

“熱帯地渡航における健康管理” —マラリア対策を中心に—

第3回

II. 基礎編（1）薬剤耐性発生機構

田 中 真奈実

連載第3回目から、これまでに紹介したマラリア原虫対策の基礎となるべき、寄生生物の生物学的解析を紹介し、抗病（予防）対策の一助としたい。

ここで、本題に入る前に、抗マラリア薬の最新情報に触れておく。昨年上半期に、ハルファンの心臓毒性により、その使用禁止令がヨーロッパのフィールド調査隊に発令されたことは第1回（熱帯林業第34号）に記した。本年（1996年）になり、真に残念なことに、我々が現在最も頼りとするメフロキン使用に対して重大な警告が出たのである。昨今のマラリア流行に対し、やむをえずメフロキンの予防投薬を処方せざるをえない場合が多いが、その副作用として、重度のうつ病ないしうつ状態が多発し、問題となっている。メフロキンの予防投薬は、250 mg（一錠）を毎週内服するのであるが、この時連続投与として一か月分（4回分）程度とすること、絶対に3か月を越えないこと、等が示されている。しかし、流行地への頻回の渡航の場合、通算3か月以上の内服になることもあり、つい薬剤への安心感がめばえ、その結果として帰国後の副作用が多発することになった。重度の精神障害の場合、その治療は、長期に渡りかつその後の経過観察も困難を極め、外からわかりにくい障害であるが故に、医師の受診も遅れがちである。

メフロキンの使用をさらに制限されるとなると、我々としても対応に困る場合が増えることになり、全く途方に暮れてしまう。紙上を借りて、やはり薬には頼るな、という警告を掲示するとともに、今後の熱帯地フィールド調査主体のプロジェクトは、その全体として衛生管理プログラムも充分に考慮する様、実行部隊も本国待機部隊も決して問題を過小評価なさらぬことを重ねてお願いたい。

TANAKA, Manami : Health Care in Tropics : Prevention and Treatment of Malaria (3)

筑波大学基礎医学系

さて、本題に入ろう。

イソップ物語のなかの“田舎のネズミと都会のネズミ”という挿話では、田舎のネズミはいくらおいしいものでもびくびくしながら食べるのはいやだ、と都会生活を嫌って田舎に帰ってしまうが、生物のなかには、進化の過程で“都會生活”を選択したものもある。“寄生 (parasitism)”の語源は、食卓のおこぼれにありつこうとする乞食を意味しており、生存に不可欠なエネルギー源を他生物に依存していることを第一義とする¹⁾。この“依存”形式は単にエネルギー源のみならず、多くの寄生虫はその生活環の完遂に1種類以上の他生物(生きている生物個体)を絶対に必要とする。よく講義で使う挿話であるが、病原性細菌は寒天培地その他人工培地上で生育可能であるが、マラリアはじめ多くの寄生虫ではそうは行かない。

この様な存在様式は、自然 (=ecosystem) の適合形式として理想的に見えるが、実際こんな経済的に見合わないものはないのである。種の保存、個体の保存をめざす生物系にあって、誰か他の生物、それも決まった種類の生物が通りかかるのを待っていることほどその目的に合わないことはない。

しかるに、この一群の生物たちが人間をターゲットとして選択したが故に、進化学上同列にある自由生活生物種に比して格段の繁栄をしたのである。全世界における主たる死亡原因のうち、寄生虫性疾病の占める割合は極めて大きく、マラリア感染者数だけをとっても2億～3億人である(世界総人口推定58億)。この数字は、ここ20年程全く変わっていない。ということは、刻々進む最先端生命科学研究の中に寄生生物学は含まれていなかったのであろうか。

答えは否、WHOやNIH(NIAID)を中心とした寄生虫病対策(うち90%はマラリア対策)は実に華々しい作戦を展開していたのである。マラリア対策としては、①媒介蚊の撲滅、②原虫表層物質の単離・同定とワクチン開発、③薬剤耐性獲得機序の解明と新しい化学療法開発、が大きな柱とされていた。

