

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B)（海外学術調査）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04513

研究課題名（和文）薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の耐性遺伝子の多型と拡散はなぜ特定の地域で起こるのか

研究課題名（英文）Why polymorphism and spread of resistance genes in drug-resistant Plasmodium falciparum occur in specific regions

研究代表者

前野 芳正（Maeno, Yoshimasa）

藤田医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：70131191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の耐性遺伝子の多型と拡散はなぜ特定の地域で起こるのか解析するため、媒介蚊と人とそれらの行動を解析した。

Binh Phuoc省において、アルテミシニン耐性責任遺伝子として同定されているK13遺伝子の変異を指標として解析した結果、アルテミシニン使用当初は全て野生株であったが、使用と共に変異株の陽性率、変異の多型の種類が多くなっていった。ところが、直近の調査ではそれらは何れも減少していた。伝播に重要な生殖母体遺伝子のアレルの種類も減少していた。原虫はもちろん人の生活様式を包含する地域の環境特性に起因していることが推測された。またこれらの現象は地域差があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本調査の主目的としてベトナム南部地域における薬剤耐性熱帯熱マラリアの現況の解析を行ったばかりでなく、基盤調査として実施したヒトおよびサルマラリア原虫の感染状況を明らかにした。得られた結果は、ベトナム南部ばかりでなく大メコン圏の一地域における実態を明らかにした。基盤調査における媒介蚊の調査では、サルマラリアとヒトマラリアの混合感染が証明され、新しい人獣共通感染性サルマラリアの可能性が新知見として挙げられた。また、薬剤耐性熱帯熱マラリアの耐性関連遺伝子の変化を見出したことにより、新しい治療方針策定のための基盤資料となった。これらの基盤資料はベトナムにおけるマラリア対策の指針となると思われる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the mutation of K13 gene, which is identified as the gene responsible for resistance to artemisinin in Binh Phuoc province, as an index.

As a result, all strains were wild strains in the early stage of artemisinin use. The positive rate of mutant strains and the number of different types of mutation sites increased depending on the use. However, in the latest survey, they all decreased. The number of allele types of the gametocyte related specific mRNA gene, which is important for malaria parasites transmission, was also reduced. It was suggested that these were derived from the characteristics of the local environment such as the lifestyle of people as well as the protozoa. Moreover, these phenomena differed depending on the region.

研究分野：寄生虫学

キーワード：熱帯熱マラリア 薬剤耐性 住民 媒介蚊 疫学調査 分子生物学 ベトナム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアは主要な感染症の一つである。国際関係機関が対象国とともにマラリアの根絶にむけて各種方策を行っているが、現在も解決できていない感染症となっている。東南アジアに広くみられる「森林マラリア」は、マラリア原虫を媒介する蚊がヒトの居住地に現れることなく森林に潜んでいることより様々な対策を実施しても効果が希薄となっている。このことが東南アジアにおいてマラリアが根絶できない主要な要因となっている。

かかる状況において、マラリアの現状における重大な問題点の一つは、早期に適切な診断、治療を行わないと致死的となる熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性株の出現と拡散である。現在マラリア治療に広く用いられているアルテミシニン誘導体は、1970年代に中国でヨモギ属のクソニンジン(*Artemisia annua*)の抽出成分から作られた抗マラリア薬である。2000年代に入り、本誘導体を中心とした併用療法がマラリア治療の中核なすようになったが、耐性原虫の出現が懸念されていた。2009年、アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の出現がタイ・カンボジア国境から報告された。その後、東南アジアを中心として耐性原虫の分布域の拡大が報告されてきている。

