

平成 28 年度 委託 研究 開発 成果 報告 書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)
(英語) International Collaborative Research Program
Science and Technology Research Partnership for Sustainable
Development (SATREPS)

研究開発課題名：(日本語) ラオス国のマラリア及び重要寄生虫症の流行拡散制御に向けた遺伝疫学による
革新的技術開発研究
(英語) Development of Innovative Research Technique in Genetic Epidemiology of
Malaria and Other Parasitic Diseases in Lao PDR for Containment of Their
Expanding Endemicity

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人国立国際医療研究センター 研究所 熱帯医学・マラリア研
究部 部長 狩野 繁之

所属 役職 氏名：(英語) National Center for Global Health and Medicine, Research Institute, Department
of Tropical Medicine and Malaria, Director, Shigeyuki Kano

実施期間：平成 25 年 5 月 20 日～平成 31 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 分担研究を置かないため、上記と同じ

開発課題名：(英語) ditto

研究開発分担者 (日本語) 分担者を置かないため、上記と同じ

所属 役職 氏名：(英語) ditto

成果の概要(総括研究報告)

和文

1) マラリア研究

三日熱マラリアの根治には抗マラリア薬プリマキンの内服が必要である。しかし生まれつき G6PD と呼ばれる酵素活性が低い者(G6PD 欠損症)は、プリマキンの内服により急性溶血性貧血を起こす危険性があるため、プリマキンの処方難しい。ラオス国民における G6PD 欠損症の割合は不明であるため、民族ごとに G6PD 欠損症に関する調査が必要である。平成 28 年 2 月、チャンパサック県(コーン郡、ムラパモック郡、パトゥンポン郡それぞれ 2

村、合計6村)で690人(男332人、女358人)の住民から採血し、Dojindoのキットおよび分光光度計 NanoDrop を用いた G6PD 酵素活性の検査を行ったところ、65名(9.4%)に欠損が認められた。この65名の血液検体から DNA を抽出し G6PD 遺伝子のエクソン9領域を解析した結果、25検体(3.6%)にピエンチャン型と呼ばれる変異が観察され、17検体(2.5%)にピエンチャン型と野生型のヘテロが観察された。G6PD 遺伝子は X 染色体(性染色体)にコードされており、女性は X 染色体を2本もっているためヘテロになる場合がある(詳細な村落別、性別なデータは、現在論文化して発表準備中)。なお、本調査にあたっては、改めて NIOPH のラオス倫理委員会に研究審査を依頼し、承認が得られた後に行った。また、参加住民すべてからはインフォームドコンセント(ラオス語)を書面で得ている。

一方、マラリア検査の結果、694名中、19名(2.7%)の顕微鏡検査陽性者を検出した。マラリア迅速診断テストで30名(4.3%)陽性、Real-time PCR 法による遺伝子診断で85名(12.0%)陽性であった。無症候性キャリアーの問題が再認識された。

アルテミシニン耐性に関する論文の成果としては、世界パスツール研究所ネットワークの研究プロジェクト「K13 Artemisinin Resistance Multicenter Assessment consortium (KARMA)」と共同研究を行うことができ、SATREPS プロジェクトで得たラオスの熱帯熱マラリア原虫のアルテミシニン耐性責任遺伝子(K13 propeller gene)の変異の分布を示すと共に、下記論文として世界での同変異の拡散に関する報告を纏めることに貢献した。

Didier Ménard, et al.: A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* Artemisinin Resistance. New England Journal of Medicine (Impact factor: 59.558), 2016, 347:2453-2464. (注) Kano S の所属には“SATREPS project for Parasitic Diseases”と、また Acknowledgements の Financial support for sample collection においても“JST/AMED/JICA, SATREPS”と書き込んだ。

2) メコン住血吸虫症／タイ肝吸虫症

平成28年4月、チャンパサック県コーン郡コーン島(Don Khon)で、メコン住血吸虫症とタイ肝吸虫症の調査を行い、村人274名から糞便検体を採取し顕微鏡検査を行った。その結果、173名(63.1%)の村人がタイ肝吸虫陽性であった。

