

平成11年度

厚生科学研究費補助金

新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化

研 究 報 告 書

平成11年度

厚生科学研究費補助金

新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化

研 究 報 告 書

新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化

主任研究者

北 潔 東京大学大学院医学系研究科・国際保健学専攻
生物医化学教室 教授

分担研究者

永井 和夫 東京工業大学生命理工学部・生物工学科
細胞工学講座 教授

薮 義貞 名古屋市立大学医学部医動物学教室 講師

皆川 信子 新潟薬科大学学生化学教室 講師

研究協力者

鈴木 高史 名古屋市立大学医学部医動物学教室 助手

目 次

新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化	1
東京大学大学院医学系研究科・国際保健学専攻・生物医化学教室 教授 北 潔	
主任研究者	
アスコフラノンの標的シアン耐性酸化酵素の大腸菌における発現系の確立	9
東京大学大学院医学系研究科・国際保健学専攻・生物医化学教室 教授 北 潔	
分担研究者	
アスコフラノン高度産生条件の確立と誘導体の合成	12
東京工業大学生命理工学部・生物工学科・細胞工学講座 教授 永井 和夫	
薬効評価系の確立	15
名古屋市立大学医学部・医動物学教室 講師 薮 義貞	
シアン耐性酸化酵素の生化学的解析	18
新潟薬科大学・生化学教室 講師 皆川 信子	
研究協力者	23
Trypanosoma brucei brucei 原虫の血流型 long slender 型から short stumpy 型に移行する 発現変動を示す遺伝子の解析	
名古屋市立大学医学部・医動物学教室 助手 鈴木 高史	
論文	27
参考文献	63

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化

主任研究者 北 潔

東京大学大学院医学系研究科・国際保健学専攻・生物医化学教室 教授

研究要旨

感染症、特に細菌感染に対する抗生物質を含む化学療法剤が人類に及ぼした医療上の恩恵は計り知れない。しかし寄生虫感染についてはそれらが宿主と同じ真核生物である事から、選択毒性の対象となる作用点が少なく、特に原虫感染では増殖が早い点から感染が致命的になる場合が多い。アフリカ睡眠病はトリパノソーマ科原虫によって発症し、毎年20～30万人の新たな患者が発生している。また地方に流行するため多くの感染者が治療も受ける事なく死亡し、その数字は確定できないのが現状である。さらに家畜類の被害はそれ以上に甚大であり、人々のタンパク源となるべき年間数十万頭のウシが死んでいる。この様にアフリカ睡眠病はアフリカの人々の健康および経済的發展を著しく妨げており、これがWHOが制圧すべき感染症の一つに掲げている理由である。この様な状況の中で申請者らは糸状菌が産生するアスコフラノンが血流型トリパノソーマのミトコンドリアに局在するグリセロール-3-リン酸酸化系をnMオーダーと言う極めて低濃度で特異的に阻害する事を見出した。またマウスを用いた実験では投与後、30分後でほとんどの原虫を血中から消失させると言う劇的な作用を示す。この成果は国際的に高く評価され、欧米諸国の研究機関から共同研究の申し込みや問い合わせを受けている。しかし実際にはアスコフラノンの作用機構の詳細は解明されておらず、全てはこれからの進展にかかっている。本研究はこの点を明らかにし、さらに高度産生変異株の作成および一層効果の高い誘導体の合成を行う事による現実的な実用化を目的として計画されたものであり、わが国からの真の国際貢献をめざす試みである。そこで以下の3点に焦点を絞り、平成11年度より厚生科学研究費の補助を得て研究を進めている。

- 1) アスコフラノンの標的と考えられるシアン耐性酸化酵素(TAO)に対する分子機構の解明(北・皆川)
- 2) アスコフラノンの高度産生株の単離とその誘導体を用いた構造活性相関の解析(永井)
- 3) 培養系および実験動物を用いた薬効評価系による実用化の検討(北・毅)

平成11年度においては組み換えTAOの大腸菌内での大量発現系を確立し、この標品を用いた解析からアスコフラノンの標的がTAOである事が明確になり、その阻害機構は基質であるユビキノンに対する競合阻害である事が判った。さらにこれを用いた新規薬剤のスクリーニング系を確立した。またアスコフラノンとの併用効果を示す新しい薬剤を見出す事ができた。これに加え、アスコフラノンの単独投与による治療法について検討を行った結果、感染マウスを完全に治癒する条件を見出す事ができた。

日々国際化が増すなかで、科学先進国としての日本が各方面において果たすべき役割は非常に多大である。この様に本研究は国際的な要請に基づき、わが国から発信する基礎研究の成果を実際に結実させる事を目的としている。

分担研究者

永井 和夫 東京工業大学生命理工学部・生物工学科・細胞工学講座 教授

藪 義貞 名古屋市立大学医学部・医動物学教室 講師

皆川 信子 新潟薬科大学・生化学教室 講師

研究協力者

鈴木 高史 名古屋市立大学医学部・医動物学教室 助手

A. 研究目的

寄生虫症の化学療法を考えた時、これが宿主と同じ真核生物である事から選択毒性の対象となる作用点が少なく、特に原虫感染では増殖が早い点から感染が致死的になる場合が多い。これまでの研究で申請者らはアフリカ睡眠病の病原体であるトリパノソーマ科原虫

Trypanosoma brucei brucei の血流型に対して極めて低濃度で特異的に作用する薬剤として糸状菌の産生するアスコフラノンを見出した。この成果は国際的に高く評価され、WHOも含め欧米諸国の研究機関から共同研究の申し込みを受けている。本研究はアスコフラノンの作用機構を解明し、さらに高度産生変異株の作成および一層効果の高い誘導体の合成を行う事による現実的な実用化を目的として計画されたものである。

A-1) アフリカ睡眠病

アフリカ睡眠病はツェツェバエによって媒介されるトリパノソーマによる原虫感染症であり、感染から10日前後で原虫が血流中に出現する。感染初期には原虫は血流中で増殖し、発熱、倦怠感、頭痛、筋肉や関節の痛み、掻痒感を与え進行とる。症状とその進行は患者により大きく異なり、数週間から数年間にわたるものまで多様である。慢性期に入ると中枢神経系が侵されて精神錯乱や全身の痙攣などの症状を呈し、最終的には嗜眠状態に陥って死に至る。アフリカ睡眠病の患者数については様々な報告がなされ