熱帯熱マラリア原虫のアルテミシニン耐性の機構解析が進み、2014年に熱帯熱マラリア原虫 PF3D7\_1343700 kelch propeller domain (*K13-propeller*) がアルテミシニン耐性の責任遺伝子として同定された。*K13-propeller* の変異型遺伝子の出現頻度の上昇は、西カンボジアにおける最近の耐性拡大と相関していることが報告されている。しかし、耐性原虫の拡散に係わる重要な問題点と思われる耐性マラリア原虫の伝播については検討されておらず、解明すべき点とされる。カンボジアの隣国であるベトナムにおいてもアルテミシニン耐性マラリア原虫に関する種々な事項が十分な調査研究がなされていないのが現況である。

### 2. 研究の目的

本研究では、近年、マラリア特効薬とされているアルテミシニンに対し耐性を示す熱帯熱マラリアが東南アジアを中心として拡大し、マラリア根絶への障害となっている。この薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の耐性に係わる遺伝子の特定、多型について報告がなされ、その多型が地域により偏在をみせているが、その原因はベトナムを含め解明されていない。かかる状況において「アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の耐性関連遺伝子の多型とその拡散はなぜ特定の地域で起きるのか」を、人類学的および分子疫学的現地調査、すなわち住民および媒介蚊の行動とそれぞれが保有するマラリア原虫の調査を通し、森林型マラリアにおけるマラリア伝播の実態について科学的に理解を深め、その地域に立脚し、「森林マラリア」に特化した薬剤耐性マラリア対策の提案を目指した。

### 3. 研究の方法

三か年の調査研究期間を段階的に分け、分子疫学的調査(ヒトおよび媒介蚊のマラリア原虫感染各種調査、薬剤耐性関連遺伝子の多型の解析)と住民の各種行動などの調査を同時並行して行った。

最初は Active case detection (ACD)と Passive case detection (PCD)によって全体像を把握した。得られた結果から、薬剤耐性株感染集団とそうでない集団に分け、相違点の把握を行った。その解析結果に対する各種専門家の意見を聴取し、目的に沿ったデータ取得を行うべく、修正した。

次に、全体像の把握から修正された方法に沿い、標的とすべき集団

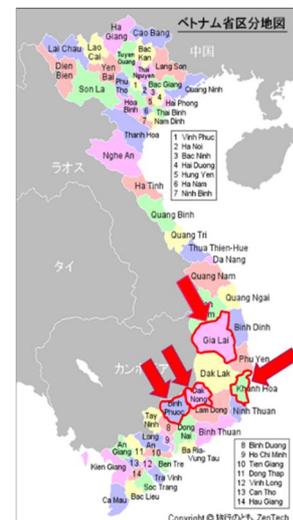


図1. 調査実施地域

の絞り込みを行い、より綿密な行動調査、分子疫学的調査を行った。調査結果をまとめ、修正を行い、前年と同様な工程を経て調査を進め、複雑な多元的な科学的データを理解、解析を行った。

本調査はカンボジアと国境を接するベトナム社会主義共和国 Binh Phuoc 省を主対象地とし、他のベトナム南部に位置する Khanh Hoa 省、Dak Nong 省および Gia Lai 省を検討補完対照地とした(図 1)。本調査は研究代表者および分担者だけでは実施不可能であるため、ベトナム国立マラリア学、寄生虫学、昆虫学研究所 (NIMPE) および地方自治体 CDC 研究協力者と協働し、実施した。

#### 4. 研究成果

##### ヒト及び媒介蚊(*Anopheles dirus*)の感染状況

ヒトサンプルは Binh Phuoc 省 Bu Gia Map 地域保健センターにおいて Passive case detection (PCD)を 2018 年 5 月から 2019 年 4 月に実施した。発熱などマラリア感染の疑いの患者末梢血をマラリア検出用迅速キット (RDT) によりマラリア患者の検出を行った。その結果、ヒト血液サンプル 48 例にマラリア感染が認められた(表 1)。感染例のうちヒトマラリアとして熱帯熱マラリア(Pf) 23 例、三日熱マラリア(Pv) 24 例及び熱帯熱マラリア及び三日熱マラリアの混合感染の 1 例が認められた。しかし、ヒトマラリアの四日熱マラリア(Pm)及びサルマラリア(*P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. inui*, *P. coatneyi*) 感染は認められなかった。これらの内、24 例の熱帯熱マラリア感染例を *K13-propeller* 遺伝子の変異、生殖母体関連遺伝子 *pf8377* アレル解析の検討対象とした(表 1)。

