

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22406012

研究課題名(和文) パプアニューギニアにおけるマラリア薬剤耐性ダイナミズムの集団遺伝学的解明

研究課題名(英文) Population genetic analysis of dynamism of malaria drug resistance in Papua New Guinea

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) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、パプアニューギニアにおける熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性ダイナミズム解明を目的とした研究である。2000年にピリメサミン及びファンシダールが第一選択薬に加えられたが、その後から急激に耐性原虫が選択されていった。先にピリメサミンへの耐性が、後にサルファドキシリンへの耐性が進み、2011年にはクロロキン及びピリメサミンへの耐性遺伝子は固定、サルファドキシリン耐性遺伝子は80%を超えていた。サルファドキシリン耐性原虫は東南アジアからの移入であった。アルテミシニン併用療法への治療政策の変更が現地に浸透し始めたのは2012年であり、期間中耐性原虫の出現は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the dynamism of drug-resistant Plasmodium falciparum in Papua New Guinea where pyrimethamine and sulfadoxine were added to the first-treatment policy of malaria in 2000. We found significant selection of resistant-parasites to both antimalarial drugs. Emergence of resistance to pyrimethamine preceded sulfadoxine. Until 2011, all parasites harbored the resistant-related multi-locus mutations for chloroquine and pyrimethamine. Nearly 80% of parasites harbored resistant-related mutations for sulfadoxine, which migrated from Southeast Asia. Parasites showing resistance to artemisinin was not identified in the study period. This may be partly explained the fact that artemisinin combination therapy has been implemented in our study area around 2012 despite it was officially introduced in 2010.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：薬剤耐性 熱帯熱マラリア原虫 クロロキン ピリメサミン ファンシダール アルテミシニン 集団遺伝

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアはエイズ、結核と並び世界3大感染症の一つで、毎年数億人の患者と百万人以上の死亡者を出している。マラリア制圧のために抗マラリア薬は不可欠であるが、特効薬であったクロロキン、サルファドキシシン/ピリメタミン(ファンシダール®)に対する耐性熱帯熱マラリア原虫は広く蔓延している。近年、世界保健機関はアルテミシニンを中心とする併用療法(CT: Artemisinin combined therapy)を積極的に推進し、多くの流行国でCTが第一選択薬として採用されている。CTは大きな効果を発揮しているが、有効な代用薬がない現在その耐性の出現・拡散が危惧されている。

従来、クロロキン及びファンシダール耐性は、タイ・カンボジア国境地域で出現し、それがアフリカへ拡散したことが報告され、耐性の出現はまれであると考えられていた(Wootton et al. Science 2002; Roper et al. Nature, 2004)。しかし、本申請者はマイクロサテライトを用いた集団遺伝学的研究によって、パプアニューギニア(PNG)、アフリカにおいて耐性が独立に進化していることを初めて示した。これは、耐性出現が従来の推測以上に頻繁であることを示唆し、その出現頻度をより正確に推定するために、世界規模で、継続的な調査を行う必要のあることを意味する。

一方、本申請者はマラウイにおいて、クロロキンの使用中止によって耐性遺伝子変異頻度が急激に減少し、クロロキン感受性が回復したことを証明した(Mita et al. Am J Trop Med, 2003; Mol Biochem Parasitol, 2004)。この知見は、クロロキンの再使用の可能性を示唆する発見で、利用可能な抗マラリア薬が少ない現況から考えて大きな意味を持つ。PNGでは2010年度中にCTが第1選択薬として採用される。また、そのフィールド特性は、短～中期的な時間軸での原虫集団変化の捕捉という観点から、本研究の遂行にとり最適である。

