

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：82610
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790465
 研究課題名（和文）アジア地域に広がる薬剤耐性三日熱マラリア原虫の起源と拡散に関する研究
 研究課題名（英文）Research on geographical origin and spread of drug resistant *Plasmodium vivax* in Asia
 研究代表者
 石上 盛敏（IWAGAMI MORITOSHI）
 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所・熱帯医学マラリア研究部・上級研究員
 研究者番号：20392392

研究成果の概要（和文）：アジアの三日熱マラリア原虫のクロロキン耐性原因遺伝子とその近くの遺伝的な多型を調べた。その結果、臨床的なクロロキン耐性の報告がないフィリピンの原虫で、耐性型と考えられる遺伝子型のみが観察された。一方、耐性の報告がある韓国から、感受性型と考えられる遺伝子型のみが観察された。今回解析した原因遺伝子の多型は、もともと各流行地域の原虫集団に存在する多型で、薬剤耐性との関連は不明瞭であると推定された。

研究成果の概要（英文）：Genetic polymorphisms of chloroquine (CQ) resistant gene and the polymorphisms flanking the gene of *Plasmodium vivax* in Asia were examined. All the isolates from the Philippines where treatment failure to CQ had never been reported possessed resistant genotype. On the other hand, all the isolates from the Republic of Korea where treatment failure to CQ had been reported possessed susceptible genotype. These results suggested that the polymorphisms of the resistant gene were local genotypes and that the association between the genotypes and CQ susceptibility were elusive.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：三日熱マラリア原虫、薬剤耐性、分子疫学研究、クロロキン、アジア

1. 研究開始当初の背景

世界規模でのマラリア対策により熱帯熱マラリアの患者数・死亡者数は減少傾向にあるが、三日熱マラリアの患者数は相対的に増加傾向にある（WHO, 2012）。特にアジア諸国、西太平洋諸国、中南米諸国では三日熱マラリア患者数が多く、重症化した症例も報告され、その対策が重要な課題である。さらに近年、三日熱マラリアのクロロキンに対する耐性が、パプアニューギニア、インドネシア、タイ、インド、韓国、南米などから報告され、プリマキンに対する耐性も、パプアニューギニア、インドネシア、タイなどから報告されて

いる（Price et al: Curr Opin Infect Dis, 2009 22:430-435）。しかし熱帯熱マラリアに比べ三日熱マラリアに関する研究は非常に遅れている。これら薬剤耐性三日熱マラリアの分布状況を正確に把握すると同時に、その起源と拡散様式のマカニズムを解明し、その対策に繋げることは喫緊の課題である。

そこで本研究では、三日熱マラリアの治療、並びに予防薬として、世界中の流行地域で広く用いられている抗マラリア薬クロロキン（CQ）に着目して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では CQ 耐性三日熱マラリアの分布状況の把握、並びにその起源と拡散様式を推定することを目的として研究を行った。これまでのところ、三日熱マラリア原虫の CQ 耐性獲得の機序は不明な点も多いが、パプアニューギニアでの調査で、同原虫の *Plasmodium vivax multidrug resistance 1 gene (pvmdr1)* 遺伝子のコドン 976 番目のアミノ酸置換 (チロシン→フェニルアラニン) が CQ 耐性獲得に関与していると報告されている (Suwanarusk et al: PLoS One, 2007 2:e1089)。

そこで本研究では、この遺伝子変異に着目し、研究代表者が所属する国立国際医療研究センター研究所で保管している三日熱マラリア原虫株、並びに研究協力者である韓国釜山のインジェ大学医学部寄生虫学教室の WG Kho 教授とフィリピンのフィリピン大学マニラ校公衆衛生学部寄生虫学教室の PT Rivera 教授が採取・保管していた三日熱マラリア原虫株を研究材料に用いて解析を行った。本研究の主な調査地域はアジア諸国であるが、その他にアフリカ諸国、並びに中南米諸国の原虫株も比較対象として解析に用い、より広い流行地域における CQ 耐性三日熱マラリアの分布状況の把握、並びにその起源と拡散様式の推定を試み、その成果をもって流行制圧への提言を目指すことを大目標として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) *Pvmdr1* 遺伝子変異の分布状況の解析

