

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07089

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリアのダイナミクス～多様性は媒介蚊の多様性によって維持される？

研究課題名(英文) Longitudinal study of population genetics of Plasmodium falciparum in Anopheles gambiae complex in Western Kenya

研究代表者

二見 恭子 (Futami, Kyoko)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：30432983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、西ケニアのビタ地区において2006年から現在まで継続的に採集されたマラリア媒介蚊の種構成と感染しているマラリア原虫の集団遺伝構造の変化を経時的に解析し、原虫の多様性が蚊種の多様性によって維持される可能性を探ろうとしている。しかし、COVID-19流行の影響などで実験がしばしば中断した。現時点で、2006～2011年の7地点のサンプル計14,631個体のうち、4,441個体からDNAを抽出し、マラリア検出を進めている。また、ELISAサンプルからの現地で購入可能な試薬による安価なDNA抽出法も開発した。ケニアの現地スタッフに実験指導を行い、今後、彼らにさらに解析を進めてもらう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは世界で最も重要な蚊媒介性感染症であり、未だ年間60万人以上の死者が出ている。マラリアの原因となる病原体はマラリア原虫で、これは感染者の血液を吸った蚊の体内で増殖し、後の吸血の際に次のヒトに感染する。原虫の多様性が高いということは、彼らが自然環境で安定して存続する一因となっていると考えられる。そのため、どのようにこの病原体の多様性が維持されているか、そのメカニズムを理解することは、マラリアの防除にも貢献できるだろう。また、これまで蚊種とマラリア原虫の多様性を経時的に見た研究はなく、本研究は宿主-寄生者間の相互作用に対する理解を深めることに繋がるだろう。

研究成果の概要(英文)：This study aims to explore the possibility that the diversity of Plasmodium falciparum (Pf) is maintained by malaria vector mosquito species diversity based on a longitudinal survey analysis of the changes in vector species composition and population genetic structure of Pf collected from 2006 in Mbita, western Kenya. However, the experiments were frequently interrupted due to many issues related to the outbreak of COVID-19. I selected 14,631 samples collected from 7 sites between 2006 and 2011. 4,441 of them were served for DNA extraction, and subsequently are being used for the malaria detection experiment. A method of inexpensive DNA extraction from ELISA samples using locally available reagents has also been developed. I have trained Kenyan local staff in molecular lab works and they will carry out further analyses.

研究分野：衛生動物学

キーワード：マラリア媒介蚊 マラリア原虫 経時的变化 集団遺伝学的解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアの媒介蚊は多種多様であるが、一様に分布するのではなく、各地域によって種構成や優占種は異なり、そのダイナミクスはヒトや環境に影響される。西ケニアのビクトリア湖畔では *An. gambiae*、*An. arabiensis*、*An. funestus* が主要な媒介蚊であったが、殺虫剤や LLINs (Long Lasting Insecticide Nets) の普及により、現在は *An. arabiensis* が優占種となった (Futami et al. 2014)。このような媒介蚊のダイナミクスは、マラリア原虫のダイナミクスに影響する可能性がある。

マラリア原虫の遺伝的多様性やダイナミクスの研究はここ数年で増加し、それらを決定する要因が明らかになってきているが (Auburn & Barry 2017)、これらの研究はヒトを対象にしたものがほとんどである。しかし、媒介蚊とマラリア原虫には系統間の compatibility が知られている (Lambrechts et al. 2006, Joy et al. 2008)。例えば、媒介蚊の種によって適応しているマラリア原虫の系統が異なり、それが蚊を介した選択を受けることにより、次世代のヒト内マラリア原虫集団構造が変化するのはないだろうか。先の西ケニアの例では、媒介蚊として最も重要な *An. gambiae* に適応した原虫の対立遺伝子は、近年の本種個体数の減少によりヒト集団内での頻度を減らし、一方で優占種となった *An. arabiensis* に適応した対立遺伝子の頻度が集団内で上昇しているかもしれない。このような変化は、媒介蚊種構成や密度、蚊及びヒト内の原虫集団構造を継時的に比較、解析すれば明らかになると考えられる。マラリア原虫の集団遺伝学的解析は近年徐々に行われ、マイクロサテライトや SNPs などの集団遺伝学的解析に適した遺伝マーカーが、熱帯熱マラリア原虫ではすでに多く開発されている (Anderson et al. 1999, Amambua-Ngwa et al. 2012, 2016)。そのため、これらの手法を利用し、熱帯熱マラリア原虫の集団構造を経時的に解析できれば、この仮説を検証することができるであろう。