表 1. 検討対象患者のマラリア

No. Examined	48
Age	28 ± 12 (3 ~ 61)
Sex	47 : 1 (M : F)
BT	38.5 ± 0.5 (37.7 ~ 39.6)
PCR	Pf : 23
	Pv : 24
	Pm : 0
	Pf + Pv : 1
	<i>P. knowlesi</i> : 0
	<i>P. cynomolgi</i> : 0
	<i>P. inui</i> : 0
	<i>P. coatneyi</i> : 0

媒介蚊も同時期、同地区、特に媒介蚊の特性を考案国立公園内で採集した。媒介蚊を胸部と腹部に分け、マラリア原虫の感染状況を PCR 法にて解析した。その結果、媒介蚊 (*An. dirus*) のマラリア原虫の感染は、1398 検体中 49 検体 (3.5%) であり、胸部からは 28 検体 (2.0%)、腹部からは 21 検体 (1.5%) にマラリア原虫感染が認められた。感染が認められたマラリア原虫のうち、ヒトマラリア原虫の熱帯熱マラリア原虫 (Pf) と三日熱マラリア原虫 (Pv) 以外にサルマラリア原虫 (*Pin*, *P. inui*; *Pcy*, *P. cynomolgi*; *Pct*, *P. coatneyi*; *Pfil*, *P. fieldi*; *Pk*, *P. knowlesi*)

表 2. 媒介蚊の マラリア感染状況

Infection	<i>Plasmodium</i> spp.	No. of mosquitoes infected		
		Total	Thorax	Abdomen
Single (37)	Pf	14	7	7
	Pv	5	3	2
	<i>Pin</i>	10	4	6
	<i>Pcy</i>	6	5	1
	<i>Pct</i>	1	0	1
	<i>Pfil</i>	1	0	1
	Double (8)	Pf, Pv	2	0
Pf, <i>Pk</i>		1	1	0
Pf, <i>Pin</i>		1	0	1
Pv, <i>Pin</i>		3	3	0
<i>Pin</i> , <i>Pct</i>		1	1	0
Triple (4)		Pv, <i>Pin</i> , <i>Pcy</i>	3	3
	Pv, <i>Pin</i> , <i>Pct</i>	1	1	0
No. of PCR-positive		49	28	21
No. of PCR-negative		1349	1370	1377
No. of samples analyzed		1398	1398	1398

の感染が単種及び混合感染として存在していることが認められた(表 2)。媒介蚊についてもヒトサンプルと同様、感染熱帯熱マラリア原虫の *K13* 遺伝子の変異を解析した。

##### ヒトの行動調査

調査対象地区住民の日常の行動調査を行った。その結果、村に居住し村外では作業をしない集団ではマラリア感染を検出しなかった。しかし、熱帯熱マラリア感染者 24 例のうち、村に居住している者 21 例、村周辺居住が 3 例であった。また、作業に伴う外泊地では、村内及びその周辺が 5 例に対し国立公園内が 19 例であり、熱帯熱マラリア感染者の多くが国立公園内での感染であった(図 2)。三日熱マラリア感染例でも同様の結果を得た。

国立公園内での感染者は、多くは公園の維持、管理者であり、特に村から遠隔地で国境付近の公園内で長期間宿泊を伴う作業従事者であった。その他、公園に接するゴム園での作業従事者であった。これらの事実より、主な感染場所は国立公園内であり、そこでの人の行動に起因してい