## 2. 研究の目的

- (1) クロロキン、ファンシダール中止後の、クロロキン、ファンシダール耐性関連遺伝子の遺伝子型頻度の経年変化(検体既保有の2001年から本研究期間の2014年まで)
- (2) 耐性遺伝子型頻度の変化と *in vitro* クロロキンおよびファンシダール耐性の関連
- (3) 薬剤使用の歴史と耐性遺伝子型の頻度変動との関連
- (4) *In vitro* アルテミシニン耐性テストによる耐性出現の監視と耐性原虫の同定
- (5) 既知アルテミシニン耐性候補遺伝子の遺伝子型頻度および遺伝子周囲マイクロサテライト多型度の経年変化および薬剤使用履歴との関連

## 3. 研究の方法

調査地は本研究者が2001年より調査を続けているパプアニューギニア国東セピック州ダグア地区及びマダン州のマダン地区である。熱帯雨林地域に属すが、乾季にも雨量があり、年間を通じてマラリアの高度流行地域である。

東京女子医科大学(のちに順天堂大学; 研究代表者の異動による)が主体となって本研究を行うが、大阪大学微生物病研究所は集団遺伝学的解析、PNG ディバインワード大学はフィールド調査をサポートする。

### (1) 海外調査

#### マラリア疫学調査

対象住民全員から指頭採血により血液を採取、種の同定および原虫密度の測定を顕微鏡学的に行った。採血した血液の一部を濾紙に保存し解析試料とした。また、住民の健康状態を把握するために、問診、体温測定、身体診察を行った。本調査は平成23年、及び平成24年にそれぞれ1-2ヶ月の期間ダグア地区の村落でおこなった。

#### コホート調査

地域におけるアルテミシニンを含む薬剤圧を、厳密かつ科学的に定量化するため、詳細な薬剤使用情報(治療行動パターン、一回治療用量、投与日数、投与間隔等)の収集を目的としたコホート調査を行った。ウェワク地区村落部では、西洋薬を販売する薬局や商店がなく、医療施設が唯一の抗マラリア薬供給源である。従って、医療施設の処方記録と聞き取り調査から薬剤使用量の推定が可能である。

### (2) 原虫遺伝子分析:

薬剤使用中止による当該薬剤への感受性回復について

クロロキン耐性と関連する *pfcr1* 遺伝子(コドン72-76の多型)、ファンシダール耐性と関連する *dhfr*(コドン50, 51, 59, 108, 164の多型)、*dhps* 遺伝子(コドン416, 417, 540, 581, 613の多型)の遺伝子型解析を直接シーケンシング法にて行い、耐性遺伝子頻度の時間的推移をみる。さらに、*pfcr1*, *dhfr*, *dhps* 周囲-360kbから+299kbに存在する12箇所のマイクロサテライト多型を決定し、耐性がどのように進化してきたかについて検討した。

既知のアルテミシニン耐性候補遺伝子に関する集団遺伝学的解析

アルテミシニン耐性との関連が示唆されている *pfATP6(serca)* のSNPs および *pfmdr1* の遺伝子重複数の解析を直接シーケンシング法、リアルタイムPCR法により行う。さらに、研究開始後に新たなアルテミシニン耐性関連SNPsが報告された(Takala-Harrison et al. Proc Natl Acad Sci 2013)。本遺伝子についても解析をおこなった。以前の調査で得たサンプルにおいても、上記の解析を行いコントロールとした。

(3) In vitro 薬剤耐性試験

インフォームドコンセントを得たマラリア患者から採取した熱帯熱マラリア原虫を5種の抗マラリア薬(クロロキン、キニン、メフロキン、アルテメシニン、ルメファントリン)の存在下で72時間培養、その後、ELISA法を用いてHRP-II抗原を定量、Sigmoid Emax法を用いて各薬剤のIC<sub>50</sub>値(原虫の増殖を50%抑制する薬剤濃度)を算出し、感受性を評価した。

