

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16631

研究課題名（和文）マラリア原虫pyknoticの解析とそれを応用したアルテミシニン耐性検査法の確立

研究課題名（英文）Development of new in vitro phenotypic assay to detect the artemisinin resistant Plasmodium falciparum

研究代表者

池田 美恵（IKEDA, Mie）

順天堂大学・大学院医学研究科・学振特別研究員（RPD）

研究者番号：40734314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルテミシニンはマラリア治療の第一選択薬であるが、アフリカではすでにアルテミシニン耐性が出現している。本研究では、アルテミシニンによって出現するpyknotic formと呼ばれる死原虫に注目し、この原虫がアルテミシニン耐性に関連するのかを明らかにすることとした。Pyknotic formが既存法に与える影響を明らかにすれば既存法をより改良することが出来ると考えた。解析の結果、予想に反してpyknotic formの出現とアルテミシニン耐性には明確な関係はないことが明らかになった。既存法はその濃度を7段階に設定することで半定量的にマラリア原虫の薬剤耐性を評価可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pyknotic formとアルテミシニン耐性の強さには相関が無いこと、pyknotic formの出現にはマラリア原虫の培養条件が大きく関与することが明らかになった。この事実は、pyknotic formが培養環境の良し悪しを評価する一つの指標となることを示唆している。

また、改良法（qRSA）で行ったウガンダでのアルテミシニン耐性調査によって、ドミナントとなっているC469Yがin vitroレベルでは非常に弱い耐性であることを示した。C469Yが蔓延するウガンダでの今後の薬剤耐性対策には蚊体内やヒト体内でのC469Y原虫の挙動を調べる必要がある。

研究成果の概要（英文）：Artemisinin is the first-line drug for malaria treatment, and artemisinin resistance Plasmodium falciparum has already appeared in Africa. This study focused on a dead parasite called the pyknotic form, which appeared due to artemisinin. I set out to determine whether this structure is associated with artemisinin resistance. I thought that the existing method could be improved further if the effect of the pyknotic form on the existing method could be clarified. Contrary to expectations at the beginning of the study, I found no clear relationship between the appearance of the pyknotic form and artemisinin resistance. The new method enables a semi-quantitative assessment of P. falciparum drug resistance by using seven levels of set concentration in the existing method.

研究分野：マラリア、薬剤耐性

キーワード：アルテミシニン耐性 熱帯熱マラリア原虫 pyknotic form in vitro 検査法 RSA qRSA C469Y A67  
5V

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在の ART 耐性検出のゴールドスタンダードは、ART 治療後にヒト体内での原虫密度の半減時間から判定する *in vivo* 検査法である。しかし頻回のマラリア感染が起こるアフリカにおいては、患者は不完全ながらマラリアへの免疫を獲得するため、患者免疫のみでも抗原虫効果がある。従って、*in vivo* 検査法では原虫の ART 耐性が過小評価されてしまう可能性が示唆されてきた。

近年、*in vitro* ART 耐性検査法として Ring-stage Survival Assay (RSA)が開発された。RSA は ART 耐性原虫の表現型に注目し、ring-stage に同調した原虫を高濃度の ART に暴露することで耐性を検出する方法である。*In vivo* 検査法と異なり、患者免疫、薬剤代謝やそのクリアランスといったヒト側因子の影響を取り除くことができ、原虫の耐性のみを直接評価可能である。申請者らは RSA をウガンダ共和国における ART 耐性のフィールド調査に取り入れアフリカにおける世界で初めての ART 耐性原虫の報告をしている(Ikeda *et al. Emerg. Infect. Dis.*, 2018)。これらの原虫は全てアフリカ独自起源であり、(1)アフリカにおける ART 耐性原虫の出現実態の把握とその起源の解明、(2)アフリカ起源 ART 耐性原虫の耐性原因遺伝子の特定、(3)耐性化機構の解明、が喫緊の問題であった。しかし、RSA には以下に示す問題点があり耐性検出系としてまだ十分とは言えなかったため、RSA の問題点を解決し、より簡単、迅速かつ客観的解析が可能な検査法にすることとして本研究課題を着想した。

### 2. 研究の目的

従来法では、顕微鏡観察による原虫の生死判定を基にして耐性を判定しているため、(1) 解析にかかる多大な労力、(2) 耐性レベルの定量性が不十分、(3) ART 治療後に出現する特徴的な死原虫(pyknotic form)と休眠した生原虫の判定基準が不明、という問題点がある。そこで本研究では、より高感度で特異度が高く、大量サンプルも迅速に解析可能な *in vitro* 定量検査法としての Pycnotic 定量的 RSA (quantitative RSA: qRSA)を開発することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Pyknotic の生死判定法の開発と生物学的特徴の解明

