

20070907

厚生科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

# マラリアの病態疫学、流行予測 及び感染動向に関する研究

(課題番号：H12-新興-17)

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 鈴木 守

平成14(2002)年4月

# 厚生科学研究費補助金研究報告書

平成14年4月10日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所

スズキ マモル

研究者 氏 名 鈴木 守  
(群馬大学医学部)

平成13年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究  
(H12-新興-17)

国庫補助金精算所要額：金 19,600,000 円也

# 目 次

I. 総括研究報告書	
マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究 鈴木 守	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 病態疫学解析分子の構造決定と野外応用 狩野 繁之	----- 5
2. 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドによる疫学調査用抗原の開発 片貝 良一	---- 7
3. タンザニアの薬剤耐性マラリアの材料収集 桑野 信彦	----- 9
4. マラリア薬剤耐性消去に関する研究 竹内 勤	----- 13
5. マラリア伝搬阻止ワクチンの開発に関する研究 鳥居 本美	----- 16
6. 特定分子の生体防御学的解析 姫野 國祐	----- 21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

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  
マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究  
主任研究者 鈴木守 群馬大学医学部教授

研究要旨

本研究班は標記研究題目の研究推進を目的として、(1) 病態疫学解明のためのマラリア原虫抗原を特定し、分子設計する分担者と、(2) 新しい視点にたつて薬剤耐性マラリアに対処する研究を行う分担者によって構成されている。(3) (1) は特に新しい対策手段となるマラリアワクチン候補物質となる可能性があるため、ワクチン開発研究を進めている研究者も参加している。(1) に関して：平成13年度は平成11年～13年にかけて世界の流行地域に少なくとも2年間滞在し、さまざまなプロジェクトに参加して帰国した日本人1352名から血清を得て、マラリア罹患歴を間接蛍光抗体法で調べ、いずれの国に赴任した場合マラリアに罹患する危険性が高いかを日本の研究室において実際に調べることができた。滞在国は52か国に及ぶ。得られた血清は病態疫学を知るために現在まで検討してきた合成抗原に対してどの様に反応するかを調べるために使用される。

(2) に関して：薬剤耐性除去に有用な化合物の検索と耐性除去の機序につき検討し、アフリカの耐性マラリア原虫の収集がおこなわれタンザニア由来の35株の原虫が搬入された。耐性除去剤とクロロキンの併用によりクロロキン耐性マラリアに対処する方法を検討したが、患者に使用するにはまだ距離がある。そこで現在広く使用されている抗生物質の中から薬剤耐性マラリアに著効を示す薬剤を選別し、ミノサイクリンが優れた抗マラリア効果を示す事実をみいだした。(3) 対策の将来の要と目されるワクチンについては、三日熱伝播阻止ワクチンの研究は、タイの分離株を得て進められている。マラリア原虫由来のエノラーゼをモデルとした合成抗原がマラリアワクチンになりうるかについて、ヨザルを使って検討を開始した。さらに DNA ワクチンの可能性の検討もすすめている。

分担研究者

狩野 繁之

(国立国際医療センター研究所部長)

片貝 良一

(群馬大学工学部教授)

桑野 信彦

(九州大学大学院医学系研究院教授)

竹内 勤

(慶應義塾大学医学部教授)

鳥居 本美

(愛媛大学医学部教授)

姫野國祐

(九州大学大学院医学系研究院教授)

研究協力者

佐藤 久美子

(群馬大学医学部教授)

片倉 賢

(群馬大学医学部助教授)

A. 研究目的

(1) 申請者は、マラリア流行地を調査し、一定地域内の流行状況が非均一に分布していること、そのため、同一地域内でもマラリア罹患者の病態が多様性に富み、ある者はマラリアに抵抗力を示し、ある者は重症化することを観察してきた。このようなマラリア疫学の実態は意外にも知られていない。新しいマラリア対策指針を推進させるためには、病態疫学調査を進め、マラリアに罹患した場合に重症化する住民と軽症で済む住民との分布図を作成し対策計画をたてる必要がある。そのためには重症化を反映するマラリア抗原エピトープおよび抵抗性を反映するエピトープを特定し、住民の血清との反応を計測することが必要となる。本研究も残り1年間となったため世界52か国の末端部に国際協力の目的で赴任し2年間滞在してきたヴォランティアより供与を受けた1352検体の血清についてマラリア間接蛍光抗体法により各自の過去のマラリア罹患歴を調べ、52か国いずれの国がマラリア罹患の危険性が高いかについて調査した。世界各地域においてマラ

リアに罹患した供与者が特定できたので、平成14年度には罹患者、非罹患者の血清と現在までの研究結果として合成に成功した熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼの活性部位抗原との間で反応系を組み、本研究班によって作られた病態調査法が世界のどの国においても利用できるか否かについて最終検討を行う。

