

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12年度 総括研究報告書

主任研究者 大村 智

平成13 (2001)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	-----	8
参考資料		

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)=2000

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*in vitro*, *in vivo*スクリーニングセンターとし機能すべく、今年度は、前年度発足した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)プロジェクトの化合物群について、引き続き*in vitro*スクリーニングを実施し、本年度末までに日本企業より1,859化合物、所内より2,316検体の提供を受け評価を行い、30種余りの有望化合物を得ている。さらに、WHO指導によるネズミマラリア原虫を用いた*in vivo*感染治療実験モデルの構築を行った後、*in vitro*で有望な32化合物について*in vivo*スクリーニングを実施し、*in vivo*で有効な3化合物を得ている。現在これらは詳細な*in vivo*モデルにて評価中であるが、活性新規の既知ポリエーテル系抗生物質X-206は*in vivo*モデルにて低用量で治療効果があることが明らかとなった。

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14社及び所内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う。さらに、*in vitro*で有望な化合物は*in vivo*のネズミマラリア原虫感染治療実験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、1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ラリア原虫浮遊液を96穴プレートにて*in vitro*系で培養し、化合物の抗マラリア活性を調べる薬剤感受性試験を行う。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ラリア剤を選択する。さらに、*in vivo*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、ネズミマラリア原虫感染治療実験モデルを用い、*in vitro*で有望な化合物を投与し、感染治療効果を調べる。

結果と考察=JPMWプロジェクトに参加している製薬会社14社より提供された1,859化合物について*in vitro*で評価を行い有望な24化合物を得た。また、所内より提供された2,316検体についても*in vitro*で評価を行い、有望株(抽出物)については独自で単離、精製を進めている。この過程で一糸状菌FKI-0266株の生産する抗マラリア活性物質はペプチド系抗生物質 leucinostatin であると同定されたが、本物質が優れた抗マラリア活性と中程度の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ペプチド系既知抗生物質の hormaomycin の抗マラリア活性も新規な知見として得られた。さらに、前年度から課題であったネズミマラリア原虫を用いた*in vivo*感染治療実験モデルの構築を行った後、前年度分を含めた*in vitro*で有望な32化合物について*in vivo*スクリーニングを実施し、*in vivo*で有効な3化合物を得ている。これらについてはさらに詳細な*in vivo*感染治療実験モデルにて評価中である。この過程で前年度から課題であったポリエーテル系抗生物質X-206の*in vivo*感染治療実験を実施した結果、皮下投与にて50%有効投与量(ED50値)0.53 mg/kg, 90%有効投与量(ED90値)0.96 mg/kgで有効であることが判明した。しかし、本物質は3mg/kg以上の投与では毒性を示し、治療域は狭い化合物であった。また、ポリエーテル系抗生物質(以下ポリエーテルと略す)は生体内で各種陽イオンとの親和性を示すことによりイオノフォアとして作用している。そこで、各種ポリエーテルについて*in vitro*での抗マラリア活性と細胞毒性を評価し、各ポリエーテルに親和性の高い陽イオンの原子価を比較したところ、1価>1価及び2価>2価の順に抗マラリア活性と選択毒性が高いことが解った。これは、マラリア原虫感染赤血球と非感染赤血球における K^+ , Na^+ を含む陽イオンの役割が異なることを示唆するものであると考えられ、現在これらのポリエーテル群の一連の知見についての論文を投稿中である。

結論=*In vivo*スクリーニングで有効であった化合物については、新規な抗マラリア剤及びリード化合物の候補化合物と成り得るか、さらに詳細な*in vivo*感染治療実験モデルにて評価する必要がある。本研究では3年間の研究期間内に抗マラリア剤探索の*in vitro*, *in vivo*スクリーニングモデルの総合的基礎研究体制構築と実施を行うことは出来たが、実施したスクリーニングの中から候補となる化合物を見出すまでには至っていない。今後、本研究は新興・再興感染症研究事業として構築された本スクリーニングの基礎研究体制を基盤に、引き続きスクリーニングを継続すべく厚生省国際課とWHO/TDRの連携による国際貢献事業として発展的にゆく予定である。

研究発表

論文発表

杉野幸夫、大村 智：日本からの新規抗マラリア剤の開発をめざして-JPMWプロジェクト成立の経緯、現状、将来-, ファルマシア 36巻12号p1054-1058 (2000)

