

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11年度 総括研究報告書

主任研究者 大村 智

平成12(2000)年 4月

## 目 次

総括研究概要	-----	1
研究目的及び必要性	-----	3
JPMWプロジェクト概要	-----	4
研究方法	-----	4
研究の実施経過	-----	5
結果及び考察	-----	6
結論	-----	7

## 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=厚生科学研究費補助金

研究事業名=新興・再興感染症研究事業

研究課題名=抗マalaria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)=1999

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alaria原虫に有効な治療薬の開発を行う抗マalaria剤のスクリーニングセンターとして機能すべく、今年度は、*in vitro*スクリーニング系の構築後、昨年10月26日、日本での新規抗マalaria剤の開発のための日本製薬会社/厚生省/WHO TDR(JPMW)プロジェクトの発足に伴い、本研究はスクリーニングセンターとしての機能を開始し、本年末までに日本企業より592化合物、所内より2,881検体の提供を受け評価を行い、数種の有望化合物を得ている。

研究目的=薬剤耐性マalaria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12社及び所内から化合物等の提供を受け、抗マalaria剤のスクリーニングセンターとして、薬剤耐性マalaria原虫を用い*in vitro*モデルで活性の評価を行う。さらに、*in vitro*で有望な化合物は*in vivo*のネズミマalaria原虫感染モデルで評価を行う。

研究方法=*In vitro*スクリーニング方法はWHOが承認した方法に準拠する。すなわち、一次スクリーニングとして、提供された化合物等を添加したマalaria原虫浮遊液を96穴プレートにて*in vitro*系で培養し、化合物の抗マalaria活性を調べる薬剤感受性試験を行う。さらに、2次スクリーニングとして*in vitro*での培養動物細胞に対する殺細胞作用を調べ、低濃度で有効な選択毒性の高い抗マalaria剤を選択する。また、WHOの指導により、*in vitro*で有望な化合物は、*in vivo*の感染実験モデル系を導入し、構築後*in vivo*で評価する。

結果と考察=JPMWプロジェクトに参加している製薬会社12社より提供された592化合物について評価を行い有望な4化合物を得た。また、所内より提供された2,881検体について評価を行い、有望株(抽出物)については独自で単離、精製を進めている。この過程で一放線菌K99-0413株の生産する抗マラリア活性物質はポリエーテル系抗生物質 X-206であると同定されたが、本物質は優れた抗マラリア活性と高い選択毒性を示すという新規な知見が得られた。また抗生物質ライブラリーよりアンストラサイクリン系既知抗生物質の urdamycin Fの抗マラリア活性も新規な知見として得られた。これらの有望な化合物について、今後、ネズミマラリア原虫を用いた*in vivo*の感染動物モデルで評価する予定である。なお、抗生物質 X-206はWHOの研究協力機関にて*in vivo*の感染治療実験が実施され、ある程度の効果を認めており、詳細について現在検討中である。

結論=製薬会社及び所内から提供される化合物等について継続的に*in vitro*スクリーニングを実施する。さらに、本スクリーニングで有望な化合物は*in vivo*の感染治療実験にてその有効性について評価を行うことにより、新規な抗マラリア剤の探索研究を行う。

#### 研究発表

厚生科学研究班寄生虫関係合同研究発表会(平成12年3月27日、神戸国際健康開発センター)

#### 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、正式には平成11年[1999年]10月26日、日本での新規抗マラリア剤の開発のための日本製薬会社/厚生省/WHO TDR (JPMW)プロジェクトとして発足した(図1参照)。

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、橋本前首相が1997年デンバー・サミットで提案し、1998年バーミンガム・サミットで提唱した国際寄生虫対策の橋本イニシアティブやWHO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、一昨年の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)の指導の下に研究協力機関となり、広く日本国内の企業12社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によるJPMWプロジェクトの目標として、各社200化合物/年、向こう5年間で10,000化合物以上について評価する方針を表明した。また、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。