マラリア対策は有効かつ安全な薬剤の使用をプライマリーケア組織に組み入れて推進させ、マラリア罹患による死亡者ができるだけ発生しないようにすることを原則として進められる。この時最大の難問は薬剤耐性とくにクロロキン耐性マラリアである。本研究班は薬剤耐性に対処するための研究として耐性因子を除去する方法を追求し、一定の成果をえてきたが、そのまま臨床応用を開始することはできない。ただちに臨床応用が可能でしかも薬剤耐性マラリアに著効を示す薬剤を選択するために、平成13年度はすでに感染症に対して使用されている抗生物質をしらべ、minocycline が薬剤耐性マラリアに著効をしめすこと、およびその理由について報告した。さらに現在WHOが進めている *in vitro* 薬剤耐性試験法が必ずしも信頼出来る方法ではないこと、個々の原虫の発育時間の相違を考慮すべきであることをソロモンにおける野外調査をもとに報告した。

マラリアワクチン研究は今後のマラリア対策推進上欠かすことのできない課題である。本研究班もこの課題に挑戦し、伝播阻止ワクチン、上記エノラーゼ活性部分合成ポリペプチドについて検討を進めている。エノラーゼ活性部分合成ポリペプチドの防御効果についてはヨザルの感染試験の予備試験を13年度に行った。基礎的研究からは、遺伝子銃をつかったDNAワクチンの効果発現に至る機序が報告された。

## B. 研究方法

52か国の末端部にヴォランティア活動に2年間従事してきた1352人から採取した血清について間接蛍光抗体法を行い、どの国でどのくらいマラリアに罹患するかを調査した。間接蛍光抗体法は一定の習熟を要し時間もかかる方法であるが、マラリア原虫そのものを抗原として蛍光顕微鏡下で直接観察する方法であるため、日本人の場合、臨床所見とほとんどの場合一致する。ヴォランティアの血清供与者は赴任地を離れて近隣諸国に行くことはないので、抗体陽性率は正確に赴任地のマラリア状況を反映す

る。日本独自の方法で世界のマラリアの流行状況を把握できる点評価されるものと思われる。今般の血清で測定された抗体価は高い場合と低い場合があるが、高い場合は急性発症している時に近く、日本人の場合、エノラーゼ合成抗原との反応は高くであるものと想定される。低い抗体価の血清はマラリアから回復して一定の日時がたったことを示し、エノラーゼ合成抗原との反応は低いものと想定される。エノラーゼ合成抗原としてGG14, AA13, GL16, AD22の4種類が現在用意されているので、ELISA法によりこれら合成抗原と感染経験者血清との反応をみる予定である。

ミノサイクリンが薬剤耐性熱帯熱マラリアに対して卓効する知見は、そのまま臨床応用が可能である。日本の多くの臨床医はミノサイクリンの使用法を熟知し、本薬剤の安全性に関する資料は十分揃っている。したがって使用したことのない抗マラリア薬の量を減らし、その分ミノサイクリンで補うなどの利用方法も考えられよう。本研究にあたっては、われわれがソロモン諸島国において試みた *in vitro* 耐性試験をつかってメフロキン耐性、ピリメサミン耐性、クロロキン耐性の熱帯熱原虫を調べミノサイクリンがいずれの耐性マラリアにも卓効することを確認した。13年度の研究においてタンザニアから35株の患者分離株が搬入され耐性試験に供せられる予定である。

三日熱伝播阻止ワクチン開発研究ではタイの流行地で分離した13種の三日熱原虫株がいずれもワクチンによって産生された抗体の作用を受けることが立証された。

## C. 結果と考察

マラリア流行地において2年間ヴォランティア活動に従事した者の内で特にマラリア罹患者の多かった国は以下の10か国である。マラウイ：陽性者20名/全被験者86名（以下陽性者、全被験者の説明をはぶく）ニジェール：29/66、タンザニア19/183、セネガル：19/76、ジンバブエ：17/100、ザンビア25/88、コート・ジボアール：25/78、ケニア：12/93、ガーナ：28/82、パプアニューギニア：11/53、ソロモン諸島国：12/48。この中で8か国まではアフリカに所属する国々で、アジア・太平洋地域の国はパプアニューギニアとソロモン諸島国の2か国である。アジア諸国およびラテンアメリカは陽性者

は散発的である。過去3年間の調査で得られた血清で特に高い抗体価(1:256、1:1024、1:4096)を示す件数は72検体、中等度抗体価(1:64)をしめす例は55検体で残りは1:16と低値をしめした。高値、中等値、低値を示す血清を利用して合成抗原との反応をしらべること、さらに血清の例数を増やすことが必要であれば、海外のヴォランティアに関するマラリア血清調査はすでに過去十数年におよぶ数千検体の資料がそろっているのでそれが利用できる。過去十数年のマラリア間接蛍光抗体法による海外ヴォランティアに対して行ったマラリア調査結果をまとめることは、世界のマラリア流行状況を知る上のさらに強固な資料が用意されることになる。

