

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する
基礎的研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 相川正道

平成13（2001）年3月

目 次

I. 総括研究報告書	1
抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究 相川 正道	
II 分担研究報告	
1. マウス赤血球における Dipyridamole の赤血球親和性 伊藤 義博	7
2. マウスを用いた抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究 西野武志	9
3. 原子間力顕微鏡を用いた液中表面電位分布測定に関する研究 金村 聖志	11
4. 熱帯熱マラリアに対するメフロキンとアーテスネートとの併用療法の効果 大友 広士	15
5. 抗マラリア薬複合投与の薬理遺伝学的研究 金子 明	18
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究
主任研究者 相川 正道 学校法人東海大学総合科学技術研究所教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫培養系において、クロロキン (CQ)感受性株および耐性株ともにディピリダモール (DP)存在下では CQ は、単独投与に比べて、より低い濃度でマラリア原虫の感染率を押さえた。DP は投与量に比例して、赤血球表層に非共有結合し、赤血球に結合した DP は血漿中 DP より安定と考えられた。しかし、経皮ないし腹腔内 DP 投与マウスにおいては、DP 単独投与による強い抗マラリア効果および CQ との同時投与での明確な相乗作用は認められなかった。この原因の一つとして、腹腔内投与の効率が極めて悪いことが考えられた。しかし、静脈注射投与では、強い抗マラリア効果を示した。また、原子間力顕微鏡システムによる観察結果から、DP 分子は細胞表面に均一に吸着し、赤血球侵入型マラリア細胞および赤血球表面の物理化学的な状態を変化させる結果、抗マラリア効果に関与するものと考えられた。

日本における熱帯熱マラリア患者にメフロキンとアーテスネートの複合投与治療を試み良好な結果を得た。また、バヌアツにおける薬理遺伝学的研究からプログアニル自体が未知の抗マラリア作用を示すことが再確認された。

分担研究者

大友 弘士 東京慈恵会医科大学教授
金村 聖志 東京都立大学助教授
西野 武志 京都薬科大学教授
伊藤 義博 財団法人生産開発科学研究所
主任研究員
金子 明 東京女子医科大学助教授

における負担の軽減を目指すものである。

本研究事業の特色の一つとして、マラリア原虫を直接殺傷することを目的とせず赤血球侵入を阻止することを目的とする薬と従来の抗マラリア薬を組み合わせることである。また、主任研究者らの研究により、原虫の赤血球侵入過程に表層荷電が関与することが判明したので、電気化学的観点から侵入阻止薬使用時の赤血球膜ならびに赤血球侵入型細胞（メロゾイト）表層の荷電の変化検出に原子間力顕微鏡 システム (AFM) を導入することも特徴の一つである。一方、プログアニル (PG) は代謝されて抗マラリア活性が発現されると考えられ、他の抗マラリア薬との効果的組み合わせが望まれているが、バヌアツでの薬理遺伝学的研究により、遺伝的素因として PG 代謝能に個人差があることが判明した。PG 複合投与をより効率的に行うために、マラリア流行地における住民の遺伝人薬理学的観点からの研究をも取り入れる。

A. 研究目的

現在、マラリアが地球レベルで再燃し、WHO は人類が撲滅すべき感染症の第一にマラリアを挙げている。マラリア再燃の原因の一つとして、クロロキン (CQ) を始めとする抗マラリア薬を治療に加えて予防的に使用した結果、多くの抗マラリア薬耐性株が出現したことが考えられる。従って、抗マラリア薬の投与法の改善が緊急に望まれる。この現状を鑑み、本研究は作用点の異なる 2 種類の薬を組み合わせ、その相乗効果によるマラリア治療効果の改善ならびに副作用等の患者に

昨年度までの研究により、抗血小板、心筋保護、冠動脈副血行促進、冠循環改善等を目的として使用されているディピリダモール (DP) がイン・ビトロで熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の増殖を抑制し、その作用機序は主として赤血球に結合して原虫の赤血球侵入を阻害することであると考えられた。また、DP が赤血球膜に結合した結果、荷電分布をも含めた表層構造の変化を生じることが、AFM およびロゼット再構成系アッセイにより明らかになった。これらの結果を踏まえて、今年度はイン・ビトロおよびイン・ビボにおける DP と CQ を同時投与することによる相乗効果を検討する。さらに、日本における熱帯熱マラリア患者にメフロキンとアーテスネートの複合投与治療を試み、バヌアツにおいて PG 複合投与をより効果的に行うための基礎研究として薬理遺伝学的調査を行った。

B. 研究方法

- 1) 熱帯熱マラリア原虫培養実験：CQ 感受性株 indochina 1 (IC-1) および CQ 耐性株 K-1 をヒト赤血球を用いて培養し、72 時間目の感染率を指標とした。
- 2) ネズミマラリア感染実験：主に感染率に対する効果を調べる目的で ICR マウスに *P. yoelii* を感染させ、ヒト重症マラリアモデルとして C57BL/6N マウスに *P. berghei* ANKA を感染させた。また、野生型 (C57BL/6 と 129 の雑種) より得られたグリコフォリン A ・ノックアウトマウスでの *P. berghei* ANKA 感染実験を行い、DP がグリコフォリン A をターゲットとするかを検討した。
- 3) AFM 観察：IC-1 のメロゾイトおよび感染赤血球表層を観測した。
- 4) DP 定量：血液ならびに赤血球を各種濃度の DP で処理し、血中の DP をメタノール抽出後、HPLC で分離・定量した。
- 5) メフロキンとアーテスネートの併用治療：ヒューマンサイエンス財団「輸入熱帯病寄生虫症に対するオーファンドラッグの臨床

評価に関する研究班」から供与されたアーテスネートとメフロキンを用いて国内患者の治療に用いた。

6) バヌアツにおける薬理遺伝学的研究：PG 治療を受けたマラリア患者の指頭血を濾紙に採取したサンプルを用いて、PG 代謝に関与する肝臓チトクロム P450 のアイソザイムである CYP2C19 の遺伝子をターゲットとして PG 代謝と抗マラリア効果を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては「動物実験に関する指針に従い、必要最小限の動物を使用する。バヌアツにおける調査研究に関しては、当地保健省の許可を得た。さらに、対象地域の協力を得て、研究の目的・危険性を説明後、同意を得た。

C. 研究結果

1) 熱帯熱マラリア原虫の培養系における感染率に対する DP および CQ の効果 (相川)