## JPMWプロジェクト概要 (図1参照)

日本製薬会社(Japanese Pharmaceutical Companies)/厚生省(MHW)/WHO TDRの3者による日本での新規抗マラリア剤開発のためのジョイントプロジェクトであり、略称をJPMW プロジェクトと呼ぶ。本プロジェクトの計画の統括はWHO/TDRが行う。本研究のスクリーニングセンターでもある北里研究所熱帯病センターは、WHO/TDRの委託及び技術指導を受けてJPMWプロジェクトのスクリーニングセンターとして機能する。WHO/TDR と化合物提供契約を締結した日本製薬企業12社及び北里研究所は、先ず本プロジェクトの窓口であるコーディネートセンター(WHO/TDR顧問の杉野幸夫博士が所長)に化合物等を提供する。コーディネートセンターは提供された化合物名、会社名をブラインドし、化合物等をスクリーニングセンターに提供し、スクリーニングを依頼する。それに基づき、スクリーニングセンターは化合物の抗マラリア活性を評価し、得られた結果を、コーディネートセンターに報告する。コーディネートセンターは結果と化合物名等のすりあわせを行い、WHO/TDR databaseに登録し、承認を得た後、製薬企業に結果等を報告する。本プロジェクトでヒット化合物が出た場合は、企業とWHO/TDRの両者が相談し、以後の開発研究を行う。スクリーニングセンターは企業とは直接接触せず、化合物の構造等の情報はコーディネートセンター及びWHOに保有される。スクリーニングの対象としては、企業の化合物ライブラリーより構造の異なる化合物を各社200検体/年の年間2,400検体及び所内天然物ライブラリーより年間約3,000検体について評価を行う。

なお、コーディネートセンターの運用費はWHOより、本厚生科学研究費はスクリーニングセンターの運用費として用いられる。

## 研究方法

初年度の方法に変更点を加筆訂正して述べる。In vitro スクリーニング方法はWHOが承認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(血漿)加-RPMI 1640培地を用い、培養条件は3%O<sub>2</sub>、4%CO<sub>2</sub>、93%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原虫を初期感染率が0.5~1%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し、化合物等の抗マラリア活性(IC<sub>50</sub>値)を調べる。さらに、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、二次スクリーニングとして*in vitro*での培養動物細胞 MRC-5 cellに対する殺細胞作用(IC<sub>50</sub>値)を調べ、両者の比から選択毒性を算出する。選択基準として化合物は抗マラリア活性(IC<sub>50</sub>値)1.65  $\mu$  M ( $\mu$  g/ml)以下で細胞との選択毒性比が10以上のもを有望とする。天然物素材については粗物質を含んでいることより、抗マラリア活性(IC<sub>50</sub>値)12.5  $\mu$  g/ml以下で細胞との選択毒性比が10以上のもを有望とする。微生物素材については細胞との選択毒性比が5以上のもを有望とする。

#### (倫理面への配慮)

マラリア原虫の培養において、恒常的に供給が必要なものはヒト血清(Atype)と新鮮な赤血球である。マラリア原虫は単独では生存できず、赤血球に寄生して増殖する。本研究遂行のためには、血液型Atypeの健常人(HIV, HB, HC, 梅毒等の検査に陰性者)ボランティアからの採血(1回に200ml)により得た血液よりヒト血清(Atype)と赤血球を分離し、マラリア原虫の培養に供する。

従って、ヒト血清と赤血球を提供する健常人ボランティアには、本研究の目的意義等を説明し、理解した後、本人の自由意思により血液提供する同意書が得られた場合、医療施設で血液検査のための採血を行い、血液検査で陰性の者から採血により血液を得、実験に供する。ただし、血液検査で陽性の者は人権尊重し、検査結果については医療施設の医師より本人のみに説明し、適切な治療方針の指導を行う。

#### 研究の実施経過

##### (進捗状況)

当面3年計画の2年目である今年度は、*in vitro*スクリーニング系の構築後、JPMWプロジェクトの発足に伴い、本研究はスクリーニングセンターとしての機能を開始し、本年末までに日本企業より592化合物、所内より2,881検体の提供を受け評価を行った。

(1)昨年度までの準備期間を経て、4月より、WHOの研究協力機関より導入した技術を基に、東京大学大学院医学系研究科北 潔教授より分与された熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*) K1 株、FCR3株(Tokyo)及び大阪大学微生物病研究所堀井俊宏助教授より分与されたFCR3株(ATCC-30932:Osaka)を用いた抗マラリア活性評価のスクリーニング系構築を行った。さらに、WHOのベルギーの研究協力機関のTibotec社のDr.L. Maesより分与されたヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞MRC-5 cellを用いた殺細胞作用のスクリーニング系構築と標準実験操作方法(SOP)の作成を行い、SOPはWHOの承認

