

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

抗マラリア剤の探索に関する研究

平成10年度 総括研究報告書

主任研究者 大村 智

平成11(1999)年 4月

## 目 次

総括研究概要	-----	1
研究目的及び必要性	-----	3
研究の実施経過	-----	4
研究方法	-----	5
結論	-----	5

## 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要

研究費の名称=厚生科学研究費

研究事業名=新興・再興感染症研究事業

研究課題名=抗マラリア剤の探索研究(総括研究報告書)

国庫補助金精算所要額(円)=13,600,000

研究期間(西暦)=1998-2000

研究年度(西暦)=1998

主任研究者名=大村 智(社団法人北里研究所)

### 研究要旨

薬剤耐性マラリア原虫に有効な治療薬の開発を行う抗マラリア剤のスクリーニングセンターとし機能すべく、今年度は、スクリーニングセンター構築の為の準備期間として、スクリーニングの情報収集及びノウハウを含む技術導入、所内研究組織確立、研究室の整備、マラリア原虫等の入手、日本国内の企業とWHO間での化合物の提供契約等を行った。現在スクリーニング系の構築中である。

研究目的=薬剤耐性マラリア原虫に有効な治療薬の開発をするために、北里研究所は世界保健機関(WHO)の熱帯病研究特別計画(TDR)の指導の下に、広く日本国内の企業、研究所から化合物等の提供を受け、抗マラリア剤のスクリーニングセンターとして、薬剤耐性マラリア原虫を用い*in vitro*モデルで活性の評価を行なう。

研究方法=*In vitro*スクリーニング方法はWHOが指定した方法に準拠する。すなわち、提供された化合物等を添加したマラリア原虫を96穴プレートにて*in vitro*系で培養し、化合物の抗マラリア活性を調る薬剤感受性試験を行い、低濃度で有効な抗マラリア剤を選択する。

結果と考察=当面3年間の研究計画の初年度である今年度は、スクリーニングセンター構築の為の準備期間として、スクリーニングの情報収集及びノウハウを含む技術導入、所内研究組織確立、機器器材の搬入にともなう研究室の整備、マラリア原虫

等の入手、日本国内の企業とWHO間での化合物の提供契約等を行った。現在スクリーニング系の構築中である。また、北里研究所は従来より独自のスクリーニングで抗マラリア剤のアルテミシニン様物質を微生物ライブラリーより探索しており、今年度も幾つかの候補素材を選択した。今後、マラリア原虫を用いた*in vitro*のスクリーニング系にて抗マラリア活性を評価する予定である。

結論=スクリーニング系の構築を急務とし、スクリーニングセンターと企業間の化合物及び結果報告の導線、スクリーニングセンターとWHO間との連携等の明確化を計り、スクリーニングを実施する。

#### 研究発表

現在までなし

#### 知的所有権の取得状況

現在までなし

## 研究の目的及び必要性

国際保健の分野では、天然痘の絶滅、ポリオ・麻疹の制圧などが達成され、又は大きな展開がみられ、さらに近年新たな強力な化学療法剤を得て、リンパ・フィラリア症などの制圧に向けてWHOを中心とした体制が構築されつつある。しかし、途上国において最大の疾病負荷を有し、最も対策が望まれているマラリアの化学療法剤については、大きな進展はみられていない。

WHO熱帯病研究部では、従来から欧米の製薬会社等と協力して抗マラリア薬の開発を行っているが、従来ほとんど調べられていない我が国の製薬会社等が有する、独自性の高い化学物質に潜在的可能性を認め、そのスクリーニングを日本国内で行う計画を策定した。

マラリア対策は1960・70年代の成功の後、1980年代以降マラリア原虫による薬剤耐性の獲得などにより、著しい発生件数の増大をみており、再興感染症の典型例となっている。また、過去、可能と思われたマラリアの駆逐は不可能であるものの、化学療法剤による治療対策・媒介蚊対策・予防対策を組み合わせることによって相当な効果が期待できることから、マラリア対策を世界的に再強化すべきとの動きが強くなっている。さらに、橋本首相が昨年デンバー・サミットで提唱した国際寄生虫対策イニシアティブやWHO次期事務局長の政策方針においても、マラリア対策に大きなウエイトが置かれており、WHO分担金のうち約10～20%を担い、独自性の高い化学物質群を有する我が国としては、本研究は有意義な国際貢献となる。さらに、昨年的大臣訪問に続いてアフリカ諸国との関係を強化する意味でも、有望な抗マラリア薬へとつながる本研究は重要である。

