

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22406010

研究課題名（和文） 熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性関連遺伝子の多型：地域による特徴

 研究課題名（英文） Drug resistant genes of *Plasmodium falciparum*:
Characteristic polymorphisms in each malaria endemic countries

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)：

有効なワクチンがまだないマラリアへの対策においては薬物療法が不可欠であり、薬剤耐性原虫の出現と拡散は憂慮すべき重大な問題である。私たちは、薬剤に対しての有効性を知り、耐性株が出現した場合に速やかに同定することのできる基礎として、熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性に関連する遺伝子の多型を解析している。ミャンマー、イラン、インドネシアの熱帯熱マラリア原虫の遺伝子解析を行って、それぞれの国、国内における地域によって特徴的な遺伝子型を示していること、その地域に適した対策が必要であることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：

Due to no effective vaccine available for malaria, drug treatment of infected patients are important strategy for malaria control, thus emergence and spread of parasites resistant to commonly used anti-malarials are serious problem. We have analyzed polymorphisms of drug resistant genes of *Plasmodium falciparum* isolated from Myanmar, Iran, Indonesia and some African countries for obtaining information of drug efficacy and efficiencies. Genotypes of each countries and areas are unique and this indicates appropriate control strategies are required in each countries and areas for efficient malaria control.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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、*pfdhfr* 遺伝子、*pfdhps* 遺伝子、*pfert* 遺伝子、*pfindr 1* 遺伝子、インドネシア、ミャンマー

1. 研究開始当初の背景

近年の有効なコントロール活動が功を奏して、マラリア感染地域における感染者数、死者の数が大幅に減少していることが報告されている。しかし世界の人口の40%を超える人々にマラリアの感染のリスクがあり、未だに年間2億人を超え

る人がマラリアに感染し、66万人を超える人がマラリアで死亡している。

有効なワクチンがまだないマラリア対策の基本は、簡易診断キットを併用しての感染の早期発見とアルテミシニンを中心とした混合療法(ACT)による治療、長期残効型蚊帳(LLINs)の使

用、残留性室内スプレー散布(IRS)、妊産婦や新生児に対する間欠的予防的治療(IPT)であり、熱帯熱マalaria原虫の薬剤耐性株の出現と拡散は重大な懸念事項である。

予防薬、治療薬として使用されてきたクロロキン、ファンシダール、メフロキンに対して耐性を示す熱帯熱マalaria原虫が出現、世界各地域に拡散するに至り、アルテシニンを基にしたACT(Artemisinin-based Combination Therapy)が広く用いられるようになった。

ACT導入の時期は、国、地域によって様々であり、早期にアルテシニンの使用を始めた東南アジア、タイ・カンボジアでは、2009年にアルテシニンによる治療効果の低下が疑われる原虫株の存在が報告された。しかし、アルテシニン耐性の分子機構も、関わる遺伝子も明らかではなく、このような原虫の拡散を防ぐこと、他の地域でも耐性原虫の出現を検出する体制を整えておくことが重要な課題となっている。

2. 研究の目的

現在、ほぼすべてのマalaria感染地域でACTが導入され、それぞれの地域でアルテシニンと組み合わせて用いる抗マalaria剤の異なる幾つかの種類のACTが用いられている。そのような状況の異なる国々、地域で、ACTの導入によってマalaria原虫の遺伝子構造がどのように影響を受けるかを調べ比較して、それぞれの地域でアルテシニンと組み合わせる最も適した薬剤についての情報を得ることを目的として研究を開始した。

アルテシニン耐性を分子レベルで説明することはできていないが、クロロキン、アモディアキン、ファンシダール、メフロキン等に対する耐性は、原虫の *pfprt*、*pfmdr 1*、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。また遺伝子型の変化を比較、追跡することでその地域のマalaria原虫がどのように薬剤に反応してきたかについての情報を得ることが可能である。

タイの隣国で様々な薬剤耐性原虫が報告されているが原虫遺伝子の情報に乏しいミャンマー、東西に広がった状況の異なる数多くの島々からなるインドネシア、熱帯熱マalaria感染に対してファンシダールの有効性が維持されていることが示されているイランにおける熱帯熱マalaria原虫の遺伝子多型を解析した。

