

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19406011
 研究課題名 (和文) マラリア原虫の薬剤耐性：検出、同定と遺伝子解析、
 地域性と時間変化、拡散の予測へ
 研究課題名 (英文) Polymorphism in drug resistant genes of *Plasmodium falciparum*

研究代表者
 上村 春樹 (UEMURA HARUKI)
 長崎大学・熱帯医学研究所・講師
 研究者番号：60184975

研究成果の概要 (和文)：熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性株の出現と拡散により、WHO はアルテミシニンを基にした ACT (Artemisinin-based Combination Therapy) を推奨するが、高価であること、十分な数が届いていないこともあって、現実にはまだ広くいきわたる段階にない。抗マラリア薬に対する有効性を把握するとともに、ACT 導入によってどのような選択が予測されるかを調べる目的で、熱帯熱マラリア原虫の遺伝子多型を地域ごとに比較した。

研究成果の概要 (英文)：Due to the wide spread of resistant malaria parasites to commonly used anti-malarial drugs, ACTs (Artemisinin-based Combination Therapies) are recommended as the first line treatment therapies in many malaria countries. From the comparison of polymorphisms in *Plasmodium falciparum* genotypes, we observed a tendency of decreasing mutant alleles of *pfcr1* and *pfmdr 1* genes in Vietnam parasites. We assume it would be effect of introduction and usage of artemisinin and its derivatives in this country.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：原虫の生化学

科研費の分科・細目：寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：熱帯熱マラリア原虫、薬剤耐性、*pfcr1* 遺伝子、*pfmdr 1* 遺伝子、*pfdhfr* 遺伝子、*pfdhps* 遺伝子、ベトナム、インドネシア

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯地域で最も問題になっている感染症の一つであり、様々な視点からのコントロール活動が行われてきている。マラリアの感染地域はここ 50 年間で減ってきてい

るが、未だに年間 80 万人の死者と 2 億 5000 万人近い人が感染している。

このようなマラリアの現状における重大な問題の一つは、熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性株の出現と拡散である。予防薬、治療薬と

して広く使用されてきたクロロキン、ファンシダール、さらに比較的新しいメフロキンに対しても抵抗性を示す熱帯熱マラリア原虫が広まり、WHOはアルテミシニンを基にしたACT (Artemisinin-based Combination Therapy)を推奨するが、高価であること、十分な数が必要とされる現場に届いていないこともあって、まだ全ての場所にいきわたるといふ段階にはなっていない。

クロロキン、ファンシダールに対する抵抗性は、原虫の *pfert*、*pfmdr1*、あるいは *pfdhfr*+*pfdhps* 遺伝子における変異によって説明され、遺伝子型を調べることで薬剤耐性の広がりを知ることが出来る。また、地域によって使用している抗マラリア薬が異なっていたり、導入される時期が異なっており、遺伝子型の変化を比較、追跡することから、マラリア原虫の薬剤応答についての情報を得ることも可能である。

2. 研究の目的

今後、世界各地域で抗マラリア薬としてアルテミシニンを基にした治療薬 ACT が導入されると考えられるが、治療に抵抗性を示す原虫株をすばやく検出、同定することが重要になってくる。それぞれの地域に既に存在しているマラリア原虫株の genotype と phenotype を記載しておくことで、治療に伴う変化、治療効果の遅れの認められる原虫が検出された場合に、速やかに対応して判断することが可能となる。これまでに集めているサンプルの解析を行うとともに、それぞれの地域で用いられている抗マラリア薬に対する有効性を確認、耐性株の割合とその時間変化を調べることを目的として研究を開始した。

早くからアルテミシニン誘導体を用いているベトナムにおけるマラリア感染率と熱帯熱マラリア原虫の遺伝子型を調べることで、アルテミシニンによる原虫 genotype の変化、選択について情報を得ることが出来る。

種々の薬剤耐性原虫が報告されているミャンマー、最近でもクロロキンを使用し続けているインドネシア、イランの熱帯熱マラリア原虫の現状と時間的変化、さらに長崎大学熱帯医学研究所がシステムティックな熱帯医学研究基盤の確立を目指して設立されたアフリカケニア拠点への参加を計画した。

3. 研究の方法

(1) ベトナム南部の調査地域 Binh Phuoc 省におけるマラリア感染率の調査とマラリア患者からの採血

この地域では、共同研究者である長崎大学熱帯医学研究所・中澤氏と、ベトナム NIMPE・

Le Duc Dao 氏が、2001年から長期にわたってマラリア研究を継続している。地域住民及び就学児童を対象として採血を行い、血液塗末標本を顕微鏡観察して原虫の有無を確認、陽性者からは原虫 DNA 検査のための濾紙採血を行った。

(2) 採血フィルターからの DNA 抽出

マラリア原虫感染陽性者から採血したフィルターからの血液から、先濱一田辺の方法に従って QIAamp DNA Mini Kit を用いて total DNA を抽出し 4℃ に保存した。