ているが調査データの信頼性が低く、その数は確定できないのが現状である。少なくともWHOによれば1996年には15万人が死亡し、10万人以上に後遺症が残ったと言われる。さらにナガナ病と呼ばれる家畜類の被害はそれ以上に甚大であり、人々のタンパク源となるべき年間数十万頭のウシが死んでいる。この様にアフリカ睡眠病はアフリカの人々の健康および経済的発展を著しく妨げており、これがWHOが制圧すべき感染症の一つに掲げている理由である。

A-2) アフリカ睡眠病の治療

アフリカ睡眠病の治療にはペンタミジン、メラルソプロールやエフロルニチンなどが用いられ、1960年代にはその撲滅も可能との感もあった。しかし、これらの薬剤は古く有効性は徐々に低下している。特にヒ素剤であるメラルソプロールに対する耐性は大きな問題となっており、効果の見られない患者は死を待つのみと言う悲惨な状況となっている。しかもペンタミジンも含めこれらの薬剤は静脈注射による投与時に苦痛を伴うとともに副作用も強く5%近くの患者が死亡するとの報告もある。また副作用の比較的少ないエフロルニチンはこれを商品化したメレル・ダウ社が1994年に製造を中止した事から、販売権はWHOにあるものの実際の使用は極めて困難になっている。

A-3) 本研究の背景と目的

トリパノソーマはヒト体内では主に血流中に生息している。この血流型のエネルギー代謝はグリコソームと呼ばれる原虫特有なオルガネラに局在する解糖系に依存しており、いわゆるミトコンドリアにおける酸化的リン酸化は機能していない。しかしこの解糖系を効率良く駆動するためには生成したNADHの再酸化が必要であり、これにはミトコンドリアのグリセロール-3リン酸酸化系が重要な役割を果たしている。この酸化系の末端酸化酵素は還元型のユビキノンを電子供与体とするキノール酸化酵素として機能し、宿主の持つ好氣的な呼吸系のシトクロム酸

化酵素とは大きく異なった性質を持っている。特に注目すべき点は宿主のシトクロム酸化酵素を速やかに阻害するシアンに非感受性と言う点である。そこでこれまでも欧米を中心に多くの研究者がこのシアン耐性酸化酵素を標的とした薬剤の開発を試みて来たが、選択毒性の高い有効なものとは得られていなかった。この様な状況の中で申請者らは抗腫瘍作用を持つアスコフラノンがトリパノソーマのグリセロール-3-リン酸酸化系をnMオーダーと言う極めて低濃度で特異的に阻害する事を見出した (Mol. Biochem. Parasitol. 1996, 81, 127-136 参考文献参照)。

アスコフラノンは抗腫瘍活性を有する微生物代謝産物として糸状菌から単離されたプレニルフェノール化合物であり、研究分担者の永井はアスコフラノンが宿主の免疫系を活性化する事により抗腫瘍作用を発現する事を明らかにし (J. Antibiotics, 35, 1547-1552, 1986)、これがマクロファージの呼吸系に作用してサイトカイン産生を誘導する事による事実を明らかにしていた (Biosci. Biotech. Biochem., 62, 1115-1121, 1998)。そこで皆川はアスコフラノンが酵母ミトコンドリア呼吸鎖のユビキノン酸化還元部位も阻害する事に基づき、*T. b. brucei* の血流型ミトコンドリアのシアン耐性末端酸化酵素の持つキノール還元酵素に対する阻害効果を調べた。その結果アスコフラノンはトリパノソーマの細胞およびミトコンドリアにおけるグリセロール-3-リン酸依存の呼吸、さらにはミトコンドリアのキノール酸化酵素活性をnMオーダーの低濃度で阻害した。そして実際にマウスを用いた数による動物実験では投与30分後にはほとんどの原虫が血中から消失していた (Parasitol. Int. 47, 131-137, 1998 参考文献参照)。この成果についてWHOをはじめとする欧米の研究機関から共同研究の依頼や問い合わせが多数寄せられている。われわれはアスコフラノンによって先に述べたアフリカ睡眠病治療の現状が解決できるのではないかと考え、その実用化を目的として本研究を進めている。

B. 研究方法

寄生原虫の電子伝達系は特有の構成成分を持ち、これが化学療法剤の作用部位となっている例は、アメーバやトリコモナスの特効薬であるメトロニダゾールでよく知られている。本研究で実用化をめざすアスコフラノンはこの様な電子伝達系の特殊性を標的とする新しいタイプの抗トリパノソーマ剤である。これまでもin vitroで有効な抗トリパノソーマ薬は多く報告されているが、in vivoで実際に効果を示す例は非常に少ない。しかしアスコフラノンはすでにマウスを用いた実験でもその有効性が明確になっており、実際に臨床で利用する事を目的として

- 1) アスコフラノンの標的と考えられるシアン耐性酸化酵素に対する分子機構の解明
- 2) アスコフラノンの高度産生条件の確立とその誘導体を用いた構造活性相関の解析
- 3) 培養系および実験動物を用いた薬効評価系による実用化の検討

の3点に焦点を絞り以下の計画に従って研究を進めた。

本研究は平成12年度までは薬剤の効果の評価を可能な限りトリパノソーマの培養系および大腸菌における組換え酵素を用いて進め、効果的なスクリーニングを行う事によって無益な実験動物の殺傷を極力減じている。また、最終年度において計画していたマウスを用いた実験の治療を予定を早めて本年度から開始したが、これはアスコフラノンの実用化をめざす上で避けては通れない過程である。この実験においては動物愛護の精神に基づき「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に従って研究を進めた。この様に本研究計画は倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