3. 研究の方法

(1)ミャンマー各地の熱帯熱マalaria原虫サンプルの収集と解析

ヤンゴン市内の病院にはミャンマーの各地方に出かけた際に感染したり、地方では治療がうまく行かなかった患者が多数集まっている。共同研究者 Hla Myat Mon 氏(Yangon Technological University)に協力してもらって、患者の同意を得

て少量の血液を採血し、遺伝子解析を行った。

(2)インドネシアの広い地域からの熱帯熱マalaria原虫サンプルの収集と解析

インドネシアは赤道直下、東西に非常に広い国である。アイルランガ大学熱帯病研究所・医学部の Prof. Yoes と Dr. Sukma の協力で、スマトラ、ジャワ、ロンボク、スンバワ、カリマンタンの島々ごとに数ヶ所のマalaria感染地域を選んで、その地域の診療所、保健所に来る患者からの血液を濾紙採血で保存してもらうシステムを確立した。大部分の現場は近年になってACTの導入が行われたところであり、長くクロロキンが第一選択薬として使用されてきた。またファンシダールも容易に入手可能で頻繁に用いられているのが現状である。このような背景を踏まえて熱帯熱マalaria原虫遺伝子の解析を行った。

(3)イランの熱帯熱マalaria原虫サンプルの収集と解析

イランでは主として南西部、パキスタン国境地域とペルシャ湾岸地域にマalariaがあり、治療薬としてはクロロキンをを用いてきた。近年、アルテスネート/ファンシダールを第一選択薬として用いており、実際にファンシダールが熱帯熱マalariaの治療に有効であるとの報告がなされている。共同研究者の Ahmad Reza Esmaeili Rastaghi 氏(Pasteur Institute of Iran)の協力を得て、アルテスネート/ファンシダールの導入によって、マalariaの感染率、治療効果がどう改善されるか調べる目的で、マalaria感染血液の収集を行った。

(4)採血フィルターからのDNA抽出

マalaria原虫感染陽性者から採血したフィルターの血液から、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°Cに保存した。

(5)マalaria原虫の薬剤耐性に関連する遺伝子多型の解析

熱帯熱マalaria原虫の *pfprt*、*pfmdr 1*、*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. 研究成果

(1)ミャンマーの熱帯熱マalaria原虫:薬剤耐性に関連する遺伝子多型の解析

ミャンマーでは、ヤンゴンなどの大都市中心部は別として、国内の大部分の地域でマalaria感染の危険性があり、人口約6千万人の60%以上の人に感染のリスクがあるといわれている。2010年には、約35万人のマalaria感染、約1千

人のマラリアによる死亡が報告されている。感染は雨季、およびその後によく報告されるが、マラリア媒介蚊による伝播の危険性は年間を通してある。人に感染するすべてのマラリア感染が報告されているが、その75%以上は熱帯熱マラリアである。さらに、近年はアルテシニンに対する感受性の低下した熱帯熱マラリア原虫の存在も懸念されるに至り、原虫遺伝子の解析は重要となっている。

ミャンマーでは、従来から広く使用されているマラリア治療薬に対する薬剤耐性の問題によって、2008年にACTが導入された。私たちは、2005年から2010年にヤンゴンの医療機関でマラリアと診断され、同意の得られた検体を用いて薬剤耐性と関連する遺伝子を解析した。

① *pfprt* 遺伝子、熱帯熱マラリア原虫のクロロキン耐性に関わる *pfprt* 遺伝子のアミノ酸配列72-76番目について、解析した120サンプルのうち2検体のみが感受性のCVMNK、他の大部分はCVIETの耐性型であり、3検体から東南アジアでは稀なSVMNTが検出された。この領域に続く配列では、220、227、326、333、356、371371番目のアミノ酸に置換が認められたが、それらは72-76番目の配列と関連するものであった。

