

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

アジアの三日熱マラリア原虫の遺伝的多様度と伝播動態の解明

研究分担者 狩野 繁之 国立国際医療研究センター研究所部長
研究協力者 石上 盛敏 国立国際医療研究センター研究所上級研究員

研究要旨 本研究では、1993年から再流行している韓国の三日熱マラリア(*Pv*)の遺伝的多様度と伝播動態を、同原虫のマイクロサテライト(MS) DNA 14座位に基づく多型解析により明らかにすることを目的とした。近年、*Pv* 集団の遺伝的多様度や集団構造に関する研究が報告されはじめたが、本研究のように長期間(1994年~2008年:15年間)にわたって *Pv* 集団の伝播動態を解析した報告はこれが初めてである。*Pv* 163株、14座位のMS DNA データに基づき、遺伝的多様度を調べた結果、*Pv* 集団の多様度が増加していると同時に、連鎖不平衡の度合いが減少していることが明らかとなった。さらに Structure 解析の結果、2002年ごろを境に *Pv* 集団が遺伝的に大きく変化していることが明らかとなった。また年毎の *Pv* 集団間の遺伝的分化度を推定した結果、2001年と2002年の集団間で有意に分化していることが明らかとなった。交配のみでこれほど急激に集団が変化するとは考えにくいこと、並びに流行地域が北朝鮮との軍事境界線付近であることから、新たな *Pv* 株が継続的に韓国に流入していると推察され、このことが再流行から約20年経過した現在でもなお、同国が三日熱マラリアを制圧できずにいる原因だと推察された。

A. 研究目的

近年、三日熱マラリア原虫(*Pv*) 集団の遺伝的多様度や集団構造に関する研究が、通年の流行が見られる熱帯・亜熱帯地域から報告されているが、季節性の流行を示す温帯地域からは少ない。そこで昨年度に引き続き、日本の防疫にも重要な韓国(温帯気候)の三日熱マラリア原虫集団に着目し研究を進めた。韓国では1970年代後半に土着の三日熱マラリアの制圧に成功しているが、1993年から北朝鮮との軍事境界線付近に従軍した韓国軍兵士を中心に再流行が確認され、今なお流行が続いている。本年度は解析に用いる *Pv* マイクロサテライト(MS) DNA マーカーの数を、昨年度の10座位から14座位に増やし、検体数も87検体から163検体に増やし、韓国の *Pv* 集団の遺伝的多様度と伝播動態についてより精度の高い解析を行い、一度はその制圧に成功した韓国が、再流行の確認から19年以上経過した現在でもなお制圧出来ずにいる原因を解明することを目指した。

B. 研究方法

1) 材料は分担研究者の所属する国立国際医療研究センター研究所で保管している韓国の三日熱マラリア原虫(*Pv*) 163株(1994年~2008年採取:韓国・仁済大学医学部の高元圭教授より分与)を用いた。

2) 患者血球から *Pv* DNA を抽出し、PCR法で *Pv* MS DNA 14座位を増幅後、ABI Genetic Analyzer 3130xl を用いてフラグメント解析を行った。得られた対立遺伝子(アリル)データに基づき、*Pv* 集団の遺伝的多様度(各MS座位に観察されるアリル数とヘテロ接合度)を算出した。次にMS 14座位のアリルの組合せに基づき、連鎖不平衡の度合い、Structure 解析による集団構造の変化、年毎の集団間の分化度、並びにボトルネックの有無を推定した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた *Pv* 株の採取は、長期間で広範囲に渡っており、患者からの *Pv* 株の採取の際に、文書または口頭によるインフォームド・コンセントを取得していない。しかし、本研究分担者らは患者

からの *Pv* 株の採取に関わっておらず、なおかつ患者と *Pv* 株が連結不可能匿名可されているので、本研究によって得られる成果が、*Pv* 株の提供者に対していかなる不利益を与えることはない。また本研究は赤血球に感染したマラリア原虫の遺伝子解析を行うもので、宿主であるヒトの遺伝子解析は行っておらず、文部科学省・厚生労働省・経済産業省が共同作成した「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」には抵触しない。

C. 研究結果

15 年間(1994 年～2008 年)にわたって採取された *Pv* 集団(163 株)の遺伝的多様度が、時間の経過に伴い増加傾向にあることは、昨年度にすでに報告済みである(Iwagami *et al*, 2012)。一方、本年度の解析で、連鎖不平衡の度合い(I_A^S)が、時間の経過に伴い減少傾向にあることが明らかとなった(例えば、1996: $I_A^S = 0.524$, 1999: $I_A^S = 0.420$, 2002-2003: $I_A^S = 0.210$, 2006-2008: $I_A^S = 0.109$, 値が大きいほど連鎖不平衡の度合いが強いことを示す)。次にベイズの確立論を応用した Structure 解析の結果、韓国の *Pv* 集団は大きく 4 つの集団に分けられ、2002 年ごろを境に遺伝的に大きく変化したことが明らかとなった(図 1)。次に年毎の集団間の遺伝的分化度(F_{ST})を推定した結果、2001 年と 2002 年の *Pv* 集団間で、大きく分化していることが明らかとなった。次にボトルネックの有無を推定した結果、1996 年と 1998 年に、ボトルネックを生じた可能性が示唆された。

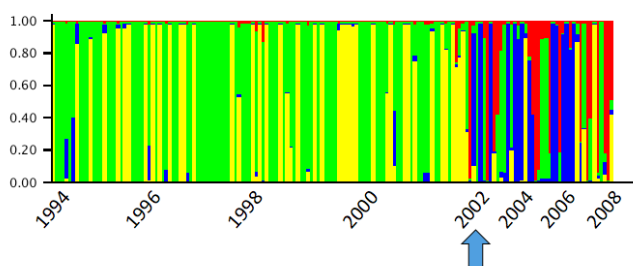


図 1 Structure 解析による集団構造の推定

各タテ棒が各個体を表し、同じ色は遺伝的な類似性を示す。

D. 考察

韓国 *Pv* 集団の集団遺伝学的特徴を経時的に解析した結果、時間の経過と共に多様度が増加傾向にあると同時に、連鎖不平衡の度合いが減少傾

向にあることが観察された。この結果からよりランダムな交配が進行していると推察された。さらに Structure 解析を行った結果、韓国 *Pv* 集団が 2002 年ごろを境に、遺伝的に大きく変化したことが明らかとなった(投稿論文作成中)。また年毎の集団間の分化度を推定した結果、2001 年と 2002 年の *Pv* 集団間で、大きく分化していた。一つの流行地域に分布するマラリア原虫集団が、交配のみでこれほど急激に集団の変化を生じるとは考えにくいこと、並びに流行地域が北朝鮮との軍事境界線付近であることから総合的に判断して、恐らく北朝鮮から新たな *Pv* 株が韓国に流入していると推察された。

E. 結論

韓国で 1993 年に三日熱マラリアの再流行が報告されてから 19 年以上経過した現在でもなお制圧できずにいる原因は、北朝鮮からの *Pv* 株の流入によると推察された。特に 2002 年ごろを境に、*Pv* 集団が大きく変化していたことから、韓国はそれ以前の *Pv* 集団をほぼ制圧したものの、北朝鮮から新たな *Pv* 集団が流入したと推察された。本解析方法はマラリアの対策が原虫集団に与える影響の評価や、患者数などの疫学情報からではわからないマラリアの流行状況を推定する有効な解析手法であることも明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iwagami M, Fukumoto M, Hwang SY, Kim SH, Kho WG, Kano S. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea based on microsatellite DNA analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases 6:e1592, 2012

2. 学会発表

石上盛敏, Weon-Gyu Kho, PT. Rivera, EA. Villacorte, 狩野繁之. 三日熱マラリア原虫 *pvmdr1* 変異に関する遺伝疫学. 第 81 回日本寄生虫学会大会, 兵庫医科大学(2012 年 3 月 22-24 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし