

MATERIALS AND METHODS

Study area

This study was conducted at Davao Regional Hospital in Tagum City, Davao del Norte Province, located in southeastern Mindanao Island (Fig 1), between August 1999 and March 2001. In this province, malaria transmission occurs throughout the year, with two peaks, one in July/September and the other in December/January. *Plasmodium falciparum* is the predominant parasite species, whereas the frequency of *P. vivax* is about 30%. All areas of Davao del Norte Province, except Tagum City, are known to be highly endemic for malaria, with the incidence of cases ranging from 0.2 to 47.9 per 1,000 population in 1993 (Pilarita *et al*, 1999). Chloroquine is currently the drug of choice for the treatment of uncomplicated malaria. Most hospitalized patients come from Asuncion, Kapalong, Laak, and Compostella in Davao del Norte Province, or from the nearby provinces of Agusan del Sur and Davao Oriental (Fig 1).

Patients and sampling strategy

Fifty-seven isolates of *P. falciparum* were obtained from symptomatic Filipino patients admitted to Davao Regional Hospital. Giemsa-stained thin blood smears were examined for iden-

tification of *Plasmodium* species. After informed consent was obtained from the patients, venous blood was collected in a tube coated with EDTA (Venoject vacuum tube, Terumo, Tokyo, Japan). All samples were drawn before any medication was given. Part of each blood sample (2 ml) was mixed with an equal volume of stock solution (glycerol 35 g, D-sorbitol 3.0 g, NaCl 0.65 g in 100 ml distilled water) for freezing and was preserved in a dry, liquid nitrogen shipping container (Vapor Shipper, MVE Inc, New Prague, MN) for transport to Tokyo, where the samples were stored in liquid nitrogen until use.

In vitro drug susceptibility test

Thirty-three of the 57 *P. falciparum* isolates were successfully cultivated and used for *in vitro* drug susceptibility testing. The *in vitro* drug susceptibility test used in this study was a modified semi-microtest described previously (Inaba *et al*, 2001). The cryopreserved blood sample was cultured by the standard method using a multi-gas incubator until parasitemia reached at least 1%. The parasites were then synchronized with 5% D-sorbitol for 15 minutes at room temperature and were washed with RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Rockville, MD) 3 times by centrifugation at 400g for 5 minutes. After washing, the erythrocytes were resuspended in RPMI 1640

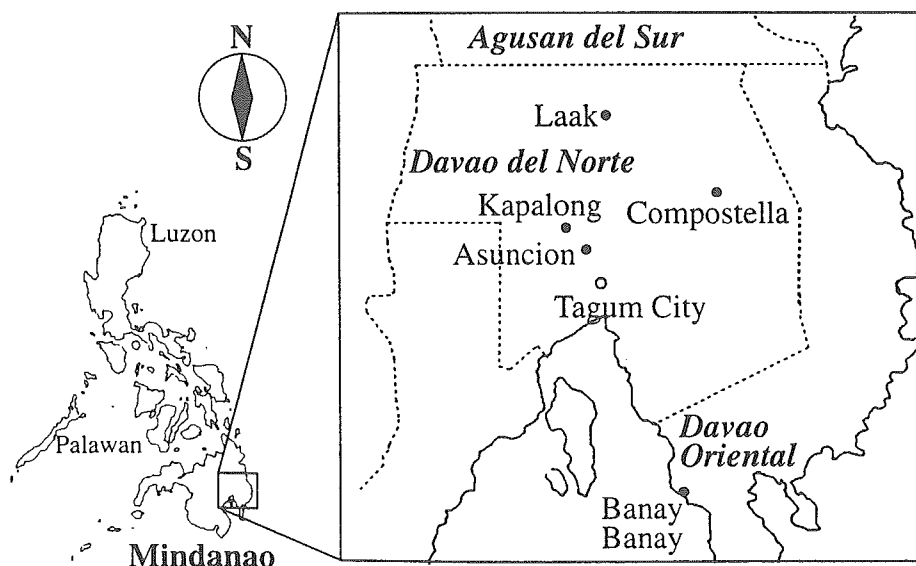


Fig 1—Location of Davao del Norte Province on Mindanao Island and the locations of the cities where the survey was conducted.

medium supplemented with 10% human serum (from non-immune Japanese donors without a previous history of malaria), 25 mM HEPES, 25 µg ml⁻¹ gentamicin, and sodium bicarbonate at a hematocrit of 5% and initial parasitemia of 1-5%. Five hundred microliters of the erythrocyte suspension were placed in each well of a tissue culture plate (24-well flat bottom, Corning Costar, New York, NY). Twenty microliters of chloroquine diphosphate were added to each well to give a series of doubling dilutions from 20 to 10,240 nM. To monitor parasite growth, six wells per plate served as controls without chloroquine. After 24 hours' incubation, the control wells were monitored for parasite growth by observing Giemsa-stained thin-smear specimens. If the trophozoites had not matured to schizonts, the control wells were checked every 6 hours thereafter. When the schizonts were observed to be fully grown in the control wells, the culture plate was removed from the incubator. Thin-smear specimens stained with Giemsa solution were made from the contents of each well, and the numbers of erythrocytes counted under a microscope in the control smears until 50 schizonts were encountered. The effect of chloroquine on parasite growth was evaluated by observing the decreased numbers of schizonts per equal numbers of erythrocytes counted previously in the control cultures. The growth inhibition effect (%) was calculated as follows: test well schizont count/control well schizont count (50) x 100.

Data analysis

The drug concentration inhibiting parasite growth by 50% (IC₅₀) was calculated by the probit method (Inaba *et al*, 2001; de Franciso *et al*, 1988). Isolates with IC₅₀ values between 80 and 114 nM were considered to have decreased susceptibility, and those with IC₅₀ ≥ 114 nM were regarded as resistant (Inaba *et al*, 2001). The threshold of the IC₅₀ value for mefloquine resistance was considered to be 40 nM (Milijaona *et al*, 2000). The Student's *t*-test or Welch's *t*-test were used for statistical analysis. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The clinical characteristics of the 33 malaria

Table 1
Characteristics of study patients grouped by city of origin.

	Asuncion	Kapalong	Laak (Davao del Norte Province)	Compostella	Agusan (Agusan del Sur Province)	Banay Banay (Davao Oriental Province)
No. of patients	10	5	8	3	4	3
Male/female	7/3	1/4	5/3	3/0	2/2	2/1
Age (years)	24.4±11.8	37.4±21.5	18.8±11.5	22.9±7.6	21.8±10.6	36.7±10.2
Body temp (°C)	38.6±0.82	37 (n=2)	38.04±1.25 (n=5)	37.4±1.38	39.2±0.25	37.6±0.96
Hgb (g/l)	96.65±19.64	95.5 (n=2)	89.93±33.33 (n=4)	91.13±30.58	99.13±13.88	105.9±15.4
Parasite count (µl)	49,618.4±26,10.7	33,700 (n=1)	40,363.3±33,327.3	448,799.7±565,000.2	14,300.0±2,066.7	17,700 (n=2)

Mean±SD data are shown.

Table 2
Susceptibility of Mindanao isolates of *P. falciparum* to chloroquine, by province.

	Davao del Norte	Agusan del Sur	Davao Oriental
No. of isolates tested	2	6	3
Susceptible (IC ₅₀ <80 nM)	6 (23.0)	1 (25.0)	3 (100)
Decreased susceptibility	10 (38.5)	2 (50.0)	0
Resistant (IC ₅₀ ≥ 114 nM)	10 (38.5)	1 (25.0)	0
With IC ₁₀₀ ≥ 640 nM	17 (65.4)	2 (50.0)	1 (33.3)
Minimum IC ₅₀ (nM)	37	27	43
Maximum IC ₅₀ (nM)	263	187	75
Mean IC ₅₀ ±SD (nM)	110 ± 54	104 ± 42	64 ± 14

Mean±SD data are shown.

Percentages are shown in parentheses.

patients on admission are summarized in Table 1. There were no significant differences in age, sex, body temperature, or hemoglobin concentration between the groups of patients from different locales. The results of the *in vitro* chloroquine susceptibility tests are shown in Table 2. Twenty-six of the 33 isolates of *P. falciparum* originated from Davao del Norte, 4 isolates were from Agusan del Sur, and 3 were from Davao Oriental. Of the 33 isolates, 11 (33%) were resistant to chloroquine, 12 (36%) had decreased susceptibility, and 10 (30%) were found to be susceptible. The IC₅₀ values for chloroquine varied from 27-263 nM, with a geometric mean (±SD) of 104 (±53) nM. Ten of the 11 (91%) resistant isolates and 10 of the 12 (83%) isolates with decreased susceptibility were from Davao del Norte Province. One of the 11 resistant isolates and 2 of the 12 isolates with decreased susceptibility were from Agusan del Sur Province. All the isolates from Davao Oriental Province were considered chloroquine-susceptible. The geometric mean (±SD) of IC₅₀ values [110 (±54) nM] recorded for the isolates from Davao del Norte Province was higher than that recorded for the isolates from Agusan del Sur Province [104 (±42) nM], but the difference was not significant. The geometric mean (±SD) of IC₅₀ values for the isolates from Davao Oriental Province [64 (±14) nM] was significantly lower than that for the isolates from Davao del Norte Province (p=0.006).