C-1)アスコフラノンの標的シアン耐性酸化酵素の大腸菌における発現系の確立

これまでのトリパノソーマのミトコンドリア

を用いた実験からアスコフラノンの標的はTAOと考えられている。また最近の遺伝子レベルの研究から、TAOと植物や酵母に存在するシアン耐性末端酸化酵素との共通性が明らかになって来たが生化学的解析は進んでいない。これは酵素が不安定で単離精製が困難であることに起因している。そこでアスコフラノンの標的を特定し、さらにその阻害機構を明らかにする目的で組み換えTAOの大腸菌内での発現を試みた。その結果、原虫TAOと同様の性質を保持した組み換えTAOを持つ大腸菌膜画分標品を大量に得る条件を見出す事ができた。さらにヘム欠損変異株FN102を発現宿主として大腸菌が本来持つキノール酸化酵素を除き、キノール酸化酵素として組み換えTAOのみを持つ系を確立した。これから得られた膜標品を用いて酵素学的解析を行った結果、アスコフラノンの阻害はユビキノンに対する競合阻害である事が明らかになった。この菌株では増殖が組み換えTAOにのみ依存するのでTAOをアスコフラノンや既存のTAO阻害剤であるサリチルヒドロキサム酸(SHAM)で阻害すると増殖も著しく阻害される。以上、今まで生化学的な性質の判っていなかったTAOの詳細を解析する事が可能になり、また、TAOを標的とした抗トリパノソーマ剤のスクリーニングを効率良く行うことができるようになった。後述する様に、永井によって実際にこの菌株を用いて大腸菌の増殖阻止によって新しい抗トリパノソーマ薬を検索するシステムが完成した。

C-2)アスコフラノン高度産生条件の確立と誘導体の合成

アスコフラノンの大量生産を目的とし、生産菌 *Ascochyta visiae* Libertの培養条件を検討した。炭素源、窒素源、塩化物添加、その他無機塩類添加の各種条件を検討した結果、28℃、6日間培養で6.48 mg/mlの生産量を達成した。

さらにC-1)で得られた大腸菌のヘム合成系変異株でアスコフラノンの標的酵素であるTAOを発現させた組み換え大腸菌を用いて、TAOの特異的阻害剤をスクリーニングする系の構築を行った。各種既知物質のアッセイを行ったところ、

アスコフラノンがTAO組換え大腸菌の増殖を選択的に阻害したことから、この系によりTAOの特異的阻害剤が選択できることが示された。

C-3)薬効評価系の確立

トリパノソーマに固有に存在するTAOを特異的に阻害する事から発見されたアスコフラノンをアフリカトリパノソーマ症に治療薬として実用化に向けトリパノソーマ症マウスモデルを用い、その治療効果を検討した。これまでの研究結果から動物モデルにおいてアスコフラノンは単独では抗トリパノソーマ効果は期待されずグリセロールとの併用が必要とされていた。しかし、培養系においてアスコフラノンは単独で抗トリパノソーマ作用を示す事から、その血中濃度をある一定のレベルに保てば単独投与でも治療効果が見られるのではとの予測からアスコフラノン単独かつ連続投与による治療効果を検討した結果、アスコフラノン100mg/Kgを24時間毎に4回腹腔内に投与する事によりトリパノソーマ感染マウスが100%治癒する事を確認した。

C-4)シアン耐性酸化酵素の生化学的解析

原虫 *Trypanosoma b. brucei* の特異的なエネルギー代謝を標的とする化学療法剤を開発する目的で、WHOとの共同研究によりマウスにおける *Trypanosoma b. rhodesiense* 急性感染に対するアスコフラノンとグリセロール同時投与について検討した結果、その治療効果を確認した。この実験は「C-3)薬効評価系の確立」に該当する内容であるが、これまでの研究の経緯からアスコフラノンに関する対外的な窓口を皆川が担当しており本項目で報告した。また投与量・投与方法に問題があるグリセロールに代わり得るアスコフラノンの併用薬剤の検索を行ったところ、漢方の抗炎症処方に含まれるビスベンジルイソキノリンアルカロイドの一種、テトランドリンの有効性が認められた。

さらにアスコフラノンと構造上深く関連しているアスコクロリンに関して、ミトコンドリアのシトクロム *bc₁* 複合体に対する作用機構をX

線結晶構造解析によって3次元構造から調べた。この結果からアスコフラノンは側鎖の構造が障害となってシトクロムbc₁複合体に結合できない事が判った。また血流中のトリパノソーマにおけるTAOの急激な発現のメカニズムを推定する目的で、酵母*Hansenula anomala*におけるAO核遺伝子発現の過程を検討したところ、金属キレーターであるジチオカルバメート類が発現を誘導する作用と同時に誘導を阻害する作用を示す事が明らかになった。

C-5) *Trypanosoma brucei brucei* 原虫の血流型long slender型からshort stumpy型

に移行する発現変動を示す遺伝子の解析

アスコフラノンはトリパノソーマ原虫のシアン耐性酸化酵素を特異的に阻害することが明らかにされてきており、宿主体内で活発に増殖するlong slender (LS)型トリパノソーマ原虫に強力に作用するが、増殖を止めてツエツエバエに移行しうるshort stumpy (SS)型に対しては作用しない可能性が高いと考えられてきた。SS型自体は48時間程度の限られた寿命しか持たないため、このことが直ちにアスコフラノンの有効性を損ねるものとは考えられないが、このLS型からSS型へ移行する際に伴う遺伝子発現変動解析を網羅的に明らかにする事によってはじめて、抗トリパノソーマ薬としてアスコフラノンの実用化を目指す上での重要な知見を得る事ができる。そこで、蛍光differential display法によりLS型からSS型へ移行する際に発現変動する遺伝子群の解析を行った。その結果、LS型で特に発現が顕著なcDNA (遺伝子) を1つ見い出した。このcDNA (遺伝子) の産物はN末側にDNA binding motifを有し、C末側にはcalpain様ドメインを有する新規プロテアーゼ (*Trypanosoma calpain-like*: TCL) 遺伝子と推定された。さらにその変動する遺伝子の機能解析としてantisense-oligo DNAを用いた遺伝子発現抑制実験を行った結果、24時間後に原虫が100%死滅した。以上の結果から、TCL遺伝子はアフリカトリパノソーマ原虫のLS型の増殖、生存に極めて重要な機能を持つと推察された。

D. 考察

今年度は実用化をめざした本研究の初年度であり、基礎的な部分に関する足固めの研究を行って来た。ここで得られた成果は直接実用化に結びつくと言うものではないが、次年度からの研究計画を進めるにあたって非常に重要な情報を与えており初期の目的を予想以上に果たしたと言う事ができる。以下に各項目別にその成果についての考察と、この成果をふまえた解決すべき次の問題点を述べる。

