
薬剤圧変遷に伴うクロロキン熱帯熱マラリア
原虫選択淘汰の集団遺伝学的検討

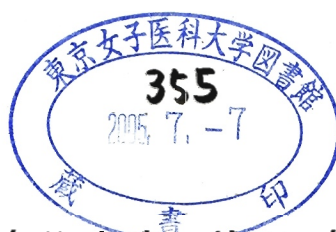
Population genetic analysis of the negative selection of
chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* parasites in the
absence of antimalarial pressure

課題番号 15590375

平成15, 16年度

科学研究費補助金 基盤(C)(2) 研究成果報告書

平成17年3月



研究代表者 美田 敏宏

(東京女子医科大学医学部・助手)

Toshihiro Mita, M.D., Ph.D.

Tokyo Women's Medical University



Population genetic analysis of the negative selection of chloroquine resistant Plasmodium falciparum parasites in the absence of antimalarial pressure

RESEARCH INSTITUTION: Tokyo Women's Medical University
CATEGORY: Scientific Research (C) (2)
TERM OF PROJECT: 2003-04 year
PROJECT NUMBER: 15590375

● **研究課題：**

**薬剤圧変遷に伴うクロロキン熱帯熱
マラリア原虫選択淘汰の集団遺伝学的検討**

課題番号 15590375

平成15、16年度

科学研究費補助金 基盤(C)(2) 研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 美田 敏宏

(東京女子医科大学医学部・助手)

Toshihiro Mita, M.D., Ph.D.

Tokyo Women's Medical University

平成15, 16年度

科学研究費補助金 基盤 (C) (2)

研究成果報告書

東京女子医科大学 国際環境・熱帯医学 美田 敏宏

● 研究課題：薬剤圧変遷に伴うクロロキン熱帯熱マラリア

原虫選択淘汰の集団遺伝学的検討

・ はしがき	1
・ 研究組織	4
・ 研究経費	4
・ 研究発表リスト	
(1) 原著論文	5
(2) 口頭発表	6
(3) 出版物	6
・ 研究成果要約	
(1) 研究目的	7
(2) 研究成果	9
・ 研究成果資料	11

International Affairs and Tropical Medicine
Tokyo Women's Medical University

はしがき

現在日本国内でマラリアに感染することはない。

かつて沖縄をはじめとして、ほぼ日本全域に存在していたマラリアは、都市化の進行とともに国内から完全に姿を消した。しかし、世界に目を転ずれば、この日本では忘れ去られた感染症は今でも多くの地域で猛威をふるっている。

グローバルゼーションという観点からマラリアを考えると、ヒトあるいは蚊によってマラリア原虫が非流行地へ持ち込まれることは避けられない事態となっている。地球温暖化により、媒介蚊であるハマダラカあるいはマラリア原虫の生存にとって有利な環境の拡大が懸念されている現在、マラリア流行は熱帯地域のみならず世界的に重要な公衆衛生学的問題と言えよう。

一方、マラリア感染を「診断」「治療」といった臨床家の目のみで見ると、「診断・治療のしやすい疾患」となる。感染症としては非特異的な症状を呈するものの、多くはギムザ染色あるいは原虫特異抗原を認識する各種診断キットにより、迅速な原虫の存在診断が可能であり、早期診断がなされれば、抗マラリア薬による治療が可能である。

しかし、医療インフラの整備されていない多くの流行地においては、この診断・治療の容易性が「薬剤耐性マラリア原虫の蔓延・拡散」という重大な公衆衛生学的問題を引き起こしている。途上国に住む多くの感染患者は医師の診察を受けることなく、抗マラリア薬の投薬を受ける。不適切・不十分・不必要な抗マラリア薬の服用は耐性原虫の選択にとって有利な環境を創出する。抗マラリア薬として歴史の長いクロロキン、ファンシダールは

