

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

サルにおけるジピリダモールの抗マラリア効果の検討

分担研究者 大友弘志（慈恵医科大学・教授）

主任研究者 相川正道（東海大学総合科学技術研究所・教授）

研究協力者 川合 覚（独協医科大学・講師）

研究要旨

マウスにおけるジピリダモール (DP) の抗マラリア効果が再確認されたので、サルを用いて DP の抗マラリア効果を検討した。DP 投与群では、無投与群に比べて感染赤血球の増加が 1-2 日遅れる傾向が認められたが有意差は認められなかった。また、症状についても顕著な差は認められなかった。

A. 研究目的

熱帯熱マラリア培養系ならびにマウス重症マラリアモデルで DP の抗マラリア効果が認められた。マウスにおける DP の抗マラリア効果を再確認し、ヒトへの応用の可能性を検討するため、独協医科大学の川合覚博士の協力を得て、よりヒトに近いサルを用いて抗マラリア効果を検討した。

B. 研究方法

1. マウス実験

マウス：C57BL/6N マウス（メス、7 週齢）
25 匹に *Plasmodium berghei* ANKA を腹腔内投与し、DP 市販品（ペルサンチン）を静脈経路で 1mgDP を感染直前に 1 回ないし一日おきに 0-2 日目まで計 3 回投与した。対象 5 匹、1 回ないし 3 回投与 10 匹。

2. サル実験

サル：Macaca 属のサル（ニホンザル）3 歳齢、メス 4 匹 (J31、J33、J38、J41) 体重 3-3.5Kg

DP 投与：ペルサンチンを 5mg/kg 上腕静脈内に投与した。一匹 (J38) は感染直前、残りの一匹 (J41) は感染 8 日後、末梢血液中に原虫が出現した時点で DP 投与を行った。

マラリア感染：ニホンザルに *Plasmodium coatneyi* を感染させた。

採血方法：感染日および感染日から 3 日間隔で実施。血清については採取後ただちに凍結保存する。感染 7 日後以降は耳介より血液塗抹標本を作製。

（倫理面への配慮）

サルを用いた実験を行うに当たり、獨協大学の実験動物に関する指針に従い、実験許可を得て必要最小限の動物を使用した。なお、独協医科大学ではサルの感染実験を行う許可を得ている

C. 研究結果

マウスに対する抗マラリア効果：感染後 7 日目までは全個体が生存した。無投与群では感染後 9 日目までに全個体が死亡した。しかし、感染後 20 日目の DP 投与群では DP1 回投与群では 40%、3 回投与では 60% の生存率が認められ、DP の抗マラリア効果が再確認された。

サルに対する抗マラリア効果：無投与群の感染率は感染後 8、9 に 0.01% に達し、12 日目 (J31) 13 日目 (J33)、に最高値に達し、また投与群 (J38、J41) での感染は 10 日目に感染が認められ 14 日目に最高値に達した (図)。

しかし、1-2 日の感染の遅れは無投与群でもしばしば認められ、この差は有意ではなかった。マラリアの症状については両群間に明確な差は認められなかった。

D. 考察

本実験ではマウスに対する明確な DP の抗マラリア効果は認められたが、サルに対しては明確な DP の抗マラリア効果は認められなかった。その原因として、DP は速やかに血中に現れ、速やかに消滅することに起因すると考えられた。この点を改善するためには、投与方法を改善する必要があると考えられる。投与回数を増やすないし徐放性カプセルによる経口投与の方法が考えられる。

結論

サルを用いた本実験では明確な DP の抗マラリア効果は認められなかった。従って、現在、DP 投与回数を 3 回に増やし、必要量の 1/5 メフロキンとの同時投与を検討中である。

F. 研究発表

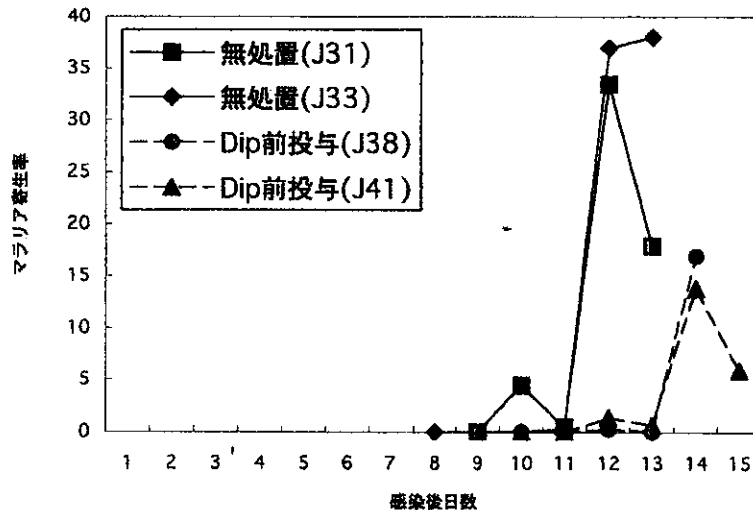
学会発表

相川、伊藤、大友その他、「イン・ビトロおよびイン・ビボにおけるディピリダモールの抗マラリア効果の検討」、第 42 回日本熱帯医学大会（東京）、平成 13 年 9 月 26 日。

G. 知的所有権取得状況

ナシ

サルのマラリア寄生率に対する DP の影響



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 金子 明 東京女子医科大学医学部 国際環境・熱帯医学 助教授

研究要旨

I. MSP-1 は有力なワクチン候補であるが、原虫株間で抗原性に著しい違いを示す。またそのハプロタイプの種類分布には地理的差異がある。ヴァヌアツ 4 島嶼における MSP-1 多型解析の結果は、この地域におけるリコンビネーションが極めて限られていることを示した。この結果は MSP-1 多型発生のメカニズムに新たな知見を加えるとともに、ワクチンによるマラリア制圧戦略に密接にかかわるものである。

II. マラウイでは 1993 年以降耐性原虫の増加(47%)によりクロロキン(CQ)投与が中止されている。1998, 2000 年当地で *in vitro* 薬剤耐性試験を行った熱帯熱マラリア原虫における *pfmdr1*(N86Y)、*pfprt*(K76T)変異について検討した。96 例中 CQ 耐性(CQR)原虫は 9%、*pfmdr1* 変異 48%、*pfprt* 変異 7%であった。両変異と CQR との関連は見られなかったが、*pfprt* 変異率は CQ を常用している他のアフリカ諸国より有意に低かった。これよりマラウイにおける CQ 薬剤圧の減少が *pfprt* 変異原虫を減少させ当地における CQ 感受性をもたらしたものと考えられるが、CQR 獲得には他の遺伝子多型が必要であることも推察された。

A. 研究目的

マラリアは、今尚人類の主要な死因である。マラリア対策においては地球規模問題として世界全体での取り組みとともに、個々の流行地域の生物学的、生態疫学のおよび社会文化的特性に即した戦略が必要であると考えられる。一方、マラリア伝播サイクル関わる人間、原虫、および媒介蚊の多様性が明らかにされつつある。これらは環境に応じ時間的に変異してきた結果、現在の地理的差異として認められ、対策要因に様々な影響を及ぼしていると考えられる。

我々はアジア・太平洋の島嶼環境におけるマラリアを主たる研究対象としている。アフリカの東に位置するマダガスカルを起点とすると、マラリアは大洋上をインドネシア、フィリピン、ニューギニアを経てメラネシア島嶼に分布しヴァヌアツで終わる。太平洋においては Buxton 線（東経 170 度、南緯 20 度）の南東にはハマダラカ属蚊が生息しない為にマラリア伝播はない。これらマラリア

島嶼には現在多様なコミュニティが生活を営むが、使用されている言語はニューギニアを除いてオーストロネシア語に属し、島嶼への人類拡散の起源とマラリア分布の関係について興味もたれる。我々はアフリカ・サハラ以南のマラリアを究極の対照としつつ、ヴァヌアツまでの島嶼コミュニティにおける人、マラリア原虫および媒介蚊の様々な遺伝学的多型の分布動態について、マラリア流行度や島嶼間距離などの自然環境および言語や住民移動などの社会環境との比較の上で解析する。さらにマラリア対策上の要因、つまり重症化、化学療法剤治療効果および流行パターンなどにおけるそれら多型の意義について検討する。究極的には島嶼マラリアの特性に適する対策戦略構築を目指している。

