

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）
総括研究報告書

ポスト国連開発ミレニアム開発目標における熱帯アフリカ
マラリア根絶可能性に関する研究

研究代表者 金子 明 大阪市立大学大学院医学研究科 寄生虫学分野 教授

研究要旨

地球規模マラリア根絶は、今世紀人類が対峙する Global Health 上の優先課題である。国連開発ミレニアム目標 (MDGs) では患者および死者数を 2015 年までに 75% 減少させることが掲げられてきた。今般の対策法強化により感染者数の減少が流行地各地で報告されてきており、アジア・太平洋では究極の目標であるマラリア撲滅が見えてきた。しかし熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅は困難かつ重要な踏み石と考えられ、そのロードマップは未だ見えていない。本研究はポスト MDGs におけるこの課題に対して日中瑞および流行国ケニアの研究者が共同で挑戦する研究ベンチャーである。ビクトリア湖高度マラリア流行島嶼をモデルとしてマラリア撲滅に挑戦するものである。オコデ島全住民 (700 人) を対象にアルテミシニンとプリマキンによる集団治療と薬剤処理蚊帳配布を組み合わせた短期集約対策によりマラリア撲滅を試みる干涉研究の枠組みにそって、以下の個々の課題について検討を加えていく：(1) 地理的に連なる島嶼および内陸村住民集団においてマラリア感染に関する寄生虫学、血清分子疫学調査を、島嶼地域間・対策前後の比較において継続する。(2) プリマキン投与の安全性と関連する G6PD 欠損症をについて検討する。(3) 集団治療実施で用いる ACT と少量プリマキンの抗原虫生殖母体効果による伝播阻止作用を臨床薬理学的に検討する。(4) 住民主導の媒介蚊対策とサーベイランスによるマラリア撲滅長期的維持システムを構築し、社会経済学的開発の側面について検討する。本研究のチャレンジは**熱帯アフリカ高度マラリア流行地域**を対象としマラリア撲滅の可能性を検証することが本研究の最大の学術的挑戦である。島嶼は対策干涉研究に対して自然の実験系を提供する。研究代表者は南太平洋ヴァヌアツ島嶼において過去 20 年間、島嶼マラリア撲滅維持モデルを構築してきた [Kaneko et al. Lancet 2000]。それをビクトリア湖島嶼に応用していくことが基盤となる戦略である。さらに**集団治療 (MDA: mass drug administration)** を干涉戦略の中心におく。当該干涉研究により、島嶼においてマラリアを短期集約的に撲滅し維持しうることを示せば、熱帯アフリカ初の撲滅成功例となり国際的インパクトが期待される。熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅戦略を国際社会へ提示し、地球規模マラリア根絶に向けたわが国のイニシアチブに対する基盤とする。

平成 26 度は干涉実施に向けて準備を進めるとともに、撲滅干涉前マラリア調査を撲滅予定のオコデ島、対照とする近隣 3 島および内陸部ウンゴイ村で継続した。本報告書においては、特にマラリア撲滅介入研究実施にあたって必要な以下の課題について検討を行ったので報告する。

**ビクトリア湖島嶼におけるマラリア原虫感染率
マラリア診断法の改良
G6PD 欠損症率モニタリング
原虫薬剤耐性分子マーカーの年次的推移**

分担研究者

皆川 昇 長崎大学熱帯医学研究所・
病害動物学分野・教授

平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所・
免疫遺伝学分野・教授

脇村 孝平 大阪市立大学・大学院経済
学研究科・教授

五十棲 理恵 大阪市立大学・大学院医学
研究科寄生虫学分野・病院講師

A．研究目的

熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅は地球規模マラリア根絶にいたる困難かつ重要な踏み石である。本研究はこの課題にケニア・ビクトリア湖島嶼より挑戦する。**熱帯アフリカ高度マラリア流行地域**を対象とすることに最大の学的特徴がある。**島嶼モデル**により挑戦することが第2の特徴である。**ACT と少量プリマキンによる集団治療**を応用することが第3の特徴である。

貧困とマラリア：2008年ニューヨークにおけるMDGsマラリアサミットで新たな地球規模マラリア根絶計画が公表された。1955年開始の世界マラリア根絶計画は1970年台に頓挫したが、それは地域特性を無視したためと総括されている。Global Fund等の資金投入による薬剤処理蚊帳(impregnated bed nets: ITN)やアルテミシニン基盤併用療法(Artemisinin-based combination therapy: ACT)等対策法強化により各地で感染減少が報告されている。しかし熱帯アフリカに代表される高度流行地における撲滅可能性は残された課題である。マラリアが住民の生活を阻害し貧困をもたらし、貧困がさらにマラリア流行を増悪する悪性サイクルがアフリカにおける社会経済開発を妨げている。本研究においてはマラリア撲滅の悪性サイクルに対する効果も検証する。