ることが推測された。

### Binh Phuoc 省における *K13*-propeller 遺伝子変異の経時変化

Binh Phuoc 省における *K13*-propeller 遺伝子変異の経時変化を Binh Phuoc 省における過去の調査で採取し、保存してあったヒト血液 DNA 検体を用い解析した。その結果、アルテミシニン使用開始前後の 2002 年の保存検体 30 検体では 30 検体全てが野生株であった。しかし、アルテミシニン使用が進んだ 2012 年の検体 32 検体中 31 検体 (97%) が、2015 年の検体では 24 検体中 23 検体 (96%) が変異株であった。2018 年-2019 年の調査では 24 検体中 17 検体 (71%) が変異株であった。

### Binh Phuoc 省における *K13*-propeller 遺伝子変異種の経時変化

Binh Phuoc 省における *K13*-propeller 遺伝子変異種の経時変化について解析した。2012 年の検体、変異株 31 検体では、P553L 変異 6 検体、V568G 変異 8 検体、C580Y 変異 2 検体、P553L+V568G の変異混合 5 検体、P553L+C580Y の変異混合 1 検体及び野生+V568G 変異 1 検体の変異混合が検出された。同様に 2015 年の検体、変異株 23 検体では、P553L 変異が 13 検体、V568G 変異が 14 検体、C580Y 変異が 3 検体、野生+V568G 変異の変異混合 1 検体が検出された。しかし、2018-2019 年の検体、変異株 17 検体では C580Y 変異が 17 検体と変異が C580Y の 1 種だけになっていた (図 2)。

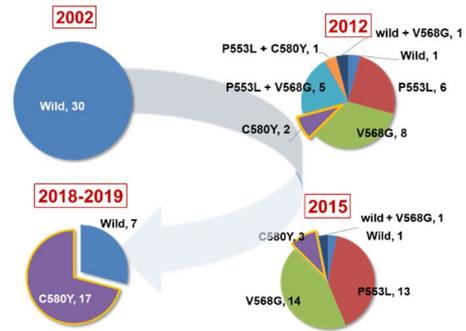


図 2. Binh Phuoc 省における *K13*-propeller 遺伝子変異種の経時変化

### *K13*-propeller 遺伝子と *pfg377* (生殖母体特異遺伝子) との関連

調査対象地において、アルテミシニン使用開始前後の 2002 年からアルテミシニンの使用につれ変異株種が多くなり 2018-2019 年では変異株の陽性率と種共に減少していた。この経時変化と原虫伝播に関連性があるか否かについて検討した。原虫伝播の指標として伝播の重要な位置にある雌生殖母体特異遺伝子として報告されている *pfg377* の mRNA アレルを測定した。

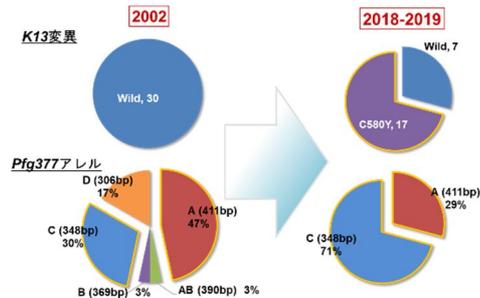


図 3. *K13* 変異と *pfg377*(生殖母体特異遺伝子) との関連

図 5 に示すように、2002 年の *pfg377*mRNA アレルは 6 種のアレルを検出したが、2018-2019 年の検体では 2 種に収束していた (図 3)。

### *K13*-propeller 遺伝子変異の地域差の有無

Binh Phuoc 省 (BP) における *K13*-propeller 遺伝子変異が地域特異であるか否かについて、Binh Phuoc 省に国立公園が接している Dak Nong 省 (DN)、Binh Phuoc 省と同様にカンボジア国境に接しているが距離的に離れている Gia Lai 省 (GL)、そして Binh Phuoc 省とは距離的に異なる位置にある Khanh Hoa 省 (KP) (図 6) 以