このような状況の中で、本研究は薬剤耐性マラリア原虫に有効な治療薬の開発を目的とする。北里研究所はWHOの熱帯病研究特別計画(TDR)の指導の下に、広く日本国内の企業から化合物の提供を受け、抗マラリア剤のスクリーニングセンターとして、薬剤耐性マラリア原虫を用い*in vitro*モデルで活性の評価を行なう。北里研究所はこれまでに、抗生物質を始めとする有用物質を微生物代謝産物の中から発見し、数多くの医薬品素材を世に送りだしてきた。特に抗フィラリア薬エバーメクチンの開発研究と国際貢献の実績は、WHOで高く評価されている。そこで、北里研究所内の微生物素材及び植物素材ライブラリーについても同評価を行ない、マラリア治療剤あるいはそのリード化合物と成りうる化合物を探索する。本スクリーニングは当面3年間計画で進める予定である。

なお、WHOに蓄積されている現在までの経験によると、約5,000～10,000物質のスクリーニングから1つの抗マラリア薬が開発されている。

## 研究の実施経過

### (進捗状況)

当面3年間の研究計画の初年度である今年度は、スクリーニングセンター構築の為の準備期間として、

(1)昨年9月にWHOから招聘され研究協力者1名が、ジュネーブで開催されたWHOの抗マalaria剤スクリーニングの欧米実務研究者会議に参加し、WHOとの連携及びWHO研究協力機関での同プロジェクトの実施情報収集に努め、日本の実情に適した新しい抗マalaria活性評価法や殺細胞作用を調べる二次スクリーニング系を導入をすることをWHOとの間で合意した。

(2)本年1月にWHOの研究協力機関のベルギーのTibotec社の研究所に研究協力者1名が技術研修に赴き、マalaria原虫の培養法、抗マalaria活性評価法や殺細胞作用を調べる二次スクリーニング法等の技術習得及び標準実験法を入手した。

(3)入手した標準実験法に準じたマalaria原虫の培養、保存、スクリーニング等の実施に適した機器、器材、培地、試薬等を購入しスクリーニングセンターとして機能すべく実験室の整備をした。

(4)ベルギーのTibotec社の研究所より、マalaria原虫、動物細胞等を凍結したかたちで入手し、培養条件等の検討を開始し、スクリーニングの立ち上げの準備中である。

(5)WHOは、主な日本企業12社とは化合物について、また北里研究所とは微生物や植物素材についての提供契約書を締結した。次年度には各社100-200化合物が提供される運びとなった。

(6)北里研究所ではスクリーニングセンターを基盤とする研究組織として評価、微生物素材、植物素材の3部門からなる熱帯病研究センターを昨年11月に所内に開設し、製薬会社の化合物の以外の所内天然物ライブラリーの供給及び有望物質の単離精製体制を整えた(図1参照)。さらに、マalaria原虫の*in vitro*の評価系が立ち上がるまで微生物代謝産物約4481検体について、当所独自系のエンドパーオキシド様作用物質の探索を行い有望な培養液約62検体を選択した。今後、現在構築中のマalaria原虫を用いた*in vitro*のスクリーニング系にて抗マalaria活性を評価する予定である。

## 研究方法

初年度の計画書と基本的な変更はないが、原虫増殖の有無を調べる方法としてアイソトープの取り込みで調べる方法の代替法として、最近、繁雑な実験操作もなく簡便で再現性の高い呈色反応で調べる方法が開発された(Makler, M. T. et al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 48, 739-741 [1993])。WHOからの呈色反応等を導入する提案に従い、本研究では新たにスクリーニング系を構築するにあたり、一部変更をした。以下初年度の方法に変更点を加筆して述べる。

*In vitro* スクリーニング方法はWHOが指定した方法に準拠する。すなわち、試験原虫として培養熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の薬剤耐性株を用い、*in vitro* 薬剤感受性試験を行う。培地として10%ヒト血清加-RPMI 1640培地を用い、培養条件は5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の混合ガス中にて37°C下で行う。前培養及び維持継代培養した熱帯熱マラリア原虫を初期感染率が(以下変更点)1%となるように非感染赤血球で希釈し、96穴培養プレートに分注し、サンプル溶液を添加し、72時間培養した後、培養プレートを凍結する。翌日凍結融解し、原虫から遊離したlactate dehydrogenaseをMalstat試薬にて呈色反応後、プレートリーダーにて原虫の酵素活性を比色定量する。原虫の増殖阻害活性(IC<sub>50</sub>値)は、薬剤添加群の吸光度及びコントロールの吸光度から算出する。さらに、動物細胞に近似の原虫に対し抗原虫活性を示す化合物は細胞毒性を示すことより、原虫に特異的に作用する化合物を選択すべく、一次スクリーニングの通過化合物について*in vitro*での動物細胞に対する殺細胞作用を調べる二次スクリーニング系も導入する。