本年度は特に次の 2 課題について解析を進めた。

I. ワクチン候補である熱帯熱マラリアメロゾイト表面抗原 1 (MSP-1) のヴァヌアツ島嶼環境に於ける多型分布

II. マラウイにおけるクロロキン使用と熱帯熱マラリアクロロキン耐性遺伝子多型：アフリカにおいてはクロロキン耐性（CQR）熱帯熱マラリア原虫は1970年代後半より拡散してきているが、依然として多くの国・地域においては使用されている。最近、熱帯熱マラリア原虫 CQR の分子マーカーとして、*P. falciparum multiple drug resistance 1 (Pfmdr1)* および *P. falciparum chloroquine resistance transporter (Pfprt)* 遺伝子変異が示唆された。特に後者の K76T 変異は genetic cross による研究 (Fidock et al. 2000) やマリヤモザンビークにおけるフィールド研究 (Djimde et al. 2001; Mayor et al. 2001) によって CQR との強い相関が報告された。マラウイにおいては1993年 CQR 率増大に伴い、クロロキン使用が完全に中止されている。この状況下において CQR 表現型および提案されている分子マーカーがどうなっているのかについて検討した。

B. 研究方法

I. MSP-1 多型は蚊体内におけるリコンビネーションにより生み出される。ヴァヌアツの熱帯熱マラリア原虫集団での MSP-1 におけるリコンビネーション頻度を決定するために、5' および 3' 末端多型部位間の連鎖不均衡を解析した。4 島嶼からの計 141 例の原虫株について、5' 末端ハプロタイプ (MSP-1 blocks 2-6) を PCR によるタイピングにより決定した。その内 131 例についてはさらに 3' 末端多型 (block 17) をシーケンスにより検討した。

II. マラウイ、サリマ地域において 1998 および 2000 年の 2 回にわたり *in vitro* マイクロ・テストを現地にて実施し熱帯熱マラリア原虫 CQR を評価した。また国内に持ち帰った紙採血サンプルよりこれらの熱帯熱マラリア原虫における *pfmdr1*(N86Y)、*pfprt*(K76T) 変異について検討した。

C. 研究結果

I. 計 4 種の 5' ハプロタイプおよび 3 種の 3' シーケンスタイプが見出された。これらの頻度

分布は島嶼間で異なっていた。また各々の島における 5' ハプロタイプの個数は 1 から 4 であり、これまで報告されている様々な地域に比べて極めて少なかった (例：ヴェトナム 21、タイ 18、ブラジル 10、タンザニア 13)。すべての 4 島において 5' および 3' 多型間 (MSP-1 gene type) に極めて強い連鎖不均衡が見出された。また混合感染は稀であり (2.1%)、個人における MSP-1 タイプの数はほとんど 1 であった。各島嶼毎に計算された MSP-1 gene type の heterozygosity は $h = 0.41-0.65$ であり、同等のマラリア流行度の他地域 ($h = 0.81-0.89$) に比し有意に低かった ($P < 0.01$)。

II. マラウイにおいて *in vitro* 薬剤耐性試験を行った熱帯熱マラリア原虫 96 例中 CQ 耐性 (CQR) 原虫は 9%、*pfmdr1* 変異 (K76T) 48%、*pfprt* 変異 (N86Y) 7% であった。両変異と CQR との関連は見られなかったが、この *pfprt* 変異率は CQ を常用している他のアフリカ諸国より有意に低かった (例：マリ 41%、モザンビーク 83%)。マラウイの *pfmdr1* 変異率は他のアフリカ諸国と同様であった (例：マリ 50%、ウガンダ 56%)。

D. 考察

ヴァヌアツにおける MSP-1 多型解析の結果は、この地域におけるリコンビネーションが極めて限られていることを示す。また MSP-1 におけるリコンビネーションの頻度はマラリア流行度のみでなく、その地域に存在する MSP-1 遺伝子の頻度にも影響されることを示唆する。MSP-1 は有力なワクチン候補であるが、原虫株間で抗原性に著しい違いを示す。またそのハプロタイプの頻度分布には地理的差異がある。今回の研究は MSP-1 多型発生のメカニズムに新たな知見を加えるとともに、ワクチンによるマラリア制圧戦略に密接にかかわるものである。

マラウイにおける CQR 分子マーカーの解析は当地における CQ 薬剤圧の減少が *pfprt* 変異原虫を減少させ当地における CQ 感受性をもたらしたものと考えられるが、CQR 獲得には他の遺伝子多

型が必要であることも推察された。低 CQ 薬剤圧下においては Pfprt-K76T 変異を維持するのは costly であるのに対して、Pfmdr1-N86Y は no cost で維持されると考えられる。強い薬剤圧下においては、耐性に寄与する costly および non-costly な変異は両方とも選択されると考えられる。薬剤圧減少下において (完全には消えない)、前者が選択されないのに対して後者は残るであろう。

E. 結論

島嶼等の自然環境やマラリア治療政策等の人為的環境がマラリア原虫集団の様々な遺伝子変異分布に影響を及ぼしており、マラリア制圧戦略においてはこれらの要因を考慮する必要があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(原著論文)

Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, Tsukahara T, Kobayakawa T, Björkman A. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of Pfprt K76T in *Plasmodium falciparum* following withdrawal of chloroquine use in Malawi. Submitted.