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(TDR)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、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)プロジェクトが発足した(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、橋本元首相が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ャティブやWHO事務総長の政策方針(Roll Back Malaria)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、1998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14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た*in vitro*モデル及びネズミマラリア原虫を用いた*in vivo*感染治療実験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14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(本年度11月よりWHO/TDR顧問の嶋一彦博士が所長、前所長の杉野幸夫博士が名誉所長)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*in vitro*及び*in vivo*スクリーニングモデルにて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

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%O₂、4%CO₂、93%N₂の混合ガス中にて37°C下で行う。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(IC₅₀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(IC₅₀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(IC₅₀値)1.65 μ M (μ 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(IC₅₀値)12.5 μ 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。

*In vivo*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、ネズミマラリア原虫の*P. berghei* N株(薬剤感受性株)及び*P. yoelli* NS株(クロロキン耐性株)等を用い、*in vivo*感染治療実験を行う。供試動物としてはICR マウスの雄(体重18-20g)を用い、 2×10^6 個の原虫感染赤血球を静注にて感染させる(day 0)。治療実験は感染2時間後から経口及び皮下にて化合物溶液を投与し、以後1日1回 3日間連続投与(day 1-3)する。治療効果の判定はday 4に尾静脈血の感染赤血球数を測定し、化合物非投与群の感染率と比較して行う。50%有効投与量(ED₅₀値)及び90%有効投与量(ED₉₀値)はdose response curveより算出する。選択基準としてED₉₀値が30mg/kg 以下のものを有効とする。

(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3年目である今年度は、前年度に引き続き日本の企業及び所内からの化合物等について*in vitro*でのスクリーニングを実施し、本年度末までに日本企業より1,859

化合物、所内より天然物素材2,316検体の提供を受け評価を行った。また、WHO指導によるネズミマラリア原虫を用いた*in vivo*感染モデルの構築を行った。さらに、前年度分を含めた*in vitro*で有望な化合物については、日本企業及び所内より32検体の再提供を受け*in vivo*スクリーニング系で評価を行った。

(1)4月より前年度に引き続き*in vitro*でのスクリーニングを実施した。

(2)4月より本研究の総合的基礎研究体制構築の為に、前年度から課題であったネズミマラリア原虫をWHOのイギリスの研究協力機関のNorthwick Park Institute for Medical ResearchのProf. W. Petterより分与された*P. berghei* N株(薬剤感受性株)及び*P. yoelli* NS株(クロロキン耐性株)等を用いた*in vivo*感染治療実験モデルの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。

(3)5月末より前年度分を含めた*in vitro*で有望な化合物について*in vivo*でのスクリーニングを実施した。

(4)JPMWプロジェクトに新たに2社が参加し、合計14社となった。

結果及び考察

(1)*In vitro*スクリーニング

スクリーニング結果をTable 1に示した。本年度末までに日本企業より1,859化合物についてスクリーニングを実施し、有望な(Score 3)24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2,002検体、和漢生薬185検体、抗生物質119検体、植物素材10検体の総計2,316検体の活性評価を行い、有望なScore 2(選択毒性5-25)のもの37検体、Score 3(選択毒性>25または抗マラリア活性のIC₅₀値が1.56 μ g/ml以下)のもの51検体の合計89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。この過程で一糸状菌FKI-0266株の生産する抗マラリア活性物質はペプチド系抗生物質のleucinostatinであると同定されたが、本物質が優れた抗マラリア活性と中程度の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hormaomycin, polyketomycin、和漢生薬抽出物より仙鶴草、金桜子、マイカイカ及び地榆(agrimol類含有)、石榴皮(tannin類含有)、胡桃肉(naphthoquinone類含有)、粉防己(bisbenzylisoquinoline類含有)等に中程度の抗マラリア活性があることが解った。これらの中でhormaomycin, polyketomycinの抗マラリア活性は新規な知見である。これまでに抗マラリア活性が新規な知見として得られた微生物由来の化合物の構造と活性をFig.2に示した。

(2) *In vivo*スクリーニング

スクリーニング結果をTable 2に示した。本年度末までに32化合物(企業より24化合物、所内より天然物の8化合物)について活性評価を行い、有効なScore 2(ED90: >30mg/kg)のもの4化合物、Score 3(ED90: <30mg/kg)のもの3化合物の合計7化合物を得た。これらについてはさらに詳細な*in vivo*感染治療実験モデルにて評価中である。

