P153

メフロキン耐性熱帯熱マラリア原虫の
pfmdr1 遺伝子の解析

○金 恵淑、永井由紀子、綿矢有佑 (岡山大学・薬)

マラリアの治療に化学療法剤は不可欠である。現在、熱帯熱マラリアの第一選択薬はメフロキンであるが、メフロキン耐性原虫の出現し、世界的拡散が危惧されている。それ故、メフロキン耐性機構の解明と薬剤耐性原虫に有効な新しい抗マラリア薬の開発が急がれている。しかしながら、この原虫のメフロキンの作用機構、及び耐性機構は未だに解明されていない。そのため、耐性克服を目指す手がかりがなく、耐性を克服する新しい抗マラリア薬の開発は困難を極めている。本研究は、熱帯熱マラリア原虫のメフロキン耐性機構を明らかにし、耐性を克服する新しい抗マラリア薬開発の手がかりを得るものである。

我々は、メフロキン耐性であった患者より単離した培養熱帯熱マラリア原虫 523a 株を用いて、pfmdr1 遺伝子の変異と薬剤耐性との関係について研究を行った。*Plasmodium falciparum* multi-drug resistant 1 (pfmdr1) 遺伝子のメフロキン耐性に関わると報告されている 86、184、1034、1042、及び 1246 番目のアミノ酸の塩基配列を PCR により目的領域を増幅した後、Dye Terminator 法を用いて変異有無を解析した。また、それぞれの原虫株を用いてメフロキン、クロロキン、キニーネ、アルテミシニン、ハロファントリン、及びピリメタミンの EC₅₀ 値の比較も行った。

培養熱帯熱 FCR-3 株、臨床で得られた 523a メフロキン感受性株、及び 523a メフロキン耐性株では、pfmdr1 遺伝子の 86、184、1034、1042、及び 1246 番目のアミノ酸に変化は見られなかった。しかし、メフロキン耐性株の EC₅₀ 値は他の原虫株に比べ、約 10 倍の高い値を示した。これらの結果より、我々の研究室でメフロキンを添加して継代しているメフロキン耐性原虫株は、pfmdr1 遺伝子の変異とは関係がないと結論した。今後、pfmdr1 遺伝子の変異とは異なる別のメフロキン耐性機構について解析を行う予定である。

P154

フィールドサンプルにおける熱帯熱マラリア原虫クロ

キン耐性遺伝子 *Pfcr1* 多型の検討 ○美田敏宏¹、金子明¹、塚原高広¹、武地美保²、Bwijo A.¹、Zungu I.²、小早川隆敏¹ (¹東京女子医大・国際環境・熱帯医学、²マラウイ公衆衛生プロジェクト)

最近米国 NIH、Wellmes らのグループは熱帯熱マラリア原虫クロキン耐性株と感受性株の交配実験により新規遺伝子 *Pfcr1* を見いだした。この PFCRT 蛋白 76 位リジンからトレオニンへの置換 (K76T) とクロキン耐性能は、培養原虫実験においては強く相関していたが、フィールドサンプルでの意義は未だ不明である。我々は K76T への変異がどの程度クロキン耐性と関連しているかをフィールドサンプルにおいて検討したので報告する。

(対象・方法) マラウイにて 2000 年 7 月に *in vitro* クロキン耐性試験を行った 52 例 (耐性 8 例、境界例 5 例、感受性 39 例)。濾紙血液サンプルより原虫 DNA を抽出後、*Pfcr1* 遺伝子のエクソン 2 を nested PCR にて増幅、76 位リジンを含む特定配列を認識する制限酵素 ApoI にて切断した。結果は 3% アガロースゲル泳動にて確認した。

(結果) クロキン耐性 8 例を含む検討した 52 例全て 76 位のアミノ酸はリジンであった。

(考察) 今回マラウイのサンプルでは、クロキン耐性と PFCRT 蛋白 K76T 変異との相関は見られなかった。しかし、スーダンでは両者の間に強い相関が見られたと報告されており、今後 *Pfcr1* 他部位の変異、また他のクロキン耐性関連遺伝子の分析を地理的差違を考慮しながら行い、*Pfcr1* を中心としたクロキン耐性遺伝子多型のフィールドにおける意義を検討していく予定である。

