

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23256003

研究課題名(和文) シャーガス病の薬剤治療反応性を規定する原虫および宿主の遺伝要因解析

研究課題名(英文) Host and parasite genetic factors that influence the reactivity to Benznidazol treatment of the paediatric chronic Chagas patients in Bolivia

研究代表者

平山 謙二 (HIRAYAMA, Kenji)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：60189868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボリビア国保健省のシャーガス病制圧プログラムと協力し、15歳以下の小児の慢性感染患者に対するベンズニダゾールによる治療成績に影響を与える原虫および宿主側の因子を明らかにすることを目的として研究を行った。現地での拠点となった保健省熱帯病研究センター、シラニ病院、日本病院の研究協力者として本研究を企画し、サンタクルースの病院を基盤とした治療プログラムと本プロジェクト研究を開始することができた。治療効果とそれに伴うサイトカイン産生、さらに血中薬剤濃度などを測定を完了し薬剤反応性の多様性、原虫血症の推移、薬剤代謝の影響、免疫応答性の特徴などが明らかになり、遺伝的な背景との関連も示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：In collaboration with the governmental Chagas control program in Bolivia, one year longitudinal hospital cohort study was performed to assess the host genetic factors on the reactivity to 2 months regimen of Benznidazol for the 77 paediatric chagas patients. The clinical records and laboratory data including specific antibody titer, parasite qPCR, plasma levels of BNZ and cytokines were monitored and used for the evaluation of their reactivity to the treatment. They were divided into three groups 1)effective, 2)less effective, 3)side effect. Host DNA were analyzed for the HLA, P-450 enzymes, genes polymorphism to see their influence on the reactivity to BNZ.

研究分野：寄生虫学分野

キーワード：シャーガス病 ボリビア ベンズニダゾール 治療効果 遺伝子多型解析

1. 研究開始当初の背景

1. 顧みられない熱帯感染症

シャーガス病はクルーストリパノソーマという鞭毛虫類に属する細胞内寄生原虫による感染症である。感染型の原虫は吸血性昆虫であるサシガメの腸内で増殖し、吸血時に糞便と共に排出され、ヒトを含む哺乳類（イヌ、ネズミ、その他の野生動物など）に感染し、主にマクロファージなどで増殖後、全身の細胞（マクロファージの他、特に心臓や結腸の神経叢など）内に侵入し増殖をくりかえす。急性期にまれに心不全などで死亡することがあるが、ほとんどは回復することなく慢性に移行する。現在2種類の治療薬が開発されているが（nifrutimox ニフルティモックス Bayer, benznidazole ベンズニダゾール Roche）、いずれも副作用が強く、効果も弱い。ため、これまで乳幼児をのぞく小児から成人に至る急性あるいは慢性患者ではほとんど治療は行われていなかった。そのため、流行地域では現在でも多数の慢性感染者が存在する。サシガメが土壁などの貧しい住居に生息することや野生動物が保有宿主になっていることなどから、シャーガス病の途上国における具体的な制御対策は遅れており、WHO など国際的な支援の必要な顧みられない感染症として認識されている。

2. 流行の状況（疫学）

サシガメの生息する中南米に広く流行しているが、顧みられない感染症の名のごとく、詳細な疫学情報に乏しい。断片的な調査の結果を総合すると（WHO レポート 2004）中南米地域全体では約9千万人が汚染地域に生活しており、抗体陽性者の頻度は1.4%、年間の死亡者は1万4千人で、疾患の社会全体への負荷の指標であるDALYは667,000とされている（Mathers et al. PLoSNTD 2007）。中南米でも南部のアルゼンチン、ブラジル、チリ、ウルグアイなどでは昆虫対策などが功を奏し感染率が激減したが、今回の対象地域を含むボリビアでは依然として高い感染率を示しており、南部のタリハでは2008年の報告で妊婦の陽性率が33.9%であった他、コチャバンバではサシガメの陽性率が79%であることから極めて感染危険度が高いことが判明した。またサンタクルース地区の調査でも輸血用の血液の供与者の出身地域の半分が汚染地域であることが指摘された（Brutus L, 2008, Medrano-Mercado N, 2008, Schmunis GA 2008）。

