

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 27 年 5 月 29 日

採択番号	26 共同-8		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター内共同研究担当教員	鈴木 宏志
研究課題名	マラリア原虫ゲノムに対する抗マラリア薬の変異原性リスク評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏名 かのう しゅんご 狩野 俊吾	所属部局等・職名 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 熱帯医学・マラリア研究部 研究員	
研究分担者			
研究期間	平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>マラリア治療においては薬剤耐性原虫の出現が問題となっている。その薬剤耐性は原虫のゲノム変異によると考えられており、突然変異生成機構の解明が薬剤耐性原虫の出現抑止へつながると期待される。一部の抗マラリア薬では大腸菌等での変異原性が微弱ながらも報告されており、抗マラリア薬の投与自体が条件次第では耐性原虫の出現に関与するのではないかという仮説を立てるに至った。</p> <p>突然変異が生じる際、多くの場合DNA損傷が前提となることから、本研究においては、抗マラリア薬への暴露によりマラリア原虫ゲノムにDNA損傷が生じるか否かをコメットアッセイにより検討を行った。</p>		
研究経過の概要	<p>研究の全体像としては、同時並行で行っている突然変異頻度測定系で検出される暴露条件をもとに、同条件下におけるDNA損傷を本研究で観察することで、突然変異生成機序の枠組みを捉えようと試みた。最初に化学的突然変異誘起剤として知られる <i>N</i>-nitroso-<i>N</i>-ethylurea (ENU) を用いてパイロット実験を行った後（総体的な突然変異頻度に顕著な差は見られなかったので、コメットアッセイは行わなかったため詳細は割愛）、以下に述べるように抗マラリア薬クロロキンの変異原性の有無を調べた。</p> <p>まず熱帯熱マラリア原虫FCR3株に（寄生率は約1%に調整）、クロロキン(CQ)濃度0, 15, 30, 60, 300, 3000nM、48時間処理し、洗浄後、通常培地に移して寄生率2%に達するまで培養してサンプリングを行い、突然変異頻度測定系で突然変異出現の有無を調べた。30nM処理群に関して、対照群の突然変異頻度 $6.1 \pm 1.8 \times 10^{-7}$ に対し、$46.0 \pm 15.6 \times 10^{-7}$ と 約7.5倍の上昇が確認されたので、この条件下におけるDNA損傷の有無をコメットア</p>		

受理年月日	受理番号

	<p>ツセイによって観察した。</p> <p>しかし同条件下でのCQ処理ではほとんどDNA損傷は確認できなかった。この原因としては、寄生率の上昇を待つ間にDNA損傷が修復される可能性を考え、CQ濃度0, 30, 3,000nM, 48時間の処理を行い、洗浄後直ちにコメットアッセイを行ったところ、3,000nM処理群において明瞭なDNA損傷が確認された一方、0, 30nM処理群ではほとんどDNA損傷の程度に差はなかった。</p> <p>CQ30nM処理群で生じた突然変異のうち、78.7%は欠損変異であったが、残りの21.3%は217A>Cトランスヴァージョン変異であり、同様の変異スペクトルは対照群では検出されなかったことから、上述の突然変異頻度の上昇はクロロキンにより誘発される変異の増加による思われる。なお、3,000nM処理群ではマラリア原虫は致死になるため、突然変異頻度測定に必要なDNA量が得られず測定は不可であった。</p> <p>以上をまとめると、コメットアッセイで明瞭なDNA損傷が検出されなかつた30nM処理群において、突然変異頻度の上昇（約7.5倍）が確認できた。</p>
研究成果の概要	<p>これまでにマラリア原虫生体へのクロロキンの変異原性の報告はなかったが、本研究内ではクロロキンが熱帯熱マラリア原虫生体内でもDNA損傷を誘引することが明らかになった。一方で、実際に突然変異と結びつくには、コメットアッセイで明瞭に検出できない程の微小なDNA損傷で十分である可能性が示唆された。今回用いた30nMというCQ濃度は成長阻害率50% (IC50) に相当し亜致死量である。このことはマラリア患者に投与したクロロキンが半減期を経て血中濃度が下がってきた際に突然変異が生じる可能性を提示する。というのも、クロロキンの抗マラリア薬の作用機序は、クロロキンのヘム重合阻害能が遊離ヘムを増やした結果、それに伴い増加した活性酸素が細胞毒性を発揮することによると考えられているが、同じメカニズムが細胞毒性を発揮しないレベルまで弱くなった際にマラリア原虫生体への遺伝的毒性を示すことが想定されるからである。</p> <p>今後は濃度系列の範囲を拡張したデータを蓄積することでその可説の検証を確固たるものとした上で、抗マラリア薬の投与によって誘起されるDNA損傷というインプットから、突然変異生成というアウトプットに至るまでの一連のカスケードを解明することで、耐性原虫出現に対する抑止の糸口につなげたいと考えている。</p>
研究成果の発表	<p>現時点でのデータ公表は行っていないが、上述の研究成果を踏まえて、クロロキンのマラリア原虫に対する変異原性に関して国内外の発表を検討している。また、実験例数を増やすのと並行して、論文投稿の準備を進めている段階である。</p>