Detailed results of *in vitro* chloroquine sus-

ceptibility testing in *P. falciparum* isolates from towns in Davao del Norte Province are shown in Table 3. The highest IC₅₀ (263 nM) to chloroquine was recorded for one isolate from Asuncion, which is located in southern Davao del Norte Province. Of ten isolates from Asuncion, six (60%) were resistant and three (30%) had decreased sensitivity to chloroquine. The IC₅₀ values of these isolates to chloroquine varied from 55-263 nM, with a geometric mean (±SD) of 133 (±41) nM. Isolates from Kapalong, located in southern Davao del Norte Province close to Asuncion, showed IC₅₀ values in the range 51-129 nM. The geometric mean (±SD) of the IC₅₀ values of the Kapalong isolates (82 (±25) nM) were significantly lower than the isolates from Asuncion (p = 0.025). Eight isolates from Laak, which is located in northern Davao del Norte Province, had IC₅₀ values of 41-224 nM, with a geometric mean (±SD) of 108 (±36) nM. Differences between the mean IC₅₀ values of isolates from Laak and those from Asuncion were not significantly different. Three isolates from Compostella, which is located in eastern Davao del Norte Province, had IC₅₀ values of 37-104 nM. The geometric mean (±SD) of the IC₅₀ value of the Compostella isolates [75 (±25) nM] was significantly lower than the Asuncion isolates (p = 0.043). The seven isolates from Asuncion, Laak, and the provinces of Agusan del Sur and Davao Oriental were successfully tested for susceptibility to mefloquine and all proved highly susceptible to mefloquine (IC₅₀ values < 10 nM) (data not shown).

Table 3
Susceptibility of Davao del Norte isolates of *P. falciparum* to chloroquine by city of origin.

	Asuncion	Kapalong	Laak	Compostella
No. of isolates tested	10	5	8	3
Susceptible (IC ₅₀ < 80 nM)	1 (10.0)	2 (40.0)	2 (25.0)	1 (33.3)
Decreased susceptibility	3 (30.0)	2 (40.0)	3 (37.5)	2 (66.7)
Resistant (IC ₅₀ ≥ 114 nM)	6 (60.0)	1 (20.0)	3 (37.5)	0
With IC ₁₀₀ ≥ 640 nM	7 (70.0)	2 (40.0)	8 (100)	0
Minimum IC ₅₀ (nM)	55	51	41	37
Maximum IC ₅₀ (nM)	263	129	224	104
Mean IC ₅₀ ± SD (nM)	133 ± 41	82 ± 25 ^a	108 ± 36	75 ± 25 ^a

Mean ± SD data are shown; ^ap < 0.05 compared with isolates from Asuncion.

DISCUSSION

To call attention to the emergence and spread of drug-resistant malaria in the Philippines, the current state of drug susceptibility of *P. falciparum* isolates on Mindanao Island was investigated. The results indicated that two groups of parasites with different susceptibility to chloroquine were distributed in Davao del Norte Province. Three genes, *pfmdr1*, *cg2*, and *pfcr1* have been reported to be responsible for resistance of *P. falciparum* to chloroquine in other parts of the world (Adagu *et al*, 1999; Babiker *et al*, 2001; Wellems *et al*, 2001). The varieties of chloroquine susceptibility seen in Davao del Norte isolates may be attributed to differences in mutations of one or more of these genes. The genetic backgrounds of the isolates should be further investigated to determine how parasites with various degrees of chloroquine resistance are spreading in this province.

Distribution of chloroquine-resistant malaria parasites in Davao del Norte Province was regionally limited, and the levels of parasite drug-resistance were generally low. Le Bras *et al* (1984) reported that the median IC₅₀ value for chloroquine obtained by *in vitro* testing was less than 120 nM in 22 isolates from patients who had been successfully treated with chloroquine, whereas the IC₅₀ was more than 250 nM in isolates from 6 patients with clinically chloroquine-resistant malaria. Based on these results, the *P. falciparum* isolates categorized as chloroquine-resistant in the present study by *in vitro* testing may still be sensitive to chloroquine *in vivo*. Counter-measures

should be taken before chloroquine becomes ineffective on Mindanao Island (Hastings *et al*, 2000; Rathod *et al*, 1997). For example, distribution of mefloquine may be a therapeutic option because mefloquine has not yet been used in the Mindanao region, and the results of this study indicated that all Mindanao isolates tested so far were susceptible to mefloquine. Combination therapy with 4-aminoquinolines (chloroquine or amodiaquine) and sulfadoxine-pyrimethamine (Bustos *et al*, 1999; Staedke *et al*, 2001; McIntosh *et al*, 1998) may also be an alternative strategy because sulfadoxine-pyrimethamine is already currently available as the second drug of choice for uncomplicated malaria in the Mindanao region.

This is the first report showing the presence of chloroquine-resistant *P. falciparum* on Mindanao Island by *in vitro* test. To prevent the spread of chloroquine-resistant malaria parasites, current control measures, such as community-based control programs should remain in effect, and control measures based on new prophylaxis or treatment schemes should be carried out simultaneously. In addition, diligent applications of *in vitro* drug susceptibility testing is advantageous in monitoring the distribution of drug-resistant *P. falciparum* in the region.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr Tabada, Provincial Health Officer; Dr Romulo Busuego,

Chief of Davao Regional Hospital; and the doctors in the Department of Internal Medicine, Davao Regional Hospital, for their assistance and support. This study was supported by an International Health Cooperation Research grant (11A-4, 13C-5) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Adagu IS, Warhurst DC. Association of *cg2* and *pfmdr1* genotype with chloroquine resistance in field samples of *Plasmodium falciparum* from Nigeria. *Parasitology* 1999; 119: 343-8.
- Alrajhi AA, Rahim I, Akood M, Hazmi M. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* cerebral malaria in a chloroquine-susceptible area. *J Infect Dis* 1999; 180: 1738-41.
- Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance gene *pfmdr1*. *J Infect Dis* 2001; 183: 1535-8.
- Baird JK, Caneta-Miguel E, Masbar S, *et al.* Survey of resistance to chloroquine of falciparum and vivax malaria in Palawan, the Philippines. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 413-4.
- Bustos DG, Canfield CJ, Canete-Miguel E, Hutchinson DB. Atovaquone-proguanil compared with chloroquine and chloroquine-sulfadoxine-pyrimethamine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in the Philippines. *J Infect Dis* 1999; 179: 1587-90.
- de Francisco Serpa LA, Chiadini PL, Hall AP, Warhurst DC. *In vitro* drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* malaria from Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 403-4.
- Hastings IM, D'Alessandro U. Modelling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today* 2000; 16: 340-7.
- Inaba H, Ohmae H, Kano S, *et al.* Variation of incubation time in an *in vitro* drug susceptibility test of *Plasmodium falciparum* isolates studied in the Solomon Islands. *Parasitol Int* 2001; 50: 9-13.
- Le Bras J, Deloron P, Hartmann JF, Coulanges P, Dourado HV, Larouze B. Application of an *In vitro* semi-microtest to the study of drug sensitivity of 66 *Plasmodium falciparum* isolates from 15 countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78: 485-8.
- McIntosh HM, Greenwood BM. Chloroquine or amodiaquine combined with sulfadoxine-pyrimethamine as a treatment for uncomplicated malaria—a systematic review. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 265-70.
- Milijaona R, Jambou R, Raharimalala L, Ranaivo L, Rason MA, Roux J. Mefloquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* in Madagascar: impact on tourists and public health. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 313-7.
- Okonkwo PO, Akpala CO, Okafor HU, Mbah AU, Nwaiwu O. Compliance to correct dose of chloroquine in uncomplicated malaria correlates with improvement in the condition of rural Nigerian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 320-4.
- Pilarita TR, Prudencio MA, Sarol J, *et al.* Clinical and laboratory correlates of the outcome of cerebral malaria in the Philippines. *Jpn J Trop Med Hyg* 1999; 27: 487-95.
- Pribadi W. *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and other antimalarials in East Timor and East Kalimantan, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992; 23 (suppl 4): 143-8.
- Rathod PK, McErlean, Lee PC. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9389-93.
- Shute GT, Ray AP, Sanglang R. Preliminary studies on a Philippine strain of *Plasmodium falciparum* resistant to amodiaquine. *J Trop Med Hyg* 1972; 75: 125-32.
- Staedke SG, Kanya MR, Dorsey G, *et al.* Amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine, and combination therapy for treatment of uncomplicated falciparum malaria in Kampala, Uganda: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 368-74.
- Thanh NV, Cowman AF, Hipgrave D, *et al.* Assessment of susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, quinine, mefloquine, sulfadoxine-pyrimethamine and artemisinin in southern Viet Nam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 513-7.
- Verdrager J, Arwati, Simanjuntak CH, Saroso JS. Chloroquine-resistant falciparum malaria in East Kalimantan, Indonesia. *J Trop Med Hyg* 1976; 79: 58-66.
- Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001; 184: 770-6.
- White NJ. The treatment of malaria. *N Engl J Med* 1996; 335: 800-6.