4. 研究成果

2010年度	ダグア地区ヘルスセンター(参考)	560検体
	ダグア地区西部14村落	1060検体
2011年度	ダグア地区東部11村落	1500検体
	東セビック州島嶼	200検体
2012年度	ウェワク地区ウェワク病院	80検体
	ダグア地区ヘルスセンター	100検体
	マダン地区モディロン病院・in vitro薬剤耐性試験	35検体
2013年度	マダン地区モディロン病院・in vitro薬剤耐性試験	50検体

(1) マラリア疫学調査:

以下のように全8回の海外調査をおこなった。うち2回はin vitro 薬剤耐性試験である。

ダグア地区の抗マラリア薬使用の概要

ダグア地区では、1カ所あるヘルスセンターが外来および入院医療の中核を担っていた。また、近隣にエイドポストも3カ所あり外来治療が可能であった。さらに、各村落にはビレッジヘルスボランティア(VHV)が配置され、経口の抗マラリア薬が供給されていた。しかし、ダグア地区の商店では抗マラリア薬の販売は全く行われていなかった。従って、抗マラリア薬の主な入手先は、ヘルスセンター、エイドポスト、VHVに限られる。

パプアニューギニア保健省は、2009年末にマラリア診断治療指針(Malaria diagnosis and the new treatment protocol)を改訂した。その結果、迅速診断キットによるマラリア診断が標準となり、アルテメシニン併用療法が第一選択薬となった。しかし、迅速診断キットとアルテメシニン併用療法を医療現場に導入するためには、医療従事者への研修と医薬品の供給体制の確立のための時間が必要である。従って、対象地域である東セビック州ウェワク郡ダグア地区では、アモダイアキン、クロロキン、ファンシダールが依然として第1選択薬として広く使用される時期が続いた。

診断治療指針の改訂後2年を経た2011年12月にヘルスセンターとエイドポストでArtemeter-lumefantrine(AL)が合併症のないマラリアの第1選択薬として導入され、妊娠初期のマラリア患者のみキニンとファンシダールが使われることになった。しかし、各村落に配置されているVHVに対するALの導入はさらに遅れて2012年8月であった。これ以降、従来薬の供給と使用は停止され、2013年2月の時点で、医療施設18カ所の薬

剤在庫の横断調査を行ったところ、クロロキンはすべての場所で在庫はなく、アモダイアキンの在庫があったのは、2カ所のVHV、ファンシダールの在庫があったのはダグアヘルスセンターのみであった。従って、ダグア地区では2012年8月以降アモダイアキン、クロロキン、ファンシダールの使用は激減し、2013年2月までにはほとんどなくなったと考えられる。

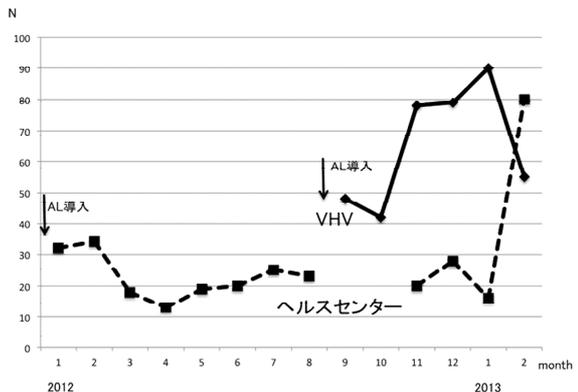
村落部のコホート調査

本研究では、当該地区にただ一つ存在するヘルスセンターの医療圏内の村落を対象地域とした。世帯調査を施行後、小児および学童を対象として、2011年2月に14村、2012年2月に11村で横断調査を施行し、調査日より2週間以内の抗マラリア服薬歴のデータを収集した。全2047例のうち、抗マラリア薬を使用したのは、207例(10.1%)で、2週間における全使用量は、アモダイアキン514錠(51.4g)、クロロキン90.5錠(13.6g)、ファンシダール77錠(S 38.5g, P 1.8g)、アルテスネート21.5錠(1.1g)、アルテメター16バイアル(0.96g)であった。