(3) ポリエーテル系抗生物質X-206の*in vivo*感染治療実験

前年度より課題であったポリエーテル系抗生物質X-206の*P. berghei* N株を用いた*in vivo*感染モデルでの治療実験を実施した結果をTable 3に示した。X-206は皮下投与にてED50値0.53mg/kg, ED90値0.96mg/kgであり、これは対照として用いた既存の抗マラリア治療剤のartemether, artesunateよりも低用量で有効であることが判明した。しかし、本物質は3mg/kg以上の投与では毒性を示し、治療域は狭い化合物であった。

(4) ポリエーテル系抗生物質群の抗マラリア活性と細胞毒性

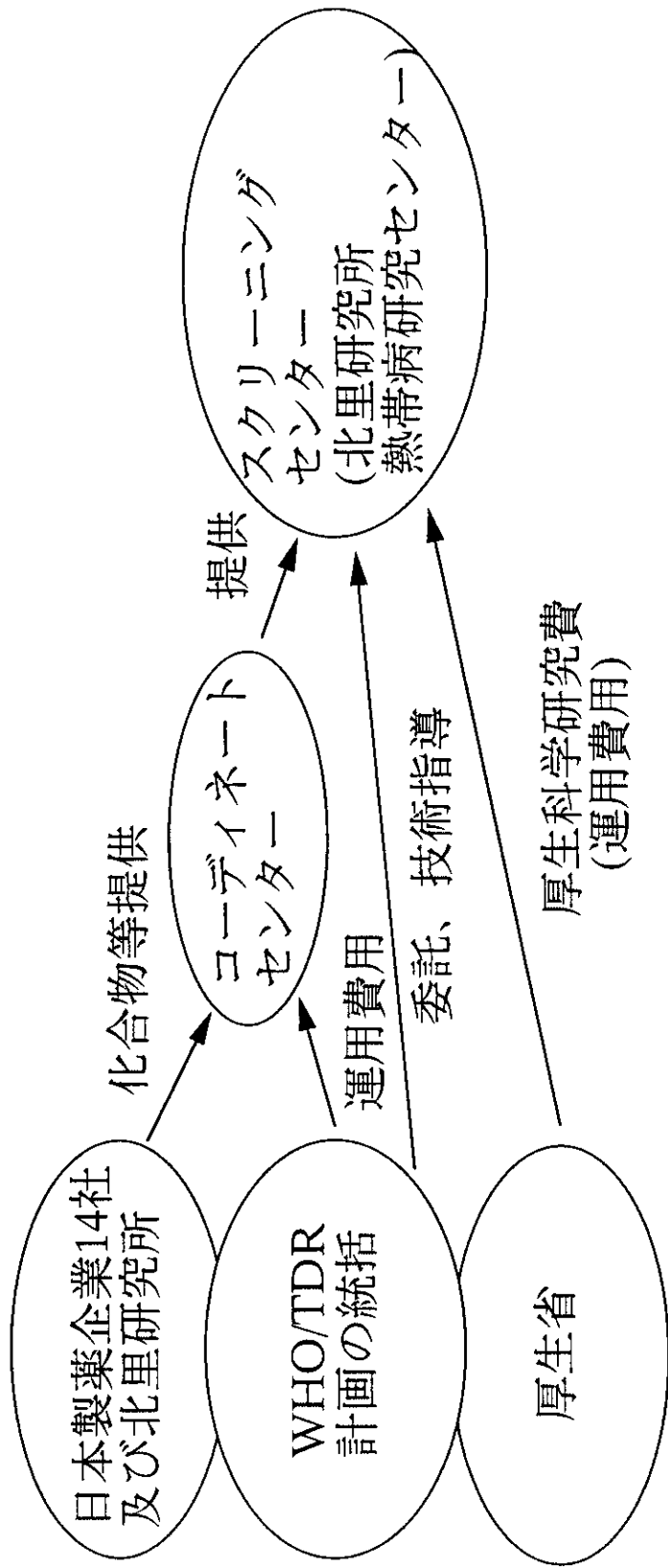
ポリエーテル系抗生物質は生体内で各種陽イオンとの親和性を示すことによりイオノフォアとして作用している。そこで、各種ポリエーテル系抗生物質について*in vitro*での抗マラリア活性と細胞毒性を評価した結果をTable 4に示した。各ポリエーテルに親和性の高い陽イオンの原子価を比較したところ、1価>1価及び2価>2価の順に抗マラリア活性と選択毒性が高いことが解った。これは、マラリア原虫感染赤血球と非感染赤血球におけるK⁺, Na⁺を含むの陽イオンの役割が異なることを示唆するものであると考えらる。さらに本研究の過程で抗マラリア活性が再評価されたX-206は、他のポリエーテル系抗生物質と比較して最も低濃度で抗マラリア活性を示し、かつ選択毒性も最も高い化合物であった。現在これらのポリエーテル系抗生物質群の一連の知見についての論文を投稿中である。