P155

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—クロロキン感受性は回復したか? ○塚原高広¹、金子明¹、Bwijo A. Bwijo¹、I. Zungu²、武地美保³、小早川隆敏¹ (¹東京女子医大・国際環境・熱帯医学、²マラウイ国立公衆衛生研究所、³JICA マラウイ公衆衛生プロジェクト)

背景: マラウイではクロロキン耐性マラリアの増加のため、1993 年よりスルファドキシム/ペリメサミン (SP) に第一選択薬を変更した。以後クロロキンの使用はほぼ完全に中止されていた。2000 年 6 月に 1) 治療指針スイッチ 7 年後のクロロキンおよび SP 耐性; 2) 多剤耐性マラリアの新薬として期待されるアトバコン/プログアニル (マラロン) の効果の評価を目的に *in vivo* 薬剤感受性試験を行った。方法: Malarimetric Survey として、サリマ地区農村部にある小学校 2 校の児童および近隣の乳幼児を主対象とし、体重、身長、脾腫検査、指頭採血を施行した。*Plasmodium falciparum* (Pf) 単独感染、原虫率 400/μl 以上、臨床症状軽微または無、服薬歴なしという基準で *In vivo* ケースセレクションを行い、Pf 陽性例を 3 群に分けクロロキン、SP、マラロンの標準量を投与した。Day 3, Day 14, Day 21, Day 28 と臨床寄生虫学的に経過観察した。結果: 505 例中 389 例 (77%) がマラリア原虫陽性、そのうち 379 例は Pf 単独感染であった。173 例について *In vivo* 試験を行い、163 例 (92.5%) は完全追跡ができた。クロロキン、SP、マラロン投与群の耐性率はそれぞれ、10%、20%、9% であった。マラロン投与群のみで RIII が 3 例見られた。考察: 予想に反して *In vivo* 試験でのクロロキンおよび SP 耐性率は低率であった。クロロキン使用中止後 7 年を経て感受性が回復した可能性があり興味深い。マラロンは早期の原虫除去効果が低い可能性がある。これらの結果について、コンプライアンス、原虫薬剤耐性、患者薬剤代謝および原虫に対する免疫の観点からさらに分析の予定である。

P156

Changing pattern of *in vitro* drug resistance of

Plasmodium falciparum malaria in Salima, Malawi ○BWIJIO A. Bwijo¹, KANEKO Akira¹, TSUKAHARA Takahiro¹, TAKECHI Miho^{1,2}, ZUNGU Inocent³, MORIYAMA Yoshinari^{1,3}, KOBAYAKAWA Takatoshi¹ (¹Dept. Int. Affairs Trop. Med., Tokyo Women's Med. Univ., Tokyo, Japan. ²Com. Health Sci. Unit, Min. Health. Pop., Malawi.)

In Malawi, chloroquine was officially replaced by sulfadoxine/pyrimethamine (S/P) in 1993 because of the reports on high treatment failure rates in *P. falciparum* cases. We conducted a survey in June-July, 2000, seven years after the change of malaria drug-use policy, to evaluate the current drug sensitivity status in parasites

P. falciparum cases were selected from malarimetric surveys at community schools in Salima, a holoendemic area. *In vitro* parasite sensitivity against chloroquine, S/P, mefloquine and quinine were tested using WHO microtest kits. Among 52 valid isolates tested for chloroquine, 39 (75%) showed schizont inhibition at $\leq 0.8 \mu\text{mol/l}$ of blood-medium mixture (BMM) indicating sensitive. Eight (15%) showed schizont maturation at $3.2 \mu\text{mol/l}$ BMM indicating resistance. The remaining 5 (10%) were intermediate. With 39 valid isolates tested for S/P, 31 (80%) showed schizont inhibition at $\leq 75 \text{ nmol PYR/l}$ BMM indicating sensitive. Two (5%) showed schizont maturation at 750 nmol/l BMM indicating resistance. The remaining 6 isolates (15%) were intermediate. Of the 16 and 28 valid isolates tested for mefloquine and quinine respectively, all were sensitive.

In Malawi, in 1988, *in vitro* resistance of *P. falciparum* to chloroquine reached to 47% among 30 valid isolates tested. In Salima, an *in vitro* study in 1998 showed ten (34%) of the 29 isolates were resistant. However, we observed only 15% were resistant isolates. These results suggest that chloroquine resistance in parasites may be reversed after a certain period of complete withdrawal of the drug pressure in a community. Our study demonstrates the need for further studies to confirm this hypothesis.