IC1 および K-1 培養 3 日目における感染率を 50% 抑制するために必要な DP 濃度 (IC50) は、それぞれ 50 μ M、70 μ M であった。CQ の IC-1 および K-1 における IC50 は、それぞれ 30nM、200nM であった。DP 5 μ M 存在時での K1 株における CQ の IC50 はおよそ 120nM であった。また、ハイポキサンチンの取込みによる 24 時間アッセイでは IC-1 における DP の IC50 は 12 μ M であった。一方、赤血球を 500 μ MDP で 37°C、20 分間前処理後、培養に用いた結果、感染率が大きく低下し、また CQ 添加によりによりさらに感染率を抑制した。DP 処理直後と 2 日後の赤血球結合 DP 量は、1ml の血液に含まれる赤血球換算当たり (/ml blood RBC) それぞれ 200ng、180ng であった。

2) マウス重症マラリアモデルにおける DP および CQ の効果 (相川、大友)

P. berghei ANKA を感染させたマウスに DP を腹腔内投与した (毎日 1 回)。無投与のものは 10 日で全部 (10 匹) 死亡したが、4mg 投与では 3 匹生き残り、有意な存命効果が認められた (χ^2 検定、 $P <$

0.001)。4mgDP 腹腔内投与 1 時間後の血中 DP 濃度はそれぞれ、231ng/ml plasma、7.1ng/ml blood RBC であった。

3)ICR マウス赤血球表層上の DP 量 (伊藤)

イン・ピトロ実験

12.5、25、50 ないし 100 μ g DP/ml で前処理をした場合、赤血球膜湿潤重量当り(/g wet RBC)の DP は、それぞれ 5.7、8.8、10.1 ないし 32.6pg であった。これらの値は前処理 DP 濃度にほぼ比例していた。

イン・ピボ実験

a)経口経路：DP7.5mg/day 投与を 1 回、2 回、3 回行い、12 時間後に採血した場合での DP 量は、それぞれ 0.6 pg/mg wet RBC、1.8pg/mg wet RBC、2.9pg/mg wet RBC であった。

b)腹腔経路：マウス体重 1 g 当り 2 μ g ないし 20 μ g の DP を 腹腔内投与し、12 時間後に採血した場合の DP 濃度は、それぞれ 1.9pg/mg wet RBC、10.5pg/mg wet RBC であった。

4)グリコフォリン A ・ノックアウトマウスでの *P. berghei* ANKA 感染実験 (相川)

野生型およびノックアウトマウスでの感染実験を行った結果、共に感染し、感染率の経時的変化もほぼ同じであった。

5)ICR マウスにおける *P. yoelii* 感染に対する DP および CQ の効果 (西野)

P. yoelii の感染量を可能な限り少量にし、原虫の接種量、接種経路の検討を行った。接種量の基準として *P. yoelii* 感染赤血球数を、接種経路としてはマウスの尾静脈を用いた場合に、100%の死亡率が得られる最少接種量が再現性よく得られた。次に、この条件下で各薬剤単独の治療効果を検討した。DP を単独で皮下投与した場合、有意な治療効果は認められなかった。さらに、CQ の単独では有意な治療効果を示さない最大投与量を決定し、これらの結果を考慮して DP と CQ 併用時の治療効果を検討したが、各薬剤単独投与時と比較して有意な治療効果の差異は認められなかった。

6)AFM による DP 処理細胞の観察 (金村、

相川)

メロゾイト侵入部位である頭頂部は陽性に荷電しているが、500 μ M の DP で処理した後は、陽性荷電の局在が認められなくなった。また、同様に DP 処理したマラリア感染赤血球を観察した結果、以下の 2 点が明確となった。第一点は、感染赤血球表面上に存在していた電位分布 (感染赤血球の特異的突起構造物 (knob)のみが陽性荷電し、それ以外では陰性に荷電している)が均一化された。第二点は、赤血球表面のナノオーダーの構造が大きく変化していたことである。

7)熱帯熱マラリアに対するメフロキンとアーテスネートの併用治療における相乗効果 (大友、相川、伊藤)

熱帯熱マラリア患者にアーテスネートを第 1 日目に 200mg を 2 回、第 2~5 日目に各 100mg 投与することにより、発熱消失時間 12~36 時間、原虫消失時間 24~36 時間となったが、服用による副作用は認められなかった。メフロキンは投与後、嘔吐して薬剤を吐出することが欠点であったが、アーテスネート投与を先行すると吐出頻度が減少し、患者の臨床症状の改善がメフロキン単独に比べて早かった。

8)バヌアツにおける PG 代謝能に関する薬理遺伝学的研究 (金子)

PG 代謝能の低い患者 (PM)が極めて高頻度(70%)で存在するバヌアツにおいて、PG 治療を受けたマラリア患者の CYP2C19 に関する遺伝子型は PG 代謝の程度と強く相関したが、抗マラリア効果には関与しなかった。更にヴァヌアツ 16 島 24 地域の住民 5538 名についての CYP2C19 に関する遺伝子型解析より、PM 遺伝子型は太平洋島嶼に広く分布することが予測された。また、バヌアツにおけるケーススタディーから、孤立した島嶼におけるマラリア伝播は、期間を限定した集団薬剤投与、殺虫剤処理蚊帳および幼虫嗜好魚の組み合わせ戦略で、住民参加を効果的に組織し実施することにより継続的に抑制されることが示唆さ

れた。

D. 考察

培養系では CQ 感受性および耐性株ともに DP 存在下では、より低い CQ によりマラリア原虫の感染率を押さえた。しかし、ICR マウスおよび C57BL/6N マウスにおいては DP による強い抗マラリア効果、CQ との同時投与による明確な相加・相乗作用は認められなかった。DP500 μ M 処理赤血球の DP 量は 200ng/ml blood RBC であった。一方、C57BL/6N マウスに DP 4 mg 腹腔内投与で 7.1ng/ml blood RBC、DP1mg 静脈注射では 1500ng/ml blood RBC で、腹腔内投与の効率が極めて悪いことが判明した。この結果を踏まえて、C57BL/6N マウスに DP を静脈注射投与 (1mg/day、3 回) した予備実験では、感染率の低下および延命効果が認められた。これら結果を基に現在、C57BL/6N マウスを用いて、DP1mg 静脈注射と CQ 経口投与の組み合わせ実験を行っている。また、投与 DP 量と赤血球表面吸着ないし結合量がほぼ比例していた。また、一度赤血球に結合した DP は安定と考えられた。また、AFM 観察により、DP 分子が赤血球表面に均一に吸着していることが明らかになった。このような現象は、赤血球表面の物理化学的な状態 (薬剤との親和性や膜を介した物質移動など) を変化させるものであり、この結果抗マラリア効果に関与しているものと考えられる。