表 3. *K13*-propeller 遺伝子変異の地域差

	WT	P553L	V568G	C580Y	mixed pattern (No.)
KP	14	11	0	0	WT+P553L(4)
BP	1	6	8	2	P553L+V568G(5) P553L+C580Y(1) WT+V568G(1)
DN	0	3	2	4	P553L+V568G+C580Y(1) P553L+C580Y(1)
GL	1	2	0	0	ND

2012年のサンプルと比較

上 3 省との比較を *K13-propeller* 遺伝子変異が最もみられた 2012 年の検体を用いて検討した。

表 3 に示すように、Binh Phuoc 省 (BP) に隣接している Dak Nong 省 (DN) の変異株は Binh Phuoc 省 (BP) と同様、P553L 変異と V568G 変異、C580Y 変異の 3 種であり、変異の混合株も認められた。Binh Phuoc 省と同様にカンボジア国境に接しているが距離的に離れている Gia Lai 省 (GL) では、検体数も少なかったため P553L 変異だけが認められた。Binh Phuoc 省とは距離的に異なる位置にある Khanh Hoa 省 (KP) では、Gia Lai 省と同様 P553L 変異だけが認められた。

## まとめ

本調査研究課題を遂行した結果より、Binh Phuoc 省におけるマラリア感染は国立公園などの自然林内あるいはその周辺に短期間でも頻繁に立ち入るあるいは長期間立ち入る、そしてそこで宿泊するという人の行動様式に起因していることが示唆された。本調査研究の基礎調査において、調査地区の主媒介蚊である *An. dirus* に感染しているマラリア原虫種の解析をすると、熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫というヒトマラリア原虫の他、*P. inui* や *P. cynomolgi*、*P. coatneyi*、*P. fieldi*、*P. knowlesi* の感染を認めた。これは何時でも新しい人獣共通感染症、殊に *P. cynomolgi* と *P. knowlesi* の感染が起きる可能性を付帯検討事項であるが強く示唆された。

アルテミシニン及びその誘導体は、マラリア特に熱帯熱マラリアの特効薬として 2000 年代より広く本誘導体を中心薬とした併用療法 (Artemisinin-based Combination Therapy; ACT) が世界中の流行地で導入されたことによりマラリア死亡者は著明に減少した。しかし、アルテミシン耐性熱帯熱マラリア原虫の出現が懸念されていた。事実、2009 年にタイ・カンボジア国境での第一報後、分布域が拡大している。ベトナムにおいても耐性原虫の報告が散発的にあるが、系統だった調査報告はない。そのため本調査研究を行った。*K13-propeller* 遺伝子の変異を指標として検索した結果、2002 年の検体では全て野生株であったが 2012 年、2015 年の検体ではほとんどの検体に変異株になっており、変異部位は P553L と V568G、C580Y の 3 種であった。検出された 3 種の変異は本調査対象地と隣接している Dak Nong 省では検出されたが Gia Lai 省と Khanh Hoa 省では P553L 変異だけが検出された。この P553L 変異はベトナムだけで検出され、周辺国では検出されていない変異であった。なぜこの変異がベトナムだけに出現したのか。また、この変異以外の変異が Gia Lai 省と Khanh Hoa 省では起きなかったのか今回の調査研究では解明できず、今後の検討課題とされた。

*K13-propeller* 遺伝子の変異を経時的に観察した結果、2018-2019 年の検体では、変異が C580Y の 1 種だけになっていた。この C580Y 変異は耐性が存在するメコン流域で最も広く分布している変異であり、もともとは他の変異が優位であった地域においても本検討対象地と同様、C580Y が他変異に取って代わってきている。この要因はマラリア原虫の伝播におけるいずれかの発育段階が関与している可能性を考え、伝播の中心である生殖母体特異遺伝子の *pfg377mRNA* アレルを解析すると 2002 年には 6 種のアレルが検出されたが 2018-2019 年の検体では 2 種に収束されていた。このような事実より、耐性変異を獲得するとそれと引き換えにフィットネス (適応度: 次世代に残す子孫の期待値) が低下することは良く知られている。C580Y 変異ではフィットネスの低下が他の変異に比べ低いこと、さらに *K13-propeller* 以外のバックグラウンド変異がフィットネスをさらに代償する可能性が推測された。