D-1)アスコフラノンの標的シアン耐性酸化酵素の大腸菌における発現系の確立

シアン耐性酸化酵素はトリパノソーマばかりでなく植物や酵母ミトコンドリアにも存在し、その共通性が明らかになりつつあるが、しかし酵素タンパク質としての性質はほとんど明らかになっていない。このような現状を考えた時、本研究によって大腸菌膜タンパク質の80%近くまでの合成量をしかも10Lと言う大量培養系で確立した点は極めて大きな前進である事は言うまでもない。しかもヘム合成系の変異株を用いる事によって大腸菌が本来持っているキノール酸化酵素活性を除き大腸菌の増殖が組み換えTAOに依存する系を構築した事により、TAOの酵素的性質を大腸菌膜を用いて解析する事ができるようになった。その結果、アスコフラノンによる阻害が基質であるユビキノン結合部位への競合阻害である事を示唆する結果を得た点は、アスコフラノンの作用機構を知る上で大きな成果であった。さらにこの系を用いてTAOを標的とする新しい抗トリパノソーマ薬のスクリーニングを行う事が可能となり、実際に永井らによって具体的な方法論が確立された点は耐性株の出現頻度が高いとされているアフリカトリパノソーマの制圧に大きく貢献するものである。

今後、可溶化、精製によって高純度、高活性の標品を得て補欠分子族などを含むタンパク質化学的な解析、さらにX線結晶解析による3次元構造解析によってキノール酸化酵素活性の発現に必要なアミノ酸残基や立体構造の同定とア

スコフラノンの結合部位とその作用機構の詳細を明らかにして行く事が重要である。これらの情報によってさらにTAOを標的とした抗トリパノソーマ薬のコンピュータによる薬剤分子設計が可能となると考えられる。

D-2)アスコフラノン高度産生条件の確立と誘導体の合成

アスコフラノンを抗トリパノソーマ薬として実際にアフリカの現地で治療に用いるためには薬剤の安定した供給が必要不可欠である。そこでアスコフラノンの大量生産を目的とし、生産菌 *Ascochyta visiae* Libertの培養条件を検討した結果、28℃、6日間培養で6.48 mg/mlの生産量を再現性良く示す事が判った。これはアスコフラノンの抗トリパノソーマ薬としての実用化に大きな一歩であり、今後、副産物との分離を考慮した大量精製の条件の検討が重要課題である。

さらにD-1)でも少々述べたが大腸菌のヘム合成系変異株でアスコフラノンの標的酵素であるTAOを発現させた組換え大腸菌を用いて、TAOの特異的阻害剤をスクリーニングする系を確立した事は今後の新しい抗トリパノソーマ薬の開発に大きな意味を持っている。すなわち、この系によってより効果の高いアスコフラノンの誘導体の検索ばかりでなく、全く構造の異なる新しい薬剤のランダムスクリーニングが可能となったからである。すでに放線菌培養液から有望な検体がこの系を用いて見い出されており、今後の進展が期待される。

D-3)薬効評価系の確立

アスコフラノンは試験管内の培養系ばかりでなくマウスを用いた動物実験においても投与後30~40分以内で見かけ上、ほとんどの原虫が消失するという劇的な効果を示す。しかしこれには解決すべき大きな問題点があった。それはこれまでの動物モデルにおいてアスコフラノンは単独では抗トリパノソーマ効果は期待されず、グリセロールとの併用が必要と言う点である。TAOの生理的役割はグリコソーム中の解糖系の

進行にともなって生じたNADHの再酸化であるが、トリパノソーマ原虫はTAOが阻害された場合、ジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール-3リン酸、そしてグリセロールを生成する系を誘導してNADHを再酸化する。動物実験においては、これまでもSHAMによるTAOの単独阻害のみでは効果が低く、グリセロール生成系の最終ステップを触媒するグリセロールキナーゼをグリセロールで阻害する必要がある事が報告されていた。これはアスコフラノンにおいても同様であり、実用化を考えるにあたっての大きな障害であった。この様な状況下で今回、アスコフラノン単独かつ連続投与によるマウスモデルにおいてトリパノソーマ感染マウスが100%治癒する条件を見出した事は大変に意義深く、投与方法のさらなる改善によって真の実用化にさらに一歩前進すると考えられる。同時にC-4)で報告した様にグリセロールに代わる効果的な併用剤の開発も重要な課題であり、この様な多方面からの研究によって実際に臨床の場で効果を示す治療法を確立する事ができると考えている。

D-4)シアン耐性酸化酵素の生化学的解析

今回、WHOとの共同研究によりマウスにおける *Trypanosoma b. rhodesiense* 急性感染に対してアスコフラノンとグリセロール同時投与が有効である事が明らかになったが、これは極めて重要な意味を持っている。つまりこれまで実験に用いて来た *Trypanosoma b. brucei* は動物には感染するがヒトには感染しない。これに対して *Trypanosoma b. rhodesiense* はヒトと動物両者に感染する。つまり今回の実験の結果、はじめてアスコフラノンが実験動物のみならずヒトのトリパノソーマ症に有効である事が判ったのである。これはアスコフラノンが実際に実験室内ばかりでなく、トリパノソーマ症で苦しんでいるアフリカの人々に対してその効果を示す事を意味しており、本研究計画の実現への確信に極めて強力な裏づけを与えるものである。また、TAOに比較して研究が先行している植物や酵母からの情報は様々な問題点の解決に重要

なヒントの供給源となる。アスコフラノンの構造類似体であるアスコクロリンに関して、この薬剤がTAOではそれほど効果を示さず哺乳類ミトコンドリアのシトクロムbc₁複合体に対して特異的に作用する事実について、X線結晶構造解析からその作用部位がキノンの結合部位である事、そして側鎖の構造的な相違が作用の相違の原因である事をつきとめた点は今後のアスコフラノンの作用機構についての解析、また新しい抗トリパノソーマ薬の分子設計に大きく貢献すると考えられる。