グリコフォリン A・ノックアウトマウスでの *P. berghei* ANKA 感染実験を行った結果、野生型と共に感染し、感染率の経過もほぼ同じであったことから、同原虫の感染にグリコフォリン A が関与していないことが判明した。C57BL/6N マウスでは DP 投与により感染率が低下することから、この系統のネズミではグリコフォリン A は DP のターゲットとなる可能性は示されなかった。

バヌアツにおける遺伝薬理学的研究から「PM のマラリア患者においては PG が効かない」という仮説が成り立たず、PG 自

体が未知の抗マラリア作用を示すことが示唆された。また、孤立した島嶼におけるマラリア伝播は、集中的抗マラリア対策に組織的に住民を参加をさせて、実施することにより継続的に抑制されることが示された。

E. 結論

赤血球表層上の DP 量測定の結果から、腹腔内投与の効率が極めて悪いことが判明したので、DP 静脈注射と CQ 経口投与の組み合わせ実験を行う必要がある。日本における熱帯熱マラリア患者にメフロキンとアテスネートの複合投与治療を試み良好な結果を得た。また、PG 自体が未知の抗マラリア作用を示すことが示唆された。

F. 健康危機情報 ナシ

G. 研究発表

1. 論文発表

Perlmann P, Perlmann H, Looareesuwan S, Krudsood S, Kano S, Matsumoto Y, Brittenham G, Troye-Blomberg M, and Aikawa M. Contrasting functions of IgG and IgE antimalarial antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62(3):373-7.

Nagayasu E, Ito M, Akaki M, Nakano Y, Kimura M, Looareesuwan S and Aikawa M. CR1 density polymorphism on erythrocytes of *falciparum* malaria patients. *Am J Trop Med Hyg*, 2001 (in press).

Sam-Yellowe TY, Fujioka H, Aikawa M, Hall T, and Drazba JA. A *Plasmodium falciparum* protein located in Maurer's cleft underneath knobs and protein localization in association with Rhop-3 and SERA in the intercellular network of infected erythrocytes. *Parasitol Res*, 2001, 87(3):173-185.

Akaki M, Nakano Y, Nagayasu E,

- Nagakura K, Kawai S, and Aikawa M. Invasive forms of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* and *Trypanozoma cruzi* have a positive charge at their contact site with host cell. *Parasitol Res*, 2001, 87(3): 193-197.
- 大友弘士、早野真史. 国内におけるマラリア治療とオーファンドラッグ, *Prog. Med.*, 2000, 21: 383-387.
- Shiraishi S, Kanamura K, and Takenaka Z. Imaging for Uniformity of Lithium Metal Surface Using Tapping Mode-Atomic Force and Surface Potential Microscopy. *J Phys Chem B*, 2001, 105: 123-134.
- Sakihama N, Mitamura T, Kaneko A, Horii T, and Tanabe K. Long. PCR amplification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from filter paper blots. *Exp Parasito*, 2001, 96(in press).
- Kaneko A., Malaria dichotomy in the Pacific [Comment to Terrel et al.]. *Current Anthropology*, 2001, 42(in press).
- Kaneko A, Taleo G, Kalkoa M, Yamar S, Kobayakawa T, and Björkman A. Malaria eradication on islands. *Lancet*, 2000, 356: 1560-1564.
- Ishikawa H, Ishii A, and Kaneko A. The prevalence of *Plasmodium vivax* in Vanuatu Islands: Computer simulation of malaria control trials. *J Fac Environ Sci and Tech Okayama Univ*, 2000, 5: 1-6.
- 金子明. マラリア治療に関わる人間および原虫の遺伝学. 東京女子医科大学雑誌, 2000, 70;609-610.
- 金子明. 南太平洋における島嶼マラリア対策: 人類拡散と遺伝学的多様性. 熱帯, 2000, 33: 45-51.
- 金子明. 見えてきた島嶼マラリア制圧戦略. JICA フロンティア, 2000, 10: 7-8. (著書)
- 金子明. マラリア. 亀山正邦、高久史磨編. 今日の診断指針、第5版. 東京:医学書院, 2000.
- 金子明. フィールドにおける抗マラリア剤治療効果モニタリング:*in vitro* マイクロテスト. 田辺和祐ら編. マラリア学ラボマニュアル. 東京:菜根出版, 2000.
- 金子明. フィールドにおける抗マラリア剤治療効果モニタリング:*in vivo* テスト. 田辺和祐ら編. マラリア学ラボマニュアル. 東京:菜根出版, 2000.
- 金子明. バヌアツ共和国. 松田朗ら編. 世界の公衆衛生体系. 東京:日本公衆衛生協会, 2000.
2. 学会発表
- 赤木真由実・中野山路・長安英治・永倉貢一・川合覚・相川正道. 侵入型原虫の侵入開始部位に局限した陽性荷電. 第41回日本熱帯医学会雑誌第28巻増刊号 p55 (2000).
- 山口剛・濱上寿一・金村聖志・梅垣高士 アパタイト初期成長過程のナノキャラクタリゼーション第4回生体関連セラミックス討論会講演予稿集, p19 (2000).
- 山口剛・濱上寿一・金村聖志・梅垣高士液中ノンコンタクトモード原子間力顕微鏡によるアパタイト成長過程の動的観察第39回セラミックス基礎科学討論会講演要旨集 p204-205 (2001).
- 金子明・George Taleo・Anders Björkman・小早川隆敏. アネイチウム島における脾腫率の推移. 第41回日本熱帯医学会大会 プログラム抄録; 2000年11月10-11日; 東京. 日本熱帯医学会雑誌 28 (増刊号) p275 (2000).
- 大友弘士. 我が国における熱帯熱マラリア治療の変遷. 第41回日本熱帯医学会雑誌第28巻増刊号 p25 (2000).
- 美田敏宏、金子明、Georgia Taleo, Morris Kalkoa, Anders Björkman, 小早川隆敏. ヴァヌアツ島嶼熱帯熱マラリアに対する pyrimethamine/sulfadoxine 治療効果の分子疫学的検討. 第41回日本熱帯医学会大会増刊号 p277(2000).