ともに安価であり、医療経済の観点から見れば経済発展の不十分な流行国において有用な薬剤である。しかし、クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫の蔓延、拡散は多くの流行地に及び、単独投与が治療に有効な地域はごく一部に限られている。ファンシダール耐性も進行しており、東南アジアにおいては、すでに治療薬としての意義を失っていると言えよう。アフリカにおいても耐性原虫の増加が深刻化しはじめており、アルテスネート、アモディアキンを中心とした併用療法を採用しはじめている国もみられる。

一方、クロロキンの完全な休薬がその感受性回復をもたらす可能性について示唆されている。2001年、我々のグループは、クロロキン耐性原虫の増加により、その使用を完全に中止したマラウイにおいて著明なクロロキンの *in vivo* および *in vitro* 感受性回復が見られたことを報告した (Trop Med Int Health. 2001;6:429-34)。この事象は、流行地における対策レベルで薬剤耐性を考えた場合、「新たな抗マラリア薬の導入」に加え、「耐性のある治療薬の完全休止による感受性回復」というもう一つの戦略が将来的に有用である可能性を示唆している。

選択と淘汰は進化の基本原則である。本研究において、我々はフィールドから得られた「完全休薬における感受性の回復」という事象について3つの角度から科学的アプローチを試みた。まず、クロロキン耐性関連遺伝子 *pfert* および原虫多剤薬剤耐性関連遺伝子 *pfmdr1* の役割および相互関連についての探求を行った。さらに、選択因子(薬剤)と、これら薬剤耐性関連遺伝子の淘汰・選択の関連を分子疫学的手法を用いて考察した。また、*in vitro* 耐性レベルと遺伝子変異の関連が明らかにされているファンシダール耐性において、原虫耐性に関わる遺伝子変異の獲得は頻繁に起こるのか、それとも起こりにくい現象なのか、「耐性原虫の出現・拡散」の本質的な疑問について検討を行った。

種々の抗マラリア薬に対する耐性能獲得メカニズムは徐々に明らかにされているが、機序の完全解明にはほど遠い。マイクロレベルでのエビデンスが不十分な現状において、

マクロ的視点であるフィールド研究から得られた公衆学的事象に対し、純粋な科学的アプローチをすることは至難の業と言わざるを得ない。その点では、我々が導き出した成果は、たとえ統計学的有意差が明らかであっても真実ではない可能性がある。マラリアを支える疫学的因子は流行地によって異なる。本研究の成果が多くの流行地において検討・実証され、究極的には流行地における対策戦略構築に貢献することを期待している。

平成17年3月

研究代表者

東京女子医科大学医学部・助手

美田 敏宏

International Affairs and Tropical Medicine

Tokyo Women's Medical University

研究 組織

◎研究代表者： 美田 敏宏 東京女子医科大学・医学部・助手

研究分担者： 金子 明 東京女子医科大学・医学部・助教授

(平成15年度)

研究分担者： 塚原 高広 東京女子医科大学・医学部・助手

(平成16年度)

研究協力者： Jeffery Kojiro Lum Binghamton 大学・助教授

研究 経費

交付決定額 (配分額)

(金額単位： 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,900	0	1,900
平成16年度	1,700	0	1,700
総計	3,600	0	3,600

研究 発表

(1) 原著論文

1. Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, Tsukahara T, Tanabe K, Kobayakawa T, Bjorkman A. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Apr;68:413-5.
2. Bwijo B, Kaneko A, Takechi M, Zungu IL, Moriyama Y, Lum JK, Tsukahara T, Mita T, Takahashi N, Bergqvist Y, Bjorkman A, Kobayakawa T. High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop.* 2003 Mar;85:363-73.
3. Mita T, Akira K, Lum JK, Zungu IL, Tsukahara T, Eto H, Kobayakawa T, Bjorkman A, Tanabe K. Expansion of wild type allele rather than back mutation in *pfert* explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;135:159-63.
4. Mita T, Masta A, Hwaihwanje I, Lum JK, Takahashi N, Osawa H, Tsukahara T, Kaneko A, Kobayakawa T, Björkman A, Hombhanje FW. Role of *pfmdr1* mutations of chloroquine resistant *pfert* K76T *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Int J Parasitol.* In submission.
5. Mita T, Hwaihwanje I, Tsukahara T, Hombhanje FW, Lum JK, Kobayakawa T, Tanabe K, Bjorkman A, Kaneko A. Rapid selection of mutant *dhfr* alleles in *P. falciparum* after introduction of sulfadoxine/pyrimethamine in combination with 4-aminoquinolines in Papua New Guinea. In manuscript.