16. マラリア

狩野繁之*1 増田剛太*2

はじめに

マラリアを他の熱病から区別し、その熱型を詳細に記載したのは Hippocrates (前 460~377 頃) である。ところが彼はマラリアを沼沢の水を飲むことにより罹る感染症であると考えた。その後「瘴気説」は 2,000 年にわたってヨーロッパ医学を支配し、マラリアという言葉がイタリア語で mala (悪い)・aria (空気) を意味するように、高温多湿で不快な「悪い空気」がその原因であると考えられてきた。病原体が明らかにされたのは、1878 年に Charles Louis Alphonse Laveran が、アルジェリアの軍病院で死亡した患者の病理組織中に、核が明瞭な原虫をはじめ確認したことによる。そしてマラリア原虫がハマダラカ属 (*Anopheles*) によって媒介されることは、1897 年になってようやく Ronald Ross により解明されたのである (Laveran および Ross はその業績によりそれぞれノーベル賞を受賞した)。このようにマラリアの病理学の歴史が始まって 1 世紀以上が現在までに経ち、さまざまな病態研究とその成果に立脚した対策が行われてきたが、いまだに熱帯、亜熱帯地域にその流行は拡散し、世界の年間罹患者数は 3~5 億、死亡者数は 150~270 万人と見積もられている¹⁾。我が国の輸入マラリア患者数も増加の傾向にあり、2000 年にはすでに 150 人に至っている²⁾。本稿では、世界に猖獗する再興感染症であるマラリアの臨床症状を病理学的な視点で概説する。

I. マラリア原虫の生活史と病理

蚊の唾液腺からヒトの末梢血中に刺入されたマラリア原虫をスポロゾイトとよぶが、スポロゾイトは直ちに肝細胞の中に侵入してそこで分裂増殖を繰り返す

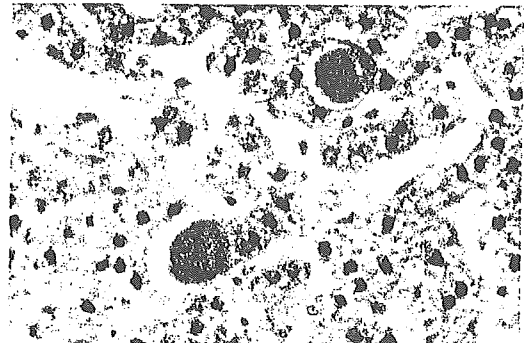


図1 肝内型原虫分裂体(HE染色) 成熟した肝内型の分裂体は、直径がおおよそ45~60 μ mで、中に1~3万個のメロゾイトを包蔵する³⁾。図中に2つの分裂体が観察される。

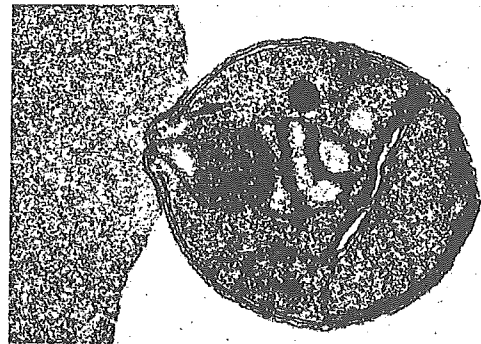


図2 赤血球に侵入するマラリア原虫のメロゾイト(透過型電子顕微鏡像)(東京大学相川正道客員教授の提供による)

(図1)。肝内型の原虫が分裂体(シゾン)に成熟するのにおよそ1週から1月かかるが、この期間はヒトは無症状であり、いわゆるマラリアの潜伏期にほぼ一致する。三日熱マラリア原虫と卵形マラリア原虫は、肝内で緩徐に分裂する休眠体(ヒプノゾイト)とよばれるステージがあることが知られている。ヒプノゾイトが数ヵ月から1年後に肝内からメロゾイトを血中に放出すると、ヒトは再発 relapse を起こすことになる。

赤内型のステージにおけるメロゾイトは洋梨のような形をしており(図2)、長径おおよそ1.5 μ mで、頂端付近には赤血球への侵入に関わる構造を備えている。その尖端は正に荷電しており、陰性に荷電した赤血球膜に接着することができると考えられている⁴⁾。メロ

*1 国立国際医療センター研究所

*2 東京都立沼瀬小児病院

ゾイトは徐々に赤血球膜を押し込みながら中に侵入し(図2),最終的に裏返った赤血球膜の中に包まれるように入り込む⁶⁾。メロゾイトは赤血球の中で栄養体(トロホゾイト)からシizontへと分裂増殖し,赤血球を破壊してメロゾイトを血中に放出する。この赤内型の生活史を繰り返すことで宿主であるヒトに病気を起こすことになる。

マラリアの確定診断は,末梢血中の赤血球に寄生する原虫を顕微鏡下に観察することで行われる。薄層塗抹標本をメタノールで固定して,ギムザ染色を施し,油浸レンズを用いて1,000倍で観察する。トロホゾイトが寄生した赤血球の代表的な形態を図3に示す。ヒトに感染する4種のマラリア原虫は,この形態により鑑別することができる。

II. 重症マラリアの病理

熱帯熱マラリアはヒトを重症化に陥らしめ,適切な治療が早期に施されないと不幸な転帰をとることがまれではない。特に脳症状が合併したいわゆる脳性マラリア cerebral malaria は死亡率が高い。他の3種類のマラリアでは,患者はこのような重症化に陥らないが,熱帯熱マラリアに特異的な以下の病理学的な所見からその理由が理解される。

1. knobの形成

熱帯熱マラリア原虫が,赤血球内で成熟していく過程で,赤血球膜表面上に電子密度の高い突起 knob が形成されることが電子顕微鏡像で確認される⁶⁾。この knob の形成は,他の3種のヒトマラリア寄生赤血球では起こらないが,サルのマラリア原虫の一種である *P. coatneyi* が感染したニホンザルの赤血球で再現することができる⁷⁾(図4)。この knob は PfEMP1 などを代表とする一連の抗原変異の激しい原虫由来蛋白で,この knob を介して,寄生赤血球は血管内皮細胞や非感染赤血球と接着することができる⁸⁾。原子間力顕微鏡を用いてこの knob を解析すると, knob の表面は正に荷電(+20mV)しており,負に荷電した赤血球膜や血管内皮細胞膜との接着に電気的にも関わることが示唆されている⁹⁾。

2. ロゼットの形成

感染赤血球の周りに非感染赤血球が接着してロゼッ

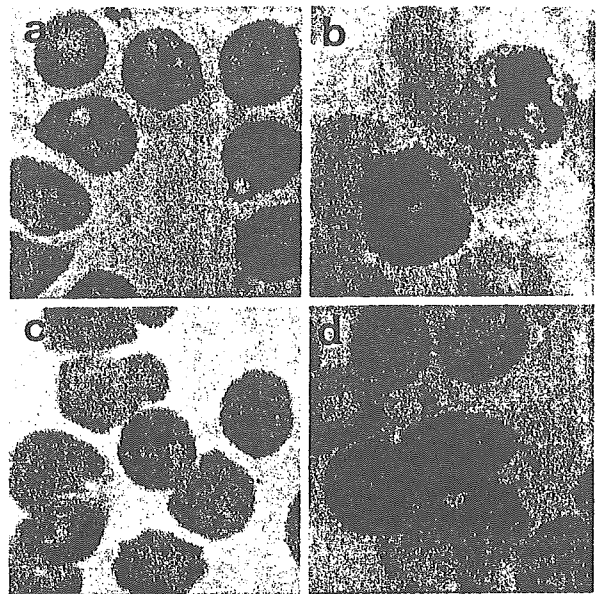


図3 ヒトに感染する4種のマラリア原虫(ギムザ染色薄層塗抹標本像) a:熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*) 赤血球に感染した原虫が指輪のような形態(ring form)を示す。ringの石に相当する赤い部分が核,紫色の輪の部分が細胞質。感染赤血球が膨化しないのが特徴。b:三日熱マラリア原虫(*P. vivax*) 感染した赤血球は膨化し,原虫は成熟すると細胞質がアメーバ状に非定型的な形態をとる。シュフナーの斑点が著明。c:四日熱マラリア原虫(*P. malariae*) 原虫が赤血球内で一文字に伸長する带状体(band form)を示すと典型的。感染赤血球は膨化しない。d:卵形マラリア原虫(*P. ovale*) 感染赤血球が膨化し,卵形を呈すると典型的。長軸端が鋸歯状になることも多い。シュフナーの斑点も著明。

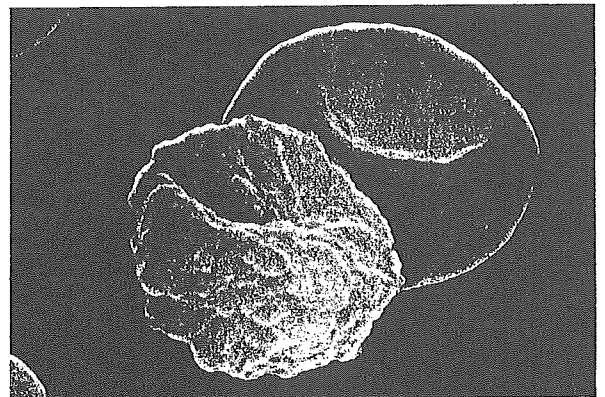


図4 knobが表面に突出したマラリア原虫寄生赤血球(走査型電子顕微鏡写真に着色)(獨協医大川合覚博士の提供による)