Lum J.K, Kaneko A , and Kobayakawa T. Population genetics and epidemiology: Malaria in Vanuatu. 第41回日本熱帯医学会大会雑増刊号 p278(2000).

Kaneko A, Taleo G, Mita T, Yamar S, Perlmann H, Perlmann P, Ichimori K, Kobayakawa T, and Björkman A. Eradication of malaria on an island of Vanuatu. Work shop. Proceedings of 40th Annual Meeting of Japanese Society of Tropical Medicine and 14th Annual Meeting of Japanese Association for International Health; 1999 Sep 3-5; Tokyo, Japan. *Jpn J Trop Med Hyg* 28:52 (2000).

金子明. 島嶼マラリア対策. ワークショップ. 第69回日本寄生虫学会大会49(増刊号) p25 (2000).

Kaneko A, Mita T, Takechi M, Nishiyama A, Taleo G, Kalkoa M, Bergqvist Y, Kobayakawa T, and Björkman A. Restrictet diversity in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase gene on Vanuatu islands. 第69回日本寄生虫学会大会 49(増刊号) p82 (2000).

Kaneko A, Taleo G, Mita T, Yamar S, Perlmann H, Perlmann P, Ichimori K, Kobayakawa T, and Bjorkman A. Eradication of malaria on an island of Vanuatu [Workshop]. Proceedings of joint Conference, 40th Annual Meeting of Japanese Society of Tropical Medicine and 14th Annual Meeting of Japanese Association for International Health; 1999 September 3-5; Tokyo, Japan. *Jpn J Trop Med Hyg* 28: 52 (2000).

金子明. 南太平洋における島嶼マラリア対策: 人類拡散と遺伝学的多様性. 熱帯 33: 45-51(2000).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 1.特許取得 ナシ
- 2.実用新案登録 ナシ
- 3.その他 ナシ

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

マウス赤血球における Dipyridamole の赤血球膜親和性

分担研究者 伊藤義博 (財)生産開発科学研究所細胞活性研究室主任研究者

研究要旨

ICR マウスを用い、ディピリダモール (DP) の膜親和性試験を *in vitro* と *in vivo* で実施した。DP 処理後に赤血球膜を分離・分画し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量分析した。投与量に比例して、赤血球表層に非共有結合し、一度赤血球に結合した DP は血漿中 DP と異なり、安定と考えられた。

A. 研究目的

Dipyridamole (DP) は試験管内で *Plasmodium falciparum* の増殖を抑制し、この作用は主として原虫の赤血球侵入を阻害し、その機構は DP の赤血球膜親和性と深く関連すると考えられた。従って、原虫に直接作用する抗マalaria薬と併用すれば、異なる作用機構で協同して薬物の持つ薬剤耐性、副作用などの欠点を補うと考えられる。

本研究の目的は、ヒト赤血球と *P.falciparum* で証明された DP の侵入阻害効果をマウス実験系に適用するために行った。

B. 研究方法

マウス実験系における DP の膜親和性試験は *in vitro* と *in vivo* で実施した。各々の判定は、処理後に赤血球膜を分離・分画し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量分析した。なお、実験を均一化するために、マウスを ICR 系統に絞り、*in vitro* で使用する赤血球と血清も ICR 由来とした。

C. 研究結果

1) *In vitro* 実験: DP の 12.5, 25, 50 及び 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理をした場合、それぞれ、赤血球膜湿潤重量当り 5.7, 8.8, 10.1 及び 32.6pg の DP を測定した。これらの値は DP の処理量にほぼ比例していた。

2) *In vivo* 実験:

a) 経口経路: DP の 7.5mg を経口投与針で 1 日 1 回投与した場合、赤血球膜湿潤重量当り 0.6 pg、1 日 2 回投与で 1.8pg、3 回投与で 2.9pg の DP をそれぞれ測定した。

b) 腹腔経路: マウス体重 1 g 当り 2 μg 及び 20 μg の DP を腹腔内投与し、1.9pg 及び 10.5pg の DP をそれぞれ検出した。

(倫理面への配慮)

「動物実験に関する指針」に従い、最少限度の動物を使用した。

D. 考察

マウス実験系において、DP の赤血球膜親和性は *in vitro* と *in vivo* の何れにおいても認められ、その HPLC 分析における吸光度は、標準

品の DP と同じであったことから、*in vivo* で投与された DP 分子は、マウス体内で変化することなく赤血球膜に接着することを示唆している。

E. 結論

以上の成績から、DP の *in vitro* 実験はマウスの動物実験に反映出来ると考えられた。

F. 健康危機情報 無し

G. 研究発表 無し

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む) 無し

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

マウスを用いた抗マalaria薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究

分担研究者 西野武志 京都薬科大学微生物学教室教授

研究要旨

マウスのマalaria感染モデルにおける薬剤の治療効果を検討するために、まずマalaria原虫 *Plasmodium yoelli* の感染量を可能な限り少量にし、原虫の接種量、接種経路の検討を行った。その結果、接種量の基準として *P. yoelli* 感染赤血球数を、接種経路としてはマウスの尾静脈を用いた場合に、100%の死亡率が得られる最少接種量が再現性よく得られた。次に、この条件下で各薬剤単独の治療効果を検討した。まず、dipyridamole を単独で皮下投与した場合有意な治療効果は認められなかった。さらに、chloroquine の単独では有意な治療効果を示さない最大投与量を決定し、これらの結果を考慮して dipyridamole と chloroquine 併用時の治療効果を検討したが、各薬剤単独投与時と比較して有意な治療効果の差異は認められなかった。

A. 研究目的

クロロキン耐性マalariaの出現に伴い、抗マalaria薬単剤の使用では治療に困難を来すことが将来的に予想される。従って、作用機序の異なる新規な抗マalaria薬の必要性および結核の治療の場合と同様、マalariaの治療の場合も2つあるいは3つの薬剤を併用することが必要になってくる可能性が予想されるので、今からその基礎的な研究を行っておく必要がある。

B. 研究方法

動物実験における薬剤の治療効果を検討するために、接種量を可能な限り少量にし、わずかな薬剤の効果であっても検出できるように *P. yoelli* の接種量、接種経路の検討を行った。なお、接種量の基準を調べるためには感染血液の希釈倍数、感染赤血球数、原虫数などについて、最適な接種経路を調べるためにはマウスの腹腔内と尾静脈について検討を行った。そして得られた