(3) マラリア原虫の薬剤耐性に関連する遺伝子多型の解析

熱帯熱マラリア原虫の *pfert*、*pfmdr1*、*pfdhfr*、*pfdhps* 遺伝子のそれぞれ全領域をカバーできるように設計したプライマーで PCR をかけた後で、注目するアミノ酸部位の多型をシーケンシングによって調べた。適切な制限酵素を用いれば多型を区別することが可能な幾つかの部位については、PCR プライマーと制限酵素を工夫してゲル電気泳動上で確認する方法も併用した。

(4) インドネシア、ミャンマー、イランの熱帯熱マラリア原虫サンプルの解析

インドネシア、ミャンマー、イランにおけるマラリア感染の現状と感染者からの採血は、それぞれの国の共同研究者に協力してもらい、それぞれの倫理委員会からの許可と患者の同意を得て行った。マラリア感染者が訪れる各地の診療所で採血と診断を行う際に、同時に濾紙採血も行ってサンプルを保存した。遺伝子解析はそれぞれの共同研究者の所属する研究機関で行う、あるいは DNA サンプルの一部を日本に持ってきて解析した。

4. 研究成果

(1) ベトナム南部 Binh Phuoc 省におけるマラリア感染率の変化

2005年1070人、2006年899人、2007年634人を対象としてマラリア診断を行い、感染率はそれぞれ3.4%、5.0%、3.5%であった。これは2001年、2002年に同じ地域で感染率の調査をした時の24.5%と24.0%と比較して著しい減少であり、その間の社会環境の変化、マラリアコントロールの結果と考えることが出来る。ベトナムでは、1990年代からアルテミシニン誘導体を使用してマラリアの感染率を劇的に減少させ、更に2003,4年からは Dihydroartemisinin を基にした CV8 を導入している。この2005年以降のマラリア感染率の減少は、ACTの一つであるこの治療薬導入の効果と思われる。

(2) ベトナム南部 Binh Phuoc 省の熱帯熱マラリア原虫：薬剤耐性に関連する遺伝子多型の解析

① *pfert* 遺伝子、熱帯熱マラリア原虫 *pfert* 遺伝子の76番目 Lys が Thr に変異することが、

クロロキン耐性には必要である。2005年に得られた原虫の *pfcr*t 遺伝子はすべて野生型 CVMNK(72-76)、2006年、2007年は、変異型が 15.8%、18.8%であった。変異型には CVIET と CVIDT の 2 種類を検出し、大部分は CVIDT であった。一方、2001年の熱帯熱マラリア原虫感染者から得たサンプルにおいては、62.2%が変異型 *pfcr*t に感染しており、その大部分は CVIET であったことを考えると、何らかの選択があったことが示唆される。

他の地域、国々の熱帯熱マラリア原虫 *pfcr*t 遺伝子では、90%以上殆ど全てが変異型であることと対照的であり、このベトナムのサンプルで野生型が多く検出されるのは、アルテシニンを長期にわたって使用し、クロロキンの使用が控えられていたことによると推測している。CVIET type と CVIDT type には *pfcr*t 遺伝子の 72-76 番目以外にも変異が認められ、我々はその比較から *pfcr*t 遺伝子内での組換えによって多型が生じる可能性を提唱した。

② *pfmdr* 1 遺伝子、今回のベトナムサンプルでは、これまでに報告がある 5 カ所のアミノ酸置換のうち、86Asn、1034Ser、1246Asp には多型が認められなかった。Tyr184Phe と Asp1042Asn を検出したが、それと *pfcr*t 遺伝子の genotype との相関は認められなかった。また、マイナーな変異として最近カンボジアのサンプルで報告された Glu130Lys、Val1109Ile を検出したが、その変異の遺伝子産物に対する影響は今後の課題である。

③ *pfdhfr*+*pfdhps* 遺伝子、スルファドキシシン・ピリメタミン耐性と関連するこれらの遺伝子多型は塩基配列の決定によって行った。ベトナムではスルファドキシシン・ピリメタミンを使用していないが、*pfdhfr* 遺伝子にも *pfdhps* 遺伝子にも多くの変異が認められ、耐性が維持され続けていることを示す結果であった。その中で注目すべきは、多型の度合いは減少傾向にあることであり、2001年サンプルには全く変異の無い野生型から多くの部位に変異を持つ強い耐性型まで多様であったが、2005年以降の原虫では遺伝子型のパターンの多様性が減っている。今回調べたベトナムサンプルにおいて *pfdhps* 遺伝子のいくつかのアミノ酸部位では 3 種類以上の多型を示し、436 番目 Ser から Ala あるいは Phe への置換、540 番目 Lys から Glu、Asn、Tyr、613 番目 Ala の Thr、Ser を検出した。また 581 番目の Ala から Gly への置換に関しては 2 通りのコドン (GGG と GGT) によるものが認められた。

(3) Genotype 間での相関について

多くのサンプルが得られている 2001-2002 年の解析結果をそれぞれの遺伝子について、遺伝子型同士の相関の有無を調べると、*pfcr*t 遺伝子の野生型は *pfdhfr*+*pfdhps* 遺伝