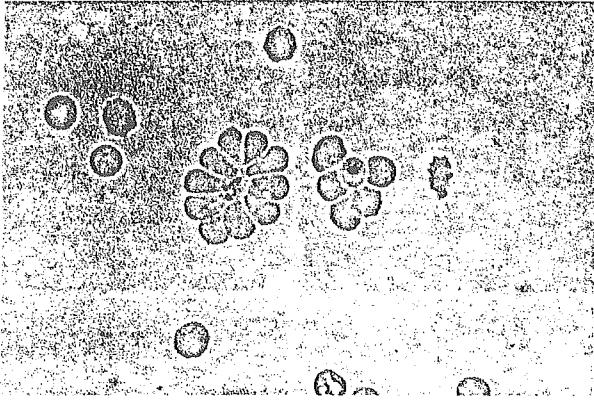


図5 ロゼットの形成(光学顕微鏡像,×1,000) マラリア原虫寄生赤血球を中央に非寄生赤血球が花冠状に取り巻く像(ロゼット)が観察される。

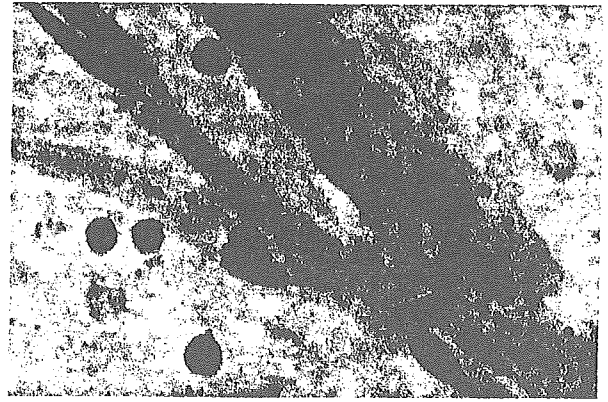


図7 脳性マラリア患者の脳スタンプ標本像(ギムザ染色) 脳の微小血管の中にマラリア原虫が粒状に観察され、血管を閉塞している様子が観察される。紡錘状を呈しているのは血管内皮細胞の核。

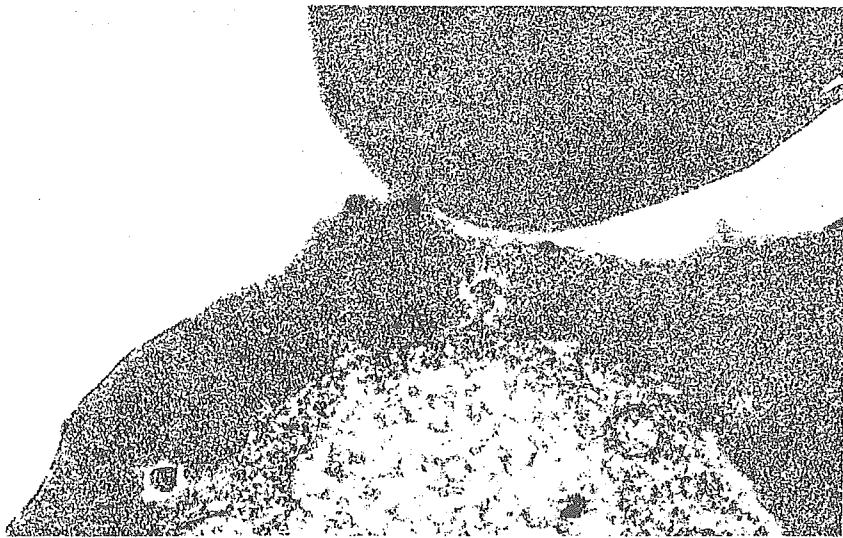


図6 マラリア原虫寄生赤血球に接着する非寄生赤血球(透過型電子顕微鏡写真)

トを形成することが(図5)、重症マラリアの病理の第一ステップとして考えられている¹⁰⁾。透過型電子顕微鏡写真でロゼットを観察すると、確かに knob を介して接着が起きていることが認められる¹¹⁾(図6)。近年このロゼット形成に関わる赤血球側のレセプターの解析も進み、また重症マラリア患者から分離した感染赤血球はロゼットを形成しやすいという *in vitro* での報告もある¹²⁾。ロゼットは微小血管を通過することができずに閉塞を起こし、血球凝集塊を形成する重症マラリアの病理組織像 sequestration をよく説明することができる。

3. 組織への接着と増員増殖

脳性マラリアを合併し死亡した患者の脳組織標本を

観察すると、微小血管に寄生赤血球がぎっしりと詰まっている像が観察されることが多い(図7)。電子顕微鏡像でさらに詳細に観察すると、寄生赤血球は血管内皮細胞と knob を介して接着していることが認められる^{7,13)}(図8)。このような病理組織像から、脳における血流量の低下が脳性マラリアの本体であるものと考えられる。しかしながら、死亡した患者の脳組織における梗塞像、壊死像、大量出血像、炎症像はきわめてまれであり、focal ring hemorrhage が皮質下の微小血管を中心に認められるくらいである¹⁴⁾。

マラリア原虫寄生赤血球の接着に関わるさまざまな血管側のレセプター分子も明らかにされ、CD36, intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), endothelial-leukocyte adhesion molecule-1(ELAM-

図8 微小血管での感染赤血球の接着(透過型電子顕微鏡写真) マラリア原虫が寄生した赤血球が観察されるが、その赤血球表面をよく見ると、電子密度の高い(黒い)突起(knob)がいくつも観察され、そのknobを介して内皮細胞の表面に接着している様子が認められる。

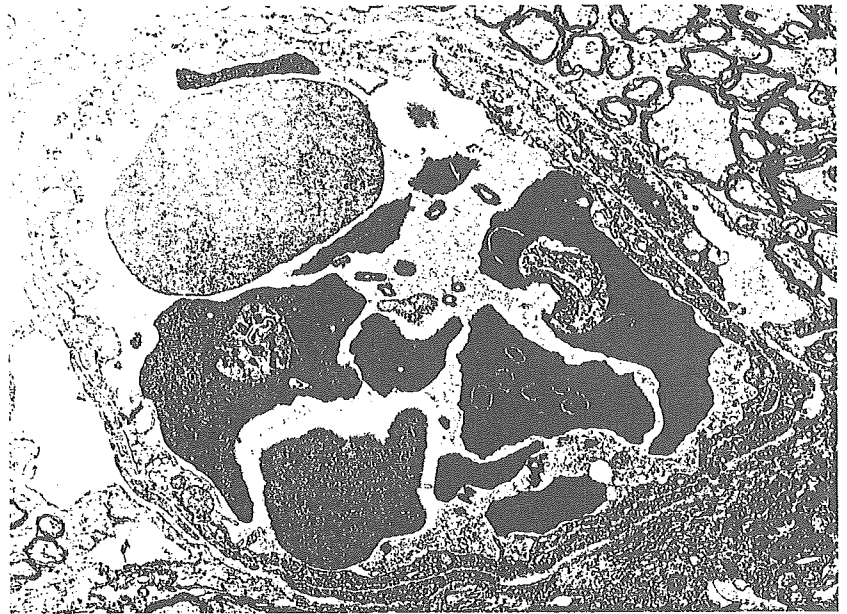


図9 マラリア原虫の deep vascular schizogony (透過型電子顕微鏡写真) *P. coatneyi* 感染ニホンザルの肺の病理組織像。肺の毛細血管に接着して分裂したシizontの中に、いくつものメロゾイトが明瞭に観察される(獨協医大川合寛博士の提供による)。

1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), thrombospondin(TSP)等が重要な分子として同定されている¹⁵⁾。マラリア原虫はこのようにシizontに分裂増殖する際に、諸臓器の深部微小血管などに接着して血流を阻害しながら、効率よく新しい赤血球にメロゾイトを寄生させていることが推測される(図9)。

III. 重症マラリアの合併症と病理

マラリアを疑う患者を目の前にしたら、まず上記のギムザ染色標本中の原虫の検出に取り掛かるべきであ

る。熱帯熱マラリア原虫が顕微鏡下に認められたら、その赤血球寄生率をカウントし、重症の指標とする必要がある。図10に不幸にも亡くなった日本人輸入マラリア患者の末梢血塗抹像を示す。WHOは、マラリアに対して免疫力をもたない患者では、赤血球寄生率が4%以上で重症マラリアと定義している¹⁶⁾(表1)。重症マラリアの合併症は、ほとんどが上記の病理組織所見と高度な赤血球寄生率で説明がつく。マラリアの治療は、あくまでも末梢血中のマラリア原虫を排除しないことには始まらないが、寄生率20%を超えるような患者に不用意に抗マラリア薬を投与し、かえって溶血性貧血を助長させ、腎不全を惹起させてしまうこ



図10 重症マラリアを合併し死亡した患者の末梢血薄層塗抹標本像(ギムザ染色)

ともある。表1に示す個別の合併症には、それぞれ十分な対症療法が必要となる。

IV. マラリアに伴う腎障害の病理

熱帯熱マラリアで腎不全を合併する例では、肉眼的なマクロ所見で腎の腫大、うっ血、出血巣が、光顕的なミクロ所見では、メサンギウム領域の細胞の増多と免疫複合体の沈着による糸球体腎炎の像が観察されることがある。重症化が進んだ例では、遠位尿細管の変性・壊死、近位尿細管の混濁変性が認められることもある¹⁷⁾。

四日熱マラリアではネフローゼ症候群を合併することがあり、腎糸球体の基底膜やメサンギウム領域に免疫複合体の沈着が認められる。慢性化すると、毛細血管基底膜の肥厚や断裂を伴う膜性増殖性糸球体腎炎を呈する¹⁸⁾。

V. 重症マラリア症例

我が国において輸入熱帯熱マラリア患者を診た場合、発症後5日以内に適切な治療が開始されないこと、患者の致死率が50%に及ぶとの報告がある¹⁹⁾。早期

表1 WHO重症マラリア基準(文献16より抜粋)

