

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04074

研究課題名(和文) 薬剤耐性マラリアの出現を予測する：加速進化系による包括的実験室進化システムの開発

研究課題名(英文) Predicting the emergence of drug-resistant malaria: Development of a comprehensive laboratory evolution system with accelerated evolution system

研究代表者

美田 敏宏 (Mita, Toshihiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80318013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって感受性株の6倍のピペラキン濃度でも生存する原虫を数週間で作成することができた。これらには8つの共通する変異が存在し、そこにはクロロキン耐性遺伝子crtのN351I変異が含まれていた。本変異を感受性株に導入したところ、わずかなピペラキンへの感受性低下と著明な増殖速度の低下が見られた。これは残りの変異も感受性低下やfitness低下の代償に関与していることを示しており、現在さらなる解析を進めている。実検体における検証研究では、アフリカにおける初めてのアルテミシニン耐性熱帯マラリアの出現をウガンダで証明した他、当地ではメフロキンへの耐性が半分近く見られることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってマラリア原虫が薬剤耐性を獲得するまでのプロセスをラボで迅速に解明する道が開けた。自然界に薬剤耐性マラリアが出現する前に起こる遺伝的な変化を解明することによって、流行地域における耐性が出現する前にアラートを出すことを可能とする。この段階で迅速に治療政策を変更することによって耐性が実際に出現することを防止できる。これによって新薬開発、耐性出現、新薬開発、という終わらないレースに終止符を打つ。2050年には抗生物質耐性病原体の蔓延による世界の死亡数はがん死亡数を上回るとされており、本研究構想が対策の実際面や開発に与える社会的波及面でのインパクトは高い。

研究成果の概要(英文)：We successfully produced protozoa in a few weeks that could survive and proliferate at the piperazine concentration 6 times higher than that of susceptible strains. There were eight common mutations in these, including the N351I mutation in the chloroquine-resistant gene, crt. When this mutation was introduced into a susceptible strain, a slight decrease in susceptibility to piperazine and a marked decrease in growth rate were observed. These indicate that the remaining mutation(s) may be involved in the decreased susceptibility and/or compensation of fitness. Further analysis is underway on the significance of these mutations to piperazine resistance. In a validation study on real malaria samples, we have evidenced the emergence of artemisinin-resistant falciparum malaria in Uganda, which was the first report of the artemisinin resistance in Africa. We have also revealed that there was nearly half the resistance to mefloquine in Uganda.

研究分野：熱帯医学、疫学

キーワード：マラリア 薬剤耐性 進化

## 1. 研究開始当初の背景

アルテミシニン(ART)と他の抗マラリア薬を併用するアルテミシニン併用療法(ACT)は、現在マラリア治療の first-choice であり、その導入によりマラリア死亡者数が劇的に減少した (World malaria report 2015)。併用療法の戦略は、即効性で高い殺原虫効果を示す ART と長い半減期を持つ併用薬を用いることによって、薬剤耐性原虫の出現を抑止することである。しかし、2008年にタイ・カンボジア国境地帯から ART 耐性原虫の出現が報告されて以来、耐性原虫はすでにメコン流域 5 か国に拡散している(Ashley et al., 2014)。さらに、ART と同等以上の効果を持つ新薬の開発には目処が立っておらず、併用薬に対する耐性原虫の出現と拡散を抑止することが必須である。ART に対しては、耐性遺伝子 *kelch13* が同定されたものの(Ariey et al., 2014)、いずれの併用薬についてもいまだ耐性遺伝子は同定されていない。

現在の薬剤耐性研究は、すでに出現・拡散した薬剤耐性原虫を用いることが出発点となっている。研究分担者の平井らは、ネズミマラリアである *Plasmodium berghei* の DNA 複製酵素の校正機能のみを抑制することにより遺伝子変異が出現しやすくなるマラリアミューテータ原虫の作成に成功した(Honma et al., 2014; Honma et al., 2016)。蓄積された変異パターンは自然条件の原虫とほぼ同様であり、化学物質や放射線などの様々な変異原性物質に対する優位性がある。

上述したように、現在用いられている ACT はアルテミシニンを基軸とした 2 剤の併用療法であり、両方の薬剤にも耐性を持つ原虫を実験室で単離することは容易ではない。実際、ART のみに耐性の原虫ですら、その単離には 5 年間かかっている(Ariey et al., 2014)。この点、ミューテータマラリアの系を用いれば、はるかに短いタイムスパンで 2 剤に耐性をもつ原虫を単離することが可能になる。これは、今後フィールドで出現しうる耐性原虫をラボレベルであらかじめ予想できることを意味している。