また、抗マラリア薬の入手先は、VHV利用が98例、ヘルスセンターが55例、家庭内が31例とこの3カ所で89%をしめた。エイドポストの利用は9例と少なく、その他の稀な選択肢として親戚、町の薬局、町のクリニックがあった。

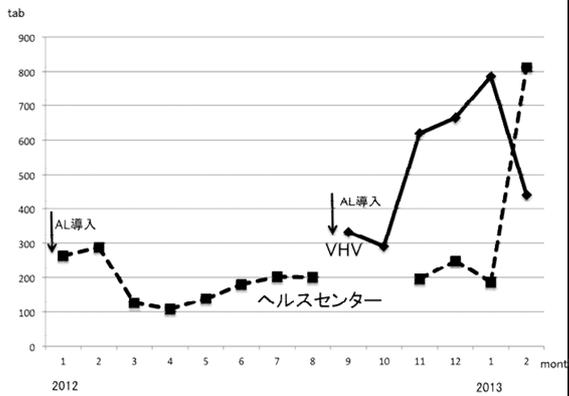
医療記録による抗マラリア薬使用の定量調査

AL導入以前の抗マラリア薬使用については医療記録に記載がないため、定量は困難であった。AL導入以後、ヘルスセンターでは、2012年1月から2012年8月、VHVでは13村落について、2012年9月から2013年1月までの医療記録データを手しALの使用量を測定した。パプアニューギニアで使用されているALはインド製で商品名をMala-1といい、1錠に含まれるアルテメターは20mg、ルメファントリンは120mgであった。



ヘルスセンターおよびVHVでの月別AL使用者数

ヘルスセンターでの月別使用者数、使用量のレンジは、13-34人、108-288錠であった。



ヘルスセンターおよびVHVでの月別AL使用量

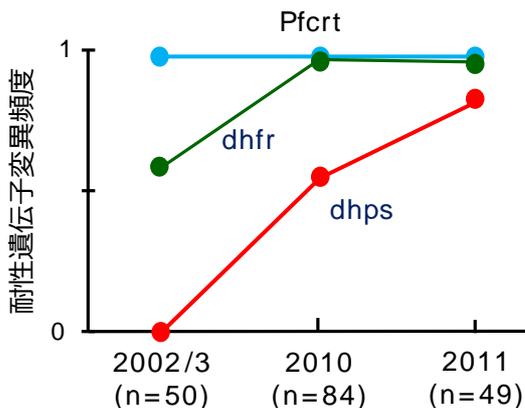
この地域では例年3月まで雨季であるが、使用者数、使用量ともに3月に激減してそれ以降漸増した。

VHV13カ所合計の月別使用者数、月別AL使用量のレンジは、141-282人、291-786錠であった。VHVでは使用者数、使用量ともに雨季となる11月以降増加する傾向がみられた。当該地域にはVHVが21カ所あることから、この地区の総使用量では、VHVの占める割合がヘルスセンターの5倍程度になると推定される。

(2) 薬剤使用中止による当該薬剤への感受性回復に関する結果

クロロキン、ファンシダール中止後の、クロロキン、ファンシダール耐性関連遺伝子の遺伝子型頻度の経年変化

クロロキン耐性に関連する *pfprt* の耐性型 (K76T 変異) は 2002 年の時点ですでに固定されていたが、調査期間中ずっと耐性型のみで感受性型は 2010 年に 2 例(2%) に観察されたのみであった。