島嶼マラリア撲滅：島嶼は干渉研究に対して自然の実験系を提供する。我々は1991

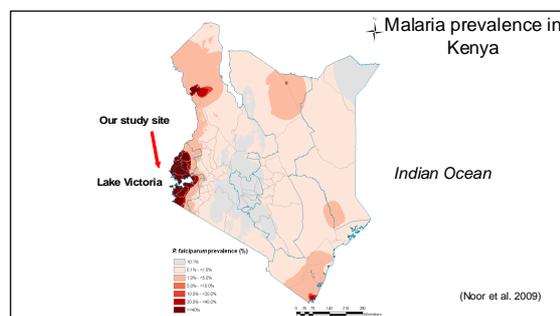
年以来ヴァヌアツ・アネイチウム島全人口700人を対象として、クロロキンとプリマキンによる集団治療とITNによりマラリア撲滅を達成し、住民主導によるITN使用とサーベイランスにより長期間マラリア撲滅を維持しうることを示してきた。このアネイチウムモデルをビクトリア湖島嶼へ応用する。

アルテミシニンの出現：中国側研究協力者Liは1970年代漢方薬からアルテミシニンを見出した。現在アルテミシニンは多剤耐性原虫に対する要であり、この業績はノーベル賞候補と目されている。近年Liはアルテミシニンと少量プリマキン併用の抗生殖母体効果による伝播阻止を目指した集団治療を迅速マラリア撲滅(Fast Elimination of Malaria by Source Eradication: FEMSE)として提唱している。本研究においては、FEMSEを応用する。

B．研究方法

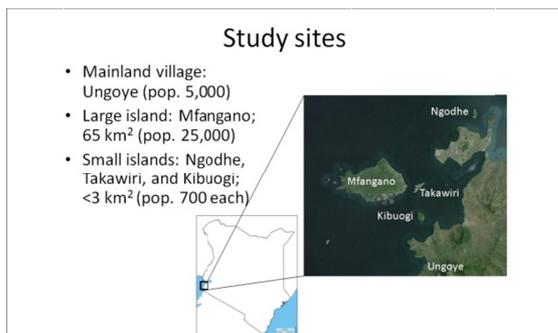
研究対象地域

本研究はケニア・ビクトリア湖スバ地区で実施される。当地では長崎大学熱帯医学研究所により2006年8月よりHDSSによる住民の移動、生死が把握されている。ムファンガノ島(人口約2万人)、オコデ、タカウリ、キプオギの3小島(各人口約700人)および内陸集落ウンゴイ(人口約3千人)を対象にする(図1)。



(図1)

本研究地域はケニア国内において、今般の ITN、ACT、RDT 等のマラリア対策法スケールアップにも関わらず高度マラリア流行が継続するホットスポットの中心に位置する(図2)



(図2)

撲滅干渉実施へ以下の研究段階を経て推進する。

(1) マラリア感染率調査: 住民感染率変動を撲滅前後で検討。以下研究の為に血液を濾紙採血にて保存する。

(2) 原虫薬剤耐性: Pf 薬剤感受性変動を評価。最近 Pf アルテミシニン耐性が示唆されている。その分子マーカーは依然不明だが *Pfmdr1* コピー数等の候補を検討する。最近アルテミシニン耐性マーカーとして報告された propellar gene 変異についても検討を行う。

(3) 赤血球異常症: G6PD 欠損症者は primaquine で血管内溶血を起こすことがある。予備的に対象地域で 7-15% の G6PD 欠損症が見いだされた。HbS、タラセミアとともに検討する。

(4) 血清疫学: Pf に対する特異的抗体の年齢群別陽性率と種類の変動を集団治療実施前後で検討する。

(5) 薬剤投与試験: artemisinin + piperazine + 少量 primaquine (APP) 投薬について Pf 抗生殖母体効果および安全性(特に G6PD 欠損症)を無症候性感染者で検討する。WHO は primaquine 15 mg が有効かつ G6PD 欠損症者にも安全との見

解を出した。

(6) マラリア伝播モデル: 撲滅干渉効果について検討する。

(7) 短期的マラリア撲滅干渉: オコデ島でマラリア撲滅を目指す。集団治療は Li の FEMSE に従い、乾季に全住民を対象に 35 日間隔で APP 2 サイクル実施する。この処方には 3 つの効果を含む: artemisinin による急速原虫排除、piperazine による長期的予防、primaquine による生殖母体急速不活化。島嶼間移動による原虫移入に対するサーベイランスを構築する。また定期的全島民スクリーニングにより陽性者に APP を投薬する。

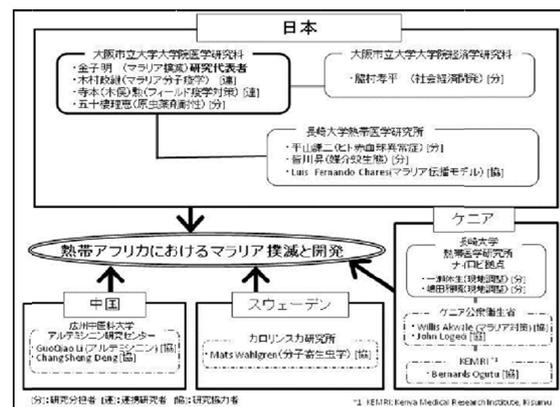
(8) 長期的マラリア撲滅維持: 住民主導の殺虫剤処理蚊帳使用とサーベイランス継続による。

(9) 社会経済学的インパクト: マラリア撲滅の影響評価。

(10) Feasibility study: 島嶼マラリア撲滅戦略のムファンガノ島への応用を検討。

(11) 熱帯アフリカマラリア撲滅モデルの提言: 国際ワークショップを企画。

これらの研究計画を推進するための体制を示す(図3)



(図3)

(倫理面への配慮)

本研究は人被験者に関する事項を含んでおり、大阪市立大学、長崎大学、ケニア保健省、カロリンスカ研究所による倫理審査

の対象となる。現地における被験者の研究調査への登録にあたっては、すくなくとも一人の当該被験者・保護者に口頭で研究目的・方法についての詳細な説明を行う。これらの過程を経た後で、被験者・保護者が同意した場合、書面にてインフォームドコンセントを得る。被験者・保護者の同意を得られなかった場合には、その理由を研究記録に記載する。

C . D . 研究結果および考察

マラリア感染率モニタリング :

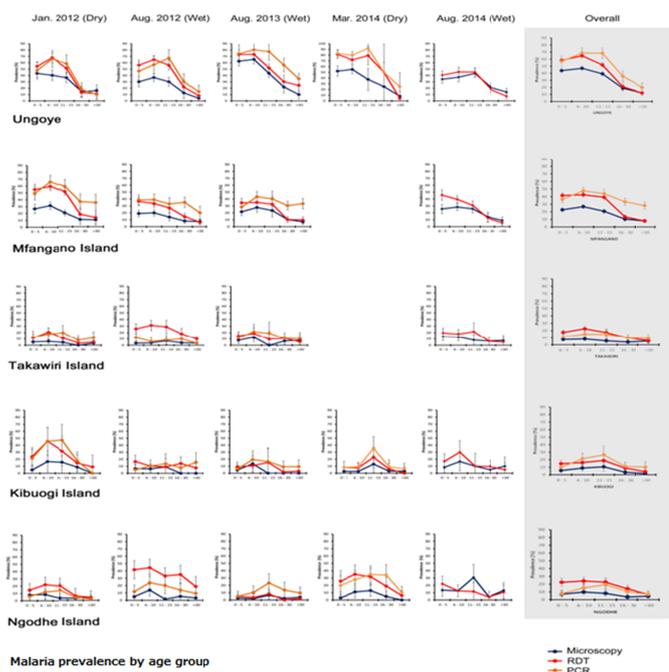
ビクトリア島嶼人口のマラリア感染率

2012 年 1 月以来、5 回にわたって Mbita においてマラリア調査を行った。このうち 4 回の調査は Ngodhe, Kibuogi, Takawiri, Mfangano の 4 島および陸側 Ungoye 村の同様な人口を対象にした。このうち 2014 年 8 月調査のラボにおける PCR 解析は終了していない。1 回の調査で総計約 2500 人全年齢を対象にし、サンプルの約半数が 10 歳以下の小児である。

マラリア原虫検査は、(1) microscopy, (2) RDT, 及び (3) PCR の 3 法で行われた。地域島別、年齢特異的陽性率について次の図に示す

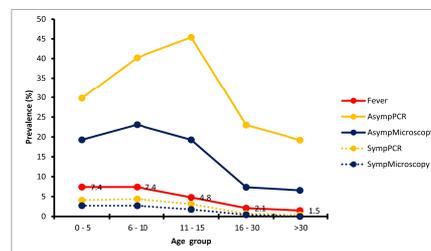
総じて原虫陽性率は Ungoye で最も高く、Takawiri, Kibuogi, Ngodhe の 3 小島では低く、Mfangano では中間であった。Ungoye では陽性率は 10 歳以下小児で高くその後加齢に従って減少していく高度伝播地域に特徴的なパターンが見られたのに対して、Takawiri, Kibuogi, Ngodhe の 3 小島ではこの年齢依存パターンははっきりしなかった。これらのデータは多くの原虫感染が submicroscopic であり、低い原虫カウントの感染者が伝播の継続に重要な役割を担っていることを示唆する (図 4、5)

2014 年 8 月の調査では、現地にて AO 法で見出された高い原虫カウントの熱帯熱マラリア感染者静脈血より原虫培養株の確立が試みられている。さらに 2014 年 2 月調査の Pf-PCR 陽性サンプルについて gametocytes の検出が LSHTM との共同研究で試みられている。



(図 4)

Symptomatic (fever, >37.5C) and asymptomatic malaria infections by age group (S1-S3)



(図 5)

G6PD 欠損症スクリーニング

マラリア撲滅プログラムにおいて、抗三日熱マラリア肝休眠体薬あるいは抗熱帯熱マラリア生殖母体薬としてのプリマキンが見直されている。しかしプリマキン投与がグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 欠損症者において血管内溶血を誘発するリスクが問題となる。G6PD 欠損症者は世界で4億人以上存在し、その地理的分布はマラリア流行地と重なる (マラリア仮説)。現在流行地現場において安全なプリマキン投与のための G6PD 欠損症スクリーニングを可能にする、迅速かつ安価な定量的 point-of-care テストが模索されている。

G6PD Assay Kit-WST (Dojindo)を流行地で実施する際、肉眼観察による誤診のリスク回避しまた女性ヘテロザイゴートにおける中間値判定の問題を解決するために、上記キットに対して簡易型光電比色計とドライバスを用い反応の開始時と終了時の吸光度を測定し、酵素反応量を WST の吸光度変化量として表す事で定量的な結果が得られる事を報告した。しかし、光電比色計の能力不足 (測定可能吸光度 0~2) のために、高濃度域で測定値に連続性が得られず、正常活性集団の分布が歪む可能性があった。そこで測定可能吸光度-0.200~3.000 の光電比色計を導入して再検討した。その結果、男性における陰性・陽性の分離は同等であったが、活性正常域の分布の対称性が改善された。

男性陰性者 (hemizygote) の閾値より推定される女性陰性者数は、予想される女性 homozygote 数より 3 倍ほど多く、女性 heterozygote の一部が関与していることが考えられた。現在これらの生化学的表現型パターンに対して遺伝子解析が進行している (平山研)

熱帯熱マラリア原虫アルテミシニン耐性モニタリング

近年、アルテミシニンに対する耐性原虫の出現・伝播がカンボジアを中心とする東南アジアで報告されていたが、2014年に K13-propeller 遺伝子とその耐性に関連していることが Arieiry らによって報告された。この報告により K13-propeller 遺伝子における点変異 (特に C580Y, R539T 及び Y439H) が *in vitro* での parasite survival rate や *in vivo* での parasite clearance rate に相関すること明らかとなった。私達はケニアのビクトリア湖の島々 (Kibuogi, Ngodhe, Takawiri 及び Mfangano 島) 及び湖畔の集落 (Ungoye) で、マラリアの分子疫学調査を 2012-2013 年にかけて展開しており、同時期に収集したサンプルを retrospective に解析した。この解析では 539 サンプルの K13-propeller 遺伝子の塩基配列を同定することに成功し、4 種類の非同義置換と 5 種類の同義置換を確認することができた。これらの変異は 5 か所の調査地域で共有されるものは認められなかったが、Mfangano 島で認められた A578S 変異は同地域で半年の時間的解離を認める複数のサンプルで確認できた。今後、経時的に K13-propeller 遺伝子のモニタリングを続けることは、今後予定される集団治療が地域原虫集団に与える変化を見極めるうえで重要な課題である。

E . 結論

上記の結果をふまえ、来年度の集団治療による島嶼マラリア撲滅介入研究実施にむけて以下進めていく。

集団治療実施

昨年 9 月に KNH/UON-ERC に提出した MDA 実施のための研究計画に対して 11 月に primaquine の安全性等多くのコメントが寄せられた。それらに基づき改訂した研究計画を 1 月に再提出し既に承認を得た。