至適条件下で薬剤単独および2薬剤間の併用効果について検討を行った。

（倫理面への配慮）

「動物実験に関する指針」に従い、最少限度の動物を使用した。

C. 研究結果

ICR マウスを用いて感染実験を行ったところ、接種量の基準として *P. yoelli* 感染赤血球数を、接種経路としてはマウスの尾静脈を用いた場合に、100%の死亡率が得られる最少接種量が再現性よく得られた。次に、この条件下で各薬剤単独の治療効果を検討した。まず、dipyridamole を単独で皮下投与した場合、1mg/マウスを1日1回3日間投与しても有意な治療効果は認められなかった。さらに、chloroquine の単独では有意な治療効果を示さない最大投与量を決定した。そして、これらの結果を考慮して dipyridamole と chloroquine 併用時の治療効果を検討したが、各薬剤単独投与時と比較して

有意な治療効果の差異は認められなかった。

- 1.特許取得 ナシ
- 2.実用新案登録 ナシ
- 3.その他 ナシ

D. 考察

今回の条件下では *P. yoelii* 感染マウスに対する治療結果において dipyrindamole と chloroquine の協力作用は認められなかった。しかし、dipyrindamole を皮下投与した時に同時に投与したとはいえ chloroquine が dipyrindamole と血中でも同時に存在しているのか、*in vitro* と同様に常時 dipyrindamole と赤血球が接しているのかといった事は不明であるため、今後 dipyrindamole 皮下投与時の体内動態を調べてみる必要があると思われる。また、dipyrindamole はその毒性についての報告からみて更なる投与量の増量が可能ではないかと思われる。したがって、投与量または投与回数を増やして *P. yoelii* 感染マウスに対する dipyrindamole と chloroquine の併用効果を検討する必要もあるのではないかと思われる。

E. 結論

薬剤の治療効果を検討するために、ICR マウスにおけるマラリア原虫 *P. yoelii* 感染モデルを確立することができた。しかし、今回の条件下では *P. yoelii* 感染マウスに対する治療結果において dipyrindamole と chloroquine の協力作用は認められなかった。

F. 健康危機情報 ナシ

G. 研究発表

論文発表および学会発表は、ともにこの内容のものはナシ

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

抗マラリア薬の複合投与による相乗効果に関する基礎的研究

（分担）研究者 金村 聖志 東京都立大学大学院工学研究科

原子間力顕微鏡・表面電位顕微鏡複合測定を用い、マラリア感染赤血球に対する観察を行い、抗マラリア薬の作用を物理化学的な観点から考察した。具体的な薬剤としてDipyridamoleを用い、この薬剤で処理した前後で赤血球表面を観察した結果、以下の2点が明確となった。第一点は、感染赤血球表面上に存在していた電位分布（ノブ部では+それ以外では-）が均一化されていることである。第二点は、赤血球表面のナノオーダーの構造が大きく変化していることである。これらの結果より、Dipyridamole分子が赤血球表面に均一に吸着していることが明らかになった。このような現象は、赤血球表面の物理化学的な状態（薬剤との親和性や膜を介した物質移動など）を変化させるものであり、このことが抗マラリア効果に関与しているものと考えられる。

A. 研究の目的

抗マラリア薬であるDipyridamoleを用い赤血球表面の状態変化について、原子間力顕微鏡・表面電位顕微鏡複合測定を用いて観察を行い、赤血球表面状態の物理的な変化を捉え、その効果について物理化学的な立場から明らかにする。また、複合投与をした場合の効果を明確にする上でも、それぞれの試薬についての基礎的な検討が必要であり、本年度はDipyridamoleを用いて以下の研究を行った。

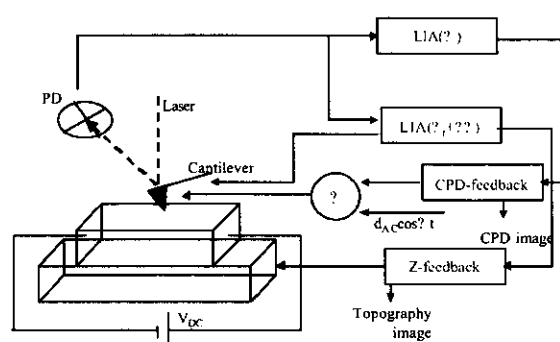


Figure 1 Schematic diagram of the KFM measurement system.

B. 研究の方法

マラリアに感染した赤血球表面に対して原子間力顕微鏡・表面電位顕微鏡複合測定による観察を行った。とくに、抗マラリア薬と考えられるDipyridamoleを用いて、マラリア感染赤血球を処理した場合の表面形態および電位の測定を行った。本研究においては試料表面の仕事関数を測定する装置であるケルビンフォース顕微鏡を用いた。Fig. 1にケルビンフォース顕微鏡の概略図を示す。ケルビンフォース顕微鏡においては、測定時に周波数の異なる2種の振動を同時にCantileverに与える。そして、試料表面の形状や電位により影響を受けるCantileverの振動を一定に保つようにフィードバック制御することにより試料表面の形状と電位を同時に測定する測定系である。

原子間力顕微鏡を用いた測定は大気中（湿潤状態）と液中での測定が考えられる。本研究の目的に最も合致するのは液中測定であるが、測定技術が十分に確立されていない。そこで、本研究では以下の実験を実施した。

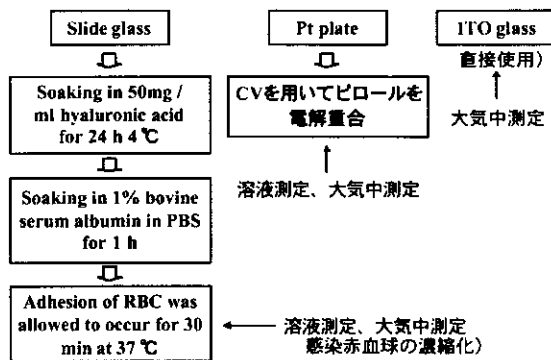


Figure 2 Preparation of substrate for fixation of the infectious erythrocyte.