D-5) *Trypanosoma brucei brucei* 原虫の血流型long slender型からshort stumpy型

に移行する発現変動を示す遺伝子の解析

アスコフラノンは宿主体内で活発に増殖するlong slender (LS)型トリパノソーマ原虫に強力に作用するが、増殖を止めてツエツエバエに移行し得るshort stumpy (SS)型に対しては作用しない可能性が高い。これはSS型のミトコンドリアが哺乳類型であり、TAOを含んでいない事による。これに対する様々な戦略が考えられるが、まず最初に行うべき事はLS型からSS型への転換がどのような分子機構によって制御されているかと言う点を明らかにする事と考えている。これは一見、実験室内のいわゆる典型的な基礎研究の様に受け取られがちであるが、決してそうではない。SS型への転換に不可欠な情報の伝達系の詳細が判れば、これを阻害し全ての原虫をLS型に捕捉しておいてより効果的な治療を行う事が可能となるからである。蛍光 differential display法によりLS型からSS型へ移行する際に発現変動する遺伝子群の解析系を確立し、さらにアンチセンス DNAを用いた遺伝子発現抑制によって目的とする遺伝子の細胞増殖への役割を調べるシステムを構築した事は標的としてのトリパノソーマの生物学的特徴を明確に知ると言う点で、大変に大きな前進と言える。

E. 結論

以上、述べて来た様に今年度は組み換えTAO

の発現系を確立し、この系を用いてアスコフラノンの標的がTAOである事を明確にし、またその作用機構について他の生物種のAOや構造類似体の解析情報も加えキノンの競合阻害である事を明らかにした。またこの大腸菌での発現系を用いて新しい抗トリパノソーマ薬のスクリーニング系を構築した。さらにアスコフラノン単独投与でも有効な条件を決定し、これに加えてグリセロールに代わる併用剤の候補も見い出した。そして血流型トリパノソーマの中でアスコフラノンが特異的に作用するLS型から次のステージであるSS型への転換について遺伝子レベルでの変動を解析する系を確立し、より有効な治療法への足掛かりを確実なものとした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Functional expression of the ascofuranone-sensitive *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*
Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., and Kita, K.
(1999) Comparative Biochemistry and Physiology 124, 141-148
- 2) Ascofuranone: A new chemotherapeutic agent for African Trypanosomiasis.
Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., and Kita, K.
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health in press

2. 学会発表

- 1) Development of the screening system for antitrypanosomal drugs targeted on trypanosome alternative oxidase
Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., and Kita, K.

第68回日本寄生虫学会 平成11年 4月

- 2) トリパノソーマシアン耐性酸化酵素の大腸菌における発現と組み換え酵素の性質
深井義久、二瓶浩一、網野比佐子
河合敬介、藪 義貞、太田伸生、皆川信子
坂上 茂、吉本昭夫、永井和男、北 潔
平成11年度日米医学協力研究会 平成12
3月

- G. 知的所有権の取得状況
特になし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アスコフラノンの標的シアン耐性酸化酵素の大腸菌における発現系の確立

主任研究者 北 潔

東京大学大学院医学系研究科・国際保健学専攻・生物医化学教室 教授

研究要旨

これまでのトリパノソーマのミトコンドリアを用いた実験からアスコフラノンの標的はTAOと考えられている。また最近の遺伝子レベルの研究から、TAOと植物や酵母に存在するシアン耐性末端酸化酵素との共通性が明らかになって来たが生化学的解析は進んでいない。これは酵素が不安定で単離精製が困難であることに起因している。そこでアスコフラノンの標的を特定し、さらにその阻害機構を明らかにする目的で組み換えTAOの大腸菌内での発現を試みた。その結果、原虫TAOと同様の性質を保持した組み換えTAOを持つ大腸菌膜画分標品を大量に得る条件を見出す事ができた。さらにヘム欠損変異株FN102を発現宿主として大腸菌が本来持つキノール酸化酵素を除き、キノール酸化酵素として組み換えTAOのみを持つ系を確立した。これから得られた膜標品を用いて酵素学的解析を行った結果、アスコフラノンの阻害はユビキノンに対する競合阻害である事が明らかになった。この菌株では増殖が組み換えTAOにのみ依存するのでTAOをアスコフラノンや既存のTAO阻害剤であるサリチルヒドロキサム酸(SHAM)で阻害すると増殖も著しく阻害される。以上、今まで生化学的な性質の判っていなかったTAOの詳細を解析する事が可能になり、また、TAOを標的とした抗トリパノソーマ剤のスクリーニングを効率良く行うことができるようになった。後述する様に、永井によって実際にこの菌株を用いて大腸菌の増殖阻止によって新しい抗トリパノソーマ薬を検索するシステムが完成した。

A. 研究目的

これまでのトリパノソーマのミトコンドリアを用いた実験からアスコフラノンの標的はTAOと考えられている。また最近の遺伝子レベルの研究から、TAOと植物や酵母に存在するシアン耐性末端酸化酵素との共通性が明らかになって来たがその生化学的解析は進んでいない。これは酵素が不安定で単離精製が困難であることに起因している。そこでアスコフラノンの標的を特定し、さらにその阻害機構を明らかにする目的で組み換えTAOの大腸菌内での発現を試みた。

B. 研究方法と結果

B-1) 組み替えTAO発現系の構築

アフリカ型トリパノソーマ原虫から精製した

mRNAより、RT-PCRにて増幅したTAO遺伝子を発現ベクターpET15bに挿入して、TAO発現ベクター(pTAO)を作成した。pTAOを導入した大腸菌BL21(DE3)pLysSにはCBB染色にて分子量約37kDaの新たなペプチドのバンドが認められた。菌体を細胞質画分および膜画分に分離し、植物シアン耐性末端酸化酵素に対するモノクローナル抗体でウエスタンブロット解析を行ったところ、分子量約37kDaのバンドはこのモノクローナル抗体と交差反応し、局在は膜画分であることが明らかになった。そこで、膜画分についてキノール酸化活性を調べたところ、pTAOを導入した大腸菌ではシアン存在下でも全く阻害されなかった。またpTAOを導入した大腸菌の増殖はシアンに耐性で、TAOの本来持

つ性質を示していた。この様に大腸菌において活性のある状態での組み換えTAOの発現が可能となった。

B-2) ヘム合成系欠損株を用いた組み換えTAO発現系の構築

BL21(DE3)pLysSを発現宿主として用いた系では、呼吸鎖中にTAOと同じキノール酸化活性を触媒する大腸菌由来の二つの末端酸化酵素、シトクロム*bo* および*bd* 複合体が存在するため、TAOの酵素学的性質の解析や活性を指標とした精製が困難であると言う問題が生じた。そこで、大腸菌末端酸化酵素の補欠分子族であるヘムを合成できない*hemA* 欠損株を用いた発現系の確立を試みた。*hemA* 欠損株は呼吸鎖中の末端酸化酵素および複合体IIの活性が失われるが、培養液中にアミノレブリン酸(ALA)を加えることによりヘムを合成させることが可能で、人為的にヘムの合成を制御することができる。