一方 LAMP 法を用いたメコン住血吸虫の分布モニタリングを、住民の糞便サンプルと中間宿主貝サンプルの両方向から検討した。糞便サンプルは島内の3つの村で100人／村程度で回収を行った。また、中間宿主貝である *Neotricular aperta* は、島の北部で採取を行った。貝は6地点で採取し、合計で3,115個になった。これを地点ごと200個以下になるようにチューブに入れ、まとめて熱アルカリ法にて DNA 抽出を行い解析した。貝サンプルを用いた LAMP 法の結果、6箇所内の3箇所で陽性の場所が見つかった。特に陽性の3箇所は近接していた場所であり、住民が洗濯、水浴びを行う場所であった。一方で、500mg の糞便サンプルを用いて同様に熱アルカリ法にて DNA 抽出を行った。それぞれの糞便サンプルは、3つの村3で回収し、Kato-Katz (KK) 法と LAMP 法により比較検討を行った。結果、KK 法では、それぞれの村で0/96、1/89、0/87の陽性者を検出する結果であったのに対し、LAMP 法では、それぞれ4/96、3/89、1/87の陽性者を検出した。島全体の結果としては、KK 法では、0.4%、LAMP 法では、2.9%の検出率であった。これらの結果から、LAMP 法は従来法である KK 法に比べて、高感度であることが示された。

また、陽性者の居住地を地図にプロットすると、陽性貝の検出された場所に近接していることが示された。一方で、貝の採取を行っていない場所でも陽性者の居住地が発見されたことから、陽性者の近隣での貝の生息調査の必要性が考えられた。以上の結果をまとめると、LAMP 法を用いた糞便、および、貝からの DNA 検出は、メコン住血吸虫感染のリスクマップ作成において有効なツールになると考えられた。

1) Malaria

To prevent relapse from *Plasmodium vivax* malaria, to control its spread, and also to achieve malaria elimination in Lao PDR, primaquine is necessary. In order to ensure a safe therapy, the G6PD status of the patient needs to be clarified first. This is a cross-sectional study to determine the prevalence of G6PD deficiency among the population in Champasak. We selected three districts with the highest number of reported malaria cases in the first half of 2015 in Champasak. The three districts were Khong, Mounlapamok, and Pathoumpone. In each district, we requested the district health officers to select two villages with the highest number of malaria cases. In total, we collected blood sample from 690 villagers.

We measured the G6PD enzyme activity through the semiquantitative test using G6PD Assay Kit-WST Lyophilized (DOJINDO Laboratories, Japan). Sixty-one blood samples with less than 60.0% of the enzyme activity were selected for further genetic analysis. All 13 exons of the G6PD gene were sequenced to determine the G6PD variant. So far, we have sequenced exon 9 and found 42 villagers to have the G6PD Viangchan variant (871G>A). No mutations were detected in exon 12 and exon 13. All other exons are currently being sequenced.

To avoid complications such as acute hemolytic anemia, the G6PD status of a villager must be known first before prescribing primaquine. The findings from this study would contribute to the decision making on primaquine prescription among healthcare providers in this area in the future.

On the other hand, 19 out of 694 (2.7%) were microscopically positive, but rapid diagnostic tests (RDTs) detected 30 (4.3%) positive results. To our surprise, Real-time PCR method revealed as much as 85 samples to be DNA positive (12.0%) which suggested that asymptomatic parasite carriers should be the target population for the elimination of malaria in Lao PDR.

Output of the study on the distribution of K13 propeller gene mutation which means how widely the artemisinin resistance prevails in the area could be successfully reported in the following paper: Didier Ménard, et al. A worldwide map of *Plasmodium falciparum* artemisinin resistance. New England Journal of Medicine (Impact factor: 59.558), 2016, 347:2453-2464. This is a collaborative paper within the Institut Pasteur International Network, K13 Artemisinin Resistance Multicenter Assessment (KARMA) consortium.

2) *Opisthorchis viverrini* and *Schistosoma mekongi* infections

We compared the LAMP method with conventional Kato-Katz (KK) method using the stool samples from people living in the highly endemic area of *Opisthorchis viverrini*, Mounlapamok district. Total of 119 stool samples were investigated. The 500mg stool samples were picked up, and the heat-alkaline DNA extraction method was applied. The extracted DNA solution was diluted with distilled water, and directly applied to the LAMP method. The KK method showed 76.5% prevalent rate of *O. viverrini*, though the LAMP method showed only 47.6%. The sensitivity of the LAMP against the KK method was 61.5%. This may be because the conventional method may include the other intestinal trematode (e.g. *Haplorchis taichui*) but not exactly *O. viverrini*. We need to further clarify this issue.