## 2. 研究の目的

- (1) 加速進化システムを用いて、ACT の併用薬に対する耐性原虫を単離する。
- (2) 全ゲノム解析によって薬剤耐性の原因となる遺伝的な変化を同定し耐性獲得メカニズムを解明する。
- (3) ウガンダおよびパプアニューギニアでマラリア薬剤耐性調査を実施し、包括進化システムで同定されたゲノム上の変化を実検体で検証する。
- (4) 包括的加速進化システムを熱帯熱マラリア原虫でも実施できるシステムを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) アルテミシニン併用薬への耐性原虫の単離

現在、ACT の併用薬として最も多く使われているルメファントリン、ピペラキンに対する耐性原虫をそれぞれ単離するために、90 世代以上の継代によってポピュレーションとなっているミューテータ *P. berghei* 原虫を感染させ、それぞれの薬剤を低濃度から開始する。薬剤暴露により当該濃度への感受性原虫は死滅し、耐性ポテンシャルを持つ原虫のみ選択される。次のマウスへの継代後、薬剤濃度を徐々に上げながら継代を繰り返していき耐性化させる。限外希釈によりクローン化し、薬剤感受性試験により耐性化していることを再確認する。なお対照として、ミューテータ原虫を薬剤暴露なしで継続培養する。

(2) 全ゲノム解析による耐性責任遺伝子の同定と逆遺伝学的証明

耐性化したクローン原虫の DNA を抽出し、ゲノムライブラリを調製後にイルミナ社 HighSeq2000 を用いて全ゲノムシーケンスをおこなう。得られた大量の配列データを progenitor である標準株 (ANKA) にマッピングする。得られた複数の耐性クローンに共通した SNPs を同定し耐性関連遺伝子候補とする。候補変異が複数存在することが想定されるため、遺伝子の構造や機能等から耐性との関連度を推定し、薬剤耐性と優位に関連する候補変異については、ゲノム編集により標準株に当該変異を挿入した組み換え原虫を作成し、その薬剤耐性を解析することで薬剤耐性獲得により深く関与する SNPs を同定していく。

(3) ウガンダおよびパプアニューギニアにおけるマラリア薬剤耐性調査

耐性の候補遺伝子変異が同定された場合、この変異が自然原虫集団で出現しうる変異かどうかについて明らかにするため、現地でマラリア薬剤耐性調査を実施する。これまで継続調査を実施し、薬剤耐性の形質データとゲノムデータが蓄積されているアフリカのウガンダ、太平洋州のパプアニューギニアで薬剤耐性試験を実施する。実際の治療効果については WHO の標準方法に従い ex vivo での評価は WWARN の SOP にしたがった方法を用いる。得られた原虫から DNA を抽出し、薬剤耐性関連遺伝子変異をサンガー法で決定するとともに、一部の検体 (100 例程度) は全ゲノム解析を実施する。以上 3 つの研究項目を実施することで、薬剤耐性獲得に関わる変化をゲノムワイドかつ包括的に解析する。

(4) 包括的加速進化システムを熱帯熱マラリア原虫

熱帯熱マラリア原虫の DNA 合成酵素 (PfPolDel) の校正活性に必須なアミノ酸 2 ヶ所 (D308, E311) は、他の生物の場合と同様に完全に保存されている。これらのコドンアラニンに置換することで *P. berghei* のミューテータ化に成功しており (DNA Res 2014)、熱帯熱マラリア原虫においてもゲノム編集技術 (CRISPR/CAS9) を用いてミューテータ化を試みる。ゲノム編集により組み換え原虫の作成が困難な場合は、熱ショックプロモーターの下流に変異型 *PfPol* 遺伝子を挿入したプラスミドを作成・原虫に導入し、原虫細胞内で変異型 *PfPolDel* タンパクを過剰発現させる。これは、先行研究の酵母を用いた研究で成功している方法である (Kim et al. JMB, 2013)。

4. 研究成果

(1) ACT 併用薬であるピペラキン感受性低下原虫の単離 (図 1) と責任遺伝子の推定

ミューテータ感染マウスに 15mg/kg のピペラキンを 4 日間投与し (図 1)、原虫が出現したら次のマウスへ継代する (図 2)。以上を 8 世代まで実施し、9 世代目には 30mg/kg に濃度を上げた。感受性原虫は 5mg/kg の投与で排除されるが、その 6 倍濃度で生存することが確認された。しかし、*berghei* におけるピペラキン耐性の基準が定まっていないこと、また 50% 致死濃度では感受性型の 1.8 倍であったため、これ

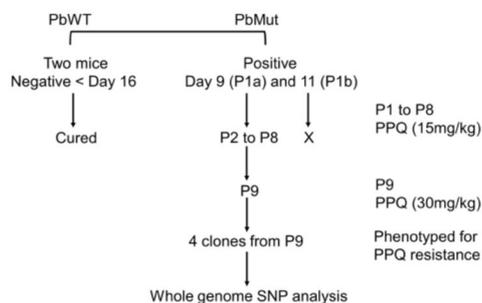


図 1 ピペラキン (PPQ) 耐性原虫の単離 (WT:野生型、Mut:ミューテータ)