- (1) 液中原子間力顕微鏡測定条件を確認するために、基板の工夫および装置の最適化を行った。
- (2) 湿潤大気下における原子間力顕微鏡および表面電位測定による赤血球表面の観察を行った。特に、Dipyridamole 処理の前後における形状および表面電位の変化についての測定を行った。

実験(1)については液中での赤血球の固定化のために3種類の基板を調整した。ヒアルロン酸をコーティングしたガラス、ポリピロロール膜をコーティングした白金板、ITOガラスの3種類である。基板の調製法はFig.2に示した。これらの3種類の固定化基板を用い

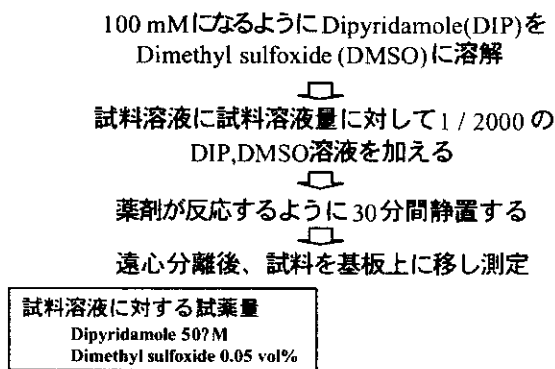


Figure 3 Flowchart of medical treatment procedure to the infectious erythrocyte.

て液中（生理食塩水）での赤血球の観察を行った。

実験(2)においては、Fig.3 に示したような手順でDipyridamole 処理を感染赤血球に対して行った。すなわち、 $50 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ 濃度のDipyridamole、そして0.05 vol%のDimethyl sulfoxideを含む溶液に30分間感染赤血球を浸漬した後、遠心分離により赤血球を取り出しITOガラス上で測定を行った。薬剤処理前後における赤血球表面の形状と電位を測定し両者を比較することによりDipyridamole 処理の効果について考察した。

C. 研究結果

実験(1)について

液中での赤血球の低解像度での観察には成功している。しかし、解像度を上げた場合に、サンプルのドリフトが起こるなどの問題が生じるため、高解像度の観察はまだ検討段階である。Fig.4に原子間力顕微鏡によるマラリア感染赤血球の生理食塩水中での低解像度での観察像を示す。今後、ドリフトを防げるような赤血球固定化用基板の更なる検討を行う必要がある。

実験(2)について

湿潤状態でのDipyridamole 処理の前後における赤血球表面の観察を行った結果をFig.5

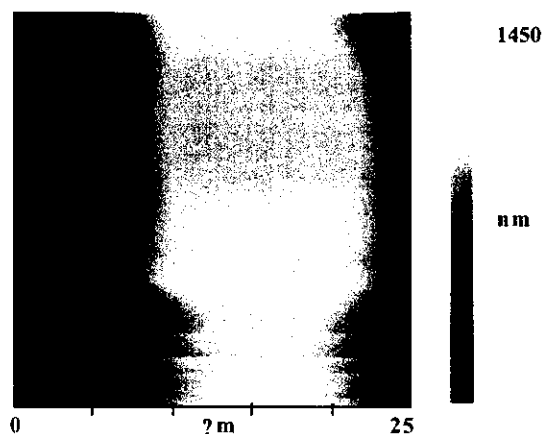
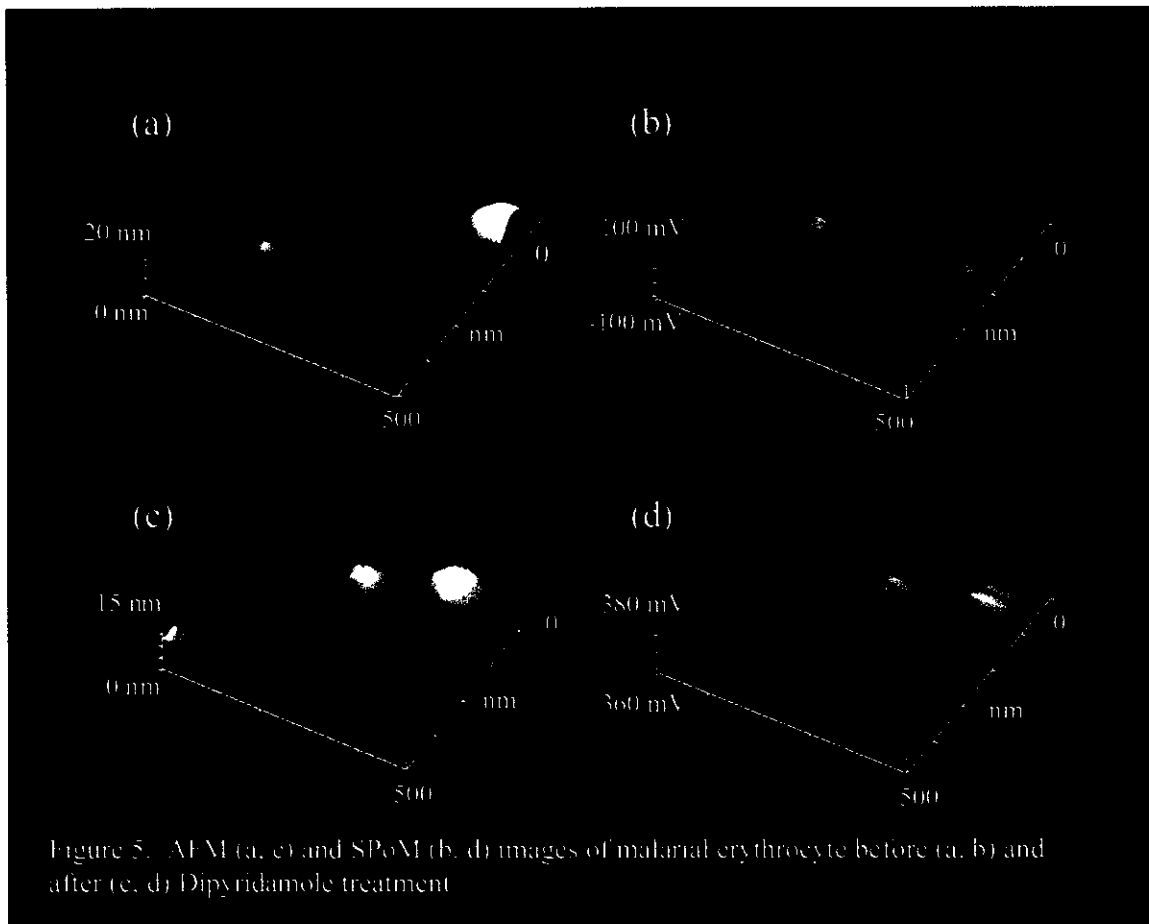


Figure 4 AFM image of malarial erythrocyte in NaCl solution.