を得た。

(2) 活性評価の準備期間として、6月より所内天然物素材について *in vitro* のスクリーニングを開始した。

(3) JPMWプロジェクト発足に伴い、11月より、12製薬会社各社から20-100化合物の提供を受け、スクリーニングを実施した。

(4) WHOの提案により、*in vitro* スクリーニングで有望な化合物をネズミマラリア原虫を用いた *in vivo* の感染動物モデルで評価すべく、本年2月に研究協力者1名をWHOの研究協力機関の英国の研究所に派遣し、技術習得を終了した。WHOの援助により、次年度 *in vivo* 感染モデルの構築及び有望化合物の評価を行う予定である。

## 結果及び考察

### (1) 薬剤感受性試験

スクリーニングを実施する前に、先ず主な抗マラリア剤に対する薬剤感受性のFCR-3株の2株及び薬剤耐性のK1株を用い、本評価系にて薬剤感受性試験を行った。その結果をTable 1に示した。2種のFCR-3株及びK1株はいずれもアルテミシニンに同程度の感受性であったが、K1株は2種のFCR3株よりクロロキンに対して約12倍及びピリメサミン、トリメトプリムに対して強い耐性を示し、多剤耐性の株であることがわかった。現在地球上の熱帯熱マラリア原虫の中で薬剤耐性株として最も多く存在が報告されているのがクロロキン耐性株であり、次に多いのがファンシダール(ピリメサミンとスルファドキシンの合剤)耐性株である。本試験で用いたK1株はクロロキン耐性以外に葉酸代謝拮抗剤であるピリメサミン、トリメトプリムに対して耐性であることより、ファンシダール耐性を獲得している可能性が示唆された。スクリーニングには本K1株を用いて評価を行う事とした。

### (2) スクリーニング

スクリーニング結果をTable 2に示した。製薬会社各社から20-100化合物の提供を受け、本年度末までに592化合物についてスクリーニングを実施し、有望な(Score 3)4化合物を得た。さらに、所内より本年度末までに微生物代謝産物2,778検体及び抗生物質、植物素材等103検体の活性評価を行い、有望なScore 2(選択毒性5-25)のもの44検体、Score 3(選択毒性>25)のもの15検体の合計59検体を得た。これらの有望株(抽出物)については独自で単離、精製を進めている。この過程で一放線菌K99-0413株の生産する抗マラリア活性物質はポリエーテル系抗生物質 X-206であると同定されたが、優れた抗マラリア活性と高い選択毒性を示すことは新規な知見である。またScore 3を示したものの中で、抗



生物質ライブラリーより既知物質の fosmidomycin, nanaomycin E, urdamycin F、和漢薬抽出物よりチンハオス (artemisinin含有)、常山(trans-febrifugin 含有)、黄柏及び黄連 (berberine alkaloids 含有)、植物抽出物よりアジサイの葉抽出液(trans-febrifugin と同定)等に抗マラリア活性と高い選択毒性があることが解った。これらの中でアンストラサイクリン系抗生物質の urdamycin Fの抗マラリア活性は新規な知見である。