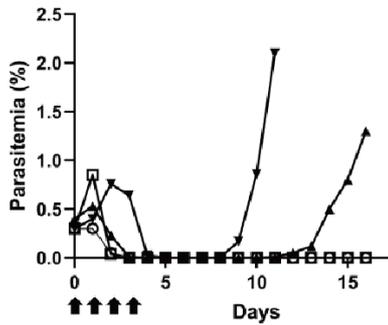


図2 PPQ5mg/kg 治療後（第1世代）

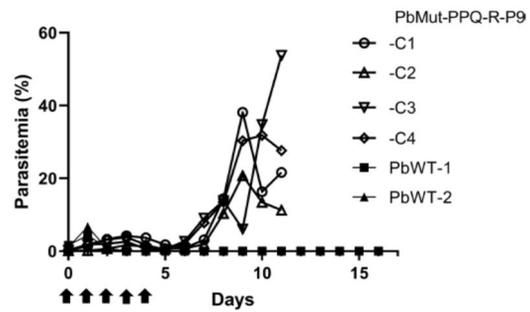


図3 クローニング後のPPQ15mg/kg 投与

を感受性低下原虫とした。

クローニング後に 15mg/kg を 5 日間投与下し、4 つのクローン原虫すべてで 15mg/kg でも生存することを確認した（図 3）。

得られた全てのクローンに共通した SNPs は 8 つであった。うち 4 つは生殖ステージでしか発現しない、または機能ドメインが存在しないと考えられるため、候補遺伝子から除外された。最も興味ある遺伝子はクロロキン耐性の責任遺伝子である *pfcr* である。クロロキン耐性とリンクする K76T ではなく N331I 変異が共通された変異である (Ikeda et al., 2021)。

## (2) ピペラキン感受性低下にかかる *pfcr* の N331I 変異の逆遺伝学的検討

ゲノム編集により感受性原虫に当該変異を挿入した組み換え原虫を作成した。本原虫はピペラキン 15, 30mg/kg では生存しなかったが、5mg/kg ではゆるやかな増殖を示した（図 4）。本原虫をピペラキンの非投与下で増殖スピードを検討したところ、野生型では 5 日目に parasitemia が 15% に達したのに対し、2% 程度と有意な増殖速度の低下が観察された。以上の結果は成果として公表している (Ikeda et al., 2021)。

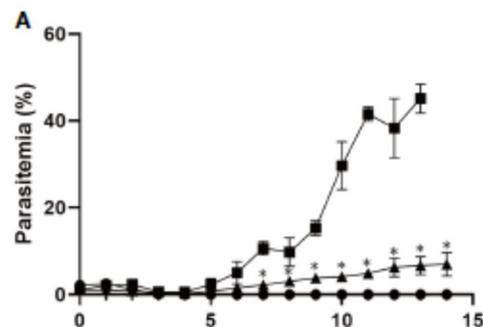


図 4 変異導入原虫 ( ) は PPQ5mg/kg 投与下においてゆるやかに増殖する

## (3) ウガンダおよびパプアニューギニアにおけるマラリア薬剤耐性調査

2014 年から 3 年間ウガンダ共和国のグル市で *in vitro* アッセイ法である Ring-stage survival assay (RSA) を実施した。その結果、194 人のマラリア患者において 2% にあたる 4 人の患者がアルテミシニン耐性原虫に感染していることを見出した (Ikeda et al., 2018)。

次に *in vitro* でのアルテミシニン耐性原虫の臨床的な意義を明らかにするために、2017 年から 3 年間ウガンダ共和国のグル市で *in vivo* 調査を実施した。その結果、240 人のマラリア患者において 5.8% にあたる 14 人が WHO のアルテミシニン耐性基準を満たすことを見出しました。そのうちの 13 人がアルテミシニン耐性責任遺伝子 *Kelch13* 遺伝子に A675V もしくは C469Y の変異を持っていること、変異原虫では *in vitro* レベルでも、野生型原虫より有意に高い耐性レベルであったことを明らかにした (Balikagala et al., 2021)。



2013年から2018年まで in vitro での薬剤アッセイ法を用いて ACT の併用薬の感受性レベルを検討した。計 321 例において結果が得られ (下表) メフロキンにおいては 45%が耐性を示していた (Fukuda et al., 2021)

The geometric means of IC<sub>50</sub>s and prevalence of drug resistance summarized by year.