以上の調査結果、「殊に森林地帯で宿泊を伴う作業がマラリア感染の重要な要因であり、現在もなおアルテミシン耐性マラリアが存在していること」をベトナムの共同研究者に報告し、マラリア対策の基礎資料として有効活用することになった。また、ベトナム国立研究所の依頼に基づき、ベトナムの若手研究者に塩基配列の解析方法などの技術移転を行い、認定書の発行を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Chinh VD, Hung VV, Binh NTH, Hanh TV, Maeno Y, Nakazawa S.	4. 巻 3
2. 論文標題 Malaria vector and Plasmodium infection in mosquitoes in endemic areas of Gia Lai and Khanh Hoa provinces, Vietnam.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vietnam J Infct Dis	6. 最初と最後の頁 83-91
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 Chinh VD, Masuda G, Hung VV, Takagi H, Kawai S, Annoura T, Maeno Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Prevalence of human and non-human primate Plasmodium parasites in anopheline mosquitoes: a cross-sectional epidemiological study in Southern Vietnam.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trop Med Health	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-019-0139-8	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 Pongvongsa Tiengkham, Culleton Richard, Ha Hoang, Thanh Le, Phongmany Panom, Marchand Ron P., Kawai Satoru, Moji Kazuhiko, Nakazawa Shusuke, Maeno Yoshimasa	4. 巻 46
2. 論文標題 Human infection with Plasmodium knowlesi on the Laos-Vietnam border	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-018-0116-7	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 Maeno Yoshimasa	4. 巻 45
2. 論文標題 Molecular epidemiology of mosquitoes for the transmission of forest malaria in south-central Vietnam	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-017-0065-6	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 -

1. 著者名 Maeno Yoshimasa, Quang Nguyen Tuyen, Culleton Richard, Kawai Satoru, Masuda Gaku, Hori Kaoru, Nakazawa Shusuke, Marchand Ron P.	4. 巻 10
2. 論文標題 Detection of the Plasmodium falciparum Kelch-13 gene P553L mutation in sporozoites isolated from mosquito salivary glands in South-Central Vietnam	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-017-2247-9	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 MAENO Y., CULLETON R., QUANG N. T., KAWAI S., MARCHAND R. P., NAKAZAWA S.	4. 巻 144
2. 論文標題 Plasmodium knowlesi and human malaria parasites in Khan Phu, Vietnam: Gametocyte production in humans and frequent co-infection of mosquitoes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 527 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0031182016002110	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
研究分担者	益田 岳  (MASUDA Gaku)  (00455916)	京都大学・東南アジア地域研究研究所・連携助教   (14301)	
研究分担者	高木 秀和  (TAKAGI Hidekazu)  (90288522)	愛知医科大学・医学部・講師   (33920)	
研究協力者	川合 寛  (KAWAI Satoru)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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	案浦 健  (ANNOURA Satoshi)		
研究協力者	カレントン リチャード  (CULLENTON Richard)		
研究協力者	チン ヴー ドック  (Chinh Vu Duc)		
研究協力者	フン ヴー ヴィエット  (Hung Vu Viet)		
研究協力者	ポンヴォンサ ティエンカム  (Pongvongsa Tiengkham)		
研究協力者	ハ ホン  (Ha Hoang)		
研究協力者	マチャンド ロン  (MARCHAND Ron P)		
研究協力者	クワン グエン テュエン  (Quang Nguyen Tuyen)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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	門司 和彦  (MOJI Kazuhiko)		