臨床症状	疲憊 意識障害 呼吸困難 痙攣の多発 循環虚脱 肺水腫 異常出血 黄疸 ヘモグロビン尿	子どもの場合は座ってられないような状態、大人であれば極端な疲労感 昏睡状態や痛覚鈍麻、いわゆる脳性マラリア状態 肋間が窪むほどの努力性の深呼吸、呼吸性アシドーシス等 眼球の一方向性の挙上を伴うなどの巢性の痙攣が多い 血圧低下や皮膚の冷感、脈が触れづらいなどが目安となりうる 肺X線像の所見による 歯ぐき、鼻、網膜、消化管出血等。血小板減少症等も併発 眼球鞏膜、口腔粘膜等 黒褐色の尿で顕微鏡学的に血尿を認めず、尿検査用 dipstick 試験で Hb 陽性
検査データ	重症貧血 低血糖 酸血症 高乳酸血症 高原虫血症 腎機能傷害	子供ではヘモグロビン値<5g/dlまたはヘマトクリット値<15%、大人ではヘモグロビン値<7g/dlまたはヘマトクリット値<20%が目安 血中グルコース濃度<2.2mmol/l、または<40mg/dl 血漿重炭酸塩濃度<15nmol/l、動脈血pH<7.35 血漿乳酸値>5mmol/l 免疫をもたない患者では赤血球寄生率4%が目安、20%以上で確定 子供では尿量<12ml/kg/24h、大人では<400ml/24hが目安。または高クレアチニン値>265μmol/lまたは>3mg/dlの腎不全状態

診断と早期治療が患者を救命するための鍵となる。本稿の最後に、不幸にして重症マラリアを合併して死亡した日本人輸入マラリア患者症例とその病理所見を提示して、マラリア患者の適切な臨床管理のための礎としたい。

症 例：40 歳，日本人男性，公務員。

現病歴：2000 年 7 月 24 日からフィリピンのマラリア流行地に滞在していた。8 月 9 日よりめまいを自覚し，8 月 10 日には 39°C 台の発熱，頭痛，不眠が出現した。8 月 11 日から 13 日まで同島の病院に入院したが，8 月 12 日からは下痢も認められた。そのときはマラリアや腸チフスの診断は下されなかった。8 月 14 日，日本に帰国。発熱，下痢が持続するため，翌 8 月 15 日に U 病院を受診した。血液塗抹標本に赤血球寄生率 7% の熱帯熱マラリア原虫が認められた。全身の黄疸も著明であった。8 月 16 日より，抗マラリア薬であるキニマックス点滴静注，メファキン内服，さらにアーテスネート坐薬の投与を行った。血小板数が 9,000/ μ l まで減少したので，血小板輸血も行った。低酸素血症，肺水腫には酸素投与も開始した。8 月 17 日に，肝機能，腎機能の増悪を認め，K 病院に転院となった。

K 病院入院時現症：意識状態は JCS1，肝脾腫，下腿に軽度の浮腫を認めた。

K 病院入院時検査所見：マラリア原虫寄生赤血球率は 15% に上昇していた。肝機能，腎機能の一層の増悪，心電図上洞性頻脈，胸部 XP で心陰影の拡大を認めた。

K 病院入院後経過：重症熱帯熱マラリアの診断で，キニマックス，ミノマイシン，アーテスネートの追加を行った。また尿量確保を目的にドパミンの持続投与も行った。8 月 18 日早朝に突然痙攣を発症し，まもなく心肺停止となり，気管内挿管・心マッサージを行うも，およそ 2 時間後に再度心肺が停止し死亡した。

剖検所見：脳に著明なうっ血と腫大が認められた。脳全体に，顕微鏡的な微小な出血壊死像が数多く認められたが，赤血球に感染したマラリア原虫が集合して閉塞している像は認められなかった。肝臓は全体的に黄色調を帯び，うっ血腫大を認めた。脾臓も著明なうっ血腫大を認め，剖面では皮膜下に地図状の梗塞があった。心臓はうっ血と浮腫が著明。末期に発生した虚血によるものと考えられる巣状壊死像が，固有心筋に散見された。腎臓は髄質を中心としたうっ血と浮腫性腫大が認められ，組織学的には間質が浮腫性に拡大していた。糸球体には著変は認めないが，一部の糸球体



図 11 糸球体を中心とする病理組織像(HE 染色)

ではボウマン嚢内への赤血球の漏出が起きていた(図 11)。肺も両側に著明なうっ血を認めた。また右肺上葉の肺動脈末梢枝内に血栓を認めた。上行結腸を中心に出血性のびらんが多発しており，潰瘍形成を伴った逆流性食道炎も認められた。以上総合的に判断して，主な死因は熱帯熱マラリアによる末梢循環不全に伴う多臓器不全と考えられた。

おわりに

マラリアの病理学は，特に重症マラリアの症状を理解し患者の治療を効果的に行うために大いに有用である。すなわちマラリアの治療薬やワクチンの開発へ向けての基礎的な知見を提供してきた。しかしながらマラリアの重症化を病理所見だけでは説明しきれないような病態も観察され，今後さらなる分子病態論が病理学の中で発展することが望まれている。マラリアの完全制圧にむけた臨床病理研究の成果に期待が集まっている。

謝辞：東京都立駒込病院病理科の船田信頭先生，滝澤登一郎先生に助言を頂いたことを付記する。

文 献

- 1) WHO: World malaria situation in 1994, Part I. Wkly Epidemiol Rec 1998, 72: 269
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター: マラリア発生動向調査, 2002
- 3) Gilles, H. M.: The malaria parasites. Bruce-Chwatt's Essential Malariaology (Gilles, H. M. and Warrell, D. A. eds.), 3rd ed., Edward Arnold, London, 1993, 12-34

- 4) Seed, T. M., Aikawa, M., Sterling, C. et al. : Surface properties of extracellular malaria parasites : morphological and cytochemical study. *Infect Immun* 1974, 9 : 750-761
- 5) Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J. et al. : Erythrocyte entry by malaria parasites : a moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* 1978, 77 : 72-82
- 6) Aikawa, M., Rabbege, J. R., Udeinya, I. et al. : Electron microscopy of knobs in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Parasitol* 1983, 74 : 435-437
- 7) Kawai, S., Aikawa, M., Kano, S. et al. : A primate model for severe human malaria with cerebral involvement : *Plasmodium coatneyi*-infected *Macaca fuscata*. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 48 : 630-636
- 8) Fujioka, H. and Aikawa, M. : The molecular basis of pathogenesis of cerebral malaria. *Microb Pathog* 1996, 20 : 63-72
- 9) Aikawa, M., Kamanura, K., Shiraishi, S. et al. : Membrane knobs of unfixed *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes : new findings as revealed by atomic force microscopy and surface potential spectroscopy. *Exp Parasitol* 1996, 84 : 339-343
- 10) Howard, R. and Gilladoga, A. D. : Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria. *Blood* 1989, 74 : 2603-2618
- 11) Kawai, S., Kano, S. and Suzuki, M. : Rosette formation by *Plasmodium coatneyi*-infected erythrocytes of the Japanese Macaque (*Macaca fuscata*). *Am J Trop Med Hyg* 1995, 53 : 295-299
- 12) Carlson, J., Helmby, H., Hill, A. V. S. et al. : Human cerebral malaria : association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet* 1990, 336 : 1457-1460
- 13) Aikawa, M. : Human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1988, 39 : 3-10
- 14) Kano, S. and Aikawa, M. : Pathology and pathophysiology of malaria. *Jpn J Trop Med Hyg* 1999, 27 : 471-476
- 15) Aikawa, M., Iseki, M., Barnwell, J. W. et al. : The pathology of human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1990, 43 : 30-37
- 16) WHO : Severe falciparum malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2000, 94(supple 1) : 1-31
- 17) 鈴木 守, 相川正道 : マラリア感染に伴う腎障害. 腎と透析 1998, 44 : 384-389
- 18) 相川正道 : シリーズ・目で見る感染症(38)マラリア. 化学療法の領域 1996, 12 : 4-7
- 19) 海老沢功, 小原 博, 田辺清勝 : 熱帯熱マラリア治療における開始遅延の意義. 日熱医誌 1991, 19 : 49-56

II. グローバル時代の感染症学

原虫感染症

マラリア

Malaria

狩野繁之

Key words : マラリア, 薬剤耐性マラリア, 輸入マラリア, 再興感染症, グローバリゼーション

1. グローバル時代のマラリア

近年一段と進むグローバリゼーションに伴い、マラリアの流行を地球規模で再興(re-emerge)させるファクターを考え直すための社会・経済・環境学的な議論が高まっている。マラリアの疫学評価を行うと、地図上にべったりと濃く色塗られた高度流行地域であっても(図1), 実はそこに均一に患者が分布しているのではなく、流行の発生フォーカスは極めて狭い範囲であることが認識される¹⁾。それは媒介蚊であるハマダラカの飛翔距離の問題, 集落であれ都市であれそこに定住するヒトの生活様式の問題, そして両者が行動圏を共有する自然環境の問題などが相互に影響し合っている結果であって、マラリアの伝播を支える生態系が成り立つには極めて厳しい条件が必要になることがわかる。すなわち、マラリアはもともとはローカルな病気であったと考えられるのである。ところがこの微妙なバランスを一方的に崩し、むしろマラリアの流行をグローバルに増大させる方向に生態系全体を無理やり動かしているのは、多くの場合我々人間であることによく気づくようになったのである。

例えば流行地における開発事業の問題がある。古くはダム建設や森林伐採, そして農地開拓など、人の社会・経済活動によって結果的に蚊

の棲息域を拡大し、そこに爆発的なマラリアの流行を招いた例があった。またそれらの開発が大規模に行われることに伴う地球の温暖化現象は、地域の異常気象や干ばつなどをもたらし、更なる媒介蚊の棲息域の拡大やヒトの移動までを余儀なくさせる。人口移動の問題としてはこのほかにも、自然災害や内乱・戦争などが大規模な難民の発生をもたらし、マラリアの流行状況を一変させることがあり、最近のアフガニスタン国境における難民キャンプの事例をみても明らかである。マラリア非流行地から流行地に人が移住する場合はもちろんのこと、マラリア流行地から非流行地に原虫を運んで人が集まる場合も大きな問題となっている²⁾。