(2) 口頭発表・ポスター

1. 美田 敏宏, 金子 明, 小早川 隆敏.
「マラウイにおけるクロロキン投与中止が熱帯熱マラリア原虫集団に及ぼした影響」
第3回分子予防環境医学研究会、東京（平成15年 12月）
2. 美田 敏宏, 金子 明, 小早川 隆敏, 田辺 和祐
「マラウイ熱帯熱マラリア原虫集団における *pfprt*-K76T 変異減少メカニズム」
平成15年度日米医学協力寄生虫専門部会国内会議、東京（平成16年 1月）
3. *美田 敏宏, 塚原 高広, 金子 明, 小早川 隆敏.
「マラウイにおける治療政策変更による chloroquine 使用中止が熱帯熱マラリア原虫集団に与えた影響」
第101回日本内科学会、東京（平成16年 4月）
4. 美田 敏宏, 金子 明, 塚原 高広, 江藤 秀顕, 小早川 隆敏, 田辺 和祐
「マラウイにおけるクロロキン投与中止が熱帯熱マラリア原虫集団に及ぼした影響」
第73回日本寄生虫学会大会, 前橋（平成16年 4月）
5. 美田 敏宏、塚原 高広、大澤 彦太、金子 明、小早川 隆敏、Bjorkman A、田辺 和祐
「Chloroquine + Fansidar 併用療法は Fansidar 耐性熱帯熱マラリア原虫の拡散を防止しうるか？」
第74回日本寄生虫学会大会, 前橋（平成17年 4月）

(* 第18回日本内科学会奨励賞)

(3) 出版物

美田 敏宏. アジア旅行者のための感染症対策, 本田 徹,
金子 明編. P.27-55. 東京:連合出版.2003.

研究 成果

1. 研究 目的

クロロキン耐性熱帯熱マラリアの出現および拡散はマラリア対策上世界的な問題となっている。しかし、alternative drug としての pyrimethamine/sulfadoxine, mefloquine 耐性原虫の拡散が急速な勢いで進んでいる現在、安全性が高く安価なクロロキンは今なお魅力的な薬剤である。その耐性機序は長らく不明であったが、原虫 *pfcr*t (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) 遺伝子が発見されたことによって大きく前進した(Fidock et al. Mol Cell. 2000;6:861-71)。 *pfcr*t は内在性膜タンパク質 PFCRT をコードし 10 個の SNPs 部位を持つ。中でもコドン 76 の置換突然変異(K76T)はクロロキン耐性能獲得に主要な役割を担っている。

マラウイではクロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫の著増により 1993 年クロロキンの投与が全面的に中止された。その後本研究者らが行った追跡調査により、in vitro クロロキン感受性の回復(Takech et al. Trop Med Int Health. 2001;6:429-34)、および耐性原虫の著減と周辺諸国に比して有意に低い K76T 変異率が明らかになった(Mita et al. Am J Trop Med Hyg. 2003 Apr;68:413-5)。

選択と淘汰は集団遺伝学の基本原則である。マラウイにおける事象は、クロロキン薬剤圧において選択された K76T 変異を持つ耐性原虫(変異型原虫)が選択因子のない環境下において淘汰を受けたと推察される。