本研究にはウガンダの ART 耐性マラリア原虫感染患者から得た凍結血液検体の培養株の他、マラリア標準培養株(3D7)およびカンボジアからの ART 耐性培養株を用いる。培養原虫に ART 処理を施すことで pyknotic を誘導、各種の生・死細胞マーカーによる蛍光標識を行った FACS によって定量する。Pyknotic の形態的特徴、特に休眠体との相違点(参考: 右図 写真)を明らかにする。さらに、ART 誘導後の pyknotic の発生頻度、通常培養中の頻度変化を定量し、pyknotic の生物学的な特徴を明らかにする。

#### (2) ART 耐性レベルの定量評価法の確立

培養株を用いた qRSA を実施し、*in vitro* 定量評価法を確立する。pyknotic が HRP2-ELISA に与える影響の有無、影響が大きい場合は必要な補正方法を検討することで、正確かつ安定したデータが得られる条件を決定する。ART 耐性レベルは、従来の 72 時間原虫を培養する伝統的検査法において実績のある Sigmoid Emax model による IC<sub>50</sub> で評価する。

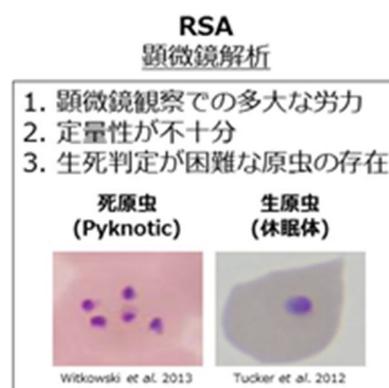


図 RSA の問題点

### (3) フィールドでの qRSA 有効性の検証

ウガンダ共和国において ART 耐性疫学調査を実施し、qRSA 有効性を検証する。全ての検体のアルテミシニン耐性レベルを  $IC_{50}$  として定量し、ゴールドスタンダードである in vivo 検査法での原虫密度半減時間との相関を明らかにする。 $IC_{50}$  が得られなかったサンプルは日本に持ち帰り、核 DNA の蛍光色素を用いて再定量、再解析する。

## 4. 研究成果

### Pyknotic formとアルテミシニン耐性の関連

Pyknotic formとART耐性の関係を明らかにするために、東南アジア由来のART耐性株と感受性株を用いて、Pyknotic formの形成率を解析した。本研究で改良を試みているin vitro 耐性検査法は原虫へのアルテミシニン暴露時間は6時間である。6時間のアルテミシニン処理でのpyknotic form形成率を解析することとしたが、6時間のアルテミシニン処理では原虫はpyknotic formを形成しなかった。

先行研究を参考に24時間アルテミシニン処理でのpyknotic formの形成率を解析した。東南アジアの耐性原虫のうち、Kech13にそれぞれ異なる変異(C480Y, M469I, R539T)を持つ3つの原虫を用いて解析を行った。Pyknotic form形成率は薬剤未処理のコントロールの原虫感染率と薬剤処理サンプルでのPyknotic formが確認された赤血球の比とした。解析の結果、3つの耐性原虫のpyknotic 形成率は、0.3-0.8であった。一方、3つの感受性原虫では0.4-0.7であり、耐性原虫と感受性原虫にはpyknotic形成率に大きな差はない。pyknotic formの形成率はアルテミシニン耐性とは関連しない可能性が示唆された。

さらにすでにin vivo耐性が出現しているウガンダでの再度のフィールド調査を行い、pyknotic formの形成とアルテミシニン耐性の関連をフィールドでも再度確認することとした。フィールド調査の結果、2022年および2023年のサンプルはともにpyknotic formがほとんど出現しなかった。Pyknotic formが出現したサンプルは培養初期の原虫感染率が高いためovergrowthの結果出現したものであった。ウガンダに出現しているアルテミシニン耐性原虫についても2つの異なる耐性変異とpyknotic formの出現頻度には相関がほぼなかった。

では、研究開始当初、2014年と2018年では2018年の方がpyknotic formの割合が多かったのは何に起因するのか、2014, 2018, 2022年のそれぞれの調査について比較を行った。まず、2014年と2018年では培養環境が大きく変わっており、2014年にはマラリア培養用に開発された $O_2$ 吸収・ $CO_2$ 発生剤を用いていたが、2018年にはこの発生剤が終売となったためキャンドルジャー法を用いた。また、2022年も2018年同様の培養条件であるが、培養液の組成を変更したことで培養環境が改善され、pyknotic formの形成が起こらなかったと考えられる。

### Pyknotic formの出現条件の検討およびRSAへのELISAの導入検討

Pyknotic formが及ぼす影響を解析するためには、pyknotic formを安定して作成することが必要であった。そこで培養原虫株を用いて、pyknotic formの作成法を検討した。Pyknotic formはring formの原虫から形成される。そこで原虫を48時間おき、2回の5%ソルビトール溶液処理によってring formに同調させた。同調させた原虫はヘマトクリット2%、感染率3%以上の条件から96時間培養することでほぼすべてpyknotic formとなることが分かった。また、培養下のヘマトクリットを2%から5%まで上昇させると同様にpyknotic formが高頻度で形成されることが明らかになった。