一方、ジャンボジェットなどの同時大量高速輸送機で即日地球の裏側にでもたどり着けるようになった現代、マラリアは世界のどの地域でも発生し、もはや熱帯地特有の病気とはいえない時代となっている。マラリアのグローバリゼーションとはまさにこのような現状を指すものとも考えられる。例えば北米や西欧諸国などの移民が、里帰りでアフリカの流行地から戻って来たときに発症する‘輸入マラリア’が重大な関心事項となっている。英語で‘VFRs(visiting friends and relatives)のマラリア’と区別しており、イギリスではアフリカへの一般旅行者の3倍のリスクがVFRのマラリア発生率に認めら

Shigeyuki Kano: Department of Appropriate Technology Development and Transfer, Research Institute, International Medical Center of Japan 国立国際医療センター研究所適正技術開発・移転研究部

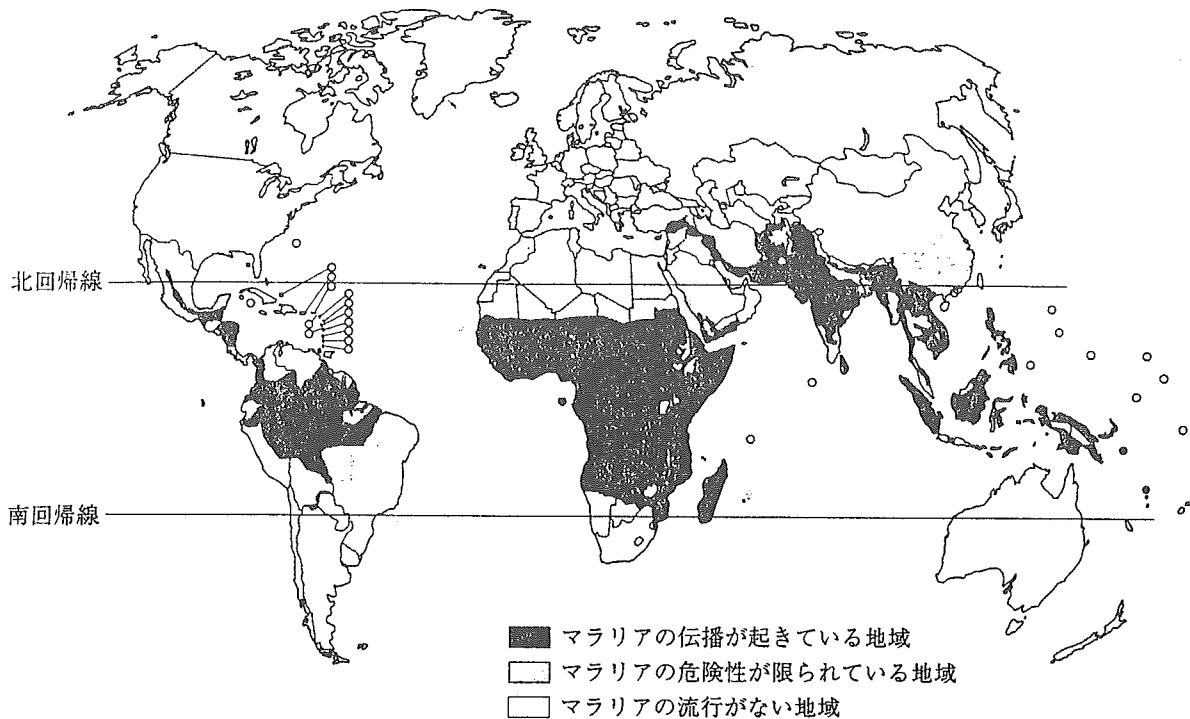


図1 世界のマラリア流行地図

およそ世界の熱帯・亜熱帯地域に年間3-5億人のマラリア患者が発生する。
(WHO: International Travel and Health, 2002より引用・一部改変)

れている³⁾。

我が国の平成13年の日本人出国者数は16,215,657人で(法務省出入国管理局統計), その数は同年の米国同時多発テロ事件の影響を受けて前年度から160万人ほど減少はしたものの, 傾向としては年々増加の一途をたどり, それに伴って輸入マラリア患者数も増加の傾向にある。1990年には年間患者数が初めて100人を超えたが⁴⁾, 2000年にはその数は既に150人となっている⁵⁾。その中には, 適切な診断と治療が得られずに死亡する例が毎年出ており, 我が国もマラリアをはじめとする熱帯病のグローバル化の波に足下を洗われていることを認識しなくてはならない。

2. マラリアとグローバルな経済損失

マラリアと貧困は密接に関連している。どちらが主たる原因で結果であるかは議論があるが, お互いに状況を悪くし合っていることは容易に想像がつく。1人当たりの国民純生産(gross domestic product: GDP)を色の濃さで表した図を

示すが(図2), この濃淡のパターンが, 図1のマラリアの流行地図の色の分布パターンとおよそ正反対であることは明らかである。マラリア高度流行地域の国々の所得を平均すると, そうでない国々の所得平均のおよそ1/5ほどになってしまうのである⁶⁾。過去50年あまりで, 幾つかの熱帯地域の島国や亜熱帯に属する国々でマラリアの対策に成功したが, それらの国々の周辺諸国と比べた経済成長の著しさは, 台湾やジャマイカの例をみれば一目瞭然であり, いかにもマラリアの対策の成功が国の経済の発展に寄与するかが理解できる。

マラリアを‘社会的疾病’として, 人がマラリアになった場合の労働力の損失, その賃金の損失, 治療代, 死亡した場合にはその命の値段などを考慮し, DALYs(disability adjusted life years)という単位を採用して, すなわち‘1DALYは健康にして失った1年’と換算すると, 世界のマラリアによる経済的損失額は総額で39 millions DALYsと算出される⁷⁾。もちろん人の生命を経済的に評価することは適当でない場合もあ

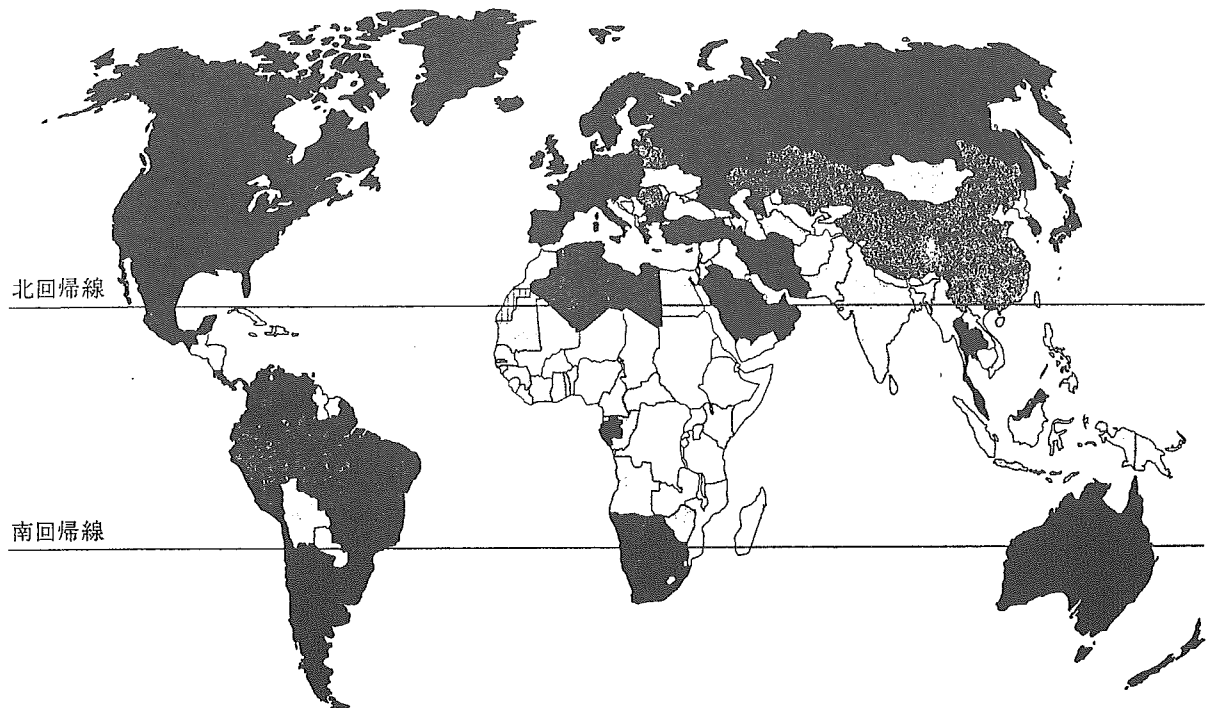


図2 1人当たりの国民純生産, 1995(文献⁹⁾より引用・一部改変)
色の濃さはGDPの高さを表す。日本やアメリカなど色濃い地域はおよそ22,000-30,000ドル、アフリカの熱帯諸国など最も色の薄い地域は1,000ドル以下である。

るが、マラリアの対策費用の正当性を客観的に認識するにはDALYsは極めて有用な指標となり得る。このようにしてマラリアによるグローバルな経済的損失の重大性を認識することができるが、やがて就学率や教育効果などの要素を含めた未来的社会損失をあわせて考える必要が出てくるであろう。

3. マラリア患者管理のグローバルスタンダード

a. 新しい診断法の開発

患者を重症化に陥らせず適切な治療に導くために最も大切なことは、いかに迅速かつ正確にマラリアと診断できるかである。従来よりマラリアの確定診断は、ギムザ染色を施した患者末梢血の薄層塗抹標本を顕微鏡で観察し、赤血球に感染したマラリア原虫を検出することによる。本法は古典的ではあるけれども、診断としての確実性、簡易性、迅速性を総合すれば、他の高度な診断法の追随を許さない。特に熱帯地で重大なファクターである診断コストの面で最も廉