Year	Total	2013	2014	2015	2017	2018	
MQ	N	177	9	41	48	52	27
	IC <sub>50</sub>	25	27.5	19.6	20.3	37.2	23.9
	[95% CI]	[22.8-27.5]	[22.0-34.5]	[16.2-23.7]	[16.6-24.8]	[33.0-41.8]	[18.7-30.4]
	Resistant - %	81 (45.8)	3 (33.3)	11 (26.8)	15 (31.3)	41 (78.8)	11 (40.7)
AQ	N	111		27	84		
	IC <sub>50</sub>	9.2		9.1	9.3		
	[95% CI]	[8.5-10.0]		[8.2-10.0]	[8.3-10.3]		
	Resistant - %	0		0	0		
PIP	N	84				54	30
	IC <sub>50</sub>	76.3				80.9	68.6
	[95% CI]	[63.7-91.3]				[68.9-94.9]	[44.7-105.3]
	Resistant - %	17 (20.2)				8 (14.8)	9 (30.0)
LUM	N	85	10	24		29	22
	IC <sub>50</sub>	19.1	19	16.1		23.1	17.9
	[95% CI]	[16.8-21.6]	[13.2-27.5]	[12.5-20.6]		[20.0-26.7]	[12.8-25.0]
	Resistant - %	0	0	0		0	0
CQ	N	238	13	45	84	61	35
	IC <sub>50</sub>	25.3	25.5	26.2	24.5	24.5	27.4
	[95% CI]	[24.1-26.5]	[20.0-32.4]	[22.9-29.9]	[22.4-26.7]	[24.8-26.4]	[24.5-30.6]
	Resistant - %	2 (0.8)	0	1 (2.2)	1 (1.1)	0	0
QN	N	200	9	40	63	57	31
	IC <sub>50</sub>	126.5	165.9	102.1	136.8	94.8	222.9
	[95% CI]	[113.9-140.5]	[128.7-213.7]	[86.6-120.4]	[113.9-164.3]	[76.8-117.2]	[170.8-290.9]
	Resistant - %	4 (2.0)	0	0	1 (1.6)	2 (3.5)	1 (3.2)

N: number of cases, IC<sub>50</sub>: half-maximum inhibitory concentration, CI: confidence interval, MQ: mefloquine, AQ: amodiaquine, PIP: piperaquine, LUM: lumefantrine, CQ: chloroquine, QN: quinine.

#### (4) 熱帯熱マラリア原虫を用いた包括的加速進化システムの開発

ネズミマラリア原虫 DNA ポリメラーゼ の校正機能に必須な 2 か所のアミノ酸は PfPolDel においても完全に保存されていた。これら 2 か所のアミノ酸をアラニンに置換した変異型 PfPolDel をドナーとしてベクターに挿入した。次に PAM 配列を検索し、候補 gRNA 配列をドナーベクターへ挿入した。完成したプラスミドと Cas9 発現用プラスミドを Preloading 法により正常赤血球に導入した後、精製した分裂期の熱帯熱マラリア原虫を添加した。培養開始 48 - 96 時間後に感染率が 5%以上に達したことを確認後、選択薬剤として DSM 1 と WR99210 を培地に加えて培養を継続した。感染率 0.1%以上になった時点で DNA を抽出した。PCR で PfPolDel を増幅し、サンガーシーケンスにより変異型 PfPolDel の検出を試みた。3 回行ったトランスフェクションの結果、変異型 PfPolDel は検出できなかった。他の候補 gRNA 配列の採用、および Silent mutation ドナーをポジティブコントロールとして用いた実験条件の最適化の検討が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計25件（うち査読付論文 25件 / うち国際共著 14件 / うちオープンアクセス 19件）

1. 著者名 Mita T, Hombhanje F, Takahashi N, Sekihara M, Yamauchi M, Tsukahara T, Kaneko A, Endo H, Ohashi J	4. 巻 8
2. 論文標題 Rapid selection of sulphadoxine-resistant Plasmodium falciparum and its effect on within-population genetic diversity in Papua New Guinea	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23811-7	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 Sekihara M, Tachibana SI, Yamauchi M, Yatsushiro S, Tiwara S, Fukuda N, Ikeda M, Mori T, Hirai M, Hombhanje F, Mita T	4. 巻 17
2. 論文標題 Lack of significant recovery of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites following discontinuance of chloroquine use in Papua New Guinea	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2585-x	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 Yamamoto T, Yatsushiro S, Hashimoto M, Kajimoto K, Ido Y, Abe K, Sofue Y, Nogami T, Hayashi T, Nagatomi K, Minakawa N, Oka H, Mita T, Kataoka M	4. 巻 132
2. 論文標題 Development of a highly sensitive, quantitative, and rapid detection system for Plasmodium falciparum-infected red blood cells using a fluorescent blue-ray optical system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 375-381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2019.02.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori T, Hirai M, Mita T	4. 巻 9
2. 論文標題 See-through observation of malaria parasite behaviors in the mosquito vector	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38529-3	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 -