Lindegardh N, Forslund M, Green M. D, Kaneko A, Bergqvist Y. Automated solid-phase extraction method for the determination of amodiaquine, chloroquine and their metabolites in capillary blood applied onto sampling paper by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 2002; 55: 5-12.

Sakihama N, Kaneko A, Hattori T, Tanabe K. Limited recombination events in merozoite surface protein-1 alleles of *Plasmodium falciparum* on islands. *Gene* 2001; 279 : 41-48

Sakihama N, Mitamura T, Kaneko A, Horii T, Tanabe K. Long PCR amplification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from

filter paper blots. *Exp Parasitol* 2001; 97: 50-54.

Kaneko A. Malaria dichotomy in the Pacific [Comment to Terrel et al. Foregone Conclusions? : In search of "Papuan" and "Austronesians". *Current Anthropology* 2001; 42: 97-124]. *Current Anthropology* 2001; 42: 115.

金子明, Yngve Bergqvist, 武地美保, 美田敏宏, Morris Kalkoa, 小早川隆敏, 石崎高志, Anders Björkman. ヴァヌアツにおける CYP2C19 多型と proguanil によるマラリア治療. 第 21 回日本臨床薬理学会年会 抄録、臨床薬理 2001;32(2): 331S-332S.

Bwijo Bwijo, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Lum J K, Kobayakawa T. Findings of decreased chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates of Malawi. *Clinical Parasitology* 2001; 12: 1: 145-147

美田敏宏, 金子明, Bwijo A, 塚原高広, 小早川隆敏, 武地美保. Malawi における熱帯熱マラリア原虫クロロキン耐性遺伝子 Pfprt および Pfmdr1 多型の検討. *Clinical Parasitology* 2001; 12: 1: 148-150

(著書)

Kaneko A, Nishiyama T. Drugs acting on parasites. In: Page, C.V. et al. (eds.), *Integrated Pharmacology* 2nd ed. London: Mosby 2002; In press.

(総説)

蟻田功、中谷比呂樹、松本慶蔵、金子明、中谷貴司. 日本がグローバル・リーダーシップを. *JICA フロンティア* 2001; 23; 4-7.

金子明. ラボと現場の「リエゾン」に. *JICA フロンティア* 2001; 23; 11.

2. 学会発表

Kaneko A. Malaria on Islands: Human and Parasite Diversities and Implications for Malaria Control in Vanuatu (Special

lecture). Proceedings of the 22nd Seminar of Tropical Medicine; 2002 Feb 22 ; Seoul, Korea. Seoul: Institute of Tropical Medicine, Yonsei University College of Medicine; p.17-24

Kaneko A. Malaria on Islands: Human and Parasite Diversities and Implications for Malaria Control (Special Lecture). Proceedings of The 17th Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology ; 2001 Dec 8 ; Taichung, Republic of China (Taiwan). P.11

金子 明. アジア・太平洋島嶼のマラリア問題. 第16回日本国際保健医療学会総会プログラム・抄録集; 2001年10月7-8日; 東京. P.169

Kaneko A, Lum J K, Takahashi N, Kalkoa M, Taleo G, Bergqvist Y, Kobayakawa T, Björkman A. Antimalarial proguanil and poor metabolizers in the Pacific. Abstracts of The informal meeting on Malaria on islands in Asia and Pacific ; 2001 Nov 8 ; Tokyo Japan. P.19

Tanabe K, Sakihama N, Kaneko A. Molecular population genetic characterization of *Plasmodium falciparum* in Vanuatu. Abstracts of The informal meeting on Malaria on islands in Asia and Pacific ; 2001 Nov 8 ; Tokyo Japan. P.21

Lum J K, Kaneko A, Mita T, Takahashi N, Syafruddin D, Marzuki S, Kobayakawa T. Genetic Relationships among Asian and Pacific human populations and their malarial parasites. Abstracts of The informal meeting on Malaria on islands in Asia and Pacific ; 2001 Nov 8 ; Tokyo Japan. P.23