価であり、本法が世界中のマラリア流行地に広く浸透している所以でもある。我が国の輸入マラリア患者を診断する場面においても、顕微鏡観察による診断が他のあらゆる臨床検査に優先されるべき基本診断法となるので、各医療機関における検査診断能力の一層の向上が望まれるところである。

一方、患者末梢血中のマラリア原虫由来の特異的蛋白を免疫学的な手法を応用して検出できる簡易法がキット化され、市販のレベルに到達している⁹⁾。原虫特異蛋白に対するモノクローナル抗体が帯状に張り付けてある短冊状濾紙(ディップスティック)に、少量の末梢全血を染み込ませる。陽性検体ではモノクローナル抗体に一致して紫色の線が認められる(図3)。本法は熟練した技術を必要とせず、1検体10分程度で検査が終了する。すなわち鋭敏性、簡易性、迅速性に優れ、マラリア流行の周辺地域で顕微鏡や電気設備がない所でも正しい診断に導ける有用な検査法として認識されだしている。今後我が国におけるマラリア診断法としても、そ

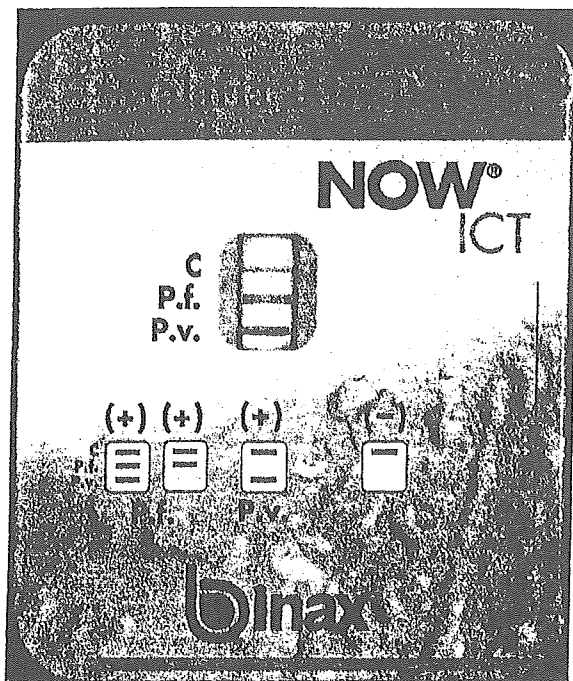


図3 Now® ICT Malaria P.f./P.v. for Whole Blood (Binax, USA)

原虫特異的 HRP-II (histidine-rich protein II) 蛋白を検出する簡易キット。中央の小窓にディップスティックが見えるが、C (対照)、P.f.、P.v. のすべてのバンドが出ているので、熱帯熱マラリア原虫陽性と判定される。

の導入の必要性が高まるものと考えられる。

b. 新しい臨床評価

マラリアの患者の臨床評価を正しく行うことが、患者の治療方針の決定や臨床管理を適切に進めるうえで極めて重要である。マラリアのいわゆる三大徴候は、発熱、貧血、脾腫であるが、いずれも末梢血中のマラリア原虫赤血球寄生率に左右される。この寄生率を正しく顕微鏡下にカウントする技術が臨床評価で必要となる。

重症マラリアで脳性マラリアを合併し死亡した患者の脳病理組織標本を顕微鏡で観察すると、細い血管にびっしりとマラリア原虫感染赤血球が詰まっているのがみられる。電子顕微鏡で更に拡大してこの感染赤血球を観察すると、赤血球表面に小さいぼつぼつとした突起物 (knob) が認められる (図4)。この knob を介して感染赤血球は血管内皮細胞や非感染赤血球と接着し、毛細血管の血流を阻害して脳症状を患者に引き

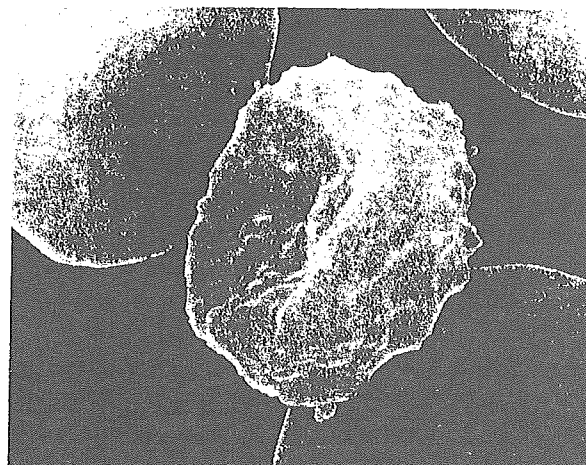


図4 マラリア原虫感染赤血球の走査電子顕微鏡像
(獨協医大熱帯病寄生虫・川合 寛博士の提供による)

起こす。WHO が新たに書き換えた重症マラリアの指標を示すが (表1)⁹⁾、それらの病態の多くはこの病理学的考察で説明がつく。また、大人と子供では合併症の発生頻度や予後の判定基準としての重要性に若干の差が認められるので注意を要する。マラリア患者を診断するときは、表1の重症マラリアの基準に常に照らし合わせ、適切な治療法の選択と患者の管理に当たらなくてはならない。

c. 新しい治療方針

我が国においてマラリア患者に投与することができる処方例 (薬価収載、健保適用) は、具体的には次の2法に限られる。

(1) ファンシダール錠 (スルファドキシシン 500 mg・ピリメサミン 25 mg 合剤)

通常成人には3錠単回投与

(2) メファキン‘エスエス’錠 275 (塩酸メフロキン 275 mg)

通常成人には体重に応じて、

30 kg 以上 45 kg 未満：初回2錠、6-8時間後に1錠

45 kg 以上：初回2錠、6-8時間後に2錠

しかしながら、これらの薬剤に耐性を示す熱帯熱マラリアの報告が世界に多いので、再燃を来した例などでは、Malarone™ (atovaquone 250 mg・proguanil hydrochloride 100 mg 合剤) や Coartem™ (artemether 20 mg・lumefantrine

表 1 WHO 重症マラリア基準(文献⁹⁾より抜粋)

臨床症状	
疲 憊	子供の場合は座ってられないような状態, 大人であれば極端な疲労感
意識障害	昏睡状態や, 痛覚鈍麻いわゆる脳性マラリア状態
呼吸困難	肋間が窪むほどの努力性の深呼吸, 呼吸性アシドーシスなど
けいれんの多発	眼球の一方向性の挙上を伴うなどの巣性のけいれんが多い
循環虚脱	血圧低下や, 皮膚の冷感, 脈が触れづらいなどが目安となり得る
肺水腫	肺 X 線写真の所見による
異常出血	歯ぐき, 鼻, 網膜, 消化管出血など. 血小板減少症なども併発
黄 疸	眼球鞏膜, 口腔粘膜など
ヘモグロビン尿	黒褐色の尿や dipstick 法などによる
検査データ	
重症貧血	子供ではヘモグロビン値<5g/dl またはヘマトクリット値<15%, 大人ではヘモグロビン値<7g/dl またはヘマトクリット値<20%が目安
低血糖	血中グルコース濃度<2.2mmol/l, または<40mg/dl
酸血症	血漿重炭酸塩濃度<15nmol/l, 動脈血 pH<7.35
高乳酸血症	血漿乳酸値>5mmol/l
高原虫血症	免疫をもたない患者では赤血球寄生率4%が目安, 20%以上で確実
腎機能障害	子供では尿量<12ml/kg/24h, 大人では<400ml/24h が目安. または高クレアチニン値>265 μ mol/l または>3mg/dl の腎不全状態

120mg 合剤)などが有用である。また, 重症を来した例では, キニーネの製剤(QuinimaxTM)やチンハオス誘導体(ArtesunateTM)などを駆使しながら患者の全身管理に当たらなければならない。(薬剤の入手法は, 著者または厚生労働省科学研究費補助金・創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「熱帯病に対するオーファン

ドラッグ開発研究」班ホームページ <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/didai/orphan/index.html> より問い合わせる。)

追記 本稿は「厚生労働省国際医療協力研究委託費(13公2)」による研究成果の一部を含む。

■ 文 献

- 1) Rivera PT, et al: Application of seroepidemiology in identification of local foci in a malarious community in Palawan, the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 49: 608-612, 1993.
- 2) 狩野繁之, 大友弘士: マラリア流行対策の標石. 別冊・医学の歩み: 地球規模での寄生虫病対策の時代(多田 功編), p19-23, 医歯薬出版, 2001.
- 3) Loutan L: Migrants; malaria prevention for particular travelers. In: *Travelers' Malaria* (ed by Schlagenhauf P), p285-302, BC Decker Inc, London, 2001.
- 4) Ohtomo H, Takeuchi T: Studies on current trend of imported malaria in Japan. *Jpn J Trop Med Hyg* 26: 151-156, 1998.
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター: マラリア発生動向調査, 2002.
- 6) Gallup JL, Sachs JD: The economic burden of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64(1, 2 Suppl): 85-96, 2001.
- 7) WHO: Burden of infectious diseases. In: *Report on Infectious Diseases, Removing Obstacles to Healthy Development*, p2-13, WHO, Geneva, 1999.
- 8) Wongsrichanalai C, Gasser RA Jr: Current status of malaria rapid diagnostic devices: un update. *Trends Parasitol* 18: 107-108, 2002.
- 9) WHO: Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(Suppl 1): 1-31, 2000.

