

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04411

研究課題名(和文)なぜ特定の地域、集団によって同一種のコモロウイルス及びサルマラリア原虫の感染に差があるか

研究課題名(英文) Why do certain regions and populations differ in transmission of the same species of human and non-human primate malaria parasites?

研究代表者

前野 芳正 (Maeno, Yoshimasa)

長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・客員教授

研究者番号：70131191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,400,000円

研究成果の概要(和文)：COVID-19の感染拡大による出張制限や研究活動等制限や相手国の事情により現地調査が実施不可能な期間が多かった。その為不完全ではあるが可能な限り調査を実施し、解析を行った。1. 調査対象地であるマレーシア、サバ州ラナウ地区において感染状況の解析を行った。ラナウ地区は内陸で標高1,000M、人口約10万人、その多くは農業従事者である。聞き取り調査及び検体解析の結果、保健所資料よりサルマラリア感染者は年々増加傾向にある事が判明した。感染者の多くは13歳以上の男性で農業従事者であった。患者の聞き取り調査で農耕地で媒介蚊に刺されたと証言があるため、森林周辺が感染地と推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは、蚊帳の配布や新規開発抗マラリア薬の配布などという有効な対策によって減少傾向が見られる。東南アジアの都市部においても同様な対策により減少傾向が見られる。しかし、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により、前述の対策と同様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。このため地域に即したマラリア対策の基盤資料の提案を行い、地域における各種健康被害の抑制をはじめ、医療経済を含めた各種損失の抑制に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The spread of COVID-19 and the situation in the partner countries restricted travel and survey activities for many periods, making field surveys impossible. As a result, surveys were conducted and analyzed to the extent possible, albeit incompletely. Analysis of the infection situation was conducted in the Ranau district of Sabah, Malaysia, where the survey was conducted. The Ranau district is located inland at an altitude of 1,000 m and has a population of approximately 100,000, most of whom are farmers. Interviews and sample analysis were conducted. (1) According to the health center, the number of people infected with monkey malaria is increasing every year. (2) Most of the infected patients were adult male farmers. (3) Based on patients' testimonies, forested areas were suspected to be infected areas. (4) Although there were no human malaria cases and only non-human primate malaria cases, we decided to continue the investigation.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア サルマラリア 人獣共通感染 疫学調査 分子生物学的解析

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、同じヒトマラリアとサルマラリアの感染であっても感染状況の異なるベトナムとマレーシアにおいて、「森林活動に密接な人とその周辺にいる人という特定の集団の行動様式の違いに起因している」という仮説を立てその証明を行う。

調査研究は以下の事項について行う。(1)調査地区の住民の生活様式及び行動調査。(2)マラリア感染の感染率及び感染種の調査。(3)マラリアで重要な位置にある媒介蚊の感染率及び感染種の調査。

ベトナムとマレーシアにおいて個々に集積したデータを比較検討し、マラリア感染原虫の感染状況が異なる二つの地域の感染特性に対し、その構造と特性を考察、地域に即した結果の還元をする。

## 2. 研究の目的

近年、新たに拡大がみられている人獣共通感染性・サルマラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi* 及び *P. cynomolgi*) は東南アジアにおける新興感染症として注目をされ、マラリア根絶への障害となっている。かかる状況において、ヒトマラリアとサルマラリア感染がみられるが、両種の感染率を比較すると、ヒトマラリア感染が多いベトナムとサルマラリア感染が多いマレーシアという感染状況が異なる二つの地域において「なぜ特定の地域、集団によってサルマラリア感染を含めたマラリア感染の相違が起きているか」を、人類学および分子疫学の現地調査、すなわち住民と媒介蚊の行動と感染マラリア原虫の種等の調査を通し、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、地域に即した「森林マラリア」に特化したマラリアコントロールの提案を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究は、感染患者からの末梢血採取による採血は 2020 年 5 月から 2022 年 1 月にかけて、ベトナム・ビンフオック省の Bu Gia Map コミューンで対象者の同意のもとに実施された。

感染患者からの末梢血を 2020 年から 2022 年は 24 検体、2003 年は 30 検体、2012 年は 24 検体、2015 年は 32 検体を分析した。

マラリアに感染したヒトの血液を指刺で採取し、分子解析に用いた。マラリア原虫の種の同定には、小サブユニットリボソーム RNA 遺伝子を標的としたネステッド PCR を使用し、次いで増幅と塩基配列決定を行った。Pfk13 と同様、(生殖母体特異遺伝子 pfg377 の領域 3 の塩基配列決定を行った。過去に同地区で採取された保存 DNA サンプルも比較対照の為上記と同様に分析した。

マラリア感染者の血液サンプルは指ブリックで採取し、分子解析に用いた。ネステッド PCR 法を用い、小サブユニットリボソーム RNA 遺伝子を標的としたネステッド PCR にて原虫種の同定に用いた。同時に比較対照の為 Pfk13 と pfg377 (生殖母体特異遺伝子) の領域 3 の塩基配列を決定した。比較対照の為過去に同じ地域で採取された保存 DNA サンプルを上記と同様に解析した。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) の研究協力者と協働して実施した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒトの感染状況