①材料としてマラリア患者から採取した三日熱マラリア原虫 94 株を解析に用いた。その内訳は、研究代表者が所属する国立国際医療研究センター株が 36 株 (採取年: 2004 年~2012 年)、韓国株が 43 株 (1996 年~2001 年、2007 年)、並びにフィリピンのパラワン島の株が 15 株 (2009 年、2012 年) であった。国立国際医療研究センター株の採取地域 (地理的由来) は以下の通り: インド (9 株)、パプアニューギニア (6 株)、インドネシア (2 株)、パキスタン (3 株)、マレーシア・ボルネオ (1 株)、タイ (1 株)、バングラデシュ (1 株)、ネパール (1 株)、中国 (1 株)、イラン (1 株)、ウガンダ (1 株)、ルワンダ (1 株)、スーダン (1 株)、コモロス (1 株)、モーリタニア (1 株)、仏領ギアナ (1 株)、ブラジル (2 株)、エクアドル (1 株)、南米 (国名不明、1 株)。

②患者血液検体から DNA を抽出し、PCR 法を用いて *Pvmdr1* 遺伝子のコドン 976 番目を

含む領域を増幅し、その後、DNA シークエンサーを用いて、DNA 塩基配列を決定した。

(2) *Pvmdr1* 遺伝子の変異型の地理的起源と拡散様式の推定

①はじめに GenBank データベースに登録されている三日熱マラリア原虫 (Salvador 1 株) の全ゲノムデータを探索して、*Pvmdr1* 遺伝子近傍 (20Kb の範囲内) にあるマイクロサテライト DNA 4 座位 (*Pvmdr1* MS1、MS2、MS3、MS4) を同定し、これらを分子マーカーとして解析に用いた。

②次に上記の 4 座位のマイクロサテライト DNA を増幅する PCR プライマーを設計し、(1) の解析に用いた三日熱マラリア原虫株のうち 58 株を (2) の解析に用いた。PCR 法で上記 4 座位を増幅後、DNA シークエンサーを用いて、DNA 塩基配列を決定した。

③マイクロサテライト DNA は、一般的に多型性に富み、生物を個体レベルで識別するのに有効で、しかもその多型がその個体の適応度に影響しない (中性な変異) と考えられている。また着目する遺伝子の近くにあるマイクロサテライト DNA は、有性生殖を行う際に生じる染色体の組換えが生じてても、着目する遺伝子と共に挙動する可能性が高いと考えられている (ヒッチハイク理論)。したがって、本研究のように着目する遺伝子と、その近傍にあるマイクロサテライト DNA とを、一緒に解析することで、着目する遺伝子の遺伝子型 (変異型、感受性型等) の地理的な起源が推定可能である。

4. 研究成果

1) *Pvmdr1* 遺伝子変異の分布状況の解析の結果

Pvmdr1 遺伝子のコドン 976 番目の遺伝子型を解析した結果、27 株が CQ 耐性型 (フェニルアラニン) で、67 株が CQ 感受性型 (チロシン) であった (図 1)。CQ 耐性型が観察された国または地域は以下の通りであった。フィリピンのパラワン島の株は、解析した 15 株すべてが耐性型であった。またアフリカの株も解析した 5 株すべてが耐性型であった。これらフィリピンと今回解析したアフリカ諸国からは、まだ臨床的な CQ 耐性 (治療失敗例) は報告されていない。その他、パプアニューギニア (4 株)、マレーシア・ボルネオ (1 株)、タイ (1 株)、インド (1 株) からも、CQ 耐性型が観察された。これらの国は、すでに臨床的な CQ 耐性 (治療失敗例) が報告されているので、三日熱マラリア原虫の遺伝子型と、臨床的な表現型とが対応して

いると考えられた。一方で、これまでに CQ 耐性の報告がある韓国の株は、今回解析した 43 株すべてが感受性型であった。また南米の 5 株もすべて感受性型であった。南米諸国からも臨床的な CQ 耐性（治療失敗例）が報告されている。