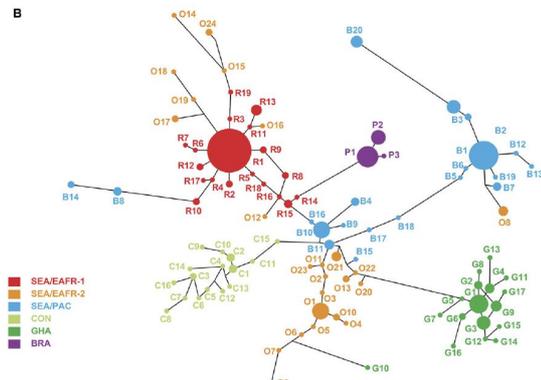


この耐性原虫の起源を明らかにするために *pfprt* 遺伝子周囲にあるマイクロサテライトのタイピングをおこないハプロタイプネットワーク解析をおこなった。解析データは他の流行地域から得られたデータと比較解析した。その結果、PNG からの原虫は他のメラネシア諸国とクラスターを形成しており、クロロキン耐性はメラネシア (おそらく PNG) から de novo 出現していることが示唆された

(Takahashi et al. Malaria J, 2012)。

一方、ファンシダール耐性に関連する原虫遺伝子頻度は大きな変化を示した。ピリメサミンへの耐性を示す *dhfr* は調査期間中、二重変異型 (CNRN1, 下線部は変異を示す) の耐性原虫が最も優位であったが、その頻度は 2002 年の約半数から 2010 年のほぼ 100% へと大きく変化した。さらに、サルファドキシリン耐性に関連する *dhps* 遺伝子は 2002-3 年にはすべて野生型だったが、2010 年には二重変異を示す耐性型 (SGEAA) が優位なタイプとなり、1 年後にはその頻度は 55% から 83% まで上昇した。

ファンシダール耐性原虫の起源について、ピリメタミン耐性は調査地で de novo に出現したタイプと東南アジアから移入してきたタイプが混在することを、研究代表者はすでに報告している。本検討では、*dhps* 周囲マイクロサテライト解析をおこない、サルファドキシリン耐性原虫の起源について説明をおこなった。解析データは他の流行地域から得られたデータと比較解析した。



*dhps* 耐性遺伝子型の Haplotype network 解析

PNG から得られた検体はハプロタイプネットワーク上東南アジアと同様の進化背景を示すことから、同地域からの耐性移入によることが示唆された (Mita et al. J Infect Dis, 2011)。

耐性遺伝子型頻度の変化と in vitro クロロキン耐性の関連

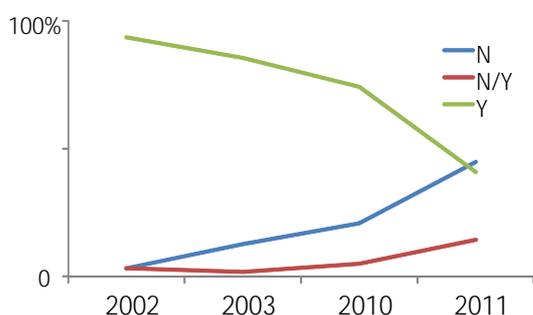
当初、東セピック州のウェワク地区ウェワク病院でおこなう予定であった in vitro 薬剤耐性試験は、機材等のセッティングの事情によりマダン州のデバイン大学のマラリア研究室において 2012, 2013 年に施行した。調査期間は、2012 年は約 1 ヶ月、2013 年は約 2 ヶ月である。サンプルは大学キャンパスの向かいにあるモディロン病院でマラリアと診断された患者から得た静脈血液である。

これらの結果を研究代表者らが 2002-3 年におこなった結果 (Mita et al. Acta Trop, 2007) と比較してみると、クロロキン感受性がわずかに回復している傾向が見取れる。しかし、この調査は東セピック州のウェワク