本研究では「選択因子のない環境下における淘汰」という仮説を、流行地から得られたサンプルについて分子生物学的および集団遺伝学的手法を用いて検証していく。現在のところ、細菌において薬剤耐性能獲得株の fitness が低下することは証明されているが、クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫における検討はない。また、原虫 *pfmdr*1 遺伝子変異は以前よりクロロキン耐性能との関連が示唆されていたが、K76T 変異の有害作用に対

する代償作用、すなわち compensatory mutation としての役割が議論され始めている。本研究ではマラリア浸淫性やクロロキン薬剤圧の程度、耐性原虫拡散ルートなど異なったフィールドにおける原虫集団の薬剤耐性遺伝子構成に対して集団遺伝学的解析を加える予定で、これら検討により、耐性遺伝子変異が持つ意義について新たな知見の創出が期待される。

マラリア治療戦略上最も難渋する問題は薬剤耐性原虫の蔓延である。流行地域における一次選択薬の変更は標準的な戦略とされている。耐性原虫蔓延地におけるクロロキン投与中止が数年後にクロロキン感受性回復をもたらしたという公衆衛生学的な報告は中国、ベトナムからなされているが、科学的な手法を用いた事象の証明はいまだ行われていない。流行地域におけるクロロキン投与中止によるその感受性の回復という公衆衛生学上重要な事象に対し、基礎的研究により解明を試みることは、流行地におけるマラリア治療政策を決定する上で大きな意義を持つ。究極的には流行地における抗マラリア薬休薬を応用した治療戦略構築を目指している。

2. 研究 成果

(1) *pfmdr1* 遺伝子変異の役割

パプアニューギニアの患者から得られたサンプルを用いて、以前よりクロロキン耐性との関連が示唆されている *pfmdr1* 遺伝子変異の役割について探索を行った。当地における熱帯熱マラリア感染はアフリカ地域に比べ、mix parasite infection が少なく(約20%)、集団遺伝学的検討に適している。

結果. *pfmdr1* の N86Y、Y184F いずれの変異もクロロキン耐性能獲得および *pfcr1*K76T 変異原虫におけるクロロキン耐性レベル増強効果も起こさなかった。以上よりこれらの変異がクロロキン耐性メカニズムに直接関与している可能性は否定された。しかし、*pfcr1*K76T と *pfmdr1*N86Y の間に強い連鎖不平衡が見られ、この変異は、K76T 変異原虫の生存にとって不都合な cost を代償するような働きをしていることが推察された。

[Mita T, Masta A, Hwaihwanje I, Lum JK, Takahashi N, Osawa H, Tsukahara T, Kaneko A, Kobayakawa T, Björkman A, Hombhanje FW. Role of *pfmdr1* mutations of chloroquine resistant *pfcr1* K76T *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Int J Parasitol*. In submission.]

(2) クロロキン薬剤圧消失下における K76T 変異減少メカニズム

マラウイでは、マラリア治療の第1選択薬としてクロロキンを使用していたが著明な耐性率の上昇(80%)により、1993年その投与が全面的に中止された。1998 および 2000年には当地におけるクロロキン感受性の著明な回復(耐性率9%)および K76T 変異率の著明な減少を示した。

本研究において、我々は、クロロキン圧消失後における K76T 変異率の減少のメカニズムとして、

仮説1:「K76T 変異原虫の相対適応度が野生型に比して低下している」

仮説2:「耐性原虫の 76 位に back mutation が起こった」

を立て、その検証を行った。

結果、マラウイにおいては back mutation を起こした原虫は見られず、K76T 変異原虫は野生型原虫に比べ、0.76 と著明に低い relative fitness を示していた。強力なクロロキン圧により選択された K76T 変異原虫は、治療政策変更により選択因子のない環境となったマラウイにおいては、その生存困難性から淘汰されていったと推察された。

[Mita T, Akira K, Lum JK, Zungu IL, Tsukahara T, Eto H, Kobayakawa T, Bjorkman A, Tanabe K. Expansion of wild type allele rather than back mutation in pfert explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;135:159-63.]