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、ネズミマラリア原虫を用いた*in vivo*スクリーニングでの評価を行う。*In vivo*で有効な化合物については、さらに各種ネズミマラリア原虫感染動物モデルにて詳細な動物実験を行う。この過程で、新規な抗マラリア剤及びリード化合物と成りうる候補化合物が得られた場合、WHOと製薬会社等が共同で抗マラリア剤としての開発研究を行なう。

結論

*In vivo*スクリーニングで有効であった化合物については、新規な抗マラリア剤及びリード化合物の候補化合物と成り得るか、さらに詳細な*in vivo*感染治療実験モデルにて評価する必要がある。本研究では3年間の研究期間内に抗マラリア剤探索の*in vitro*, *in vivo*スクリーニングモデル系の構築と本評価系によりJPMWプロジェクトの化合物群について探索の実施を行うことができ、現在も継続中である。現在までに総合的基礎研究体制構築と実施を行うことは出来たが、実施したスクリーニングの中から候補となる化合物を見出すまでには至っていないが、今後、新興・再興感染症研究事業として構築された本スクリーニングの基礎研究体制を基盤に、引き続き本研究のスクリーニングを継続すべく厚生省国際課とWHO/TDRの連携による国際貢献事業として発展してゆく予定である。



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

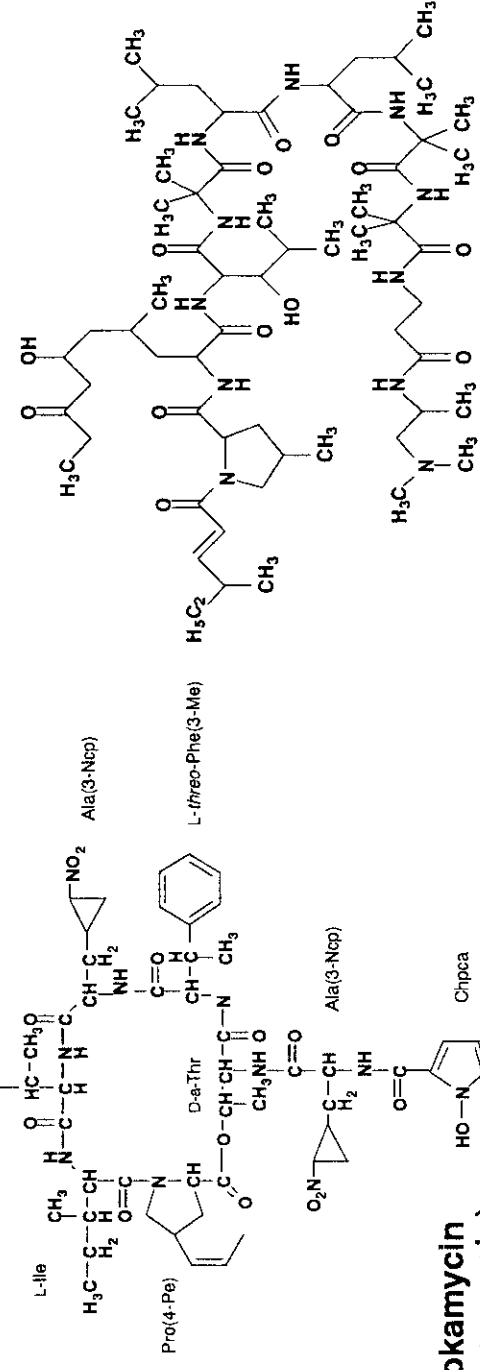
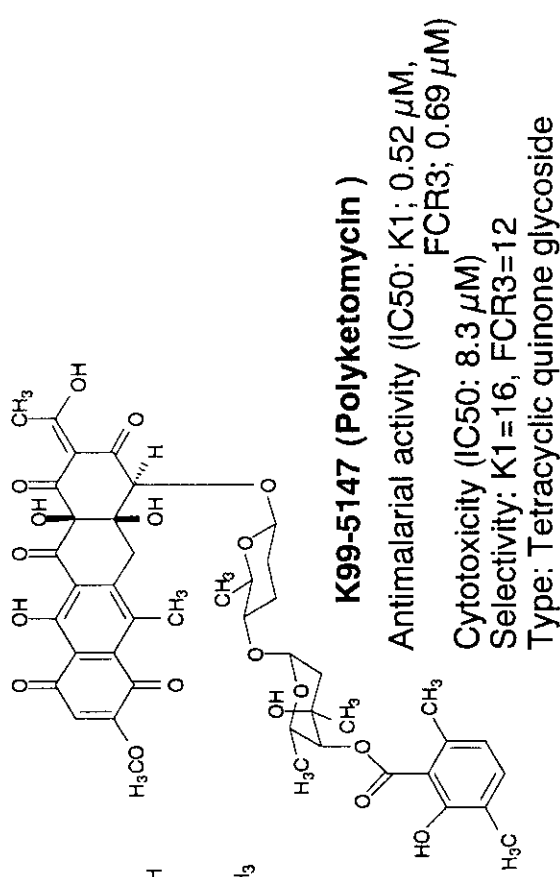