我々は長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点に所属しており、西ケニアのビクトリア湖畔のビタ地域でマラリア媒介蚊の調査・研究を続けている。2週間ごとに行われる媒介蚊の家屋からの採集は 2006 年 11 月から継続されており、その種構成やマラリア感染率が明らかになっている。2006 年から行われた LLINs の導入により、*An. gambiae* の密度低下による *An. arabiensis* の優占が観察されている (Futami et al. 2014)。また、同地域で年 1、2 回のヒトの熱帯熱マラリア感染率を調査しており、RDT、スライド及び PCR によって診断されている。この地域でのヒトの感染率は非常に高く (~66.5%)、蚊の繁殖地の豊富さとの関係が示唆されている (Minakawa et al. 2012, 2015)。2006~2008 年の媒介蚊の感染率は、種によって異なるが、ELISA の結果では 2~7% であった (未発表)。つまりビタにおいては、媒介蚊種構成の変化、それぞれの媒介蚊のマラリア感染率、及び同時期のヒト集団のマラリア感染率が得られると同時に、これらの DNA サンプルまたは抽出前のサンプルが保管されている。

### 2. 研究の目的

当初の予定では、すでに他の解析に用いられた蚊およびヒトのサンプルを二次的に利用し、熱帯熱マラリアの集団遺伝学的解析を行うことを目的としていたが、予算の縮小および COVID-19 の流行によるスタッフ不足のため、蚊サンプルのみの解析を目的とした。2006 年から西ケニアのビタ地区および周辺の島で採集された、最も重要なマラリア媒介蚊 2 種 (*An. gambiae* および *An. arabiensis*) から熱帯熱マラリア原虫を検出し、それらの集団遺伝的構造を継時的に比較することで、マラリア媒介蚊のダイナミクスが媒介蚊内原虫集団構造に影響するかどうかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

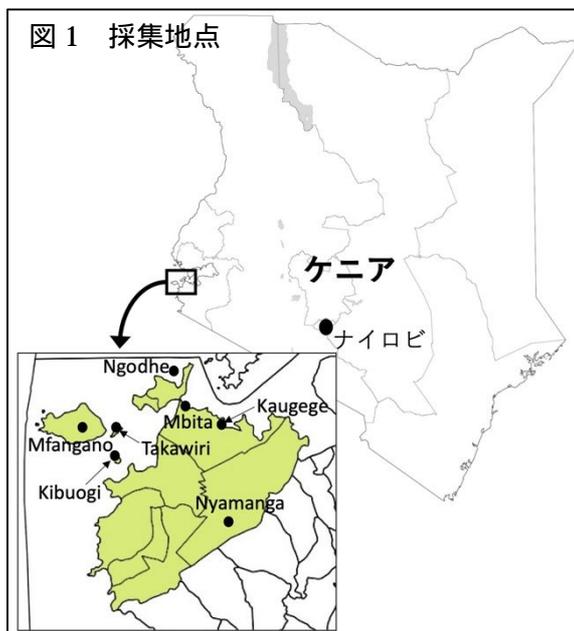
#### (1) サンプルの選定

2006 年から 2017 年の間に採集された蚊サンプルのデータを整理し、長期間に渡り同じ場所で採集されているマラリア媒介蚊 2 種 (*An. arabiensis*、*An. gambiae*) のサンプルを選定した。それらのサンプルについて、種同定がされているか、ELISA による熱帯熱マラリア原虫の検出が行われているか、を確認するとともに、2 種の種構成を調べた。

#### (2) 頭部・胸部からの DNA 抽出

ELISA によるマラリア原虫の検出がされていないサンプルについて、頭部と胸部から DNA を抽出した。抽出法は、通常研究室で利用しているエタノール沈殿法ではタンパク質を十分に除去できないため、プロテアーゼ K を利用した方法を検討した。

図 1 採集地点



### (3) ELISA サンプルからの DNA 抽出方法の確立

ELISA によってマラリア原虫を検出したサンプルについては、ELISA 用に処理したサンプルから DNA を抽出する方法を検討した。タンパク質を多量に含むサンプルであるため、アルコール沈殿抽出法 (Collins et al. 1987) ではなく、市販のキットを用いた方法やプロテアーゼ K を利用した方法を検討した。