ヒトサンプルは Binh Phuoc 省 Bu GiaMap 地域保健センターにおいて Passive case detection (PCD) を 2020 年 5 月から実施した。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 Table 1)。感染



図1. 調査実施地域

表1 ヒトの感染状況

Table 1 Characteristics of patients infected with *Plasmodium* parasites (a) in Bu Gia Map commune, Binh Phuoc Province, and diagnosis results of *Plasmodium* species in samples of human blood samples (b)

a. Characteristics of the study patients				
No. examined ( <i>Plasmodium</i> positive cases) 48				
Age (years)	3 to 61 (mean ± SD: 28 ± 12)			
Sex	47 male, 1 female			
Body temperature (°C)	37.7 to 39.6 (mean ± SD: 38.5 ± 0.5)			
Estimated location of infection	Total	Pf	Pv	Pf + Pv
In the National Park	36	18	17	1
In the commune	12	5	7	0
b. Malaria diagnosis results of the study sample				
Infected <i>Plasmodium</i> species	Microscopy	RDT	PCR	
Pf	24	24	23	
Pv	24	24	24	
Pm	0	-	0	
Pf + Pv	0	0	1	

Pf: *P. falciparum*; Pv: *P. vivax*; Pm: *P. malariae*; Pf + Pv: mixed infection with Pf and Pv

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)、卵形マラリア(Po)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 *pfg377* アレル解析の検討対象とした。

媒介蚊も同時期、同地区、特に媒介蚊の特性を考え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。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*)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。

## (2) 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 18 例のうち、村に居住している者 15 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 13 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(表 1)。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。

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

患者から採取された血液サンプルを検査した。原虫の存在と種類を PCR 法で調べた。

寄生虫の有無と種類を調べた。単一原虫および混合原虫種の感染はそれぞれ 47 例と 1 例であった。その中で Pf が 23 検体、Pv が 24 検体、Pf と Pv の混合感染が 1 検体であった。

Pv を含むものが 24 検体、Pf と Pv が混在していた(表 1)。

この地域の主媒介蚊である *Anopheles dirus* はヒトと霊長類両方のヒトおよび霊長類原虫が、サルマラリアによるヒトへの感染は観察されなかった。マラリア患者の体温は、マラリア原虫とピバックス原虫で平均 38.6°Cであった(表 1)。マラリア患者の体温はそれぞれ平均 38.6°Cと 38.5°Cであった。感染種の違いによる体温の有意差はなかった。

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。患者には、初診時にマラリアを発症した場所について聞き取り調査を行った。

その結果、Pf と Pv の両マラリア患者において国立公園での感染はコミュニケーションでの感染の 3 倍であった(表 1)。しかし、Pf と Pv 患者の感染場所には差がなかった。

また Pf と Pv 感染では、感染経路に違いはなかった。つまり感染と伝播のリスクは国立公園地域の方が高いことは、同じ時期に実施された媒介蚊の調査結果からも裏付けられた。

48 のマラリア陽性検体のうち、24 の Pf 陽性 24 検体を分析し、Pfk13(塩基位置 1279-2127 部分)の塩基配列を決定した。一塩基 Pfk13 配列に対する塩基多型 3D7 クローン(PF3D7\_1343700)を基準として Pfk13 配列に関する変異をそれぞれ記録した。

2020 年の Pf 感染検体 24 例中 17 例(71%)に変異が認められた。それらのうち変異が認められ 17 検体(71%)は非同義変異のみであった。その結果、アルテシニン使用開始前の 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、アルテシニン使用が進んだ 2012 年の検体 24 検体中 23 検体(96%)が、2015 年の検体では 24 検体中 23 検体(96%)

が変異株であった。2020 年-2022 年の調査では 24 検体中 17 検体 (71%) が変異株であった (図 2)。

#### (4) 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 (図 2)。

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、2020-2022 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)。

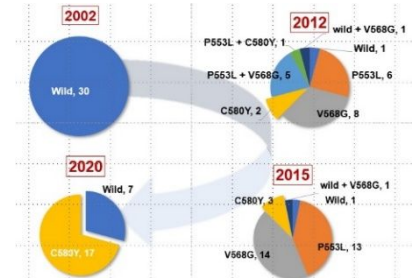


図 2 Binh Phuoc 省における *K13-propeller* 遺伝子アミノ酸変異の経時変化

#### (5) *K13-propeller* 遺伝子と *pf377* (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 *pf377* の mRNA アレルを測定した。図 3 に示すように、2002 年の *pf377* mRNA アレルは 5 種のアレルを検出したが、2020-2022 年の検体では 2 種に収束していた (図 3)。

#### (6) *K13* 変異と *pf377* (生殖母体特異遺伝子) との関連

*K13-propeller* 遺伝子変異の経年変化の比較を *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。