1976年、TRAGER and JENSENがマラリア原虫の*in vitro* 培養法を確立してから、マラリアの生物学が飛躍的発展を遂げた²⁾。それは寄生虫材料の豊富な供給と生化学的アッセイシステムの導入を可能にしたからである。広域化学療法によるマラリア対策の問題点は、容易に耐性株が出現し、かつ短時日のうちに浸淫地全域に広がってしまうことがある。この様な疾病に対し、単に新たな化学物質を導入テストすることは、いたずらに耐性株の発生を促すことにはかならない。まずは徹底的な生物学的情報が必要なのである……と気づくのに、人類は、研究者は1976年の起点から15年もかかった。

即ち、結果的に見れば、病原細菌を使った戦略を寄生原虫マラリアに単純応用できると見た楽観主義が、15年の間にしっぺ返しを喰った、ということになるのだが、楽観主義にしがみついているしかなかった程、疾病としての重要性が高かったのだとも解釈できる。しかし、どの様に好意的にこのプロセス、失敗の歴史をふり返ってみても、世界の主たる研究室は、大幅な研究費削減を含めて極めて厳しい措置をもって見直しを迫られ、70年代から80年代を生き延びたマラリア研究者はかなり少なく、USAを中心に大規模な研究室の再編成が行なわれた。

前置きが長くなつたが、表1に示される熱帯熱マラリア原虫から発見された遺伝子数を見ていただきたい。1990年までは、毎年数える程しかないが、1991年よりマラリアゲノムプロジェクト（Wellcome Trust支援）が開始されるに従い、EST（Expressed Sequence Tag, 構造遺伝子群のランダムシーケンス）の大規模解析によって驚異的な数の増加が見られる。単純に数だけ比べれば、このEST解析が世界でたった5つの研究室で行なわれているということは信じ難いであろう。

1990年までの基礎解析は、ある特定物質に注目して、その遺伝子解析・機能解析へと進むファンクショナルクローニングが主流であった。即ち、寄生虫が“都会生活”に適合するためには、特殊な才能が必要というのか、これら生物群は、実に柔軟性に富む遺伝子構造及び物質産生系を有する。ここで、たとえば“薬剤耐性獲得機構”に注目すると、実験室内培養にて感受性株から耐性変異

株を作製し、変異株に検出される遺伝子変異により、原因となるシステムを同定していくのである。

1987年USAにおいて、マラリア原虫の核酸合成に必須の酵素DHFR・TS（Dihydrofolate reductase-thymidilate synthase）の遺伝子構造が発表された³⁾。この酵素は、ファンシダールの主成分、ピリメサミンのターゲットであり、ピリメサミン耐性熱帯熱マラリア原虫を用いて、耐性獲得機構の解析が華々しく展開されるこ

表1 热帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 遺伝子登録数

年	遺伝子登録数	うちEST数*
1995	160	
1994	452	273
1993	849	670
1992	375	161
1991	9	
1990	2	
1989	21	
1988	2	
1987	2	
1986	3	
合 計	1,885	1,104

とになった（1987～1992）。

結果として明らかになったことは、

① DHFR 遺伝子が点突然変異を起こし、物質構造を変化させてしまうために、薬剤（ピリメサミン）が酵素に結合できなくなり、阻害作用がなくなる、即ち寄生虫は薬剤存在下でも順調に核酸合成を行うことができる⁴⁾。

② 次に、突然変異を起こそうが起こすまいが DHFR 遺伝子を大量に増幅してしまうため、同じ量の薬剤では効かなくなる。しかし、もともと薬剤も細胞毒なので 10 倍、20 倍という量を人間に投与するわけにはいかない。従って、実用としての価値は全くなくなる⁴⁾。

③ その上、DHFR 遺伝子が存在する染色体を選択的に増幅・重複（duplication）・（recombination）させることにより、変異遺伝形質を次世代に受け