地区ウェワク病院で施行されており、地域差が結果に与える影響について今後の検討が必要であろう。

薬剤使用の歴史と耐性遺伝子型の頻度変動との関連。

上述の通り、PNG では2000年にマラリア治療方針が変更となり、クロロキン(成人)もしくはアモダイアキン(小児)の単剤投与から、クロロキン+ファンシダール(成人)もしくはアモダイアキン+ファンシダール(小児)へと変更された。しかし、治療への不応例の報告が増加したことを受けて、2010年からコアルテム(アルテメター+ルメファントリン)の合剤が第一選択薬となった。本研究の開始時期がちょうどACTの導入と重なっており、その影響がどのような形であられるかについて、耐性関連遺伝子の頻度変化を用いて検討した。



pfmdr1 遺伝子の N86Y 変異遺伝子頻度(n=331)

pfmdr1 遺伝子における N86Y 変異は前述した pfcrt の K76T 変異と同様にクロロキン耐性に関連する。調査期間中に 86Y 変異頻度の有意な低下と感受性型である 86N の頻度の上昇が証明された。同様に Y184F 変異が有意に上昇していた。pfmdr1 における 86 と 184 のアリルにおいて有意な連鎖不平衡が見られた ( $D = 0.17$ ,  $D' = 1$ ,  $r^2 = 0.73$ )。

### (3)アルテミシニン耐性候補遺伝子の探索

既知アルテミシニン耐性候補遺伝子の遺伝子型頻度および遺伝子周囲マイクロサテライト多型度の経年変化および薬剤使用履歴との関連

原虫の *Plasmodium falciparum* sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (PfATP6) 遺伝子における変異 (L263E and S769N) がアルテミシニン耐性と関連していることが示唆されている。2001-2002 年にかけておこなった調査で得られた熱帯熱マラリア原虫検体 89 例を用いて PfATP6 遺伝子のシークエンス解析をおこなった。その結果、アルテミシニン耐性との関連が示唆されている L263E 及び S769N 変異はいずれも観察されなかった (Tanabe et al. Antimicro Agent Chemother 2011)。

2013 年にアルテミシニン治療の遅延に関

連する新規 SNPs (MAL10-688956 および MAL13-1718319) がゲノムワイド関連解析によって同定された。2002-3 年にダグア地区から得られた検体を用いて本 SNPs の頻度について検討した。その結果、MAL10-688956 に関しては、耐性型とされる変異が 14% に観察された。一方、MAL13-1718319 では 1 例感受性型と耐性型の混合感染が見られたが、他はすべて感受性型であった。2010 年に同地区から得られた検体でも同様の傾向を示していた。他のマラリア流行地域から得られた検体を用いておこなった検討では、MAL10-688956 変異はアルテミシニン耐性原虫の出現及び拡散が示唆されている Great Mekong Subregion とメラネシアに分布していることが明らかになった。メラネシアにおいて本変異はアルテミシニンの正式導入以前から存在していることから、メラネシアの地域特有 SNP の可能性がある。

以上、薬剤耐性関連遺伝子変異の経時的変化、連鎖不平衡解析および in vitro 薬剤耐性試験から以下の点が明らかにされた。

1) クロロキン感受性の明らかな回復は今回の調査期間内では確認されなかった。ただし、研究代表者がおこなっているウガンダでの調査では、クロロキン使用中止 7 年後の調査で、in vitro での感受性及び pfcrtK76T 変異率の低下が確認されている。PNG における本研究の調査地では ACT への切り替わりが 2012 年であり、今後クロロキンの感受性が回復していく可能性があり、継続的な調査を続ける必要がある。

2) ファンシダールの開始後に急激な耐性原虫の増加が見られた。我々がダグア地区保健センターでおこなった調査では、ACT の導入により、ファンシダールの使用量が著明に低下していた。このようなファンシダールによる薬剤選択圧の減少がマラリア原虫集団に与える影響について調査をしていく必要がある。

3) サルファドキシニン耐性原虫はクロロキンやピリメサミンと異なり、PNG における indigenous な出現と進化をしておらず、東南アジア型原虫の移入によることが明らかになった。