Fig. 2. Structures and activities of the compounds from microorganisms

Table 1. Results of *In Vitro* Screening (April, 2000 - March, 2001)

	Tested	Score 2*	Score 3**
Compounds from Japanese Pharmaceutical Companies			
Compounds	1,859	231	24
Natural products from The Kitasato Institute			
Microbial metabolites	2,002	11	2
Antibiotic libraries	119		38
Traditional Japanese herbal medicines	185	24	5
Plant extracts	10	2	6
<hr/>			
Total:	2,316	37	51

*|C₅₀: 1.56-12.5 μ M (μ g/ml) or selectivity 5-25

**|C₅₀: < 1.56 μ M (μ g/ml) or selectivity > 25

Table 2. Results of *In Vivo* Screening (April, 2000 - March, 2001)

	Tested	Score 2 (ED ₉₀ :>30mg/kg)	Score 3 (ED ₉₀ :<30mg/kg)
Compounds*	24	2	1
Natural products**	8	2	2
Total:	32	4	3

*from Japanese Pharmaceutical Companies

**from The Kitasato Institute

Table 3. *In vivo* antimalarial activities of X-206, artemether and artesunate against *P. berghei* strain N

Compound	Route	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₉₀ (mg/kg)
X-206*	s.c.	0.53	0.96
Artemether	s.c.	1.5	4.0
Artesunate	s.c.	1.7	10.0

*toxic dose=3mg/kg

Table 4. Antimalarial activities and cytotoxicities of polyether antibiotics

Compound	Antimalarial activity A		Cytotoxicity B IC ₅₀ (nM) for MRC-5 cells	Selectivity (B/A)		Ion-affinity ^{***}
	IC ₅₀ (nM) for K1 [*]	FCR3 ^{**}		K1	FCR3	
Class 1						
K99-0413(X-206)	0.15	0.51	551	3,673	1,080	K ⁺ > Na ⁺
Lonomycin A	2.2	13	94	43	7.2	K ⁺ > Na ⁺
Nigericin	2.7	19	100	37	5.3	K ⁺ > Na ⁺
Narasin	1.0	1.6	65	65	40	K ⁺ > Na ⁺
Salinomycin	1.4	1.4	104	74	74	K ⁺ > Na ⁺
Dianemycin	1.2	8.5	41	34	4.8	Na ⁺ > K ⁺
Monensin	0.9	0.9	6.6	7.3	7.3	Na ⁺ > K ⁺
Class 2						
Lysoceollin	6.4	5.4	127	20	24	K ⁺ > Na ⁺ > Mg ²⁺ Ca ²⁺
Lasalocid A	65	29	1,648	25	57	K ⁺ > Na ⁺ Ca ²⁺ > Mg ²⁺
Class 3						
A-23187	115	1,203	210	1.8	0.2	Ca ²⁺ > Mg ²⁺
Indanomycin	587	567	506	0.9	0.9	Ca ²⁺ > Mg ²⁺
lonomycin	455	321	428	0.9	1.3	Ca ²⁺ > Mg ²⁺
Unkown class						
Octacyclomycin	39	3.0	1,112	29	371	ND ^{****}

*drug resistance strain

**drug sensitive strain

***determined by Pressman, Westley and Bolte et al.

**** not determined

参考資料

論文

杉野幸夫、大村 智：日本からの新規抗マalaria剤の開発をめざして
-JPMWプロジェクト成立の経緯、現状、将来-，ファルマシア
36巻12号p1054-1058 (2000)

20000536

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「参考資料」をご参照ください。