改良型RSA (qRSA)へのELISA導入の検討のために、東南アジア培養株を用いたqRSAを行っ

た。qRSAを実施した培養サンプルをマラリア原虫のHRP-2抗原を用いたサンドイッチELISAによって測定し算出したIC<sub>50</sub>を比較したところ、感受性株は14.7 nM (n=7)、耐性株は19.5 nM (n=6)であり、統計的に有意な差は見られなかった。qRSAは感染率1-2%から培養を開始するため、参考にした他の薬剤でのELISA法のままでは正確な抗原量の測定が難しい。ELISAを用いるためにはサンプルの希釈倍率をコントロールとそれ以外の薬剤処理区で変更するなどの修正が必要である。

### 改良型RSAを用いたウガンダ原虫集団のART耐性評価

薬剤濃度を7段階に設定し、定量評価を可能とした改良型RSA (qRSA)によってART耐性レベルの評価を行った。本研究の開始当時の2019年頃、ウガンダに出現していたアルテミシニン耐性原虫は*Kelch13*遺伝子に変異を持つ A675V型であった。この原虫はRSAでもqRSAでもARTへの耐性が非常に高いタイプである。2022年調査では、アルテミシニン耐性出現以前の2014-15年頃に比べて原虫のART耐性が上昇していた、この上昇はRSAだけではなくqRSAにおいても見られた。qRSAでは100 nM以上の高濃度域において統計的にも有意な差が見られた。2022年調査時点で、耐性責任変異の頻度は3割以上を占めており、この3割のうち2割がC469Y型、1割がA675V型であり、C469Y型がドミナントであった。

この3割の変異によって耐性が上昇している可能性を考慮し、*Kelch13*遺伝子型と耐性との関係を解析したところ、A675V変異は全ての濃度域で強い耐性を示したのに対し、C469Y型は野生型原虫とほぼ同じであった。集団の耐性上昇に大きく寄与しているのはA675V型原虫であることが明らかになった。

一方で、ウガンダにおいて耐性変異のdominantはC469Y型である。A675V型に比べ非常に弱い耐性しか持たないC469Yが拡散するためにはA675Vのアルテミシニン耐性の強さを凌駕する適応が必要である。そこで、C469Y型の赤血球期における増殖率がA675V型を上回るのはいかと仮定し、qRSA培養前後での原虫の増殖率を比較した。野生型原虫を1とした時の増殖率はC469Yが0.78、A675Vは0.86であり大きな差が見られなかった。ウガンダにおいて耐性の非常に弱いC469Yが拡散している原因はqRSAやRSAを用いるin vitroレベルでは全く不明であり、ヒト体内または蚊体内における増殖に目を向ける必要があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ikeda Mie, Hirai Makoto, Tachibana Shin-Ichiro, Mori Toshiyuki, Mita Toshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Isolation of Mutants With Reduced Susceptibility to Piperazine From a Mutator of the Rodent Malaria Parasite Plasmodium berghei	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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 Balikagala Betty, Fukuda Naoyuki, Ikeda Mie, Katuro Osbert T., Tachibana Shin-Ichiro, Yamauchi Masato, Opio Walter, Emoto Sakurako, Anywar Denis A., Kimura Eisaku, Palacpac Nirianne M.Q., Odongo-Aginya Emmanuel I., Ogwang Martin, Horii Toshihiro, Mita Toshihiro	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 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1171
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 Olivo, Sekihara Makoto, Tachibana Shin-Ichiro, Yamauchi Masato, Pearson Richard D., Amato Roberto, ~ (24人中13番目) Ikeda Mie, Mori Toshiyuki, Hirai Makoto, Tavul Livingstone, Hetzel Manuel W., Laman Moses, Barry Alyssa E., Ringwald Pascal, Ohashi Jun, Hombhanje Francis, Kwiatkowski Dominic P., Mita Toshihiro	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 Pathogens	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 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 18
2. 論文標題 ecoverly 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 Malar Journal	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田美恵, 吉田菜穂子, Betty Balikagala, 平井誠, 福田直到, Osbert Katuro, Dennis Anywar, Nirianne M.Q. Palacpac, Emmanuel Aginya, 木村栄作, 堀井俊宏, 美田敏宏
2. 発表標題 ウガンダ北部における熱帯熱マラリア原虫アルテミシニン感受性調査
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Betty Balikagala, Naoko Yoshida, Mie Ikeda, Naoyuki Fukuda, Makoto Hirai, Denis AAnywar, Osbert T Katuro, Gerald Odong, Eisaku Kimura, Nirianne M Q Paracpac, Martin Ogwang, Emmanuel I Odongo-Aginya, Toshihiro Horii, Toshihiro Mita.
2. 発表標題 Efficacy of piperaquine drug in Gulu Northern Uganda
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------