BL21(DE3)にP1 形質導入により*hemA* 欠損を導入しヘム欠損変異株FN102を作成した。培地中にALAを添加し、ヘムを合成させたコントロールベクター導入株FN102/pET15bの膜画分の活性はシアンに感受性でアスコフラノンに耐性であった。一方、培地中にALAを添加せず、ヘムを合成させないFN102/pET15bの膜画分のキノール酸化活性は検出限度以下であり、さらにpTAO導入株FN102/pTAOではシアンに耐性でアスコフラノンに感受性のキノール酸化活性が認められた。これにより、組み換えTAOを唯一の末端酸化酵素として持つ発現系が確立された。

B-3) 組み換えTAOの酵素学的性質の検討

発現条件を検討した結果、トリパノソーマ原虫から調製したミトコンドリアの少なくとも10倍の比活性を持つ膜画分を再現性よく得られるようになった。そこで、大腸菌で発現させた組み換えTAOが、トリパノソーマ原虫が本来持っているTAOと同等の性質を保持しているかを確かめるため、トリパノソーマ原虫から調製したミトコンドリアと

FN102/pTAO膜画分のキノール酸化活性の酵素学的解析を行ったところ、電子供与体であるユビキノールに対する*K_m*値、阻害剤であるアスコフラノンに対する*K_i*値ともに両者で同程度の値であった。これは組み換えTAOが本来のTAOの性質を保持している事を示しており、この標品が今後の精製や阻害機構解析に用いる事ができる点が明らかになった。

B-4) FN102/pTAOのTAO阻害剤のスクリーニング系としての応用

FN102/pET15bとFN102/pTAOのLB培地中での好氣的増殖を調べたところ、FN102/pET15bの倍加時間約4時間に対してFN102/pTAOの倍加時間約1時間となり、組み換えTAOにより増殖が早くなることが分かった。また、FN102/pTAOの増殖はシアンに耐性であり、TAOの性質を保持していた。これはヘム欠損株の液体培地中での好氣的増殖は組み換えTAOによって相補されている事を示しており、したがってFN102/pTAOは、TAOの阻害を好氣的増殖の阻害として検出できる可能性を強く示唆している。そこで、FN102/pTAOをTAO阻害剤であるアスコフラノンおよびSHAMを添加したLB培地中で好氣的に培養したところ、アスコフラノン3 nM~10 μM、SHAM 3 μM~1 mMにおいて濃度依存的に増殖が阻害された。以上、FN102/pTAOは液体培地中でもTAOの阻害の程度を増殖の阻害として検出できることが明らかになり、抗トリパノソーマ剤の新しいスクリーニング系として利用できる事が判った。

C. 考察

シアン耐性酸化酵素はトリパノソーマばかりでなく植物や酵母ミトコンドリアにも存在し、その共通性が明らかになりつつあるが、酵素タンパク質としての性質はほとんど明らかになっていない。その理由はシアン耐性酸化酵素が非常に不安定であり、生物種を問わず十分な活性を持った形での精製が未だに成功していない事にある。この点を解決する目的で多くの研究室で組み換え酵素を用いた解析の試みがなされて

いるが、タンパク質としてSDS-PAGEで検出できるほどの合成量を示す系を確立したグループは皆無であった。このような現状を考えた時、本研究によって大腸菌膜タンパク質の80%近くまでの合成量をしかも10Lと言う大量培養系で確立した点は極めて大きな前進である事は言うまでもない。しかもヘム合成系の変異株を用いる事によって大腸菌が本来持っているキノール酸化酵素活性を除き大腸菌の増殖が組み換えTAOに依存する系を構築した事により、TAOの酵素的性質を大腸菌膜を用いて解析する事ができるようになった。その結果、アスコフラノンによるグリセロール-3-リン酸化系の阻害の標的がTAOである事が明確になった点は、アスコフラノンの作用機構を知る上で大きな成果であった。さらにこの系を用いてTAOを標的とする新しい抗トリパノソーマ薬のスクリーニングを行う事が可能となり、実際に永井らによって具体的方法論が確立された点は耐性株の出現頻度が高いとされているアフリカトリパノソーマの制圧に大きく貢献するものである。

今後、可溶化、精製によって高純度、高活性の標品を得て補欠分子族などを含むタンパク質化学的な解析、さらにX線結晶解析による3次元構造解析によってキノール酸化酵素活性の発現に必要なアミノ酸残基や立体構造の同定とアスコフラノンの結合部位とその作用機構の詳細を明らかにして行く事が重要である。これらの情報によってさらにTAOを標的とした抗トリパノソーマ薬のコンピュータによる薬剤分子設計が可能となると考えられる。

D. 結論

組み換えTAOの大腸菌内での発現系を確立し、この系を用いてアスコフラノンの標的がTAOである事を明確にした。またその作用機構について他の生物種のAOや構造類似体の解析情報も加えキノールとの競合阻害である事を明らかにした。さらにこの大腸菌での発現系を用いて新しい抗トリパノソーマ薬のスクリーニング系を構築した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Functional expression of the ascofuranone-sensitive *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*
Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., and Kita, K.
(1999) *Comp. Biochem. Physiol.* 124, 141-148
- 2) Ascofuranone: A new chemotherapeutic agent for African Trypanosomiasis.
Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., and Kita, K.
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health in press

2. 学会発表

- 1) Development of the screening system for antitrypanosomal drugs targeted on trypanosome alternative oxidase
Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., and Kita, K.
第68回日本寄生虫学会 平成11年 4月
- 2) トリパノソーマシアン耐性酸化酵素の大腸菌における発現と組み換え酵素の性質
深井義久、二瓶浩一、網野比佐子
河合敬介、藪 義貞、太田伸生、皆川信子
坂上 茂、吉本昭夫、永井和男、北 潔
平成11年度日米医学協力研究会 平成12
3月