We also applied the LAMP method to schistosomiasis mekongi for the infected snail survey in Khon island and for stool examination from people living in the same area. In Don Khon, the intermediate snails (*Neotricula aperta*) were collected at the east river side, and maximum 200 snails were used for DNA extraction together, and were directly applied to the LAMP method. Positive snails infected with *S. mekongi* were more than 0.5% at any of the 3 collection points. The stool samples in the same areas are currently analyzed using the LAMP method. So far, it

is obvious that the LAMP method is useful for a large-scale screening of the snails infected with *S. mekongi* in order to detect the risk areas of the infection.

II. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0 件、国際誌 3 件)

1. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, Rahim-Awab G, Barnadas C, Berry A, Boum Y, Bustos MD, Cao J, Chen JH, Collet L, Cui L, Thakur GD, Dieye A, Djallé D, Dorkenoo MA, Eboumbou-Moukoko CE, Espino FE, Fandeur T, Ferreira-da-Cruz MF, Fola AA, Fuehrer HP, Hassan AM, Herrera S, Hongvanthong B, Houzé S, Ibrahim ML, Jahirul-Karim M, Jiang L, Kano S, Ali-Khan W, Khanthavong M, Kreamsner PG, Lacerda M, Leang R, Leelawong M, Li M, Lin K, Mazarati JB, Ménard S, Morlais I, Muhindo-Mavoko H, Musset L, Na-Bangchang K, Nambozi M, Niaré K, Noedl H, Ouédraogo JB, Pillai DR, Pradines B, Quang-Phuc B, Ramharter M, Randrianarivelosia M, Sattabongkot J, Sheikh-Omar A, Silué KD, Sirima SB, Sutherland C, Syafruddin D, Tahar R, Tang LH, Touré OA, Tshibangu-wa-Tshibangu P, Vigan-Womas I, Warsame M, Wini L, Zakeri S, Kim S, Eam R, Berne L, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, Legrand E, Barale JC, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock DA, Rogier C, Ringwald P, Ariey F, Mercereau-Puijalon O; KARMA Consortium: A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. **N Engl J Med**, 2016, 374(25): 2453-2464 (注) Iwagami Mと Paul T. Breyも、KARMA Consortium の Contributors に名を連ねた。
2. Akiyama T, Pongvongsa T, Phrommala S, Taniguchi T, Inamine Y, Takeuchi R, Watanabe T, Nishimoto F, Moji M, Kano S, Watanabe H, Kobayashi J: Asymptomatic malaria, growth status, and anaemia among children in Lao People's Democratic Republic: a cross-sectional study. **Malar J**, 2016, 15:499
3. Pongvongsa T, Nonaka D, Iwagami M, Nakatsu M, Phongmany P, Nishimoto F, Kobayashi J, Hongvanthong B, Brey PT, Moji K, Mita T, Kano S: Household clustering of asymptomatic malaria infections in Xepon district, Savannakhet province, Lao PDR. **Malar J**, 2016, 15:508

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

ラオス国内開催

The 10th National Health Research Forum (NHRF), Don Savan Hotel, Savannakhet province, Lao PDR, 2016.10.27-28.

1. Lorphachan L, Soundala P, Keomalaphet S, Khattingavong P, Sengphimthong S, Iwagami M, Hongvanthong B, Brey PT, Kano S. Training course in Malaria and Parasitic Diseases Diagnosis at five southern provinces in the Lao PDR. (口頭)
2. Keomalaphet S, Khattignavong P, Soundala P, Lorphachan L, Xangsayalath P, Iwagami M, Hongvanthong B, Brey PT, Kano S. Malaria Epidemiology in five southern provinces: Savannakhet, Saravane, Sekong, Champasak and Attapeu in the Lao PDR in 2015. (口頭)
3. Ong KIC, Iwagami M, Lorphachane L, Soundala P, Xangsayarath P, Hongvanthong B, Brey PT, Kano S, Jimba M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among people in malaria endemic areas in Champasak Province, Lao PDR. (口頭)
4. Araki H, Ong KIC, Lorphachane L, Soundala P, Iwagami M, Hongvanthong B, Brey PT, Kano S, Jimba M. Factors associated with *Opisthorchis viverrini* infection among children in an endemic area in

Khammouane province, Lao PDR. (口頭)