1. 著者名 美田敏宏	4. 巻 72
2. 論文標題 薬剤耐性マラリア原虫の進化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝	6. 最初と最後の頁 382-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 美田敏宏	4. 巻 39
2. 論文標題 薬剤耐性マラリアの最新疫学知見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 病原微生物検出情報 国立感染症研究所	6. 最初と最後の頁 173-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 美田敏宏	4. 巻 44
2. 論文標題 蚊媒介感染症に関する最近の話題	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 263-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Balikagala B, Mita T, Ikeda M, Sakurai M, Yatsushiro S, Takahashi N, Tachibana SI, Auma M, Ntege EH, Ito D, Takashima E, Palacpac NM, Egwang TG, Onen JO, Kataoka M, Kimura E, Horii T, Tsuboi T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Absence of in vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Malar J.	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-016-1663-1	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 Ikeda M, Kaneko M, Tachibana SI, Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Yamauchi M, Sekihara M, Hashimoto M, Katuro OT, Olia A, Obwoya PS, Auma MA, Anywar DA, Odongo-Aginya EI, Okello-Onen J, Hirai M, Ohashi J, Palacpac NMQ, Kataoka M, Tsuboi T, Kimura E, Horii T, Mita T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum with High Survival Rates, Uganda, 2014-2016.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerging infectious diseases	6. 最初と最後の頁 718-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2404.170141	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 Rodrigues PT, Valdivia HO, de Oliveira TC, Alves JMP, Duarte A, Cerutti-JC, Buery JC, Brito CFA, de Souza JC Jr, Hirano ZMB, Bueno MG, Catao-DJL, Malafronte RS, Ladeia-AS, Mita T, Santamaria AM, Calzada JE, Tantular IS, Kawamoto F, Raijmakers LRJ, Mueller I, Pacheco MA, Escalante AA, Felger I, Ferreira MU.	4. 巻 8
2. 論文標題 Human migration and the spread of malaria parasites to the New World.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports.	6. 最初と最後の頁 1993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19554-0	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 Hashimoto M, Bando M, Kido JI, Yokota K, Mita T, Kajimoto K, Kataoka M.	4. 巻 73
2. 論文標題 Nucleic acid purification from dried blood spot on FTA Elute Card provides template for polymerase chain reaction for highly sensitive Plasmodium detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101941	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 -

1. 著者名 Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Tachibana SI, Ikeda M, Yamauchi M, Katuro OT, Ntege EH, Sekihara M, Fukuda N, Takahashi N, Yatsushiro S, Mori T, Hirai M, Opio W, Obwoya PS, Anywar DA, Auma MA, Palacpac NMQ, Tsuboi T, Odongo-Aginya EI, Kimura E, Ogwang M, Horii T, Mita T	4. 巻 19
2. 論文標題 Recovery and stable persistence of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites after its discontinued use in Northern Uganda	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Malaria J.	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-020-03157-0	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 Mita T	4. 巻 65
2. 論文標題 Epidemiology of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 130-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Hashimoto M, Yokota K, Kajimoto K, Matsumoto M, Tatsumi A, Nakajima Y, Mita T, Minakawa N, Oka H, Kataoka M	4. 巻 8(11)
2. 論文標題 Highly Sensitive and Rapid Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using an Image Cytometer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8111769	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 -

1. 著者名 Kanoi BN, Nagaoka H, White MT, Morita M, Palacpac NMQ, Ntege EH, Balikagala B, Yeka A, Ewang TG, Horii T, Tsuboi T, Takashima E.	4. 巻 11
2. 論文標題 Global Repertoire of Human Antibodies Against Plasmodium falciparum RIFINs, SURFINs, and STEVORs in a Malaria Exposed Population.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00893	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 Miotto O, Sekihara M, Tachibana SI, Yamauchi M, Pearson RD, Amato R, Goncalves S, Mehra S, Noviyanti R, Marfurt J, Auburn S, Price RN, Mueller I, Ikeda M, Mori T, Hirai M, Tavul L, Hetzel MW, Laman M, Barry AE, Ringwald P, Ohashi J, Hombhanje F, Kwiatkowski DP, Mita T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Emergence of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum with kelch13 C580Y mutations on the island of New Guinea.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	6. 最初と最後の頁 e1009133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009133	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 Yamamoto T, Hashimoto M, Nagatomi K, Nogami T, Sofue Y, Hayashi T, Ido Y, Yatsushiro S, Abe K, Kajimoto K, Tamari N, Awuor B, Sonye G, Kongere J, Munga S, Ohashi J, Oka H, Minakawa N, Kataoka M, Mita T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a quantitative, portable, and automated fluorescent blue-ray device-based malaria diagnostic equipment with an on-disc SiO <sub>2</sub> (2) nanofiber filter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63615-2	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 Hashimoto M, Yokota K, Kajimoto K, Matsumoto M, Tatsumi A, Yamamoto K, Hyodo T, Matsushita K, Minakawa N, Mita T, Oka H, Kataoka M.	4. 巻 8(9)
2. 論文標題 Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using, LUNA-FL, A Fluorescent Cell Counter.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8091356	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 -