F. 知的所有権の取得状況

特になし

アスコフラノン高度生産条件の確立と誘導体の合成

分担研究者：永井和夫 東京工業大学生命理工学部

研究要旨

アスコフラノンの大量生産を目的とし、生産菌 *Ascochyta visiae* Libert の培養条件を検討した。炭素源、窒素源、塩化物添加、その他無機塩類添加の各種条件を検討した結果、28℃、6日間培養で6.48 mg/mlの生産量を達成した。

アスコフラノンの標的酵素である *Trypanosoma brucei* alternative oxidase (TAO) を発現させた組換え大腸菌を用いて、TAOの特異的阻害剤をスクリーニングする系の構築を行った。各種既知物質のアッセイを行ったところ、アスコフラノンがTAO組換え大腸菌の増殖を選択的に阻害したことから、この系によりTAOの特異的阻害剤が選択できることが示された。

A. 研究目的

アスコフラノン誘導体の合成や *in vivo* 投与実験など、本研究を滞りなく遂行するためにはアスコフラノンの安定供給が欠かせない。そこで、アスコフラノン生産株 *Ascochyta visiae* Libert を用いた高生産株の構築と高度生産条件の確立を目的とした。

また、アスコフラノンの標的酵素 *Trypanosoma brucei* alternative oxidase (TAO) の活性検出には、現在のところ原虫より調製した膜画分や精製酵素を用いた測定が必要であり熟練した高度な技術が要求される。そこで合成した各種誘導体の活性を簡便にアッセイするため、さらに天然物等からTAOの特異的阻害剤をスクリーニングするためのアッセイ系の構築を目的とした。

B. 研究方法

1) アスコフラノン高生産条件の検討

アスコフラノン生産菌 *Ascochyta visiae* Libert を 50 ml の培地（基本培地、5% glucose, 0.5% peptone, 0.02% K_2HPO_4 , 0.2%

$CaCl_2$, 0.2% dry yeast, 0.1% NH_4Cl ）に接種し、28℃にて培養した。菌体のメタノール抽出物中のアスコフラノン関連物質 [アスコフラノン (AF)、アスコクロリン (AC)、ジヒドロアスコクロリン (DHAC)] を $FeCl_3$ による比色定量、またはHPLCにより分離定量した。炭素源として glycerol, sucrose, sucrose+starch, starch, glucose を、窒素源として peptone, peptone+各種無機窒素源, dry yeast, casein を、塩化物として $CaCl_2$, NH_4Cl , KCl を、様々な濃度で添加してアスコフラノン生産量に対する効果を検討した。

2) TAO阻害剤のスクリーニング系の構築

大腸菌 *hemA* 変異株にクローン化したTAOを導入した組換え大腸菌をアッセイに用いた。この菌では、大腸菌本来のキノール酸化酵素は欠損しているためTAOのみが呼吸鎖の末端酸化酵素として機能しており、アスコフラノン等のTAO阻害剤の添加により好氣的増殖が阻害される。また、アミノレブリン酸 (ALA) の添加によりヘム合成が回復するため末端酸化酵素を大腸菌本来の

ものに切り替えることができる。ALA無添加のとき増殖阻害を示し、ALA添加時には阻害活性を示さない化合物はTAO特異的阻害剤と判定できる。

(倫理面への配慮)

特に該当するような実験は行っていない。

C. 研究結果

1) 各種培養条件を検討した結果、7% glucose, 0.6% casein, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4$, 0.2% $CaCl_2$, 0.1% dry yeastで28°C、6日間培養したときに6.48 mg/mlの生産量を達成した。このときアスコフラノン関連物質の組成はAF:DHAC:AC=50:30:20であった。副産物であるDHACの産生を低下させるためには、7% glucose, 0.3% peptone, 0.6% $CaCl_2$, 0.05% K_2HPO_4 , 0.03% $MgSO_4$, 0.1% dry yeast, 0.2% $CaCl_2$ (別滅菌)で28°C、7日間培養が優れていた。このとき生産量は4.92 mg/mlで、AF:DHAC:AC=45:10:45であった。

2) 各種既知化合物 (DNA合成阻害剤、RNA合成阻害剤、タンパク質合成阻害剤、細胞壁合成阻害剤等) はALAの有無にかかわらず検定菌の増殖を阻害したのに対し、アスコフラノンはALA無添加時のみ阻害活性を示した。このことから本アッセイ系はTAOの特異的阻害剤の検定に有効であることが示された。そこで放線菌培養液約400検体を本アッセイ系にてスクリーニングしたところ、1検体がALA無添加時のみ検定菌の増殖を阻害した。

D. 考察

1) 培養条件の検討によりアスコフラノン6.48 mg/mlの生産量を達成し、アスコフラノンの安定供給のめどがたった。今後、副

産物との分離等を考慮した大量精製の条件を検討する必要がある。

2) 大腸菌本来のキノール酸化酵素を欠損させたTAO組換え大腸菌を用いることにより、TAOの特異的阻害剤の簡便なアッセイ系が構築された。今後合成する予定であるアスコフラノン誘導体の活性を検討する一次試験として本アッセイ系は有用であろう。また本アッセイ系により放線菌培養液よりTAO阻害剤と思われる検体が見出された。今後、活性物質の精製、構造決定、酵素阻害活性の検討を行う必要がある。

E. 研究発表

1. Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada, A., and Nagai, K. *Escherichia coli cafA* gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 483-488, 1999.
2. Nagano, K., Wachi, M., Takada, A., Takaku, F., Hirasawa, T., and Nagai, K. *fcsA29* mutation is an allele of *polA* gene of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 427-429, 1999.
3. Wachi, M., Wijayarathna, C. D., Teraoka, H., and Nagai, K. A *murC* gene from coryneform bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 223-228, 1999.
4. Malathi, K. C., Wachi, M., and Nagai, K. Isolation of the *murl* gene from *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 encoding D-glutamate racemase. *FEMS Microbiol. Lett.*, **175**, 193-196, 1999.
5. Wachi, M., Takada, A., and Nagai, K. Overproduction of the outer-membrane proteins FepA and FhuE responsible for iron transport in