決定した抽出方法を用いて、ELISA で熱帯熱マラリア陽性であったサンプル全てと一部の陰性サンプル (100 個体程度) から DNA を抽出する (未了)。

### (4) PCR によるマラリア原虫の検出

頭部・胸部から抽出した DNA について、Snounou et al. (2002) の Nested-PCR 法を用いてマラリア原虫の検出を行った。まず *Plasmodium* 属をターゲットとした PCR で陽性サンプルをスクリーニングしたのち、熱帯熱マラリア原虫の同定を行った。

ELISA サンプルから抽出した DNA について、同様の手法で熱帯熱マラリア原虫を同定、検出する (未了)。ELISA 陰性サンプルを解析するのは、どの程度の偽陰性があったかを評価するためである。

### (5) *An. gambiae* complex の種同定 PCR

種同定が終わっていない蚊サンプルについては、頭部・胸部から抽出した DNA または脚からアルコール沈殿抽出法で抽出した DNA を利用して種同定 PCR を行い、種を決定する (未了)。

### (6) 遺伝子型判定と集団遺伝学的解析 (未了)

過去の研究でマイクロサテライト遺伝子座のプライマーが開発されている (Anderson et al. 1999) また先行研究では 10 個のマイクロサテライト遺伝子座によって集団構造の地理的変異が検出されていることから (Murray et al. 2016, Duffy et al. 2017)、先ずはこれらの 10 遺伝子座を解析する。さらにガメトサイトコード領域近傍の遺伝子座 (SNP) については、シーケンスでハプロタイプを決定する。得られた遺伝子型結果から一般的な集団遺伝学的統計量 (Allele frequency, Genetic distance, genetic differentiation 等) の算出の他、媒介蚊種間や媒介蚊-宿主間で *Fst* を計算し、MANOVA や Structure を利用した集団構造解析 (採集年、蚊種で階層化) を行う。

これらの解析によって、媒介蚊各種内マラリア原虫の遺伝的多様性の継時的変化が明らかになる。それにより、媒介蚊種によって感染している原虫の集団構造は異なるのか、集団構造は継時的に変化するのか、媒介蚊の種構成はヒト内原虫集団構造に影響されている可能性があるか、どのような条件で原虫の多様性が維持されるかなどを考察する。

## 4. 研究成果

### (1) サンプルの選定とマラリア感染状況

これまで採集されてきたサンプルのリストを研究協力者から受け取り、地域、サンプル数、種構成などから、どのサンプルを解析に用いるかの選定を行なった。2006 年から 2011 年にかけて蚊帳が広く利用されるようになってきたため、それに伴って *Anopheles gambiae* complex の種構成が変化したと考えられる。そこで、この期間中に継続的に蚊の採集が行われた 7 地点 (Mbita, Nyamanga, Kaugege, Mfangano, Takawiri, Kibuogi, Ngodhe) を解析の候補とした (図 1)。候補とされた計 14,631 個体のうち、すでに 9,305 個体の ELISA による解析が終わり、内 210 個体から熱帯熱マラリアが検出されていた。残りの 5,326 個体 (36.4%) について、頭部・胸部から DNA を抽出して Nested-PCR によるマラリア原虫検出を行うこととした。

また、すでに蚊種が同定されているサンプルのみで 2006 年から 2011 年の種構成の変化を地域ごとと比較したところ、Mbita, Kaugege, Nyamanga では *An. arabiensis* が優占種であり、Ngodhe, Takawiri では *An. gambiae* が優占種であった。しかし全体的に変動が激しく、地域全体で一定の傾向を認めることはできなかった。一方で、サンプル全体の 25.8% では種が同定されておらず、それらは主に 2010 年、2011 年に集中していたことから、これらの種を同定することで、種構成の変動が認められる可能性がある。

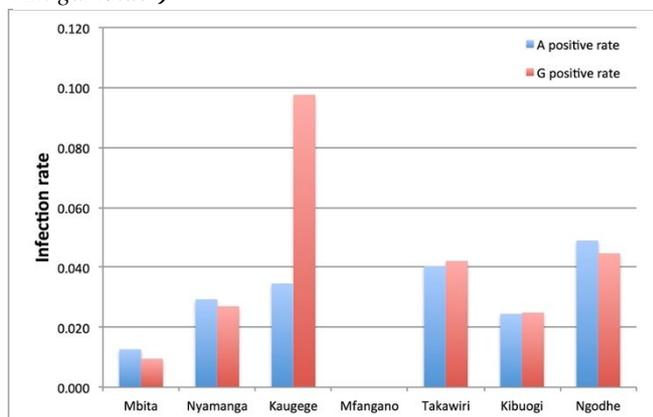
さらに ELISA によって検出された各地点の熱帯熱マラリアの感染率は、平均 2.1% であり、*An. gambiae* と *An. arabiensis* の間で、Kaugege を除き、大きな差はなかった。Kaugege では *An. gambiae* の感染率が非常に高く、9.8% に達していた (図 2)。