IV. 感染症特論

薬剤耐性原虫

薬剤耐性マラリア

Drug resistant malaria

狩野繁之

Key words : マラリア, クロロキン, 薬剤耐性, 熱帯熱マラリア原虫

1. 概念と疫学

抗マラリア薬に対する耐性とは、一般に推奨される投与量以上の許容範囲内の薬物量が患者に投与され吸収されているにもかかわらず、ある単一の原因株(strain)が生き残り分裂増殖することができる能力をいう¹⁾。マラリア原虫の薬剤標的部位の機能または構造にかかわる分子、または薬剤がそのターゲットに到達するのにかかわる分子に何らかの突然変異が起こり、原虫は薬剤耐性の形質を獲得しているものと考えられており、これにいわゆる薬剤淘汰(drug selection)の現象が加わって、耐性マラリアが拡散してゆくことになる。

この薬剤耐性原虫の selection は、治療効果が得られる濃度以下の薬剤曝露環境が血中に整うと加速されると考えられており、品質の悪い薬剤の流通や不適切な薬剤投与方法などがその原因となり得る。更には、抗マラリア薬のうち、血中からの除去半減期が長いものほど耐性が獲得されやすい傾向があること、抗マラリア薬の使用頻度が高い地域ほど耐性の出現頻度が著しいこと、媒介蚊の棲息密度が高く、それによる伝播が頻繁かつ時間的にも長い流行地域は耐性マラリアの流行が広がりやすいことなど、生物学的、環境学的な多因子が薬剤耐性の疫学にかか

わる。一方、我々ヒト側のファクターとして、人口移動による薬剤耐性マラリア原虫の拡散は、災害、戦争、飢饉などが引き金となって大規模に起こり、世界における再興感染症の代表例として大きな問題となっている。

2. 分 布

マラリアの撲滅の歴史を振り出しに戻すほどに大問題となった出来事が、1950年代後半に起こり始めた。マラリアの特効薬として全世界に定着したクロロキン(chloroquine)に対する薬剤耐性マラリアの報告が、世界の2カ所のフォーカス(コロンビアおよびタイ・カンボジア国境)から同時に出たのである²⁾。以後、クロロキン耐性マラリアは世界中に拡散し、現在その耐性の報告がないのは中央アメリカ、中国、中近東の一部だけである(図1)¹⁾。特にタイおよびその周辺、オセアニア、アマゾン川流域、そして東アフリカにおける高いクロロキン耐性度が、それらの地域におけるマラリア対策を極めて困難にしている。

また、我が国でファンシダールという商品名で流通している合剤、スルファドキシシ(sulfadoxine)/ピリメサミン(pyrimethamine)に対する高い耐性の報告も、アマゾン川流域、東南アジア全領域(カンボジア東部と北ベトナムを除

Shigeyuki Kano: Department of Appropriate Technology Development and Transfer, Research Institute, International Medical Center of Japan 国立国際医療センター研究所適正技術開発・移転研究部



図1 薬剤耐性マラリア流行地図(文献¹⁾より引用・一部改変)

く)に広がっている。メフロキン(mefloquine)に対する耐性は今やタイにおいては日常的に認められ、カンボジアとミャンマーとの国境付近では50%以上がそうであると報告されている³⁾。更には、ブラジルのアマゾン川流域やアフリカ地域におけるメフロキン耐性株の出現も報告されだしている¹⁾。

多剤耐性マラリアの治療には、古典的な抗マラリア薬であるキニーネ(quinine)が有効であることが多いが、このキニーネの有効性の低下も東南アジアの幾つかの国やブラジルで報告されている(図2)³⁾。

また三日熱マラリアのクロロキンに対する耐性の報告も、1989年にパプアニューギニアおよびインドネシアで報告され、同地域での感受性の低下が問題となっている。散発的なクロロキン耐性三日熱マラリアの報告は、その後ブラジル、グアテマラ、ギニア、インド、ミャンマーでも確認されている¹⁴⁾。更に、三日熱マラリア原虫の肝内型ステージに有効な薬剤であるプリマキン(primaquine)に対する感受性が低下している報告も散見される³⁾。四日熱マラリアの

クロロキンに対する臨床的な耐性が、初めてインドネシアから報告された⁹⁾。卵形マラリアの薬剤耐性は現在のところ認められていない。

3. 薬剤耐性のメカニズム

薬剤耐性を起こすメカニズムは単独な原因によるものではなく、複雑な事象の積み重ねによる宿主内での原虫の動向がそう観察されるものであると考えられるが、分子レベルでの薬剤耐性メカニズムが近年徐々に明らかになり、耐性克服のための研究につながる可能性が出てきている。

クロロキンは赤血球に寄生したマラリア原虫の酸性度の高い食胞中に濃縮されてゆき、原虫のヘモグロビン代謝におけるヘムの重合(polymerization)を阻害する。すなわち原虫はヘムを無毒化することができずに死ぬことになる。感受性株の食胞中のクロロキンの半減期は数時間であるのに、耐性株ではわずか数分となっており、急速なクロロキンの排出が耐性株において認められる。この機序をつかさどる遺伝子は熱帯熱マラリア原虫のクロモゾームの7番目に

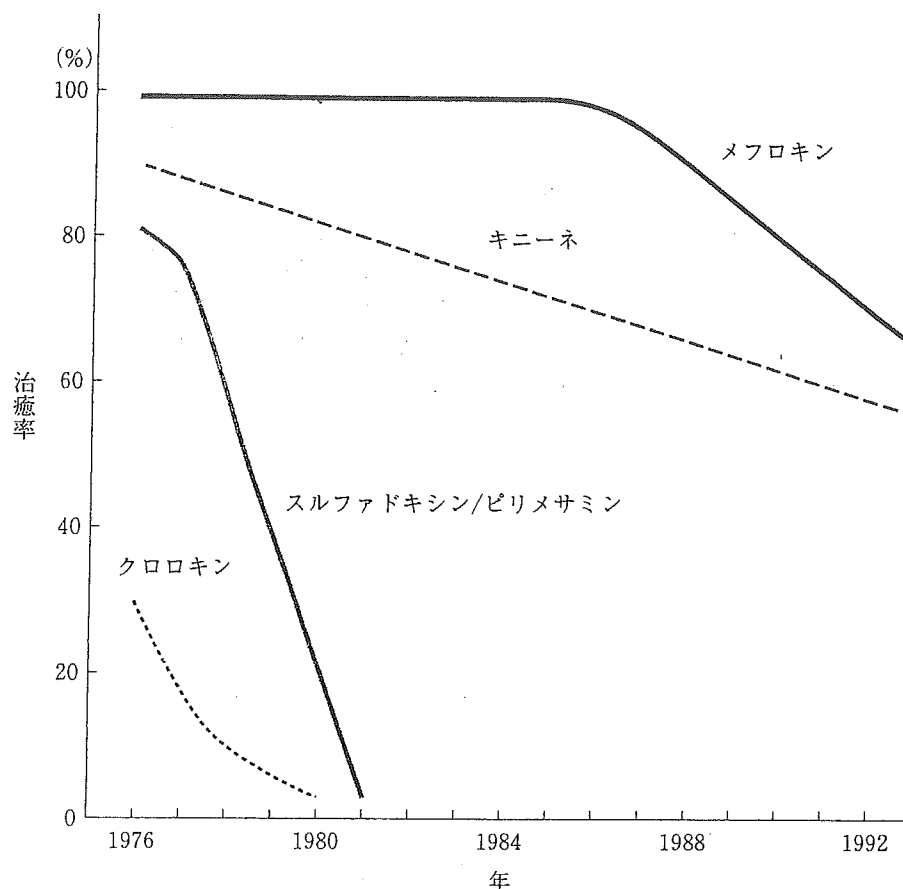


図2 タイにおける種々抗マラリア薬による患者治癒率の推移
(文献⁹⁾より引用・一部改変)

乗る 200 kb のセグメントに局在していると考えられている。食胞のトランスポーター様の分子をコードする *cg2* 遺伝子の多型性が、クロロキン耐性と強く関連しているとの報告がなされている⁷⁾。

ファンシダールの一つの成分であるピリメサミンは、原虫の核酸合成における DHFR (dihydrofolate reductase) の阻害剤である。ところがファンシダール耐性の原虫はこの DHFR の活性部分であるアミノ酸のセリン(-108)がアスパラギンに置換されていることが多く、これによりピリメサミンが DHFR に結合することが制限される。この現象はピリメサミンの曝露により、原虫の DNA が点変異 (point mutation) を起こして獲得されたものと考えられている⁸⁾。またもう一つの成分であるスルファドキシンは PABA (*para*-aminobenzoic acid) の拮抗剤であるが、耐性原虫では薬剤ターゲットである

DHPS (dihydropteroate synthetase) をコードする遺伝子に同様の点変異が認められている⁹⁾。

そのほか、多剤耐性にかかわる遺伝子 (*mdr* gene) に関する研究が進んでいる。タイで分離された熱帯熱マラリア原虫株では、*pfmdr1* という遺伝子のコピー数が増大または発現量が増加している株で、メフロキンやハロファントリン (halofantrine) への耐性度が高まっていると報告されている¹⁰⁾。

4. 診 断

薬剤耐性マラリア流行地では重症マラリアの発生率が高く、それに伴って5歳以下の子供の死亡率も高いとの報告がある¹⁾。すなわち、薬剤耐性熱帯熱マラリアの診断・治療の遅れは患者を重症化に陥らしめ、しばしば致命的となるので、鑑別に当たっては特に注意が必要となる。輸入マラリア患者では、渡航歴を詳細に聴取し