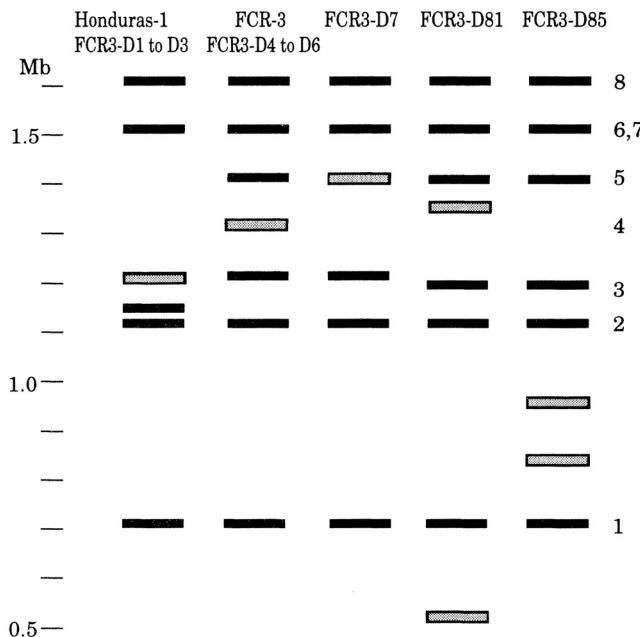


図 1 ピリメサミン耐性熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の染色体変異。左のバーはゲノムサイズを、右の番号は染色体ナンバーを示す。DHFR 遺伝子は第 4 染色体上に位置する。FCR3：ピリメサミン感受性株；Honduras-1：ピリメサミン耐性株；FCR3-D1～D85：実験室内で作製したピリメサミン耐性株。番号が大きくなるに従って耐性度が増す。

継ぐ⁵⁾。

図1に、薬剤感受性株FCR3が、薬剤耐性獲得に従い、DHFR遺伝子の存在する第4染色体をいかに変異させていくかを記した。マラリア原虫は全部で14本の染色体をもち、約700 kb(キロベース, 1×10^3 bp)から3 Mb(メガベース, 1×10^6 bp)とサイズが小さいことから、アガロース電気泳動にて簡便に分離・解析可能である。ところが、この技術(パルスフィールド電気泳動)を用いて、種々のマラリア原虫株を解析してみると、株により似ても似つかぬパターンとなつた。それもそのはず、図1に示す様に、薬剤を始めとする自然界の選択的プレッシャーにより、いとも簡単に染色体変異を起こすのである。図1では、左から右に行くに従い、耐性度が増すのであるが、高い耐性度を示す株では染色体重複を起こし、さらに重複した染色体が組換えまで起こるのである。図2は、その重複染色体のより詳細なマップを示してあるが、概して言えば、染色体の中心部(centromere)はよく保存され、末端部(subtelomere)がよく組換えを起こしている。これは、末端部領域に各染色体共通の反復配列が存在するため、組み換えとそれにひき続く末端修復(これにより、染色体構造として完結する)が比較的容易であるから、とされている⁵⁾。

もう一つ、薬剤耐性に関与するといわれる遺伝子を例に類似した現象を紹介する。哺乳類の癌細胞において、抗癌剤耐性獲得に関与する原因遺伝子として mdr (multi-drug resistance)遺伝子があるが、これに相同性を持つ遺伝子がマラリア原虫でも単離され、その遺伝子増幅が、抗マラリア薬、クロロキンに

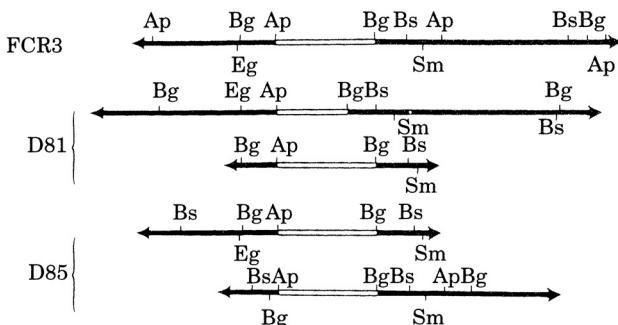


図2 ピリメサミン耐性に伴う第4染色体内部の変異。アルファベットは制限酵素の略称。Ap; ApoI, Bg; Bgl II, Bs; BssH II, Eg; EagI, Sm; SmaI。白線部にDHFR遺伝子が位置する。