に示す。表面形状より Dipyridamole 処理後は処理前と比較すると、明らかに表面の本来持っている大きな凹凸に加えて何らかの小さな分子の集合体と考えられる非常に小さな凹凸が確認できた。また、電位像からは処理前には正に帯電していた突起部（ノブ）の表面の電位が処理後には完全に反転していることが確認できる。また、赤血球表面全体に電位の分布が小さくなっていることがわかった。

D. 考察

以上の結果より、Dipyridamole 処理の赤血球表面に及ぼす影響は、Dipyridamole の表面への均一な吸着と赤血球表面電位の均一化として理解することができる。また、感染赤血球の突起部にはとくに吸着しやすく、その電位を正から負に完全に反転させる効果があることがわかった。

今後、Dipyridamole 以外の薬剤、またその複合系についても同様の測定を行う。

E. 結論

本研究の結果より、赤血球表面への抗マラリア薬 Dipyridamole の特異的な吸着が見られ、このような物理化学的な挙動が重要と思われる。また、このような観察は、これまでの透過型電子顕微鏡に依存してきた基礎的な研究においては発見することのできないものであり、できる限り実際に近い状態（湿潤状態や液中）で測定することが抗マラリア研究において重要であることを示唆するものであり、今後大きく展開できる手がかりを得たと結論できる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Soshi Shiraishi, Kiyoshi Kanamura, Zen-ichiro Takenaka

Imaging for Uniformity of Lithium Metal Surface Using Tapping Mode-Atomic Force and Surface Potential Microscopy

The Journal of Physical Chemistry B

Volume 105, Number 1, Pages 123-134 (2001).

2. 学会発表

[1]山口剛・濱上寿一・金村聖志・梅垣高士
アパタイト初期成長過程のナノキャラクタリゼーション

第4回生体関連セラミックス討論会講演予稿集 p.19 (2000).

[2] 山口剛・濱上寿一・金村聖志・梅垣高士
液中ノンコンタクトモード原子間力顕微鏡によるアパタイト成長過程の動的観察

第39回セラミックス基礎科学討論会講演要旨集, pp. 204-205 (2001).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

特になし

熱帯熱マラリアに対するメフロキンとアーテスネートとの併用療法の効果

分担研究者 大友 弘士 東京慈恵会医科大学熱帯医学

研究要旨 近年、治療上の隘路になっている薬剤耐性熱帯熱マラリアの克服のため新規薬剤が次々と開発されている。しかし、いずれも国内未承認の希少薬として存在するため、日本人患者を対象にその効果や副作用などを検討した報告は極めて少ない。そこで本研究では国の支援により組織された研究班からの供与件数の多いメフロキンとアーテスネートの併用療法の効果について検討した。

A. 研究目的

臨床経過が悪性の熱帯熱マラリアでは、診断や治療開始の遅延により重篤な病態や合併症を発現して死の転帰をとる危険が高いことに加え、近年、その病因原虫の薬剤耐性株が出現し、本症の治療が極めて困難な状況になっている。すなわち、1970年代にそれまでのキニーネに代わる合成抗マラリア薬として登場したクロロキン耐性株が1960年前後にタイとコロンビアに出現し、以後急速に熱帯各地に拡散したことに端を発し、1970年代に開発されたスルファドキシシン・ピリメサミン合剤、1980年代に導入されたメフロキンやハロファントリン耐性株も各地から報告され、特にタイ・カンボジア、タイ・ミャンマー国境地帯ではこのような薬剤の全てに耐性を示す多剤耐性株の存在も確認されているほか、従来耐性が獲得されにくいとされていたキニーネの効果も減弱しており、マラリア対策の大きな隘路になっている。

ところで、高度の耐性マラリアや多剤耐性マラリアの克服を目的として既知抗マラリア薬の併用療法、あるいはキニーネとテトラサイクリンとの併用療法などが案出され、その効果が種々検討されているほか、1970年代に中国で古くから民間療法に使用されてきた薬草から抽出された青蒿素（チンハオスー、artemisinin）、およびその各種誘導体、アーテミシニン誘導体の1種であるアーテメターと中国で開発されたキノリンメタノール系薬物のルメファントリンとの合剤、1990年代に開発されたアトバコンとプログアニルとの合剤、タフェノキンなどの新規薬剤も多剤耐性マラリアの治療薬としての効果が期待されている。そこで、今回、国内未承認薬であるが、ヒューマンサイエンス振興財団「輸入熱帯病・寄生虫症に対するオーファンドラッグの臨床評価に関する研究班」から無償供与され、すでに臨床使用されているアーテミシニン誘導体の1種であるアーテスネートとメフロキ

ンとの相乗効果について検討した。

B. 研究方法

わが国での輸入マラリアの増加が注目され始めた 1970 年代初期には約 30% の症例にクロロキンが選択され、多くの患者がそれで治癒していたほか、当時は国内で入手できたスルファモノメトキシシン・ピリメサミン合剤 (MP 錠) もよく使用され、その単独療法、クロロキンとの併用療法、キニーネによる治療も実施されていた。また、1980 年に発足した厚生省研究班がスルファドキシシン・ピリメサミン合剤 (ファンシダール) の無償供与を開始し、それが 1987 年に承認されたこと、クロロキン耐性マラリアの出現が問題化するにつれ、ファンシダールの単独療法、もしくはファンシダールと他剤との併用療法が主力となった。

また、1991 年から研究班がメフロキンの供与を開始したことに加え、熱帯各地からクロロキン、ファンシダール耐性株の出現が報告されるに及び、1995 年の熱帯熱マラリア治療はほとんどメフロキンの単剤もしくは他剤との併用療法が主体となり、重症例にはキニーネの非経口療法が普遍化するに至った。さらに、1997 年からはアーテミシニン誘導体のアーテスネート、1998 年からはアトバコン・プログアニル合剤の供与も開始したため、1999 年にはメフロキンの単剤療法、あるいはメフロキンと他剤との併用療法も汎用されはじめ、その中にアーテスネートも含まれるようになった。そこで、熱帯熱マラリアに対する有効性が高く、患者の病悩期間の短縮を図る目的で、アーテスネートとメフロキンとの併用療法の効