Bwijo B, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Zungu I, Moriyama Y, Lum J.K, Kobayakawa T. Changing patterns of

antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* reflect the change of the national treatment policy in Malawi. Program and Abstracts of The 42nd Annual Meeting of Japanese Society of Tropical medicine ; 2001 Sep 23-24 ; Tokyo Japan. P.157

美田敏宏、金子明、塚原高広、武地美保、Bwijo B、Zungu I、小早川隆俊. Malawiにおける熱帯熱マラリア原虫クロロキン耐性遺伝子 *Pfprt* および *Pfmdr1* 多型. 第42回日本熱帯医学会大会プログラム・抄録 ; 2001年9月23-24日 ; 東京. P.159

Kaneko A. Vanuatu: The southwestern limits of Island Malaria. Program and Abstracts of 2nd International Eijkman Symposium ; 2001 Sep 2-6 ; Lido Lakes-Bogor, Indonesia. p.25

B. Bwijo, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Zungu I, Moriyama Y, Kobayakawa T. Findings of decreased chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates of Malawi. Program and Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Japanese Society of Clinical Parasitology ; 2001 Jun 9 ; Tokyo Japan. P.35

美田敏宏、金子明、塚原高広、武地美保、Bwijo A. Bwijo, Inocent Zungu, 小早川隆敏. Malawiにおける熱帯熱マラリア原虫クロロキン耐性遺伝子 *Pfprt* および *Pfmdr1* 多型の検討. 第12回日本臨床寄生虫学会プログラム・抄録集 ; 2001年6月9日 ; 東京. P.35

金子明、マラリア対策における infection と disease. 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会 プログラム抄録 ; 2001年4月4-6日 ; 山形. P.34

美田敏宏、金子明、塚原高広、武地美保、Bwijo A. Bwijo, Inocent Zungu, 小早川隆敏. フィールドサンプルにおける熱帯熱マラリア原虫

クロロキン耐性遺伝子 *Pfprt* 多型の検討. 第
70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物
学会合同大会 プログラム抄録; 2001年4月
4-6日; 山形. P.47

塚原高広、金子明、Bwijo A. Bwijo, Inocent Zungu、
武地美保、小早川隆敏. マラウイ国サリマで
の抗マラリア薬 *in vivo* 感受性試験予報ーク
ロロキン感受性は回復したか? 第70回日本
寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同
大会 プログラム抄録; 2001年4月4-6日;
山形. P.47

Bwijo B, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M,
Zungu I, Moriyama Y, Kobayakawa T.
Changing pattern of *in vivo* drug
resistance of *Plasmodium falciparum*
malaria in Salima, Malawi. Proceedings of
The Joint Meeting of The 70th Annual
Meeting of society of Medical Entomology
and Zoology; 2001 Apr 4-6; Yamagata
Japan. P.47

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Akaki M, Nagayasu E, Nakano Y, Aikawa M.	Surface charge of Plasmodium falciparum merozoites as revealed by atomic force microscopy with surface potential scopy.	Parasitol Res	88	16-20	2002
Akaki M, Nakano Y, Itoh Y, Nagayasu E, Aikawa M.	Effects of dipyridamole on Plasmodium falciparum infected	Parasitol Res (投稿中)			
Hamagami J, Yamaguchi G, Kanamura K, Umegami T.	IN SITU OBSERVATION OF APPATITE FORMATION ON BIOGLASS.	Key Eng Materl	218-220	279-282	2002
金村聖志	原子の針を用いた実験材料表面のその場観察	表面	39	433-442	
Sakihama N, Mitamura T, Kaneko A, Horii T, Tanabe K.	Long PCR amplification of Plasmodium falciparum DNA extracted from filter paper blots.	Exp Parasitol	97	50-54	2001
Sakihama N, Kaneko A, Hattori T, Tanabe K.	Limited recombination events in merozoite surface protein-1 alleles of Plasmodium falciparum on islands.	Gene	279	41-48	2001
Bwijo B, Kaneko A, Tsukahara T, Takechi M, Lum J K, Kobayakawa T.	Findings of decreased chloroquine resistance in Plasmodium falciparum isolates of Malawi.	Clinical Parasitology	12	145-147	2001
美田敏宏, 金子明, Bwijo A, 塚原高広, 小早川陸敏, 武地美保.	Malawiにおける熱帯熱マラリア原虫クロロキン耐性遺伝子 PfcrtおよびPfmdr1多型の検討.	Clinical Parasitology	12	148-150	2001

20010725

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。