に対する耐性獲得に関与すると報告された⁷⁾。この遺伝子産物（P 糖蛋白質）は、細胞内から外への物質輸送を活性化するため、遺伝子重複が起こると、細胞内における薬剤滞留時間を極端に減ずることになり、結果として薬は寄生虫にしろ癌細胞にしろ“殺す”に充分なヒマがなくなってしまう。従って、見かけ上は細胞が薬剤に耐性になってしまったことになる。図 3 に、種々の熱帯熱マラリア原虫における、染色体レベルでの遺伝子重複のマップを示した（マラリア *mdr* 遺伝子—*pfrmdr* は、第 5 染色体上に位置する）。

実際は 5.5 kb に過ぎない *pfrmdr* 遺伝子部分の増幅が、全体として 400 kb もの染色体増幅に帰結するのは驚異である。ちなみに、DHFR の増幅も 100 kb の染色体増幅を起こす。ここでも、染色体中心部はあまり変化せず、遺伝子の位置する部分を中心に末端部が大きく変化している。

この様な染色体の柔軟性は、他の寄生原虫でも認められ、トリパノソーマ等では、部分重複ではなく、染色体丸ごとの重複がいとも簡単に起きる（様に見える）。もしも人間の染色体がこの様に自由な重複・組み換えを起こしたら、人間として発生することさえ不可能である。トリソミーや性染色体異常を考慮すれば、その寄生虫の驚異的適合システムには脱帽するしかない。個人的には、

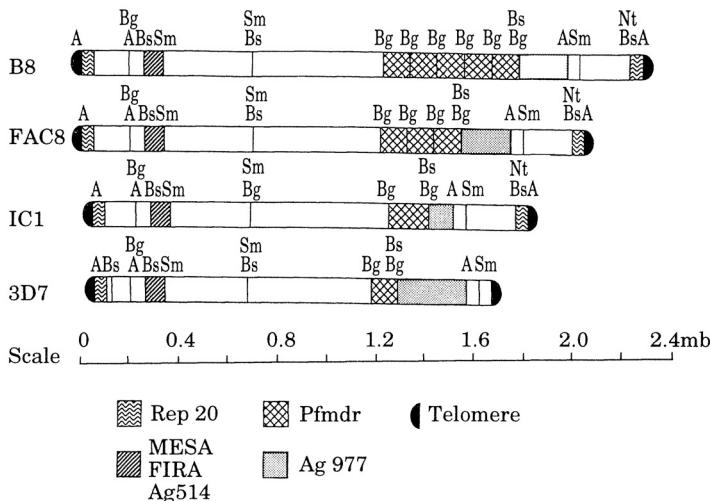


図 3 クロロキン耐性に伴う第 5 染色体内部の変異。アルファベットは制限酵素の略称。図 2 の略称とほぼ同じであるので追加のみ示す。Nt ; NotI。

この様な生物の撲滅活動というのに不可能性しか見出せない、と結論した研究者は私だけではないだろう。

この不可能性に対する突破口は何か？世界のマラリア学者の選んだ道は大別して二つのうちどちらかである。

1) 前述のファンクショナルクローニングの成果を生かし、マラリア原虫の遺伝子産物を大腸菌等を使って人工的に大量精製し、X線回折等を通じて三次元構造を解析、構造変異体に対するドラッグデザイン等へと研究を進める。

2) ファンクショナルクローニングによる単一遺伝子解析の集積に飽き足らず、この生物の遺伝子解析を大規模解析へと飛躍させ、全情報を短時日で得てしまおうというポジショナルクローニングへの移行。

こう記してしまうと、どちらも必然の流れの様に見えるが、2)は将来の研究指向と全く異なり、研究者の人生そのものを変える思考の転換が必要である。

1)は、やはり撲滅すべき生物としての寄生虫モデルとしての研究対象であり、2)は、“寄生する”という特徴を持つ真核生物モデルとしての研究対象を意味する。即ち、進化の因果関係の帰結点としての寄生生物の存在事由を明らかとし、その特質を利用して生物の共生法則を探り、一般生活に活用しようというものである。ヒトがヒトとしてあるゆえんを探るに“遺伝子病”という内因性遺伝子マーカーがあり、また“寄生虫”という外因性マーカーがある。これらのマーカーは、遺伝子または染色体構造として進化系統樹を縦横に結び、個体・種としての驚くべき特殊性と普遍性を描出する。