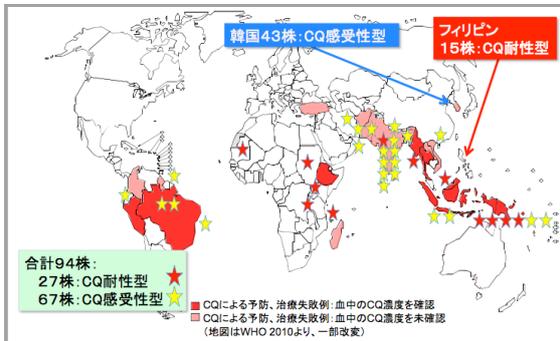


図 1. *Pvmdr1* 遺伝子の CQ 耐性型と感受性型の分布

(2) *Pvmdr1* 遺伝子の変異型の地理的起源と拡散様式の推定の結果

(1) の解析に用いた 94 株のうち、58 株 (CQ 耐性型: 25 株、CQ 感受性型: 33 株) を用いて、*Pvmdr1* 遺伝子近傍 (20 Kb の範囲内) にあるマイクロサテライト DNA 4 座位 (*Pvmdr1*-MS1, MS2, MS3, MS4) の多型解析を行った結果、3 座位 (MS1, MS2, MS3) に多型が観察され、残り 1 座位 (MS4) には多型が観察されなかった。次に CQ 感受性型だった韓国の 10 株と、CQ 耐性型だったフィリピンの 15 株のマイクロサテライト DNA の型を比較したところ、フィリピンの 1 株を除いて、まったく同じ型であった。一方、多型性に富んでいた株は、パプアニューギニア、インド、パキスタン、ネパールといった三日熱マラリアの患者数が比較的多い国とその近隣諸国の株であった。しかしこれらのマイクロサテライト DNA の多型パターンと、*Pvmdr1* 遺伝子の遺伝子型 (CQ 感受性型、CQ 耐性型) との間に、特定の関連は認められなかった。すなわち、CQ 耐性型を持つ株に特徴的なマイクロサテライト DNA の多型パターンは観察されなかった。

(3) 考察

(1) の解析結果より、臨床的な CQ 耐性 (治療失敗例) がまだ報告されていないフィリピンのパラワン島と今回解析したアフリカ諸国の株が、すべて CQ 耐性型であったことから、近い将来、これらの国と地域で、臨床的な CQ 耐性が出現する可能性は否定できない。その一方で、すでに臨床的な CQ 耐性が報告されている韓国の株が、すべて CQ 感

受性型であった。ただ韓国で CQ 耐性が確認されたのは、2003 年と 2007 年であり (Lee et al: *Am J Trop Med Hyg*, 2009 80:215-217)、今回解析した韓国株は、1 株 (2007 年) を除いて、2001 年以前に採取された株だったので、2003 年以降の株を多数解析したら、CQ 耐性型の株が検出される可能性がある。

(2) の解析結果より、*Pvmdr1* 遺伝子の CQ 耐性型と考えられている遺伝子型は、特定の地域でのみ生じた変異型と考えるよりはむしろ、それぞれの流行地域の三日熱マラリア原虫集団のなかに古くから存在する地域的な多型である可能性が示唆された。さらにパプアニューギニアとインドのように、CQ 耐性型と感受性型とが混在する地域の原虫集団に着目した場合、CQ 耐性型を持つ株のマイクロサテライト DNA 多型のパターンが、特定のパターンに固定していなかったことから、クロロキンの選択圧による、Selective Sweep が生じていない可能性が示唆された。Selective Sweep とは、何らかの選択圧により、それに対して有利な遺伝子型が選択され、それ以外の遺伝子型が、集団内から一掃されてなくなる (あるいは限りなく少なくなる) 現象をいう。

パプアニューギニアの株では、*Pvmdr1* 遺伝子のコドン 976 番目のアミノ酸置換と CQ 耐性との間に相関が報告されているが、これが他の国や地域の三日熱マラリア原虫集団に当てはまるのか不明である。したがって *Pvmdr1* 遺伝子のコドン 976 番目のアミノ酸置換の他にも、三日熱マラリア原虫の CQ 耐性獲得に寄与する変異や、他の遺伝的要因がある可能性が考えられる。

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 4 件)

(1) Tanizaki R, Ujiie M, Kato Y, Iwagami M, Hashimoto A, Kutsuna S, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Kano S, Ohmagari N: First case of *Plasmodium knowlesi* infection in a Japanese traveller returning from Malaysia. *Malaria Journal*, 査読有, Vol. 12, 2013, 128
DOI: 10.1186/1475-2875-12-128

(2) 石上盛敏、駒木-安田加奈子、氏家無限、竹下望、加藤康幸、金川修造、大曲貴夫、狩野繁之: マラリア診断法 3 種 (顕微鏡検査、迅速診断キット、PCR 法) の有用性: 結果が一致しなかった症例の分析、日本臨床寄生虫

学会誌、査読有、23 卷、2012、77-81

(3) Iwagami M, Fukumoto M, Hwang SY, Kim SH, Kho WG, Kano S: Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea based on microsatellite DNA analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases, 査読有, Vol. 6, 2012, e1592