## 研究により得られた成果の今後の活用・提供

現在までには成果は得られていないが、申請時研究目的で示すように、本研究で得られる有効な化合物は、WHOの支援のもとに薬剤耐性マラリア原虫の治療薬として開発研究が行われ、国際医療に貢献するものである。

## 結論

スクリーニング系の構築を急務とし、スクリーニングセンターと企業間の化合物及び結果報告の導線、スクリーニングセンターとWHO間との連携等の明確化を図り、スクリーニングを実施する。

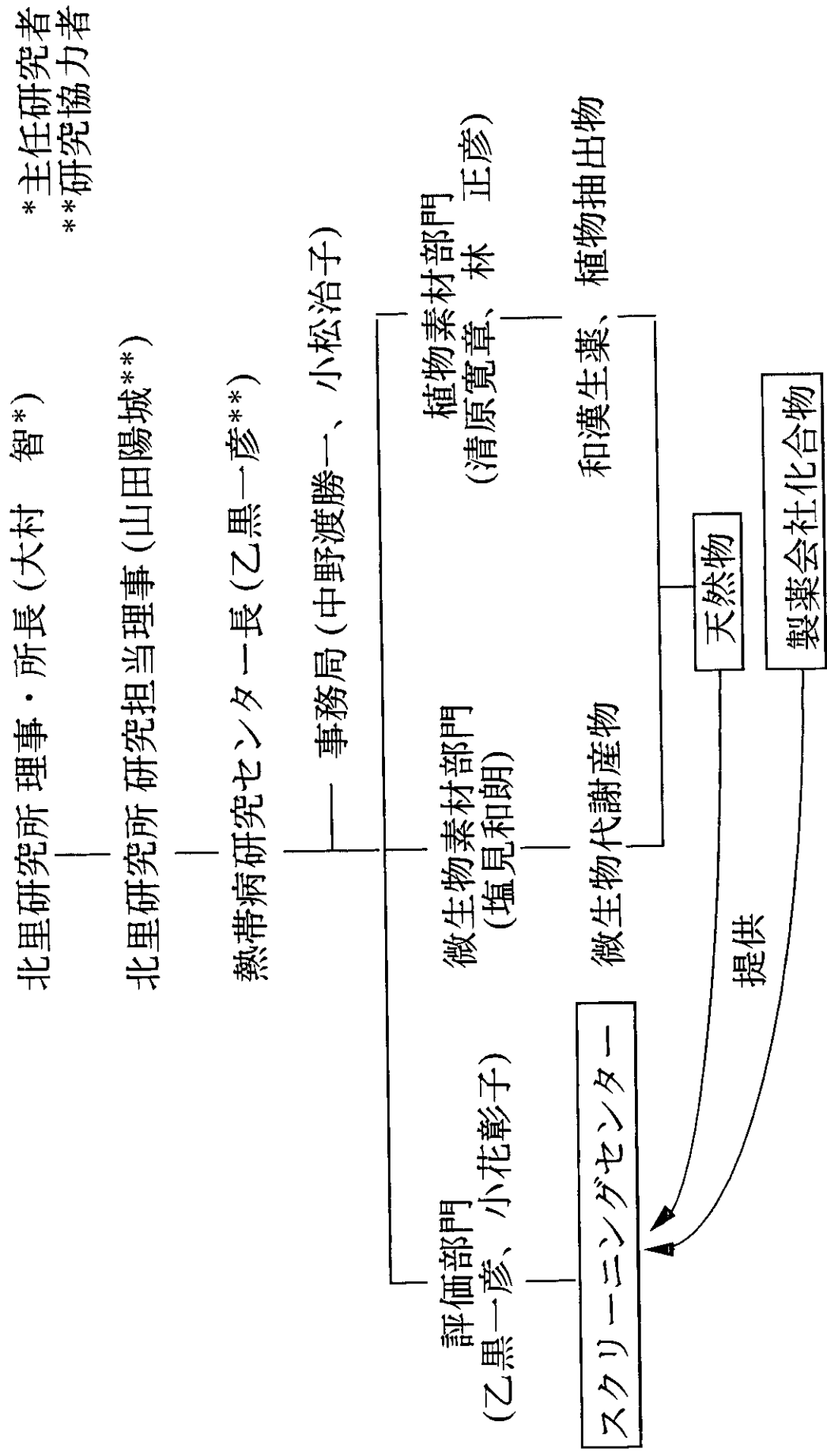


図1. 北里研究所熱帯病研究センター組織図 (平成11年3月31日現在)