先に私たちは2000年代の早期からアルテシニンおよびその混合療法と取り入れている南ベトナム一地域の遺伝子解析を行い、年次を追うごとに *pfprt* 遺伝子の耐性型が減少し野生型が増加していることを報告している。今回のミャンマーのサンプルにおいては事例数が少なく、耐性型と野生型の割合については結論を出すことは出来ないが、多型の割合についてはベトナムのサンプルでも見られたと同様、年次ごとに *pfprt* 遺伝子の多型度が減少していることが観察された。

② *pfmdr1* 遺伝子、この *pfmdr1* 遺伝子の産物であるPgh1タンパク質は *pfprt* 遺伝子産物とともに原虫の食胞に局在して、クロロキン、メフロキン、ハロファントリン、アルテシニン等、種々の抗マラリア剤に対する感受性と関連することが示されてきている。

今回解析したミャンマーのサンプルでは、これまでに報告のある5か所のアミノ酸置換のうち、Ser1034、Asp1246の変異は検出されず、Asn86Tyr、Tyr184Phe、Asp1042Asnの置換が認められた。86Tyrは2007年までのサンプルからは検出されたが、それ以降は見つからなかった。184Pheの割合は、調べた期間を通して大きく変わらず選択圧を受けていないように思われるが、1042Asnは常に184Pheを伴っており相互作用が推測される。全体として4種類の遺伝子型が認められたが、常にNYSND野生型が最も多く検出され、YYSNDとNYSDDは年次ごとに減少する傾向にあった。

③ *pfdhfr*+*pfdhps* 遺伝子、スルファドキシム・ピリメサミン(SP)耐性と関連する *dhfr*/*dhps* 遺伝子について、塩基配列を決定して変異の割合

を調べた。*dhfr*遺伝子の59番目と108番目のアミノ酸は100%、51番目と164番目では約75%のサンプルで変異型となっており、*dhfr*遺伝子全体としては5種類の遺伝子型を認めた。一方、*dhps* 遺伝子では437番目と540番目が90%以上、436番目と581番目が50%程度変異型であり、それらの組み合わせとして全体では8種類の遺伝子型が検出された。SPに対する感受性を考えるにあたって重要となる *pfdhfr*と *pfdhps* 遺伝子両方でのアミノ酸変異の蓄積は、6ヶ所以上に変異が認められる原虫の割合が80%以上という結果であった。ミャンマーではSPの使用を中止して長期間経っているが、遺伝子に変異が多く蓄積しており、SP耐性の割合は変化していないことが示唆された。また、*pfprt* 遺伝子、*pfmdr1* 遺伝子で認められたような多型の割合が減少するという傾向は見られなかった。

(2) インドネシア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

インドネシアはスマトラ島からニューギニア島まで東西に広い島国で、国内でも島、地域によって感染率にも原虫の薬剤感受性にも違いが認められる。それぞれ地域の保健所と患者の協力を得て、マラリア原虫感染血液を集めたが、感染率が高く抗マラリア剤による治療効果が問題となっている地域は、カリマンタン島とニューギニア島であった。

クロロキン耐性と関連する *pfprt* 遺伝子についてはいくつか報告もなされており、インドネシアでは地域によってパプアニューギニア起源の耐性型SVMNTと東南アジア起源の耐性型CVIETがそれぞれ局在していることが認められている。それぞれの地域内では遺伝子型は非常によく似ていて多型に乏しい。感受性型は検出されることは非常に稀で、クロロキン耐性が隅々までいきわたってしまっていることがわかる。インドネシア政府はスルファドキシム・ピリメサミン(SP)についても、治療効果が低下し耐性型熱帯熱マラリア原虫が大部分であるとの見解で公式には使用していないが、マラリア地域で簡単に入手可能で地域住民はしばしば使用している。これは、熱帯熱マラリア以外のマラリア感染が50%程度あることも理由であるが、実際に効果があることも示唆している。調べてみるとインドネシアの熱帯熱マラリア原虫の *pfdhfr*、*pfdhps* 遺伝子解析はほとんど報告がない。インドネシア政府の方針でサンプルの国外持ち出しが制限されており、アイルラング大学で制限酵素を用いた解析を行った。すべての変異部位を調べることは出来ないが、変異が蓄積されてくる重要な場所について調べたところは、妊婦のマラリア感染率が高くSPの予防的投与を考慮しているカリマンタン島でも感受性を疑われる原虫の割合は50%程度、それ以外の地域では有効であることを示唆する結果が得られた。現在より詳細な解析と遺伝子多型の解析を目的として塩基配列を比較している。

この結果は、インドネシアではアルテミシンと組み合わせる薬剤としてスルフアドキシン・ピリメサミンを考慮してもいいことを示唆している。

(3) イラン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

イランの熱帯熱マラリア原虫遺伝子について、他の国、地域の原虫遺伝子と比較して大きく異なる特徴は多型の度合いが少ないことである。*pfert* 遺伝子については、解析した約 5% のサンプルで野生型の CVMNK、他の大部分は耐性型の SVMNT であった。この 72-76 番目に続く領域に関しては、野生型、耐性型それぞれについて 220、326、356 番目のアミノ酸部位にのみ違いが認められ、全体としても野生型、耐性型の 2 種類の遺伝子型のみが認められた。

pfindr1 遺伝子については、変異多型はほぼ 86 番目のアミノ酸のみに認められ、1 サンプルからのみ 184 番目のアミノ酸が異なるものが検出された。また、86 番目のアミノ酸については、同じ検体から野生型の Asn と変異型の Tyr の両方が見つかるとも 10% 程度あり、この部位のみが異なる 2 種類が共存していることが検証された。2005 年の検体においても 2010 年の検体においても野生型、変異型の両方が認められたが、その割合は野生型がより多くなっている傾向にあった。

pfdhfr、*pf dhps* 遺伝子について、90% 以上のサンプルで *dhfr* 遺伝子の 59 番目と 108 番目のアミノ酸に変異が認められた。しかし *pf dhps* 遺伝子では 15% 程度のサンプルで 437 番目のアミノ酸に変異があったが、540 番目を含めて他の部位には置換を検出しなかった。イランではアルテスネート/ファンシダールを第一選択薬として用いており、実際にファンシダールが熱帯熱マラリアの治療に有効であることを支持している結果である。

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2件)

- ① Fitriah¹, Sri Wijayanti Sulistyawati, Sugeng Riyanto, Budiono, Sukmawati Basuki, Yoes Prijatna Dachlan and Haruki Uemura. Polymorphism of Plasmodium Falciparum Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase Genes among Pregnant Women with Falciparum Malaria in Banjar District, South Kalimantan Province, Indonesia. Journal of Tropical Life Science, 2 (2), 92-98 (2012)、査読有
- ② Yoko Tsumori, Mathieu Ndounga, Toshihiko Sunahara, Nozomi Hayashida, Megumi Inoue, Shusuke Nakazawa, Prisca Casimiro, Rie Isozumi, Haruki Uemura, Kazuyuki Tanabe,

Osamu Kaneko and Richard Culleton. *Plasmodium falciparum*: Differential Selection of Drug Resistance Alleles in Contiguous Urban and Peri-Urban Areas of Brazzaville, Republic of Congo. PLoS ONE 6(8): e23430 (2011)、査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Petronella Maria Risamasu, The efficacy of Dihydroartemisinin and the mutation of 769 codon of PfATPase gene in uncomplicated falciparum malaria in Jayapura District, Papua Province, Indonesia. The 2nd International Congress of Life Sciences 2012: "Prospective and Contribution of Life Sciences for Better Life", 2012 年 7 月 14 日、University of Brawijaya, Malang, East Java, (Indonesia)
- ② Fitriah, Polymorphism gene Plasmodium falciparum DHFR and DHPS among Pregnant Women with Falciparum Malaria in Banjar District, South Kalimantan Province. The 2nd International Congress of Life Sciences 2012: "Prospective and Contribution of Life Sciences for Better Life", 2012 年 7 月 14 日、University of Brawijaya, Malang, East Java, (Indonesia)
- ③ Hla Myat Mon, ミャンマーの熱帯熱マラリア原虫薬剤耐性関連遺伝子の多型、第 81 回日本寄生虫学会大会、平成 24 年 3 月 24 日、兵庫医科大学(兵庫県)

[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

金子 聡 (KANEKO SATOSHI)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 00342907