具体的には、マラリアを始めとする寄生生物ゲノムプロジェクトは、各種遺伝子ライブラリー (Yeast Artificial Chromosome Library 及び Cosmid Library など) によるトータルゲノムプールの作製に、前述のESTのジェネレーションによる全遺伝子情報解析、染色体構造解析、フィジカルマップの作製(ゲノムマッピング)、遺伝子群発現操作による宿主-寄生虫適合変化の検索を加え、寄生成立を可能にしてきた生物の分子遺伝学的背景を明らかにしようとするものである。

図4と表2にその一例を示す。図4は、熱帯熱マラリア原虫の第4染色体(約1.2 Mb)の完全カバーマップ(コンティグマップ)であり、染色体識別用の新しい22のマーカー遺伝子の詳細を表2に示してある。現在14のマラリア染色体のうち8つまでが既にこの様なコンティグマップが完成しており、うち6つのうち4つは8割方コンティグが完成しているという。ここで、もう一度繰り返すが、この仕事は、世界でたった5つの研究室(それも、そんなに大規模

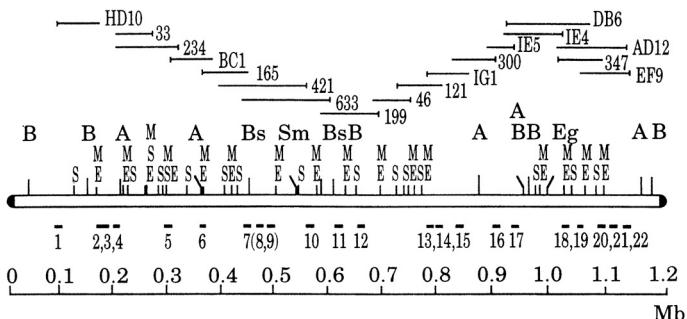


図 4 热帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の第4染色体コンティグマップ。上部のバーはYACライブラリーによる染色体のカバー位置を示す。1~22はマーカー遺伝子の存在部位。アルファベットは制限酵素の略称であり、図2、図3に加えて、E；Eael, M；Mscl, S；StuI。

表 2 热帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の第4染色体上の遺伝子マーカー。1~22までの遺伝子の位置は図4参照。

Chromosome 4 Sequence-Tagged Sites (第4染色体における遺伝子配列領域)

STS	Origin	Primer 1	Primer 2	Size (bp)
4-1	YHD10L	GAATTCAACAAACCAAC	GTAATCTGTTAATTCTTC	182
4-2	C4.1	GTGAAAATTAACACTCCACG	CCAGTAGAATACTTCACAC	177
4-3	YHD10R	CTATCTGATATGTCAC	TAATATGGAAATGATGCAC	248
4-4	Y234R	CATCTTATTCTTATTAGTTGTC	CATCATTTTATTATGAAATGTAACGTCAC	315
4-5	HORA	CTGGCTTAAATTTCTCATGGG	GACAGAAATGGATCGAGATGC	320
4-6	VAPB	GGTAGAACGAGATATCAGG	CAGATACATATGGATGATCG	324
4-7	Y165R	CACACCGAAATAAGGACAC	TAATATTGCGGAATCT	205
4-8	C4.D21	GTAATCACTTTTAAATGGACC	ATGATCTAGTACATTCAACG	223
4-9	C4.2	ATGAAATAATCAGGTTCAC	CTTCAAGTAGATCATAGAC	186
4-10	Y421L	GTAATTTATAATGGATCG	CTCATCATCTTATATCTTC	167
4-11	DNA pol α	AATAATAGATGGATACAGAC	GAATTCCTCTTATTCGATG	203
4-12	Y46R	GCTTAATAAGATGGAGGTAG	GCATAGATTGCAAGACAGG	385
4-13	DHFR	GGGAAATATTGACTTAAATC	GAATAATAGTACATATGAATGTG	544
4-14	Y121R	CACTATTTCTGACCAATTAAAC	CATATCAATATGTTCAATTTC	155
4-15	C4.H31	AAAGAACATTGATAGAGG	TTTCCAAAACAGAAAATTGTC	169
4-16	Y300L	AAAGAACATTCTATATTACG	ACAATTCCTTAAACATTCTAGC	98
4-17	YIE5L	TGGTTTTTACTCGTCATC	TGGTTATTGTTGATCATC	85
4-18	α_2 -Tubulin	GACCAAGTCGTGCTGGTGTG	TTCTCTTCCATATCTATGCC	518
4-19	YEF9R	GAATTCATTGTTGATGTG	CCGATGATATGTTATCC	155
4-20	Y347R	CACCTTTATATCTTCAGG	CAACTAAATCATCACAGAGATAG	195
4-21	PF4.3	CTTCATCATACCAATTCTGGTAG	CAACTTTATCATACACCTTC	630
4-22	YAD12R	AATTAAGGAAAGAGAAACT	CACTATTTGAAAAACCTTC	59