- Escherichia coli hfq::cat* mutant. Biochem. Biophys. Res. Commun., **264**, 525-529, 1999.
6. Wachi, M., Iwai, N., Kuniyama, A., and Nagai, K. Irregular nuclear localization and anucleate cell production in *Escherichia coli* induced by a Ca²⁺ chelator, EGTA. Biochimie, **81**, 909-913, 1999.
7. Takada, A., Wachi, M., and Nagai, K. Negative regulatory role of the *Escherichia coli hfq* gene in cell division. Biochem. Biophys. Res. Commun., **266**, 579-583, 1999.
8. Yuuya, S., Hagihara, H., Suzuki, T., Ando, M., Yamada, A., Suda, K., Kataoka, T., and Nagai, K. Guaianolides as immunomodulators. Synthesis and biological activities of dehydrocostus lactone, mokko lactone, eremanthin, and their derivatives. J. Nat. Prod., **62**, 22-30, 1999.
9. Takami, M., Woo, J.-T., and Nagai, K. Osteoblastic cells induce fusion and activation of osteoclasts through a mechanism independent of macrophage-colony-stimulating factor production. Cell Tissue Res., **298**, 327-334, 1999.

分担研究報告書

薬効評価系の確立

分担研究者：藪 義貞 名古屋市立大学

研究要旨

トリパノソーマに固有に存在するシアン耐性酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO) を特異的に阻害することから発見されたアスコフラノン (Af) をアフリカトリパノソーマ症の治療薬として実用化に向けトリパノソーマ症マウスモデルを用いその治療効果を検討した。我々のこれまでの研究結果から動物モデルにおいて Af は単独では抗トリパノソーマ効果は期待されずグリセロールとの併用投与が必要とされていた。しかし、培養系において Af は単独で抗トリパノソーマ作用を示すことから、その血中濃度をある一定のレベルに保てば単独投与でも治療効果が見られるのではとの予測から Af 単独かつ連続投与によるトリパノソーマ症マウスモデルを用いた治療効果を検討した結果 Af 100mg/kg を24時間毎に4回腹腔内に投与することによりトリパノソーマ感染マウスが100%治癒することを確認した。

A. 研究目的

アフリカトリパノソーマ症はアフリカ睡眠病とも呼ばれ、サハラ砂漠以南の北緯15度から南緯15度に分布し、ツエツエバエによって媒介される。毎年2～30万人の新しい患者が発生し2万人以上が死亡していると言われているが実際はその10倍以上という説もある。実際にCDCの寄生虫部長の Dr. D. Colley によれば1998年のスーダンにおけるトリパノソーマ症による死者は1万人を越えたという。さらに、家畜の被害は甚大で約1千万平方キロのアフリカの草原で牧畜がトリパノソーマのために不可能になっている。それはほぼアメリカ合衆国と同じ面積で1億2千5百万頭

の牛の牧畜が可能な広さである。現在サハラ砂漠以南の37カ国で牛だけでも6千万頭が感染の危険にさらされ、年間の経済的損失は50億ドル以上と推定されている。

これらのトリパノソーマ症に対する治療薬はヒトに対し4種類、家畜に対しては2種類あるのみでいずれも副作用が強い薬ばかりである。このような理由から副作用の少ない有効な薬剤の開発が待たれている。本研究では Af をアフリカトリパノソーマ症の有効な治療薬として実用化に向けトリパノソーマ症マウスモデルを用いその有効性について投与回数、投与量などについて検討した。

B. 研究方法

1) 薬剤

アスコフラノン(細川知良博士(免疫学研究所、東京都)から分与されたものをリン酸緩衝液に懸濁しマウスの腹腔内に投与した。

2) アフリカトリパノソーマ株

Trypanosoma brucei brucei (ILTat 1.4 株および GUTat 3.1 株)は農林水産大臣の許可を得てケニア共和国ナイロビにある国際家畜疫病研究所 (ILRAD) から分与されたものを名古屋市立大学医学部実験動物教育センター内感染動物飼育室にてマウスに接種し、また名古屋市立大学医学部医動物学教室培養室にて培養系を用い維持しているものを用いた。

3) アフリカトリパノソーマ症マウスモデルを用いた実験的治療

マウス (Balb/c, ♀, 1 群 5 匹) に *T. b. brucei* を 10^4 /mouse 腹腔内接種し 3 日後マウス血中の原虫数が 10^7 /ml 以上であることを確認し Af を 25mg/ml, 50mg/kg, 100mg/kg 腹腔内に投与した。1 回の投与量は 0.2ml/mouse とした。投与回数は 1 回から 2 4 時間毎に 4 回まで行った。投与後の治療効果の評価はマウス尾静脈血をスライドグラスに取り顕微鏡にて検鏡し原虫の有無を確認し判定した。治癒の判定は 60 日間観察し再発のないことを確認し決定した。このマウスモデルを用いた実験的治療において動物愛護の精神に基づき、「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物

の飼育及び保管等に関する基準」に従って研究を進めた。

C. 研究結果

本実験において治療を行わなければ必ずマウスは死亡する急性型トリパノソーマ症マウスモデル (ILTat 1.4 株) を用い Af の治療効果を投与回数及び投与量について検討した。

1) Af を 25mg/kg ~100mg/kg 1 回のみ投与した場合はコントロール群と差は認められず全てのマウスは治療開始後 2 日以内に死亡した。

2) 2 4 時間毎に 2 回投与した場合は 25mg/kg, 50mg/kg 投与群にコントロールと比べ 2 日間の延命効果が見られた。100mg/kg 投与群においては投与開始後 4 日目に原虫がマウス血中から消失しその状態は 5 ~ 6 日間続いた。しかし、全てのマウスに再発が見られ全てのマウスは治療開始後 11 ~ 12 日目に死亡した。

3) 3 連続投与した場合 25mg/kg 投与群において治療開始後 4 ~ 5 日目に全てのマウス血中から原虫が消失したが 5 日目に再発し全てのマウスは治療開始後 11 ~ 12 日目に死亡した。50mg/kg 投与群では治療開始後 4 日目に全てのマウス血中から原虫が消失しその状態は 6 日間続いた。しかし、その後全てのマウスに原虫の再発が見られマウスは治療開始後 13 日目に全て死亡した。100mg/kg 投与群では 5 匹の内 1 匹のみに感染マウスの治癒が見られたが、他の 4 匹は再発を示し治療開始後 14 日 ~ 15