図で示していないが、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。

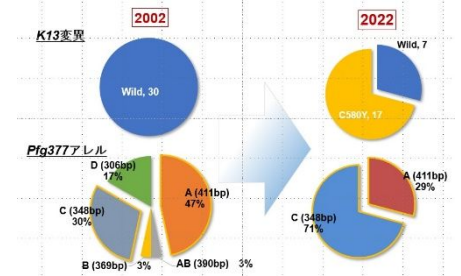


図 3 *K13* 変異と *pf377* (生殖母体特異遺伝子) との関連

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 省とは異なる位置にある Kanh Hoa 省 (KP) では、Gia Lai 省と同様 P553L 変異だけが認められた。

#### (7) 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。

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、アルテミシニ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 Kanh 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 Kanh 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 *pfg377*mRNA 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。

薬剤耐性を付与する突然変異の獲得は、薬剤圧力がない野生型と比較して容易に変異が生じることがある。Pfk13 C580Y 変異は、他の突然変異よりもフィットネスクストが低いと推測される。しかし、C580Y のフィットネスクストだけではこの置換の急速な広がりを説明することはできない。ゲノムワイド関連解析は Pfk13 以外の遺伝子における変異がさらにフィットネスを補う可能性がある。

本課題で調査された各時点における Pf の相対有病率は、Bu Gia Map が位置する Binh Phuoc 省で調査したその他の地点での Pf の相対有病率は減少していた。これは寄生虫プールの有効個体数が減少しているためと推測された。

寄生虫プールの有効個体数が減少すると、ゲノム全体の多様性が減少することになる。

多様性が減少する。これが変異株の多様性の減少の一因であると考えられた。

Bu Gia Map 国立公園では、24 例中 19 例がマラリアに罹患していた。その多くが Bu Gia Map 国立公園で発症した。この国立公園を含む調査地域は、カンボジアとの閉鎖的な国境地帯の一部であり、地元の少数民族は他の地域との交流がほとんどない。特に夜間は他所との交流がない。そのため、外来種からの新たな変種の侵入は考えにくい。この地域で観察された対立遺伝子有病率の変化は、外来種からの侵入によるものではないと推測された。つまりこの地域で観察された対立遺伝子の流行率の変化は、外来株の輸入によるものではなく、現地の寄生虫集団の環境条件の変化によるものであることが示唆された。

Pfk13 の変異は年によって異なる。今回の研究では Pfk13 の対立遺伝子の数や多様性と薬剤耐性や感染効率との間には有意の関連性は認められなかった。遺伝的多様性の減少が他の遺伝子座でも観察されるかどうかを調べるために他の遺伝子座でも観察可能かどうかを調べるため、次のような調査を行った。

生殖母体特異的遺伝子 *pfg377* を調べた。その結果調査地域における *pfg377* の対立遺伝子のアレル数は、2012 年の 5 種から 2020-2022 年では 2 種に減少していた。同時に 2012 年では Pfk13 変異株の混合感染も観察された。しかし 2020 年から 2022 年では、Pfk13 と *pfg377* の両方で各 2 種に減少していた。C580Y 変異は、アルテミシニンおよびその誘導体に対して中程度の耐性を付与することが報告されている。もともと他の変異が優勢であった地域で、C580Y 変異に取って代わってきている。

薬剤耐性を付与する変異の獲得は、薬剤圧がない場合、野生型と比較して Pfk13 C580Y 変異は、他の変異に比べてフィットネスクストが少ないと証明されている。しかし、C580Y のフィットネスクストだけではこの置換の急速な広がりを説明することはできないとされている。ゲノムワイド関連解析は Pfk13 以外の遺伝子における変異がさらにフィットネスを補う可能性を示唆されている。この点については今後の解析が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Thieu Nguyen Quang, Chinh Vu Duc, Van Hanh Truong, Van Dung Nguyen, Takagi Hidekazu, Annoura Takeshi, Kawai Satoru, Masuda Gaku, Van Tuan Nguyen, Hung Vu Viet, Nakazawa Shusuke, Culleton Richard, Binh Nguyen Thi Huong, Maeno Yoshimasa	4. 巻 50
2. 論文標題 Reduction in Plasmodium falciparum Pfk13 and pfg377 allele diversity through time in southern Vietnam	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-022-00409-4	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 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前野芳正
2. 発表標題 ベトナム南部における媒介蚊の疫学調査からみえてくる人獣共通感染性サルマラリア原虫について
3. 学会等名 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前野芳正
2. 発表標題 人獣共通感染症マラリアのフィールド調査における分子生物学的手法
3. 学会等名 16TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PHYSIOLOGICAL ANTHROPOLOGY（招待講演）（国際学会）
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
研究分担者	益田 岳  (Masuda Gaku)  (00455916)	東京女子医科大学・医学部・助教   (32653)	
研究分担者	高木 秀和  (Takagi Hidekazu)  (90288522)	愛知医科大学・医学部・准教授   (33920)	

	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
研究協力者	ブドックチン  (Vu Duc Chinh)	国立マラリア学、寄生虫学、昆虫学研究所・昆虫学・部長	
研究協力者	川合 覚  (Kawai Satoru)		

## 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			
マレーシア	マレーシアサバ大学			
ベトナム	国立マラリア学・寄生虫学・昆虫学研究所			