニン耐性は起きていないことを示す結果であった。

(3)熱帯熱マラリア原虫の *pfcr*t、*pfmdr*-1、*pfdhfr*、*pfdhps* 遺伝子解析

これまでにインドネシアのマラリア原虫の薬剤耐性関連遺伝子の多型解析を行って、東南アジアで報告されているものとは異なる遺伝子型が検出されること、それぞれの地域で特徴的な遺伝子多型が認められることを報告してきた。ACT の導入によって多くの地域でマラリア感染者数を減少させることが出来ており、それに伴う原虫の遺伝子多型の変化を解析した。

クロロキン耐性と関連する *pfcr*t 遺伝子について、インドネシアでは既にクロロキンを治療薬として使用していないにもかかわらず、2015 年以降のサンプルでもほぼすべての原虫で耐性型 K76T の変異が認められる。インドネシアの大部分の地域でパプアニューギニア型 SVMNT (72-76) が検出されるのに対して、カリマンタン島の一部のみ東南アジア型 CVIET とパプアニューギニア型の共存が認められていた。カリマンタン島でも 2015 年には感染率が大きく減少しており、そのサンプルを調べると東南アジア型 CVIET のみが検出された。他の地域ではパプアニューギニア型 SVMNT のみで変化はなく、カリマンタン島における *pfcr*t 遺伝子型の変化が使用している ACT ジヒドロアルテミシニン-ピペラキンによる選択圧によるものであるのか、関連は興味のあるところである。

我々はスルファドキシシン/ピリメタミン耐性と関連する *pfdhps* と *pfdhfr* 遺伝子について、2009-2010 年のカリマンタンの熱帯熱マラリア原虫を解析して、それまでに報告のないインドネシアの原虫に特徴的な 2 種類の *pfdhps* 変異を報告している。今回、それ以前の原虫サンプルを含めて解析を行い、K540T 変異はカリマンタン島の多くの場所で検出されるが他の島では検出されないこと、もう一方の I588F 変異はスンバウ島で検出された後に、パプア島を含むインドネシア東部の幾つかの地域に広まっていることを報告した。これは、ヒトの移動に伴って、薬剤耐性マラリア原虫が拡散する危険を示唆している。

インドネシアの多くの地域でマラリア感染者数の減少が報告されているが、媒介蚊はほとんどの地域に残ったままである。これらの地域に薬剤耐性を有する原虫が入ればアウトブレイクの危険があり、マラリア感染を早期に診断して適切な治療を施すことが重要であり、サーベイランスシステムの維持が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Basuki Sukmawati, Fitriah, Risamasu Petronella M., Kasmijati, Ariami Pancawati, Riyanto Sugeng, Hidayat Ari, Susilowati Dewi, Iskandar, Armika Budi, Budiono, Dachlan Yoes P., Kanbara Hiroji, Uemura Haruki	4. 巻 17
2. 論文標題 Origins and spread of novel genetic variants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum isolates in Indonesia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 475 (1-14)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2597-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 T. Mita, R. Culleton, N. Takahashi, M. Nakamura, T. Tsukahara, C. W. Hunja, Z. Z. Win, W. W. Htike, A. S. Marma, L. Dysoley, M. Ndounga, M. Dzodzomenyo, W. S. Akhwale, J. Kobayashi, H. Uemura, A. Kaneko, F. Hombhanje, M. U. Ferreira, A. Bjorkman, H. Endo and J. Ohashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Little Polymorphism at the K13 Propeller Locus in Worldwide Plasmodium falciparum Populations Prior to the Introduction of Artemisinin Combination Therapies	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 3340 ~ 3347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02370-15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Basuki S, Fitriah, Budiono, Risamasu PM, Rosyanti R, Pusarawati S, Habibi M, Arnoldina DDW, Merrylin, Surya A, Uemura H
2. 発表標題 Polymorphisms of Plasmodium falciparum drug resistant genes in Indonesia
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uemura H, Basuki S, Fitriah, Risamasu PM, Kasmijati, Ariami P, Riyanto S, Hidayat A, Susilowati D, Iskandar, Armika B, Budiono, Dachlan YP, Kanbara H
2. 発表標題 Genetic Variants of Sulfadoxine- Pyrimethamine-resistance in Plasmodium falciparum isolates in Indonesia
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Basuki S, Fitriah, Habibi M, Budiono, Uemura H
2. 発表標題 Polymorphism in Drug Resistant genes of Plasmodium falciparum After Introduction of Artemisin Combination Therapy in East Kalimantan, Indonesia
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Basuki S, Fitriah1, Budiono, Kasmijati, Ariami P, Armika B, Risamasu PM, Rossyanti R, Aspriyanto W, Pusarawati S, Habibi M, Arnoldina DDW, Merrylin, Surya A, Isozumi R, Uemura H
2. 発表標題 Reduced Polymorphism in Drug Resistant Genes of Plasmodium falciparum after Introduction of Artemisinin Combination Therapy in Indonesia
3. 学会等名 第59回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Basuki S, Fitriah, Risamasu PM, Kasmijati, Ariami P, Riyanto S, Hidayat A, Susilowati D, Iskandar, Armika B, Budiono, Dachlan YP, Kanbara H, Uemura H
2. 発表標題 Sulphadoxine-Pyrimethamine Efficiency and Plasmodium falciparum dhfr and dhps Genotypes in Indonesia Parasites
3. 学会等名 2nd Molecular and Cellular Life Sciences International Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Basuki S, Fitriah, Risamasu PM, Kasmijati, Ariami P, Riyanto S, Hidayat A, Susilowati D, Iskandar, Armika B, Budiono, Dchlan YP, kanbara H, Uemura H
2. 発表標題 インドネシアの熱帯熱マラリア原虫の薬剤感受性と遺伝子解析
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Basuki S, Fitriah, Habibi M, Budiono, Surya A, Uemura H
2. 発表標題 Analysis of Plasmodium falciparum of Kelch 13 and other drug resistant genes after introduction of Artemisinin Combination Therapy in East Kalimantan, Indonesia
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sukmawati Basuki, Rie Isozumi, and Haruki Uemura
2. 発表標題 Drug Resistance of Malaria Parasite; Local Concern for Global Problem
3. 学会等名 International Seminar on Global Strategy to Combat Emerging Infectious Diseases in Borderless Era (GSEID2016) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Basuki S, Fitriah, Risamasu PM, Kasmijati, Ariami P, Riyanto S, Hidayat A, Susilowati D, Iskandar, Armika B, Budiono, Dachlan YP, Kanbara H, Uemura H
2. 発表標題 Efikasi Sulfadoksin-Pirimetamin dan Variasi genetik Pfdhfr/Pfdhps di Indonesia
3. 学会等名 Annual Malaria Research in Indonesia
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Aspriyanto W, Rossyanti L, Sulistyawati SW, Pusarawati S, Fitriah, Budiono, Dachlan YP, Uemura H, Hadi U, Basuki S
2. 発表標題 Malaria Asimtomatik di Daerah Eliminasi Malaria di Barito Utara, Kalimantan Tengah, Indonesia
3. 学会等名 Annual Malaria Research in Indonesia
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	五十棲 理恵 (ISOZUMI Rie) (30550355)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	
研究 協力者	バスキ スクマワティ (BASUKI Sukmawati)	アイルランガ大学・熱帯病研究所・マラリア研究リーダー	