

様式3

令和2年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年3月4日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関：長崎大学熱帯医学研究所

部局・職名：国際保健学分野・大学院生

氏名：Nundu Sabiti Sabin

1. 研究課題

コンゴ民主共和国の学童児における pfhrp2 欠失マラリアの蔓延状況の把握

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 Nundu Sabiti Sabin	長崎大学熱帯医学研究所・国際保健学分野	大学院生	フィールド調査で取得したデータの整理及びPCRによるHRP2/3の検出
研究分担者 山本太郎	長崎大学熱帯医学研究所・国際保健学分野	教授	個人情報管理 疫学的視点による考察 論文執筆
Richard Culleton	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター分子寄生虫学部門	教授	分子生物学的実験のプロトコル指導 論文執筆

3. 研究成果

別紙のとおり

研究課題名：コンゴ民主共和国の学童児における pfhrp2 欠失マラリアの蔓延状況の把握

研究代表者：

長崎大学熱帯医学研究所・大学院生・Nundu Sabiti Sabin

研究分担者：

長崎大学熱帯医学研究所・教授・山本太郎

愛媛大学分子寄生虫学部門・教授・リチャード・カレトン

1. 研究目的

人に感染するマラリアには熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、四日熱マラリア、卵形マラリア、サルマラリアの 5 種が報告されており、特に熱帯熱マラリアは脳症、腎症、肺水腫などを合併することがあり、重症化しやすいことが知られている。アフリカ中央部に位置するコンゴ民主共和国（DRC）からは世界の熱帯熱マラリア症例全体の 12%が報告されている。マラリアの検査方法には光学顕微鏡によるスミアの鏡検や迅速診断（RDT）キットによる検査、PCR による遺伝学的検査がある。顕微鏡検査では、血液をスライドガラスに塗抹しギムザ染色するだけで標本作製できるため、価格を安く抑えることができ、マラリア検査のゴールドスタンダードとなっている。しかしマラリア原虫の鑑別には技術と知識が必要であるため現地の医療施設においても訓練を受けた技術者が必要となる。一方 RDT キットは手技が簡便であることから、特別な技術を必要としないため、多くの国々の現場で使用されている。さらに PCR は陽性判定の信頼度が最も高い一方で、実施するためには専用機器や高い技術が求められ、コストも高いことから途上国の診療では主に顕微鏡と RDT キットによる検査が主流となっている。

熱帯熱マラリアを検出する RDT キットでは、熱帯熱マラリアのみが持つ HRP2 タンパクを検出するための抗体による抗原抗体反応を機序としている。しかし、このタンパク発現をコードしている pfhrp2 遺伝子の一部が欠失していると、熱帯熱マラリアに感染していても RDT キットで検出できず、正確な診断や疫学的データの蓄積が困難にする。そこで本研究では、通学によるマラリア拡散リス

クを抱える小児マラリアの pfhrp2 / 3 の欠失状況を、顕微鏡・RDT・PCR によって疫学的に明らかにすることを目的とした。

2. 研究内容

本研究で用いているデータ及びサンプルは、コンゴ民主共和国の首都キンシャサで 2019 年 10 月から 11 月にかけて実施されたフィールド調査で収集されたものである。キンシャサは 35 の保健区からなり、本研究では都市部のセレンバオ保健区及び地方のモンガフラ保健区を対象としている。それぞれの保健区から小学校と医療機関を指定し、通学もしくは通院している 6-14 歳の小児を対象としてマラリア感染に関わるフィールド調査を実施した。対象児の年齢や身長・体重などの基本的な身体情報に加え、過去 2 週間における 37.5°C 以上の発熱既往や抗マラリア薬の摂取歴を調査した。さらに指先からランセットで微量採血をし、スメアの作成、RDT キットによる迅速診断、濾紙 (Whatman 903™) への滴下及び乾燥保存を行った。

濾紙血から DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、人に感染するマラリアに共通の遺伝子領域である *cox3* を PCR を用いて検出したところ、634 名 (207 名 : 症候性、427 名 : 無症候性) がマラリア陽性となった。本研究では、このマラリア陽性となったサンプルを用いて HRP2 及び HRP3 遺伝子の欠失状況を明らかにする目的で同遺伝子領域の DNA 検出を実施している。

本研究課題はキンシャサ大学及び長崎大学熱帯医学研究所の両倫理委員会において承認されている (承認番号 : ESP/CE/042/2019、190110208-2)。また、個別の同意取得に際してはフランス語もしくは現地語のリンガラによる研究内容の説明を保護者に行い、その上で研究参加への承諾を得ている。

(参考文献) Jonathan B. Parr, Olivia Anderson, Jonathan J. Juliano and Steven R. Meshnick. Streamlined, PCR-based testing for pfhrp2-and pfhrp3-negative *Plasmodium falciparum*. *Malar J* (2018) 17:137

研究成果

微量血液から抽出した DNA を用いて標的遺伝子の検出を行うため、SYBR GREEN (LightCycler® 480 SYBR Green I Master) によるリアルタイム PCR を用いる

ことを検討した。リアルタイム PCR による HRP2 及び HRP3 遺伝子の検出を行う上でも検出限界が存在するため、まず熱帯熱マラリアの LDH 遺伝子 *pfl*dh の定量リアルタイム PCR を測定機器 LightCycler480 で行った。検量線を取得するために HRP2 陽性のマラリア株 3D7 の DNA による希釈系列 (0.1ng/ μ l、0.01ng/ μ l、0.001ng/ μ l、0.0001 ng/ μ l) を作成し PCR を行った。続いて DRC のマラリア陽性サンプルを用いてリアルタイム PCR を行ったところ、221 サンプルが 0.001ng/ μ l の検出限界を超えたため、この 221 サンプルを HRP2 及び HRP3 遺伝子の検出を行う対象とした。これにより、HRP2 遺伝子が検出されなかったサンプルは DNA 量の不足ではなく HRP2 欠失と認識することができる。HRP2 遺伝子を検出するリアルタイム PCR でも同様に 3D7 による希釈系列で検量線を作成し、HRP2 遺伝子を標的としたプライマーで DRC サンプルのリアルタイム PCR を行ったところ、すべてのサンプルで陽性となった。現在、HRP3 でも同様に検量線を作成しており、その後 DRC サンプルからの HRP3 遺伝子の検出を進めていく。

成果発表

現在、症候性及び無症候性の小児マラリアに関する疫学的な調査結果をまとめた論文の投稿準備中であり、また DRC 国内の小児マラリアにおける HRP2 及び HRP3 欠失に関する疫学的調査結果も PCR 実験が終了し次第、投稿準備に入る予定である。

今後の課題

本研究では RDT キットを用いたマラリア検査の偽陰性の影響を、HRP2 及び HRP3 遺伝子の欠失を観察することで評価することを試みている。しかし実際にはキットの抗体が結合する HRP2 タンパクのエピトープを構成する部位の配列変異も RDT 偽陰性を引き起こす可能性がある。つまり、HRP2 遺伝子が完全に欠失していなくとも、配列の変異により RDT 偽陰性が生じる可能性がある。そこで今後は、HRP2 遺伝子領域、特に Exon2 領域のシーケンスを行い、より詳細に RDT 偽陰性が生じている可能性を探っていく。