DOI : 10.1371/journal.pntd.0001592

[学会発表] (計 14 件)

① Iwagami M, Kho WG, Rivera PT, Villacorte EA, Kano S: Polymorphisms of *pvmr1* and microsatellite DNA of *Plasmodium vivax* population showed no evidence of selective sweep by chloroquine pressure, 第 82 回日本寄生虫学会大会, 東京医科歯科大学, 東京, 2013. 3. 29-31

② Iwagami M, Kho WG, Rivera PT, Villacorte EA, Kano S: Analysis of *pvmr1* and microsatellite DNA loci flanking the gene of *Plasmodium vivax* collected worldwide showed no evidence of chloroquine pressure, Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 & The 7th Seminar on Food- and Water-Borne Parasitic Zoonoses, Centara Grand & Bangkok Convention Centre, Bangkok, Thailand, 2012. 12. 12-14

③ Iwagami M, Kho WG, Rivera PT, Villacorte EA, Kano S: Evidence of selective sweep by chloroquine pressure was not detected in codon 976 of *pvmr1* and microsatellite DNA loci flanking the gene of *Plasmodium vivax* isolates collected worldwide, 第 72 回日本寄生虫学会東日本支部大会・第 10 回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会, 群馬大学医学部, 前橋市, 2012. 10. 12-13

④ Iwagami M, Rivera PT, Villacorte EA, Kho WG, Kano S: Molecular genetic epidemiology on *pvmr1* mutation of *Plasmodium vivax*, The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and the XLVIII Congress for the Brazilian Society of Tropical Medicine, Royal Tulip Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2012. 9. 23-27

⑤ Iwagami M, Kho WG, Kim SH, Rivera PT, Villacorte EA, Kano S: Molecular epidemiology on chloroquine resistant gene of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea, the Philippines and other endemic countries based on *pvmr1* genotype and microsatellite DNA polymorphisms flanking the gene, 第 53 回日本熱帯医学会大会, とかつブラザ, 帯広市, 2012. 9. 5-6

⑥ 石上盛敏, 駒木-安田加奈子、氏家無限、竹下望、加藤康幸、金川修造、大曲貴夫、狩

野繁之: マラリア診断法 3 種 (顕微鏡検査、迅速診断キット、PCR 法) の有用性: 結果が一致しなかった症例の分析、第 23 回日本臨床寄生虫学会大会、東京女子医科大学、東京都、2012. 6. 23

⑦ Iwagami M, Kho WG, Rivera PT, Villacorte EA, Kano S: Molecular genetic epidemiology on *pvmr1* mutation of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea and other endemic areas, Forum Cheju 15, The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar, Miyazaki Aoshima Palm Beach Hotel, Miyazaki, Japan, 2012. 5. 23-25

⑧ Iwagami M, Rivera PT, Villacorte EA, Kho WG, Kano S: Molecular epidemiology on *pvmr1* genotype of *Plasmodium vivax* in the Philippines and the other endemic areas, 5th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, University of the Philippines Manila, Manila, The Philippines, 2012. 5. 15-17

⑨ 石上盛敏, Weon-Gyu Kho, Pilarita T Rivera, Elena A Villacorte、狩野繁之: 三日熱マラリア原虫 *pvmr1* 変異に関する遺伝疫学、第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学西宮キャンパス、2012. 3. 23-24

⑩ Iwagami M, Rivera PT, Villacorte EA, Kho WG, Kano S: *Pvmr1* mutation for genetic epidemiology of chloroquine resistant *Plasmodium vivax*, American Society of Tropical Medicine and Hygiene 60th Annual Meeting, Philadelphia Marriott Downtown Hotel, Philadelphia, PA, USA, 2011. 12. 4-8

⑪ 石上盛敏, Weon-Gyu Kho, Pilarita T Rivera, Elena A Villacorte、狩野繁之: 三日熱マラリア原虫 *pvmr1* 変異の分布に関する分子疫学研究、第 71 回日本寄生虫学会東日本支部大会、杏林大学医学部、東京都、2011. 10. 1

[その他]

ホームページ等

<http://www.rincgm.jp/department/lab/01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石上 盛敏 (IWAGAMI MORITOSHI)
独立行政法人国立国際医療研究センター
研究所・熱帯医学マラリア研究部・
上級研究員
研究者番号: 20392392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし