

分担研究報告書

西ケニアにおける *K13-propeller* 遺伝子の多型解析

分担研究者：五十棲 理恵 大阪市立大学

研究要旨

近年、アルテミシ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 Arieley らによって報告された。この報告を受けて私達は西ケニアで熱帯熱マラリア原虫 *K13-propeller* 遺伝子多型解析を行い 4 種の非同義置換と 5 種の同義置換を確認した。

A. 研究目的

本研究の研究代表者が計画するピクトリア湖島嶼マラリア撲滅に向けた集団治療という介入に関連して、対象地域のマラリア原虫の薬剤耐性関連遺伝子の変遷を観察、解析するという目的を有する。ケニアでは 2004 年から Artemisinin-based-combination therapies (ACTs) が熱帯熱マラリアを治療する際、第一選択薬として推奨されている。しかしながら、近年、カンボジアでは ACTs の感受性低下を示す症例が多数報告されており、*K-13 propeller* の遺伝子変異との関連が指摘された (*N Engl J Med* 2009, A.M.Dondorp et al., *Nature* 2014, F. Arieley et al.)。現段階でケニアにおける明らかなアルテミシニン耐性株の分離はなされていないが、今後の出現に備えて、分子疫学的な評価を行う必要があると考える。

B. 研究方法

[研究材料]

- a. 研究フィールド：ケニアのピクトリア湖島嶼及び沿岸 (Ngodhe 島、Kibuogi 島、Takawiri 島、Mfangano 島及び沿岸の村落 Ungoye)
- b. 期間：2012 年 1-2 月、8 月、2013 年 8 月、2014 年 3 月、8 月、以後も年 2 回で行う予定

[方法]

対象地域の住民にマラリア調査を行うことを周知し、参加希望者にはインフォームドコンセントを行い、同意を得て濾紙採血、G6PD Assay Kit-WST 検査を行った。

血液濾紙は後日まとめて DNA 抽出を行った (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN)。加えて、マラリア原虫の有無と種の同定を行うためマラリア原虫 MtDNA の検出を PCR 法で行った。

K13-propeller 遺伝子の多型解析は サンガー法を用いて決定した。
同遺伝子の 440 位以降の塩基配列を

C. 研究結果

Table 1. The prevalence of *Plasmodium falciparum* as determined by PCR and analyzed number of the K-13 propeller gene in Mbita district, Kenya, 2012-2013.

time	place	total , no.	PCR positive, no (%)*	K-13 propeller gene analyzed, no.
February 2012	Kibuogi	130	34 (26.2)	21
	Ngodhe	250	18 (7.2)	5
	Takawiri	250	34 (13.6)	19
	Mfangano	427	202 (47.3)	138
	Ungoye	250	96 (38.4)	69
August 2012	Kibuogi	195	17 (8.7)	10
	Ngodhe	232	36 (15.5)	18
	Takawiri	230	15 (6.5)	9
	Mfangano	706	222 (31.4)	145
	Ungoye	248	104 (41.9)	65
August 2013	Ungoye	250	160 (64)	40

*PCR detected *Plasmodium falciparum* only.

Table 2. Observed mutations in the K-13 propeller gene in *Plasmodium falciparum* from Mbita district, Kenya, 2012-2013.

	amino acid change location	and genetic change	time			
			February 2012 Site (no. isolates)	August 2012 Site (no. isolates)	August 2013 Site (no. isolates)	
Non synonymous mutations	M442V	atg gtg		Mfangano (1)		
	N554S	aat agt	Ungoye (1)			
	A569S	gca tca			Ungoye (1)	
	A578S	gct tct	Mfangano (4)	Mfangano (1)		
	Synonymous mutations	C439C	tgc tgt	Ungoye (2)		
		S477S	tct tcg	Takawiri (1)		
		Y500Y	tat tac		Mfangano (1)	
N531N		aat aac			Ungoye (1)	
	G538G	ggt gga	Mfangano (3)			

D. 考察

近年、アルテミシ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遺伝子はその耐性に関連していることがAriey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ケニアでのアルテミシン耐性株の出現を早期に発見し、対策を講ずるために必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Isozumi, R.; Uemura, H.; Kimata, I.; Ichinose, Y.; Logedi, J.; Omar, A. H.; Kaneko, A., Novel mutations in K13 propeller gene of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Emerg Infect Dis* **2015**, *21*, (3), 490-2.

2. Isozumi, R.; Fukui, M.; Kaneko, A.; Chan, C. W.; 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* **2014**.

2. 学会発表

1. 「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)」

木俣勲、木村 政継、五十棲 理恵、Md Idris Zulkarmain、Chan Chim W、Kongere James、Omar Ahmedeen、金子明。

第84回日本寄生虫学会総会

2. 「Novel point mutations were observed in the *Plasmodium falciparum* K13-propeller gene of an artemisinin-resistant candidate in western Kenya.」

Rie Isozumi, Haruki Uemura, Isao Kimata, Masatsugu Kimura, Yoshio Ichinose, John Logedi, Ahmeddin H. Omar, Akira Kaneko

第84回日本寄生虫学会総会