3. 臨床像と治療

急性期の治療（ベンズニダゾール）は母子感染の新生児に行われているが、流行地域では小児期にほぼ30-50%が感染し、無症候性の慢性期に移行する。10年以上の経過後に約30-50%に典型的な慢性シャーガス病の合併症が現れる。1つは心筋障害（心臓型）で、もう一つは巨大結腸（食道）症（消化器型）である。我々の2000年からの現地での調査により、心臓型あるいは消化器型の30才代以

降での出現頻度が約30%前後であることが示され、これらの合併症を有する患者の感染原虫に特定の病原性のある系統が存在しないことが明らかになった。すなわちこれらの合併症発症者は何らかの宿主要因により発症していることが示唆された（Del Puerto PLoSNTD 2010）。

4. 現在行われている制御対策と今後の方向性

ボリビアではシャーガス病対策として以下の4つのプロジェクトが行われている。

（1）昆虫対策、（2）慢性感染小児の治療、（3）母子感染対策、（4）輸血による感染対策。

WHOはこれまで重点的に昆虫対策を進めているが、ボリビアのような高度流行地では（2）以下のヒトへの感染対策あるいは慢性感染者の治療が大きな課題となっている。このような現状をふまえて慢性期の合併症を予防できるような治療プロトコルの確立が急務であり、その根幹となるのは治療薬あるいは治療予防ワクチンの開発である。

今回の研究ではボリビアの高度流行地の小児を対象とした治療プログラムに参加して、以下の項目について明らかにする。

1. 小児期の流行の状況や臨床症状の実態。
2. ベンズニダゾール治療に対する反応性の個体差、特に原虫排除能や副作用感受性。
3. 上記の治療反応性という表現型と宿主あるいは感染原虫の遺伝背景との関連性。

原虫の系統についてはII d 系統が主体であるがIやII e 系統も存在している。宿主側のHLAについては成人を対象に合併症の調査を行い主要な遺伝子アレル頻度と合併症に対する抵抗性アレルを同定している（57thASTMH 米国熱帯医学会で発表、投稿準備中）。本研究では治療反応性における宿主の遺伝子多型の影響を明らかにする。また最終的に患者群と対応する血清抗体陰性群を採血し、感染しない群との比較を行い、感染抵抗性についての解析も行う。

薬物治療による効果は主に3つの要因により決定されている。（1）原虫の薬物感受性（2）ヒトの薬物代謝能および代謝経路（3）ヒト宿主の原虫排除能と過敏反応。国家プロジェクトとして承認されたベンズニダゾールの治療プロトコルによる治療成績を詳細に調査することで、個人の治療成績を客観的なデータとして把握することができるので、本研究で解析するHLAなどの候補遺伝子の多型との治療成績の関連、さらには今後のゲノムワイド関連研究（GWAS）も視野に入れ、最終的にはオーダーメイド医療に基づく治療法開発へと発展させることができ、合併症により今後失われる生命を効率よく救うことができる。

2. 研究の目的

ボリビア国保健省のシャーガス病制圧プログラム National Chagas Control Program (NCCP) と協力し、15歳以下の小児の慢性感染患者(血清反応陽性者)に対する Benznidazol ベンズニダゾール(Roche)による治療成績に影響を与える原虫および宿主側の因子を明らかにすることを目的として研究を行った。

NCCPの概要:大きく3つのグループに分かれて活動している。いずれも保健省から各県の管轄の保健省責任者が担当し、地域病院での患者の治療グループおよび媒介昆虫駆除の担当グループが活動している。(Manual de Procesos para la detección, diagnóstico, tratamiento de la enfermedad de Chagas infantil, La paz, programa Nacional de Chagas- Ministerio de Salud y Deportes-2007)

1. 媒介昆虫駆除プログラム:殺虫剤の住居壁への塗布や室内噴霧
2. ベンズニダゾールによる治療プログラム:住民の血清抗体陽性者のうち、15歳以下の小児を対象に60日間連続内服療法により根治を行う。
3. 妊産婦の出産児を対象にした治療プログラム:出産後PCR陽性児に対する薬物治療。

3. 研究の方法

1999年から7年間科学研究費により推進したボリビアでのシャーガス病研究グループを基盤として、現地での拠点となった CENETROP の分子生物免疫分野と西沢医師(シラニ病院)、日本病院の Dr Gutierrez、パラグアイアスンシオン大学教授の Prof Graciela Russomando を主たる研究協力者として本研究を行った。サンタクルーズ県の都市近郊地域のシャーガス病に関する4つの基幹病院において、5-15歳の小児の慢性感染患者77名に対してベンズニダゾールによる治療を行い、その治療効果について治療前、治療中、治療直後、終了後2, 4, 6, 10か月後の採血と診察を行い、評価した。またDNAを抽出し成績に影響を与える原虫および宿主側の遺伝因子を解析した。

- 調査研究実施国:ボリビア共和国(南アメリカ大陸中部)
- 実施地域:東部サンタクルーズ県の3つの行政区域であるワルネス、ポルタチュエロ、モンテロ、サンタクルーズ18区。
- 研究実施現地中心機関:ボリビア保健省直轄サンタクルーズ熱帯病センター(CENETROP)、JICA 関連大学病院である日本病院、および民間のシラニ病院

4. 研究成果

対象者77名について、治療中および治療後10か月間の血中抗体価、定量PCRによる原虫血症の評価を行い、治療効果に個体差のある

ことを明らかにした。この効果の違いは副作用による中断などの影響ではなく、なんらかのヒト側の個体差によると考えられた。HLA多型、P450酵素遺伝子多型との相関について現在データ解析を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- ① 平山謙二、シャーガス病への備え、週刊日本医事新報、No.4723、pp47、2014 査読無
- ② Del Puerto F, Kikuchi M, Nishizawa JE, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Gutierrez Velarde FU, Hirayama K. 21-Hydroxylase gene mutant allele CYP21A2(*)15 strongly linked to the resistant HLA haplotype B(*)14:02-DRB1(*)01:02 in chronic Chagas disease. Hum Immunol. 2013, 74(6):783-6., doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.023. 査読有
- ③ 平山謙二、シャーガス病, 特集 世界に広がるトロピカルディジェーズ、化学療法の領域、Vol.29、No.8、pp60-68. 株式会社医薬ジャーナル社、2013年8月号 査読無
- ④ Del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Miura S, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis. 2012, 6(3):e1587. doi: 10.1371/journal.pntd.0001587 査読有

[学会発表](計7件)

- ① 大山 要、吉見 春香、フイグエンティエン、岸川 直哉、西澤 ファンエイキ、黒田 直敬、平山謙二; 慢性シャーガス病患者の循環免疫複合体に含まれる抗原タンパク質のプロテオーム解析. 第84回日本寄生虫学会大会、2015年3月21日-22日、杏林大学三鷹キャンパス、三鷹市、東京
- ② Hidenori Sakanashi, Hirokazu Nosato, Eichi Takahashi, Masahiro Murakawa, Koji Furukawa, Kazuhiko Yamasaki, Tomomi Kubota, Tesuo Yanagi, Kenji Hirayama. Pattern recognition approach to high-speed counting of live tripomastigotes. 第55回日本熱帯医学会大会・第29回日本国際保健医療学会学術大会合同大会、官民連携時代における人材育成、2014年11月1日-3日、東京女子医科大学弥生記念講

堂・国立国際医療研究センター、新宿区、東京

- ③ Kenji Hirayama: GENETIC ANALYSIS OF CHRONIC CHAGAS DISEASE IN BOLIVIA -HOST OR PARASITE FACTOR? XLIX CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE, August 06th to 10th, 2013 in Campo Grande, MS, Brazil, at the Centro de Convenções Arquiteto Rubens Gil de Camilo. 第49回ブラジル熱帯医学会年次大会招待講演, 2013年8月8日 Campo Grande, MS, Brazil,
- ④ Florencia Del Puerto Rodas, Eiki J. Nishizawa, 菊池三穂子, Yelin Roca, Luis A. Renjel, 小宮憲洋、前村浩二、平山謙二: V281L of the CYP21 gene causing 21-Hydroxylase deficiency located in the class III region of resistant HLA haplotype in the chronic Chagas disease. 第21回日本組織適合性学会大会, 平成24年9月15日-17日、明治大学駿河台キャンパス リバティホール、東京
- ⑤ Florencia del Puerto Rodas, Juan Eiki Nishizawa, Mihoko Kikuchi, Naomi Iihoshi, Yelin Roca, Cinthia Avilas, Alberto Gianella, Javier Lora, Freddy Udalrico. Gutierrez. Velarde, Luis Alberto. Renjel, Sachio Miura, Hiroo Higo, Norihiro Komita, Kouji Maemura, Michio Yasunami, and Kenji Hirayama; Immunogenetic analysis of chronic Chagas disease in Bolivia. 第20回日本組織適合性学会大会、ツインメッセ静岡 北館および中央棟、静岡、2011年8月28日-30日
- ⑥ Puerto Florencia del, Nishizawa Juan Eiki, 菊池三穂子, Iihoshi Naomi, Roca Yelin, Avilas Cinthia, Gianella Alberto, Lora Javier, Velarde Freddy Udalrico Gutierrez, Renjel Luis Alberto, 三浦左千夫、肥後広雄、小宮憲洋、前村浩二、安波道郎、平山謙二; Quantification of Trypanosoma cruzi parasitemia in peripheral blood of Chronic Chagasic patients in Bolivia using real time PCR. 第80回日本寄生虫学会大会、東京慈恵会医科大学、東京、2011年7月17日-18日
- ⑦ Florencia del Puerto Rodas, Juan Eiki Nishizawa, Mihoko Kikuchi, Naomi Iihoshi, Yelin Roca, Cinthia Avilas, Alberto Gianella, Javier Lora, Freddy Udalrico. Gutierrez. Velarde, Luis Alberto. Renjel, Sachio Miura, Hiroo Higo, Norihiro Komita, Kouji Maemura, Michio Yasunami, and Kenji Hirayama; Using real time PCR to detect

Typanosoma cruzi in peripheral blood of chronic Chagasic patients in Bolivia. 第4回 原虫感染免疫研究会、ポンペ会館、長崎、2011年2月4日-5日

[図書] (計 6件)

- ① 平山謙二: 心疾患や消化器疾患の原因が寄生原虫だった!?, トレンドビュー③ シャーガス病を知っていますか?, 日経メディカルオンライン, 2013
- ② 藤田 紘一郎, 平山 謙二 著者: 臨床検査学講座 第2版 医動物学、医歯薬出版株式会社、pp1-142, 2012
- ③ 平山謙二: 熱帯医学と感染症, 感染症事典, pp35-49, 医学書院, 編集: 感染症事典編集委員会, 2012 (総ページ 617頁)
- ④ 平山謙二: 感染症とは、感染症事典, pp1-34., 医学書院, 編集: 感染症事典編集委員会, 2012 (総ページ 617頁)
- ⑤ 藤田 紘一郎, 平山 謙二 著者: 臨床検査学講座 第2版 医動物学、pp1-142, 医歯薬出版株式会社, 2011
- ⑥ 三浦 修、平山 謙二: 監修, 高橋茂樹: 著 STEP SERIES, 内科② 感染症・血液 第3版、pp. 1-363, 海馬書房 2011

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 謙二 (HIRAYAMA, Kenji)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 60189868

(2) 研究分担者

奈良 武司 (NARA, Takeshi)
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40276473

グエン フイティエン
(NGUYEN, Huytien)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授
研究者番号: 20457526

菊池 三穂子 (KIKUCHI, Mihoko)
長崎大学・熱帯医学研究所・講師
研究者番号: 40336186

(3) 連携研究者

前村 浩二 (MAEMURA, Koji)
長崎大学・医歯薬学総合研究科
(医学系)・教授
研究者番号：90282649