

課題番号	LS057
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	マラリア原虫人工染色体を用いた革新的耐性遺伝子同定法の確立と応用
研究機関・ 部局・職名	三重大学医学研究科・准教授
氏名	岩永 史朗

1. 当該年度の研究目的

本プロジェクトでは熱帯熱マラリア原虫人工染色体を用い、薬剤耐性原虫由来遺伝子ライブラリーを直接、原虫内に構築し、これをスクリーニングすることにより迅速且つ正確に薬剤耐性遺伝子を同定することを目指している。H25年度は昨年度構築したクロロキン耐性原虫由来の遺伝子ライブラリーをクロロキンでスクリーニングし、耐性遺伝子の同定を試みる。またタイ・ミャンマー国境地域に設置したフィールドサイトより採取した患者血液由来の原虫に対し、各種抗マラリア薬(クロロキン・メフロキン・デハイドロアルテミシニン)に対する耐性を調べ、昨年度に引き続き、耐性原虫の分離・株化を行う。

2. 研究の実施状況

①クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫由来遺伝子ライブラリーからの耐性遺伝子の同定  
 昨年度までにクロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫(Dd2株)より平均インサート長16.0kb、原虫ゲノムの被覆度1.28~1.60の遺伝子ライブラリーを構築済みである。そこで次に蛍光プローブ(SYBR green)を使用した薬剤耐性検出法により野生型原虫(3D7株)のクロロキンに対するIC<sub>50</sub>(9.2 nM)及びIC<sub>90</sub>(33.0 nM)を決定し、これを指標として最適スクリーニング条件の設定を行い、ライブラリーからの耐性遺伝子同定を試みた。具体的には原虫寄生率0.1%のライブラリーを出発材料とし20 nMクロロキン存在下、3~6日間の培養を3回繰り返して原虫を選択した。スクリーニングの結果、第7番染色体由来の11.8 kb及び24.9 kbのDNA断片を含む人工染色体が導入された2種の原虫が得られた。両DNA断片には既知のクロロキン耐性遺伝子であるChloroquine-resistance transporter(CRT)遺伝子が存在し、我々の耐性遺伝子同定法の実現性・実用性が証明された。また、選択された原虫は親株であるDd2株よりもクロロキン耐性度が低く、CRT遺伝子以外の耐性遺伝子の存在が示唆された。

②タイ・ミャンマー国境地域患者由来薬剤耐性原虫株の分離  
 タイ・ミャンマー国境地域(Mae Sariang)に設置したフィールドサイトよりこれまでに総計209株の安定培養株を樹立し、さらにこれらの中からクロロキン・ピリメサミン・メフロキン耐性原虫を合計66株樹立した。更に詳細にクロロキン耐性を調べた結果、前述のDd2株よりも約3倍のIC<sub>50</sub>を示す強耐性株を4株得た。また同定した66株の薬剤耐性原虫について、デハイドロアルテミシニン(アルテミシニン誘導体)耐性についても調べたが、顕著な耐性を示す原虫は存在しなかった。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

雑誌論文 計0件	(掲載済み一査読有り) 計0件 無し。 (掲載済み一査読無し) 計0件 無し。 (未掲載) 計0件 無し。
会議発表 計1件	専門家向け 計0件 無し。 一般向け 計1件 1. 帯広畜産大学大学院連携セミナー(招待講演), 岩永史朗, マラリア原虫人工染色体の開発と応用, 2013年9月11日
図書 計0件	無し
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件
Webページ (URL)	<a href="http://www.medic.mie-u.ac.jp/idoubutsu/">http://www.medic.mie-u.ac.jp/idoubutsu/</a> (三重大学・医学部・医動物) <a href="http://jikei-tropmed.jp/nextindex.html">http://jikei-tropmed.jp/nextindex.html</a> (最先端次世代寄生虫系採択者共同ホームページ)
国民との科学・技術対話の実施状況	東京慈恵会医科大学・公開講義実習:2013年9月13日, 東京慈恵会医科大学において東京学芸大学高校生(20名程度)を対象とし、寄生虫系3課題採択者(岩永史朗・嘉糠洋陸・西川義文)によってそれぞれの専門領域に関する講義・実習を実施し、採択者らの研究の紹介と質疑応答を行った。
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	無し
その他	無し

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	126,000,000	75,640,000	50,360,000	0	0
間接経費	37,800,000	22,692,000	15,108,000	0	0
合計	163,800,000	98,332,000	65,468,000	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	5,370,771	50,360,000	0	55,730,771	55,730,771	0	0
間接経費	1,611,232	15,108,000	0	16,719,232	16,719,232	0	0
合計	6,982,003	65,468,000	0	72,450,003	72,450,003	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	33,937,372	CO2インキュベーター、極微量分光光度計
旅費	264,730	研究打ち合わせ、学会出席
謝金・人件費等	12,285,850	技術補佐員人件費
その他	9,242,819	動物実験施設利用料、遺伝子実験施設利用料
直接経費計	55,730,771	
間接経費計	16,719,232	
合計	72,450,003	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
極微量分光光度計	NanoDrop2000	1	1,617,000	1,617,000	2013/4/9	三重大学
サーマルサイクラー	AppliedBiosystem sVeriti 60-Well	1	823,200	823,200	2013/8/8	三重大学
薬用冷蔵ショー ケース	FMS-702G	1	695,100	695,100	2013/11/27	三重大学
サーマルサイク ラー	3×32-Well	1	1,134,000	1,134,000	2013/12/4	三重大学
電子計算機	Precision T7610 CTO	1	617,057	617,057	2013/12/27	三重大学
CO2インキュベ ーター	3130	1	1,176,000	1,176,000	2014/3/27	三重大学