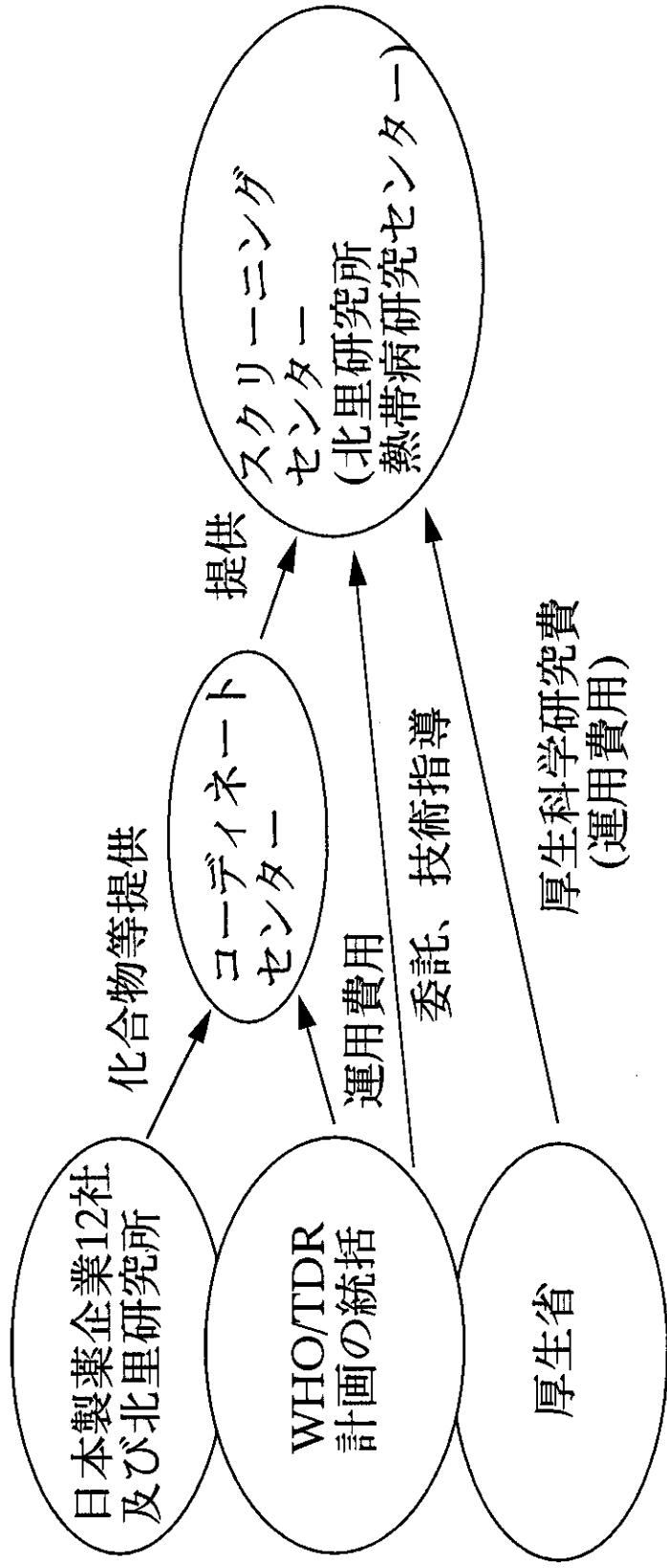
なお、抗生物質 X-206はWHOの研究協力機関にて *in vivo*の感染治療実験が実施され、ある程度の効果を認めており、詳細について現在検討中である。

#### 研究により得られた成果の今後の活用・提供

*In vitro* スクリーニングで優れた抗マラリア活性と高い選択毒性を示す有望な化合物については、今後、当センターで新たに構築される *in vivo*のネズミマラリア原虫を用いた感染動物モデルでの評価を行う。さらに詳細な動物実験を行う必要がある場合は、WHOと相談の上、欧州のWHO研究協力機関に評価を依頼する事も考えられる。*In vivo*で効果のみられた化合物についてはWHOと製薬会社とが共同で抗マラリア剤としての開発研究を行なう。

#### 結論

製薬会社及び所内から提供される化合物等について継続的に *in vitro*スクリーニングを実施する。さらに、本スクリーニングで有望な化合物は *in vivo* の感染治療実験にてその有効性について評価を行ことにより、新規な抗マラリア剤の探索研究を行う。



対 象：企業の化合物ライブラリー(200検体/年/企業, 2400検体/年)  
及び北里研究所の天然物ライブラリー(約3,000 検体/年)

予 定：5年計画

図1.JPMWプロジェクト概要

Table 1. Antimalarial activities of antimalarial drugs against FCR3 strains and K1 strain of *Plasmodium falciparum*

	IC <sub>50</sub> (nM)		
	FCR3 strain		K1 strain*
	Tokyo*	Osaka**	
Amodiaquine	14	15	41
Artemisinin	18	21	24
Chloroquine	29	28	357
Pyrimethamine	7.8	16	>100,000
Quinine	600	290	780
Trimethoprim	140	360	>100,000
Primaquine	3,300	2,200	2,633

\* obtained from Prof. Kita (The University of Tokyo)

\*\* obtained from Aso. Prof. Horri (The University of Osaka) : ATCC-30932

**Table 2. Results of Screening (-March, 2000)**

	Test	Score 2	Score 3
Compounds from Japanese Pharmaceutical Companies			
Compounds	592		4
Natural products from The Kitasato Institute			
Microbial metabolites	2,778	32	4
Antibiotic libraries	13		3
Traditional Japanese herbal medicines	82	11	5
Plant extracts	8	1	3
<hr/>			
Total:	2,881	44	15