果を検討することにし、下記に方法を駆使した。

①アーテスネート及びメフロキンの薬物動態を検討する目的で HPLC による患者検体の迅速定量法を確立した。

②アーテスネートを 1 日目 400mg、分 2、第 2~5 日目各 200mg 投与。次いでメフロキンを初回 500mg、6~8 時間後に 250mg (体重 45kg 以下) ~500mg (体重 45kg 以上) 投与した。なお、治療に際しては、事前に治療目的で、薬剤の特性、予想される副作用などについて十分説明し、文章で同意を確認してから投薬した。

③経時的に患者血中の薬物濃度を測定した。

④薬剤の治療効果を判定するため、経時的に採血、その塗抹ギムザ染色標本を作成、顕微鏡下で赤血球の原虫感染密度の推移、原虫の変性像などを観察した。

⑤必要な場合は、患者の血中抗原の消長も測定した。

C. 研究結果

①アーテスネートの先行治療により、発熱消失時間 (FCT) は 12~36 時間、原虫消失時間 (PCT) は 24~36 時間となり、特に初回投与 6~12 時間で原虫に変性像が観察されたが、薬剤服用による副作用はみられなかった。

②メフロキンを投与したが、 T_{max} は 4~6 時間、 C_{max} は 1,000ng/ml 前後、消失半減期は 14 日前後となり、アーテスネートを先行投与してもメフロキンの薬物動態には影響を及ぼさなかった。

③この治療による熱帯熱マラリアの治療

率は100%であった。

D. 考察

中国で開発されたアーテミスニンとその誘導体は生体内で活性代謝産物のジヒドロアーテミスニンに代謝され、熱帯熱マラリア原虫に高い濃度で濃縮され、その構造中の7員環における endoperoxide が切断されて活性酸素を発生させ、即効的な殺シゾン作用を呈するとされている。

また、アーテミスニンは難溶性であるため、この構造のC12位の酸素二重結合部をコハク酸に置換して水溶性にしたのがアーテスネートである。併用薬剤のメフロキンはキノネと同様に4-キノリンメタノール誘導体に属する薬物で原虫の膜構造や特異酵素に対する阻害が作用機序といわれる。

なお、多くの抗マラリア薬は構造式中にキノリン環を有するが、アーテスネートの構造は根本的に異なるため、両者を併用しても薬物相互作用はみられないとされている。

①アーテスネートは即効性であり、多剤耐性マラリアにも有効であるが、その単独療法では再燃率が高いのが難点である。そのためメフロキンによる後療法の追加が推奨されている。

②メフロキン投与の問題点は薬剤投与後、ときに嘔吐し薬剤を吐出することである。しかし、アーテスネートの投与を先行させた場合は、患者の臨床症状の軽快は早く、吐出頻度を減少させるようである。

E. 結語

アーテスネートとメフロキンとの併用療法はQOLの向上に結びつく治療法として期待できると思われ、さらに症例数を増やしてその有用性を検討する予定である。

D. 文献

- 1) WHO: Drugs used in parasitic diseases (2nd ed), Geneva, WHO, 1995, p.145
- 2) 大友弘士、早野真史、: 国内におけるマラリア治療とオーファンドラッグ、Prog. Med. 21:383-387, 2000
- 3) 大友弘士: 国内における抗マラリア薬の供給体制とその供与実績、治療、81:2256-2660,1999

抗マラリア薬複合投与の薬理遺伝学的研究

分担研究者 金子 明 東京女子医科大学国際環境・熱帯医学教室助教授

研究要旨

抗マラリア剤 proguanil (PG)は”prodrug”であり、cytochrome P450 (CYP) 2C19により cycloguanil (CG)に代謝されると原虫 dihydrofolate reductase (DHFR)阻害作用が発揮されると考えられてきた。この「poor metabolizer (PM)のマラリア患者においては PG が効かない。」という仮説に対して、PM が極めて高頻度(70%)で存在するヴァヌアツにおいて、PG 治療後マラリア患者の CYP2C19 に関する遺伝子型は PG 代謝の程度と強く相関したが、抗マラリア剤効果には関与しなかった。これは従来の仮説を否定するものであり、PG 自体が未知の抗マラリア作用を示すことが示唆された。更にヴァヌアツ 16 島 24 地域の住民 5538 名についての CYP2C19 に関する遺伝子型解析より、PM 遺伝子型は太平洋島嶼に広く分布しているかもしれないことが予測された。孤立した島嶼におけるマラリア伝播は、期間を限定した MDA、殺虫剤処理蚊帳および幼虫嗜好魚の組み合わせ戦略で、住民参加を効果的に組織し実施することにより継続的に抑制されることが示された。

A. 研究目的

地球上において、マラリア流行性が潜在的にも存在したことがないのは砂漠、高地、極地等のむしろ例外的な場所と言えよう。その範疇に属する第 4 の場所が一部の島嶼である。太平洋は、地球表面の 3 分の 1 を占める広大な空間に島嶼が点在する地域だが、東南アジア島嶼に引き続くマラリア帯はニューギニア、ソロモンを経てヴァヌアツに終わる。東経 170 度南緯 20 度の Buxton 線が知られ、それより東南のニューカレドニア、フィジーおよびポリネシアの島嶼には Anophelism が存在しない。

太平洋人類集団は古典的にその外観的特徴からメラネシアとポリネシアに分けられてきた。また言語学的にはパプア語（非オーストロネシア語）が話される地域と、東南アジア由来のオーストロネシア語地域に分類される。さらに考古学はニューギニア、ソロモン北部には数万年前から人類が存在していたが(Near Oceania)、ポリネシアに

人類が定住したのは数千年前からであることを明らかにした(Remote Oceania)。これらの事象は「太平洋人類はいつ、誰が、どこから、どのように定住したのか」という命題に帰結し、統一的な説明を試みた”Express train” (Diamond 1988), “Entangled bank” (Terrel 1988)等の仮説が提唱されている。Remote Oceania 人類の起源を、前者は東南アジア島嶼に求め、その定住過程において先住 Near Oceania 人類と係らなかったと見るのに対して、後者はその両者が交流した結果だとする。

太平洋島嶼マラリアの起源はこの人類定住過程と密接に関係するだろう。現在観察される当地域における人類、原虫さらに媒介蚊多型は、これら原初の定住様態を反映しつつ、個々の地域の生態・文化的特質およびそこに確立されたマラリア流行性による選択・修飾を受けた結果と考えられ、それらは現在マラリア対策に様々な影響を及ぼす。