### (2) 頭部・胸部からの DNA 抽出

2019-2020 年度にかけて、成虫頭部・

胸部からの DNA 抽出を行った。抽出には、ナイロビの実験室で蚊から DNA を抽出する際に通

図 2 各地点のマラリア感染率 (青: *An. arabiensis*, 赤: *An. gambiae*)



常利用しており、試薬が現地で容易に購入可能かつ安価なアルコール沈殿抽出法 (Collins et al. 1987) を採用し、最終的に 4,441 個体から DNA を抽出した。

### (3) ELISA サンプルからの DNA 抽出

ELISA サンプルからの DNA 抽出法についても検討した。ELISA に利用したサンプルは元々のサンプルよりも多くのタンパク質を含む。そこでタンパク質除去効果の高いとされる市販のキットによる抽出方法と、新たに Protease K とアルコール沈殿を利用した抽出法を開発し、両者を比較したところ、Protease K とアルコール沈殿による抽出法によってキットを利用した場合よりも効率よく DNA を回収することができた。さらに PCR 阻害物質に強いポリメラーゼを選択することで、特異性の高い PCR 結果を得ることができた。

### (4) PCR によるマラリア原虫の検出

2020 年度までに成虫頭部・胸部からの DNA 抽出が終わったので、渡航が可能になった 2022 年から Nested-PCR による熱帯熱マラリア原虫の検出を始めた。これまでに約 1,200 サンプルの解析が終わり、11 個の陽性サンプルが検出されている。

現在、長崎大学ケニアプロジェクト拠点の新しいラボである Kisian-KEMRI ラボにて、新規に雇用された現地の常駐スタッフが実験を続けている。

本プロジェクトの遂行中、現地ラボスタッフの退職、COVID-19 の流行による渡航制限、新規加入スタッフを含めた現地スタッフのコロナウイルス感染及び退職、現地ラボの移転と実験が繰り返し中断された。2022 年から渡航制限が緩和されたことで代表者自身が現地を訪れて実験を進めることができたが、いまだ原虫検出の段階である。2023 年度からは現地の新規常勤スタッフが雇用され、彼らへの実験指導が可能になったため、現在は現地スタッフが実験を進めている。

### < 引用文献 >

1. Amambua-Ngwa et al. 2012. SNP genotyping identifies new signatures of selection in a deep sample of west African *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.* 29: 3249–3253.
2. Amambua-Ngwa et al. 2016. Exceptionally long-range haplotypes in *Plasmodium falciparum* chromosome 6 maintained in an endemic African population. *Malar. J.* 15: 515.
3. Anderson et al. 1999. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology.* 119: 113–125.
4. Auburn & Barry. 2017. Dissecting malaria biology and epidemiology using population genetics and genomics. *Int. J. Parasitol.* 47: 77–85.
5. Collins et al. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates between member species of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 37–41.
6. Duffy et al. 2017. Population genetic structure and adaptation of malaria parasites on the edge of endemic distribution. *Mol. Ecol.* 26: 2880–2894.
7. Futami et al. 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.
8. Joy et al. 2008. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol Biol Evol.* 25: 1245–1252.
9. Lambrechts et al. 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.* 22: 12–16.
10. Minakawa et al. 2012. Malaria vectors in Lake Victoria and adjacent habitats in western Kenya. *PLoS One.* 7: e32725.
11. Minakawa et al. 2015. Sleeping on the floor decreases insecticide treated bed net use and increases risk of malaria in children under 5 years of age in Mbita District, Kenya. *Parasitology.* 142: 1516–22.
12. Murray et al. 2016. Microsatellite genotyping and genome-wide single nucleotide polymorphism-based indices of *Plasmodium falciparum* diversity within clinical infections. *Malaria Journal.* 15 (1): 275.
13. Snounou et al. 2002. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods in molecular medicine.* pp. 89–203.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	皆川 昇  (Minakawa Noboru)  (00363432)	長崎大学・熱帯医学研究所・教授    (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ケニア	Kenya Medical Research Institute		