

リアルタイムPCR法による熱帯熱マラリア原虫クロロキン耐性関連遺伝子
pfcr 耐性型 / 感受性型の定量的検出システムの開発と疫学応用

片貝 祐子 駒木-安田 加奈子 河津 信一郎 狩野 繁之
国立国際医療センター・研究所 適性技術開発・移転研究部

マラリア患者の血液中には、異なる遺伝的形質をもつ複数の熱帯熱マラリア原虫 (Pf) クローンが混合して寄生している。薬剤投与によって、その薬剤に耐性の遺伝的形質を持つ原虫が選択され、患者血液中の耐性原虫の比率が高まると考えられる。しかし、耐性原虫と感受性原虫との比率が、個人または地域の薬剤耐性度を規定するかどうかは十分には検証されていない。

そこで我々は、TaqManリアルタイムPCR法を用いて、Pfのクロロキン耐性関連遺伝子*pfcr*上の単塩基置換(single nucleotide polymorphism; SNP)を定量的に検出する系の構築を試みた。*pfcr*は、野生型の遺伝子は感受性型であるが、SNPにより76番アミノ酸のリシンがスレオニンに変異すると耐性型 (K76T) の表現型を示すと考えられている。*pfcr*が感受性型の原虫 (FCR-3株) と耐性型の原虫 (K-1株) を任意の割合で混合した培養血液材料を作製し、耐性型SNPを含む約15bpの塩基配列と同領域の感受性型塩基配列各々に特異的なプローブ、ならびに両型に共通配列のプライマーを用いてリアルタイムPCRをおこなった。サンプル中に混在する感受性型と耐性型遺伝子各々を定量的に検出した結果、両型の原虫の混合比に一致した定量値をリアルタイムPCRの測定値から推定することが可能であった。

本法を用いて、フィリピン・パラワン島の熱帯熱マラリア患者血液13検体それぞれの*pfcr*耐性型と感受性型原虫の混合比率を測定した。6検体で感受性型と耐性型両方の遺伝子が、5検体で感受性型遺伝子のみが検出され、残り2検体はいずれの型の遺伝子についても検出限界以下であった。両型が同時に検出された検体中の感受性型 : 耐性型の遺伝子量の比率 (%) は8.7 : 91.3から44.5 : 55.5であった。同地域ではクロロキンに対しRI耐性のマラリアが流行していると報告されているが、今後、両型の混合比を指標とした感受性 / 耐性原虫の分布と同地域の薬剤耐性度との関係について検証を進めてゆく予定である。

A real-time PCR assay for quantitative detection of *pfcr* in *Plasmodium falciparum* and its application to epidemiology

YUKO KATAKAI

Dept Appropriate Technology Development and Transfer, Research Ins, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