5. Kumagai T, Iwagami M, Yamabe M, Keomalaphet S, Khattignavong P, Lorphacan L, Soundala P, Hongvanthong B, Ohta N, Brey PT, Kano S. The application of the LAMP method to *Opisthorchis viverrini* and *Schistosoma mekongi* infections in Champasak Province, southern Lao PDR. (口頭)
6. Pongvongsa T, Nonaka D, Iwagami M, Xangsayarath P, Nishimoto F, Khattignavong P, Soundala P, Lorphacan L, Hongvanthong B, Brey PT, Kano S, Kobayashi J. Malaria among foreign migrant workers in Savannakhet Province, Lao PDR. (口頭)

国際学会

1. Iwagami M, Khattignavong P, Soundala P, Lorphachan L, Keomalaphet S, Xangsayarath P, Hongvanthong B, Brey PT, Kano S. Current Malaria Situation in five southern provinces, Lao PDR—A study by the SATREPS Project. **Joint International Tropical Medicine Meeting 2016**, Bangkok, Thailand, 2016.12.7-9. (ポスター)

日本国内学会

1. 狩野繁之: 熱帯医学の視座から:マラリア研究の必要性和重要性、**第1回国際臨床医学会学術集会**、日本橋ライフサイエンスハブ、東京、2016.12.17. (口頭)
2. 熊谷貴、石上盛敏、山邊将史、Sengdeuane Keomalaphet、Phonepadith Khattignavong、Lavy Lorphacan、Pheovaly Soundala、Bouasy Hongvanthong、太田伸生、Paul T. Brey、狩野繁之. ラオス国チャンパサック県における LAMP 法を利用したメコン住血吸虫感染マップ作成について、**第10回蠕虫研究会**、ハートピア熱海、静岡、2016.11.18-19. (口頭)

(3)「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(国内)

1. 当該研究部への大学生／高校生／中学生の職場訪問(進路学習指導等)での学生との対話
本 SATREPS プロジェクトの展開の様子を紹介し、国際的な視野に立つ医療協力への将来への憧れを喚起した。
 - 1) 渋谷教育学園渋谷中学高等学校見学(2016年5月13日)
 - 2) 愛知県高浜市立南中学校(2016年6月2日)
 - 3) 筑波大学医学類4年生の実習(2016年6月24日)
 - 4) 茨城県立下館第一高等学校(2016年10月6日)
 - 5) 帯広三条高校(2016年10月13日)
 - 6) 松江東高校(2016年10月13日)
 - 7) 桐生女子校(2016年10月20日)
 - 8) 太田女子校(2016年11月2日)
2. 狩野繁之: グローバル化する熱帯感染症の撲滅に向けて。ゲストスピーチ、YMCA 東京クラブ4月例会、東京 YMCA 東陽町センター視聴覚室、東京、2016.4.12
3. 狩野繁之: NCGM 研究所のグローバルな取り組み(ポスター展示)、国立国際医療研究センター病院内 オープンスペース、2016.5.12-16
4. 狩野繁之: ラオス感染症研究拠点研究 SATREPS(JICA/AMED)プロジェクト、研究所国際感染症部門セ

ミナー、NCGM 病院新外来棟1階集団指導室、2016.5.31.

5. 狩野繁之:外務省医務官マラリア研修、国立国際医療センター研究所、2016.7.5/8.12/9.2.
6. 狩野繁之:世界のマラリアの現況。Malaria No More & Malaria No More Japan 主催セミナー。東京會館オリオンルーム・世界貿易センタービル 39 階、浜松町、東京、2016.10.18.
7. 狩野繁之:マラリアの制圧に向けての世界の動き。山口大学中高温微生物研究センター・シンポジウム「熱帯感染症の制圧に向けて」、山口大学大学会館大ホール、山口市、2016.11.25.
8. 本研究成果を NCGM 研究所熱帯医学・マラリア研究部の HP で紹介して一般に情報提供している。
(http://www.rincgm.jp/individual/lab01/whats_new1.html)
9. JICA の HP「ODA 見える化サイト」へ協力現場の写真掲載(10枚の写真とキャプションで説明)
(国外)
10. ラオス国立パスツール研究所の HP で紹介して、広く世界に情報発信している。
(<http://www.pasteur.la/lao-japan-lab-parasitology-2016-2017/>)

(4)特許出願 なし