1. 著者名 Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuru OT, Tachibana SI, Yamauchi M, Opiyo W, Emoto S, Anywar DA, Kimura E, Palacpac NMQ, Odongo-Aginya EI, Ogwang M, Horii T, Mita T.	4. 巻 385
2. 論文標題 Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 N Engl J Med	6. 最初と最後の頁 1163-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMoa2101746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mita T, Hirai M, Maki Y, Nahar S, Yoshida N, Oshima Y, Kikuchi H, Kubohara Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Derivatives of Dictyostelium differentiation-inducing factors suppress the growth of Plasmodium parasites in vitro and in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 114834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirai M, Maeta A, Mori T, Mita T	4. 巻 10(12)
2. 論文標題 Pb103 Regulates Zygote/Ookinete Development in Plasmodium berghei via Double Zinc Finger Domains.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10121536	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 -

1. 著者名 Yoshida N, Yamauchi M, Morikawa R, Hombhanje F, Mita T	4. 巻 20
2. 論文標題 Increase in the proportion of Plasmodium falciparum with kelch13 C580Y mutation and decline in pfprt and pfmdr1 mutant alleles in Papua New Guinea.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Malar J.	6. 最初と最後の頁 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-021-03933-6	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 Ikeda M, Hirai M, Tachibana SI, Mori T, Mita T	4. 巻 11
2. 論文標題 Isolation of Mutants With Reduced Susceptibility to Piperaquine From a Mutator of the Rodent Malaria Parasite Plasmodium berghei.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 672691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.672691	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 -

1. 著者名 Yamauchi M, Hirai M, Tachibana SI, Mori T, Mita T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Fitness of sulfadoxine-resistant Plasmodium berghei harboring a single mutation in dihydropteroate synthase (dhps).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Trop.	6. 最初と最後の頁 106049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2021.106049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda N, Tachibana SI, Ikeda M, Sakurai-Yatsushiro M, Balikagala B, Katuru OT, Yamauchi M, Emoto S, Hashimoto M, Yatsushiro S, Sekihara M, Mori T, Hirai M, Opio W, Obwoya PS, Auma MA, Anywar DA, Kataoka M, Palacpac NMQ, Odongo-Aginya EI, Kimura E, Ogwang M, Horii T, Mita T.	4. 巻 81
2. 論文標題 Ex vivo susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs in Northern Uganda	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 102277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102277	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38件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 29件)