子の変異の少ない原虫と、耐性型は変異の多い原虫との相関が示唆された。これらの遺伝子産物に共通して影響を与える何かの薬剤による選択の結果であるか、他の影響であるのかは、更なるデータが必要である。

(4) イランの熱帯熱マラリア原虫のクロロキン感受性

イランでは 1983 年に初めてクロロキン耐性マラリア原虫が報告されて以来、その割合は年々増加している。クロロキンの有効性が低くなって治療薬変更の必要性を判断する調査が必要となり、共同研究者の AR Esmaeili Rastaghi を含む研究チームは 2003-4 年にパキスタン、アフガニスタンとの国境に近い Sistan & Baluchestan 地域を担当した。彼らは臨床試験でクロロキンの有効性は 20% 程度しかないことを確認して、その遺伝子解析を行う目的でサンプルをもって来日した。*pfcr*t 遺伝子の Lys76Thr 部位を、PCR と制限酵素 Apo I を用いて調べるとともに、塩基配列を決定した。PCR で増幅出来た 64 サンプルのうち 60 サンプル (93.75%) は Apo I で切断されない Thr76 であり、その塩基配列の解析からは多様性に乏しいことが示唆された。*pfcr*t 遺伝子の比較から、野生型と耐性型で 72-76 の領域以外にも置換が認められたが、それらは 72-76 のパターンと関連しているものであった。遺伝子多様性がほとんど認められないことは *pfmdr* 1 遺伝子解析からも示されたが、*pfcr*t 遺伝子のタイプと *pfmdr* 1 遺伝子のタイプの間に関連は認められなかった。この薬剤耐性と関連する遺伝子における多型の乏しさは、他の薬剤選択圧の影響を受けない microsatellite においてはどうか、非常に興味を引き起こすものである。

(5) インドネシアの熱帯熱マラリア原虫の遺伝子多型

インドネシアは赤道直下、東西に非常に広い国であり、パプアニューギニアに起源する *pfcr*t 遺伝子 SVMNT type と東南アジア型の *pfcr*t 遺伝子 CVIET type がそれぞれ局在していることが分かった。我々がこれまでに解析した結果では、クロロキン耐性にかかわる *pfcr*t 遺伝子について野生型の CVMNK の原虫をインドネシアから検出しておらず、ほとんどの原虫が耐性型 *pfcr*t 遺伝子である。それぞれの地域ごとにみると個々の遺伝子についての多型性に乏しいが、地域間で比較すると異なる遺伝子型を示すものが認められる。インドネシアのマラリア患者からの採血とサンプルの保存は継続しているが、政府の方針ですべてのサンプルの国外持ち出しが禁止されているので詳細な解析は十分に行うことが出来なかった。現在、解析の許可を申請中である。

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3件)

- ① Rie Isozumi, Haruki Uemura, Le Duc Dao, Truong Van Hanh, Nguyen Duc Giang, Ha Viet Vien, Bui Quang Phuc, Nguyen Van Tuan and Shusuke Nakazawa.
Longitudinal survey of *Plasmodium falciparum* infection in Vietnam: Characteristics of antimalarial resistance and their reflecting factors. J Clin Microbiol., 48(1), 70-77 (2010/01) (査読有)
- ② Maekawa Y, Sunahara T, Dachlan YP, Yotoranoto S, Basuki S, Uemura H, Kanbara H, Takagi M. First record of *Anopheles balabacensis* from western Sumbawa Island, Indonesia. J Am Mosq Control Assoc. 25(2):203-5. (2009/06) (査読有)
- ③ AR Esmaeili Rastaghi, M Nateghpour, M Assmar, MR Razavi, H Kanbara, H Uemura, SR Naddaf, H Keshavarz, A Raeisi, M Mohebbali. Detection of K76T Mutation in *pfert* Gene as an Applicable Genetic Marker for Prediction of Chloroquine Resistant *falciparum* Malaria in Isolates from an Endemic District of Iran. Iranian J Parasitol: Vol. 3, No. 2, 2008, 48-56.

[学会発表] (計4件)

- ① 五十棲理恵、ベトナム Binh Phuoc 省で採取された熱帯熱マラリア原虫の縦断的網羅的薬剤耐性遺伝子解析 (*pfert*, *pfmdr 1*)、第78回日本寄生虫学会大会、2009年3月28日、東京、
- ② H.Uemura、Polymorphism in *pfert* and *pfmdr1* genes of malaria parasite populations in Binh Phuoc, Vietnam. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, October 2-3, 2008, Cheju, Korea.

[その他]

ホームページ等

長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/nekken/research/protozoology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 春樹 (UEMURA HARUKI)

長崎大学・熱帯医学研究所・講師

研究者番号：60184975

(2) 研究分担者

一瀬 休生 (ICHINOSE YOSHIO)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：70176296

金子 聡 (KANEKO SATOSHI)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：00342907

(3) 研究協力者

五十棲 理恵 (ISOZUMI RIE)

長崎大学・熱帯医学研究所・COE 研究員