MDA 実施の pilot study として ビクトリア湖 Ngodhe 島全住民(700 人)を対象にアルテミシニンとプリマキンによる集団治療をおよび薬剤処理蚊帳配布によりマラリア撲滅が達成できるかをみる feasibility study 実施に向かう予定である。これとは別に中国側 Prof Li から Mfangano 島 (25,000 人)のMDA実施に対して、人的、資金的な全面協力の申し出があった。この拡大MDA 計画の妥当性をケニア側と話し合うため、Prof Li らの広州グループの参加を得て MDA セミナーを 3 月 17-19 日、ナイロビにて MOH と共同で開催し、本干渉研究推進についてケニア側の前向きな対応が得られている。

住民組織の確立

Ngodhe 島での集団治療実施、および community-directed surveillance 確立に必要な住民組織の確立を目指すための準備、住民側と綿密な話し合いを持つ。2015 年 3 月に既にオコデ島においてマイクロスコプコープを設置し community microscopist が住民側より選定されている。現在この人材に対して ICIPE において訓練が進む。



マラリア移入危険性モニター

オコデ島における人の移動とマラリア移入パターンを把握するための調査が 2015 年 3 月に実施され、現在解析が進む(図 6)。これにより MDA 実施後に懸念される他の

地域からのマラリア移入問題に対して具体的な方策を確立したい。

疫学調査

集団治療実施に先立つ 地理的に連なる島嶼および内陸湖岸村住民集団においてマラリア感染に関する寄生虫学、血清学、分子疫学的調査を島嶼地域間比較において継続していく。また熱帯熱マラリア培養株確立を調査と並行して進める(木村)。Pf 生殖母体分布について検討するための濾紙 RNA 採血を試み分子マーカーによる検討を LSHTM と共同で継続する。これまでに実施した疫学調査から得た濾紙採血サンプルにより血清疫学的検討をカロリンスカ研究所で着手する。また G6PD 欠損症の遺伝子型解析を継続する(平山研)。

F . 健康危険情報
なし

G . 研究発表

1. 論文発表

英文論文

- (1) Isozumi, R, Uemura H, Ichinose Y, Logedi J, Omar AH, Kaneko A. Novel Mutations in K13 Propeller Gene of Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum. Emerg Infect Dis, 2015 Mar;21(3):490-2. doi: 10.3201/eid2103.140898.
- (2) Chan CW, Sakihama N, Tachibana S, Lum JK, Tanabe K, Kaneko A. At the crossroads of exchange: Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum gene flow among islands in Vanuatu and implications for malaria elimination strategies. PloS One 2015. Mar 20; 10(3):e0119475. doi: 10.1371/journal.pone.0119475. eCollection 2015.
- (3) Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the

Plasmodium mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. Parasitol Int 2015 Jun;64(3):304-8. doi: 10.1016/j.parint.2014.09.006. Epub 2014 Sep 22.

- (4) Watanabe N, Kaneko A, Yamar S, Leodoro H, Taleo G, Tanihata T, Lum JK, Larson PS. Determinants of the use of insecticide-treated bed nets on islands of pre- and post-malaria elimination: an application of the health belief model in Vanuatu. Malaria Journal 2014 Nov 20;13:441. doi: 10.1186/1475-2875-13-441.

著書

- (5) 金子明、マラリア「midicina」 Vol.5 2 No.4増刊号2015、pp.603-606、医学書院(東京).

2. 学会発表

- (1) Kaneko A., Sustainable malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu, 1991 -2014. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 63rd Annual Meeting. 2nd-6th November 2014. New Orleans(USA).
- (2) 木村 政継、寺本 勲、五十棲 理恵、川本 文彦、金子 明. マラリア迅速診断法としての AO 染色の再評価. 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015 年 3 月 21 日(東京)
- (3) 木俣 勲、木村 正継、五十棲 理恵、Zulkarmain Md Idris、Chim W. Chan、James Kongere、Ahmedeen Omar、金子 明. マラリア撲滅プログラムにおける G6PD 欠損症スクリーニング法改良の試み(2). 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015 年 3 月 21 日(東京)
- (4) 五十棲 理恵、上村 春樹、木俣 勲、木村 政継、一瀬 休生、John Logedi、Ahmeddin H.Omar、金子 明. Novel point mutations were observed in the *Plasmodium falciparum* K13-propeller gene of an artemisinin-resistant candidate in western Kenya. 第 84 回日本寄生虫

学会大会、2015 年 3 月 21 日(東京).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他

本プロジェクトのプロモーションを目的として、短編映画”THE MALARIA FIGHT”を作成した。以下のリンクから供覧できる。
<https://drive.google.com/open?id=0BzwXqXPg29thcU5FTlMzYTN0VFE&authuser=0>