1. 発表者名 Taniguchi T. Miyauchi E. Olia A. Nagayasu E. Osbert K. Suzue K. Imai T. Shimokawa C. Onishi R. Odongo-Aginya EI. Palacpac N. Maruyama H. Kimura E. Mita T. Ohno H. Horii T. and Hisaeda H.
2. 発表標題 Altered gut microbiota composition in Plasmodium falciparum patients in Uganda
3. 学会等名 14th International congress of parastiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mita T. Tachibana S. Sekihara M. Yamauchi M. Hombhanje F. and Ohashi J
2. 発表標題 Global issue of drug resistant malaria and population structure of malaria parasites for global malaria control
3. 学会等名 14th International congress of parastiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mita T. Ikeda M. Kaneko M. Tachibana S. Balikagala B. Sakurai-Yatsushiro M. Yatsushiro S. Takahashi N. Yamauchi M. Sekihara M. Hashimoto M. Obwoya PS. Auma MA. Anywar DA. Odongo-Aginya EI. Hirai M. Ohashi J. Palacpac NMQ. Kataoka M. Tsuboi T. Kimura E. and Horii T
2. 発表標題 Detection of Artemisinin-resistant Plasmodium falciparum with High Survival Rates in Uganda
3. 学会等名 14th International congress of parastiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平井誠, 池田美恵, 橘真一郎, 美田敏宏.
2. 発表標題 原虫学・寄生虫学が現代のトップサイエンスにもたらす貢献 マラリアミューテーター マラリア原虫薬剤耐性進化解明の新たな研究ツール.
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 美田敏宏
2. 発表標題 End malaria-マラリアのeliminationをめざして アルテミシニン耐性の評価・検出ツールは出そろったか? 流行地でのフィールド調査から見えてきた問題点.
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会.(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 美田敏宏
2. 発表標題 人類を助ける進化学研究: 進化し続ける薬剤耐性マラリアの克服.
3. 学会等名 公益信託 進化学振興木村資生基金 “微生物と人類の共存” をゲノムの視点から考える.(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池田美恵, 橘真一郎, 山内祐人, Auma M, 関原誠, 森稔幸, 平井誠, Palacpac N, 木村英作, Aginya E, 堀井俊宏, 美田敏宏.
2. 発表標題 ウガンダにおけるin vivo薬剤耐性試験およびRSAを用いたアルテミシニン耐性疫学調査.
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口委代, 宮内栄治, OliaAlex, 長安英治, OsbertKaturo, 鈴江一友, 今井孝, 下川周子, 大西里咲, I. O-A, PalacpacNirianne, 丸山治彦, 木村英作, 美田敏宏, 大野博司, 堀井俊宏, 久枝一.
2. 発表標題 ウガンダ国の熱帯熱マラリア患者において腸内細菌叢の変化が起こる.
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会プログラム・抄録集.(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前多晟壮, 森稔幸, 平井誠, 美田敏宏.
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫の有性生殖関連分子の機能解析.
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 森稔幸, 平井誠, 美田敏宏
2. 発表標題 マラリア原虫有性生殖の透視観察法の開発
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 山内祐人, 橘真一郎, 池田美恵, 関原誠, Balikagala B, 八代-櫻井美樹, 平井誠, Palacpac N, 木村英作, 堀井俊宏, 美田敏宏.
2. 発表標題 ウガンダにおける熱帯熱マラリア原虫キニーネ感受性の実態.
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋真一郎, 池田美恵, Balikagala B, 櫻井美樹, 八代聖基, 関原誠, 山内祐人, Auma MA, 平井誠, 森稔幸, Palacpac N, 片岡正俊, 木村英作, 堀井俊宏, 美田敏宏.
2. 発表標題 宿主内競争による熱帯熱マラリア原虫のクロロキン感受性の回復.
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関原誠, 橋真一郎, 美田敏宏.
2. 発表標題 Epidemiology of antimalarial drug resistance in Papua New Guinea.
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tachibana S-I, Mori T, Hirai M, Mita T
2. 発表標題 Prerequisite Emergence of Background Mutations For Kelch13-Related Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum Isolates.
3. 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mita T, Ikeda M, Kaneko M, Balikagala B, Tachibana S-I, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Hashimoto M, Katuru O, Olia A, Obwoya P, Auma M, Anywar D, Odongo-Aginya E, Hirai M, Palacpac N, Kataoka M, Tsuboi T, Kimura E, Horii T.
2. 発表標題 Detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum isolates with ex-vivo ring-stage survival assay in Uganda.
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference: Malaria: (国際学会)
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 Mita T
2 . 発表標題 A mutator Plasmodium berghei model to investigate antimalarial drug resistance.
3 . 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Maeta A, Hirai M, Mori T, Mita T
2 . 発表標題 Pb102, A Novel Gene Essential for Female Fertility or Ookinete Maturation of Murine Malaria Parasite, Plasmodium Berghei.
3 . 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Hirai M, Ikeda M, Tachibana S-I, Mita T
2 . 発表標題 Isolation of Piperaquine Resistant Rodent Malaria Parasite from Mutator Malaria.
3 . 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Ochiai S, Maeda J, Hirai M, Mita T, Mori T
2 . 発表標題 Synthetic biotin ligase enables to label surface invasion factors of cultured human malaria parasite, Plasmodium falciparum.
3 . 学会等名 68th American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting, Maryland USA (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Miotto O, Sekihara M, Tachibana S, Yamauchi M, Pearson R, Amato R, Goncalves S, Somya M, Noviyanti R, Marfurt J, Auburn S, Price R, Mueller I, Ikeda M, Mori T, Hirai M, Tavul L, Hetzel M, Laman M, Barry A, Ringwald P, Ohashi J, Hombhanje F, Kwiatkowski D, Mita T.
2. 発表標題 Emergence of artemisinin-resistant <i>P. falciparum</i> with kelch13 C580Y mutations on the island of New Guinea.
3. 学会等名 68th American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mita T
2. 発表標題 Epidemiology and evolution of artemisinin-resistant <i>Plasmodium falciparum</i> parasites.
3. 学会等名 Asia - Pacific Scientific Workshop. National University of Singapore (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 落合紗雪、前田樹里、平井誠、美田敏宏、森稔幸
2. 発表標題 ピオチン化を用いた、新規マラリア原虫赤血球侵入関連因子の探索
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 片山瑞希、山内祐人、美田敏宏
2. 発表標題 ウガンダにおけるマラリア予防政策とその実態
3. 学会等名 第79回日本寄生虫学会東日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 美恵 , 金子 恵 , 橘 真一郎 , 山内 祐人 , パリカガラ ベティ, 江本 桜子, 福田 直到, 牧 喜子, 森 稔幸, 平井 誠 , 橋本 宗明, カツロ オスベルト, アウマ マリー, アニワー デニス, パラクパック ニリアン, 片岡 正俊, アギニア エマニュエル, 木村 英作, 堀井 俊宏 , 美田 敏宏
2. 発表標題 ウガンダ北部マラリア原虫集団におけるアルテミシニン耐性レベルの推移
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 パリカガラ ベティ, 池田 美恵, 橘 真一郎, 山内 祐人, 福田 直到, 関原 誠, 江本 桜子, Katuru Osbert T., Opio Walter, Auma Mary, Anywar Denis A., 森 稔幸, 平井 誠, 片岡 正俊, Palacpac Nirianne M.Q., Odongo-Aginya Emmanuel I., 木村 英作, 堀井 俊宏 , 美田 敏宏
2. 発表標題 In-vivo artemisinin resistance may have emerged in Uganda,
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内 祐人, 平井 誠, 橘 慎一郎, 森 稔幸, 美田 敏宏
2. 発表標題 蚊-マウスモデルにおけるサルファドキシン耐性マラリア原虫の適応度に関する研究
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 美田敏宏
2. 発表標題 マラリアの現状と薬剤耐性の最前線
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第9回例会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Balikagala Betty
2. 発表標題 In vivo artemisinin resistance has emerged in Uganda (Africa).
3. 学会等名 The United States-Japan Cooperative Medical Science Program. The 50th Joint Conference on Parasitic Diseases, in Ehime Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 誠、森 稔幸、美田 敏宏
2. 発表標題 アルテミシニン耐性マーカーKelch13 ネズミマラリア原虫オルソログの機能解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田 直到, Balikagala B, 山内祐人, 牧 喜子, 江本 桜子, 落合 紗雪, Katuro O, 橘 真一郎, Anywar D, Palacpac N, 木村 英作, Odingo-Aginya E, 三井田 孝, 堀井 俊宏, 美田 敏宏
2. 発表標題 血管内皮との接着は熱帯熱マラリア原虫のアルテミシニン抵抗性を増強する
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美田敏宏
2. 発表標題 アフリカに出現したアルテミシニン耐性
3. 学会等名 日本熱帯医学会受賞記念講演 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 誠、森 稔幸、美田 敏宏
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫Kelch13のインターラクトーム解析
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 直到, Balikagala B, 江本 桜子, 上野 剛, Katuro O, Palacpac N, 木村 英作, 三井田 孝, 堀井 俊宏, 美田 敏宏
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫 - 血管内皮間の接着と脂質代謝異常の関連
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 菜穂子、山内 祐人、森川 瞭介、宋 書馨、平井 誠、美田 敏宏
2. 発表標題 パプアニューギニアにおけるKelch 13 C580Y変異熱帯熱マラリア原虫の出現と現状
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 シジルエルデネ ムンフソブド、吉田 菜穂子、千葉 結奈、Francis Hombhanje、美田 敏宏
2. 発表標題 Papua New Guinea におけるマラリア迅速検査の感度と特異度の解析
3. 学会等名 第 80 回日本寄生虫学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田 治亮、吉田 菜穂子、山内 祐人、Francis Hombhanje、美田 敏宏.
2. 発表標題 20年にわたるパプアニューギニアでのサルファドキシシ・ピリメサミンの使用は薬剤耐性をもたらしたか？
3. 学会等名 第 80 回日本寄生虫学会東日本支部大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宋 書馨、吉田 菜穂子、稲葉 悠、堀 敦詞、福田 直到、三井田 孝、美田 敏宏
2. 発表標題 血清リボタンパクは熱帯熱マラリア原虫の増殖を促進するのか？
3. 学会等名 第 80 回日本寄生虫学会東日本支部大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Betty Balikagala
2. 発表標題 Emergence of artemisinin resistance in Africa.
3. 学会等名 The 90th Annual meeting of the Japanese Society of Parasitology（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マラリア原虫の増殖抑制剤	発明者 美田敏宏、久保原禅	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-040682	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

美田敏宏. "マラリア治療薬の耐性原虫アフリカに出現" 科学新聞 2018.4.6,  
 "マラリア薬に耐性 アフリカでも原虫"日経新聞朝刊 2018.4.23, "アフリカで耐性マラリアの蔓延を確認 順天堂大など国際共同研究"朝日新聞デジタル  
 2021.9.23, TOPICS "ウガンダ 耐性マラリア蔓延"朝日新聞夕刊 2021.9.27, "薬剤耐性マラリア アフリカで出現"科学新聞 2021.10.8, 教育・科学短信"  
 アフリカに耐性マラリア"熊本日日新聞朝刊 2021.11.26, トピックス"アフリカに治療薬耐性マラリア"北海道新聞夕刊 2021.11.27, 科学スコープ"アフリカ  
 に耐性マラリア"京都新聞夕刊 2022.3.9, その他 中国新聞、福井新聞、河北新報に掲載される。  
 NHK BS1 2021.10.7"WHOマラリアワクチンはじめて推奨"に取り上げられる。  
 "Threat of drug-resistant malaria looms in Africa" Nature INFECTIOUS DISEASE 2021.9.24, Science NEWS21,2021.

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	平井 誠  (Hirai Makoto)  (50326849)	順天堂大学・医学部・准教授    (32620)	

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			
ウガンダ	グル大学			
パプアニューギニア	デバイン大学			
英国	オックスフォード大学			
タイ	マヒドン大学			