4) アルテミシニンへの感受性低下を示す原虫は調査期間中に出現しなかったが、耐性関連候補遺伝子である MAL10-688956 は多型を示し、耐性型変異が 14% に見られた。同変異はバヌアツやソロモンでも観察された。PNG 同様にこれらの国では調査時にアルテミシニン耐性の出現例はなく、また導入もされていなかった。したがって MAL10-688956 の耐性型は natural variation としてメラネシアの原虫集団に存在する可能性がある。

### 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 21 件)

1. Honma H, Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu S, Palacpac N, Hisaeda H, Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yssunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, Tanabe K. Generation of Rodent Malaria Parasites with a High Mutation Rate by destructing Proofreading activity of DNA Polymerase. **DNA Res** In press
2. Mita, T., Ohashi, J., Venkatesan, M., Marma, A. S., Nakamura, M., Plowe, C. V., & Tanabe, K. Ordered accumulation of mutations conferring resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in the *Plasmodium falciparum* parasite. **J Infect Dis**. 2014. 209: 130-139
3. Tanabe K, Jombart T, Horibe S, Palacpac N, Honma H, Tachibana S, Nakamura M, Horii T, Kishinod H, Mita T. *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. **Mitochondrion** 2013 13: 630-636
4. Mita, T., Tanabe, K. Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. **Jpn J Infect Dis** 2012 65: 465-45
5. Takahashi, N., Tanabe, K., Tsukahara, T., Dzodzomenyo, M., Dysoley, L., Khamlome, B., Sattabongkot, J., Nakamura, M., Sakurai, M., Kobayashi, J., Endo, H., Hombhanje, F., Tsuboi, T., Mita, T. A large scale survey for novel genotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistant *p fcrtr* gene **Malaria J** 2012 11:92
6. Mita, T., Venkatesan, M, Ohashi, J, Culleton, R, Takahashi, N, Tsukahara, T., Ndounga, M, Dysoley, L, Endo, H, Hombhanje, F, Ferreira, M, Plowe, CV, Tanabe, K. Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant *dhps* alleles in *Plasmodium falciparum* populations. **J Infect Dis** 2011 204:1980-8
7. Tanabe, K, Zakeri, S, Palacpac M, Afsharipad, M, Randrianarivojosia M, Kaneko, A, Marma, AS, Horii, T, Mita, T. Spontaneous mutations in the *Plasmodium*

*falciparum* sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PfATP6) gene among wide geographical parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. **Antimicrob Agents Chemother** 2011 55:94-100.

〔学会発表〕(計 28 件)

1. (Invited) Mita T. Interrelated paths for accumulation of mutations in the two malaria parasite genes for antifolate resistance: inference from population-genetics based approach. Biochemistry toward malaria control (Symposium), 第 86 回日本生化学会大会、横浜、9 月 11 日 ~ 13 日、2013
2. (Invited) Mita T, Ohashi J, Tanabe K. Evolution of *Plasmodium falciparum* Pyrimethamine/Sulfadoxine Resistance. Forum Cheju 16, August 30-31, Seoul, Korea, Yeongon Campus Seoul National University.
3. (招待講演) 美田敏宏. 熱帯マラリア原虫の進化と地理的拡散, 第 21 回感染研シンポジウム「病原体と薬剤耐性-現状をどう捉え、どう向き合うか-」, 国立感染症研究所, 東京, 5 月、2011

〔図書〕(計 2 件)

1. 美田敏宏. マラリア/バベシア. 今日の治療指針 2014. 256-7, 2014
2. 遠藤弘良、美田敏宏. 熱帯性脾腫. 症候群ハンドブック 274, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美田 敏宏 (MITA, Toshihiro)  
順天堂大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 80318013

(2) 研究分担者

田邊 和裕 (TANABE, Kazuyuki)  
大阪大学微生物学研究所・招聘教授  
研究者番号: 40047410

塚原 高広 (TSUKAHARA, Takahiro)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90328378

早川 敏之 (HAYAKAWA, Toshiyuki)  
九州大学・基幹教育院・准教授  
研究者番号: 80418681