(注) STS : Sequence-Tagged Sites ; bp : base pair (DNA配列の単位)

プライマー (Primer) : STSに対するオリゴヌクレオチドプライマー

A : アデニン, C : シトシン, G : グアニン, T : チミン, Origin : 遺伝子名

経営ではない)で完遂されたのである。けだし、研究というものは、環境によるものではなく、遂行しようと意図する研究者の存在にのみ依存するという良い例であろう。また、遺伝子マップと同時に、マラリア研究者の存在マップを見ると、その推移(衰移)にがく然とするものがある。

この様な試行型研究の発展により、停滞ぎみであった1)の研究の歩みを取り込み、二者の流れが一致した現在までのところの最大収穫を次回に示そうと

思う。

マラリアゲノムプロジェクトは、マラリアがマラリアであるための構造様式に到達する情報を与えた。その鍵は、*mdr*を始めとしてヒトが保有する多くの遺伝子を共有していることにあるのだが、それでは何故マラリアはヒトが“うまい”と感じるのであろうか。マラリア原虫はヒトにのみ感染するのではないが、熱帯熱マラリア原虫を用いて、この生物がヒトへ到る道を次回に紹介する。

〔文献〕 1) VIDAL, *et al.* Cell 73, 469-, 1993. 2) TRAGER and JENSEN Science 193, 673-, 1976. 3) BZIK, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8360 -, 1987. 4) TANAKA, *et al.* Mol. Biochem. Parasitol. 39, 127-, 1990. 5) TANAKA, *et al.* Mol. Biochem. Parasitol. 42, 83-, 1990. 6) RUBIO, *et al.* Genomics 26, 192-, 1995. 7) FOOTE, *et al.* Cell 57, 921-, 1989

図書紹介

◎東南アジアで普通に植えられている樹木—野外図鑑— (Trees Commonly Cultivated in Southeast Asia—An Illustrated Field Guide—Michael JENSEN, 1995, FAO Regional Office for Asia and the Pacific (RAP), Maliwan Mansion, Phra Atit Rd., Bangkok 10200, Thailand, 229 pp. 郵送料込み 20 US\$/冊, 20部以上まとめれば 18 US\$/冊)

著者は、デンマークで森林生態学を専攻した方で、バンコックのFAO アジア太平洋地域事務所に準専門官として勤務した2年間に、東南アジアで普通に植えられている樹木についての情報を精力的に集積するとともに、それらの写真をとったり、挿絵の作成にもつとめた。これらをとりまとめたのが本書である。およそ 110 種を I 針葉樹類とモクマオウ類, II 竹類, III ヤシ類とバナナ類, IV 広葉樹類の4群に分け、まず独特の検索表に整理した上で、樹種ごとに学名(科名)・シノニム・一般名・記載・用途・生態・分布(ほぼ分布図つき)・参考文献を1ページに手際よく整理し、反対側のページにはカラー写真と挿絵を組み合わせて葉・花・果実・樹皮などを示している。ほとんどの樹種にあるシリエットの樹形はユニークな試みである。著者の上司で、まえがきを書かれている樺尾氏(Mr. M. KASHIO, Regional Forest Resources Officer)から恵送されて刊行を知ったが、東南アジアで樹木を扱う方々はもちろんとして、熱帯樹木に関わりをもつ方々にとって格好のハンドブックである。なお入手されたい方は、上記金額の Bank Draft を同封して同氏に依頼して下さい。(浅川澄彦)