以上の研究予定により、14年度中に病態疫学、流行予測および感染動向に関する一定の研究成果は提出可能であると考えている。

薬剤耐性マラリアに対するミノサイクリンの効果に関してはタンザニア、タイ、フィリピンにおいて現地のエキスパートに臨床試験を依頼することが考えられるほか、日本の輸入マラリアに関してもキニーネ、メフロキン、アルテミシニンなどの併用療法を試みることは可能であろう。日本の臨床医が特にあまり使用したことのない抗マラリア薬を使うことに抵抗があるので、日常的に使用に慣れたミノサイクリンを併用し、使用慣れしていない抗マラリア薬を早めに打ち切る上にも本剤の試用が薦められよう。薬剤耐性熱帯熱マラリアの測定法は、前述したようにWHO標準法では正確な答えがえられない。本研究班がソロモン諸島でおこなった方法(文献参照)によれば、臨床結果とよく合致する耐性試験が可能である。日本の輸入マラリアに関しては是非本班の主張する耐性試験を標準法としたいものである。

以上の成果を踏まえて先端的なマラリアワクチン研究を進めることは、単に研究室にとどまってしまうワクチン研究よりもはるかに多角的な検討によりワクチンの可能性を探索することになるものと考えている。

#### D. 結論

本研究班は表題に表現されるとおり、厚生行政にも関与の深い研究課題について取り組むことを目的として組織された。平成12年度においては特に基礎的研究を固めるための作業が進められ一定の成果を得た。平成13年度の研究においては、基礎的研

究課題に取り組むと同時に厚生行政に現実的に有益な資料を揃えることを念頭において、マラリアの疫学、流行に関してマラリアに対して免疫力に乏しい日本人が流行地に赴任した場合、どの国では、どの程度の危険度を予測すればよいかについての検討を進めた。具体的には流行地に赴任して現地の人と一体化した生活を2年間過ごしたヴォランティア1352人から帰国後血清を採取し、間接蛍光抗体法によりマラリアの罹患歴をしらべることにより、該当国の危険度を数値化することを試みた。その結果、主として熱帯地にある52か国について一定の結果をだすことができた。平成14年度は過去十数年間にわたって行った調査を集計し、さらに各国のマラリア危険度予想の精度を高める資料を用意することを計画している。このようにして集積された数千例の血清は記録とともに保管されてあるので、本研究班によって用意された4種類の合成抗原との反応を調べる予定である。この結果は、合成抗原の内のどれかがマラリアワクチン候補物質として有望かを調べる研究にもつながることになる。

マラリア対策の推進が、安全、効果的かつ廉価な抗マラリア薬を中心に進められるWHOの方針を受けて本研究班は、既存の抗生物質を検討した結果ミノサイクリンが、テトラサイクリン誘導体の中でもっともマラリアに対して効果的であり、薬剤耐性マラリアに対しても奏功することを報告した。ミノサイクリンの脂肪親和性の性質が、特にマラリア原虫のプラスチッドの膜を通過する上に有利であることがその理由であることも報告した。本研究班の提唱する薬剤耐性マラリアの正しい測定法と相俟って今後日本に輸入されたマラリアに対して、ミノサイクリンを試用するための条件も考慮してよいのではないかと考える。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Lin, Q., Katakura, K., Oue, M., Kano, S. and Suzuki, M. Effects of minocycline against mefloquine-, chloroquine- and pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. Jpn. J. Trop. Med. Hyg., 29: 343-348 (2001)
2. Inaba, H., Ohmae, H., Kano, S., Faarado, L., Boaz, L., Leafasia, J. and Suzuki, M. Variation of incubation time in an *in vitro* drug

susceptibility test of *Plasmodium falciparum* isolates studied in the Solomon islands. *Parasitol. Int.*, 50: 9-13 (2001).

3. 池ノ上望、佐藤久美子、鈴木 守、増田剛太、狩野繁之 マラリア患者血中クロロキン濃度の簡便な測定系の構築 日本臨床寄生虫学会誌 12: 139-141 (2001)
4. Lin, Q., Katakura, K. and Suzuki, M. Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. *FEBS Lett.*, in press (2002).
5. Nonaka, R., Oku, H., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. and Katakai, R. Synthesis of small domain peptides of glycolytic enzyme enolase. In: *Peptide Science 2000*, T. Shioiri ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2001; pp 301-304 (2001).
6. Ishiguro, T., Oku, H., Yamada, K., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. and Katakai, R. Synthesis of a peptide having partial sequence of enolase. In: *Peptide Science 2000*, T. Shioiri ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2001; pp 293-296 (2001).
2. 学会発表
1. 片野又兵衛、林清華、椋清美、片倉賢、鈴木守：ミノサイクリンのアルテメサとの併用によるネズミマラリア治療効果：第 70 回日本寄生虫学会大会、山形、2001 年 4 月
2. 林清華、片倉賢、鈴木守：熱帯熱マラリア原虫に対するテトラサイクリン系抗生物質の作用機序：プラスチドを標的とする可能性について：第 70 回日本寄生虫学会大会、山形、2001 年 4 月
3. 石川浩之、河津信一郎、畑生俊光、駒木加奈子、池ノ上望、鈴木守、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫由来解糖系酵素、エノラーゼをターゲットとした原虫増殖抑止能に関する基礎的研究：第 70 回日本寄生虫学会大会、山形、2001 年 4 月
4. 奥浩之、狩野繁之、佐藤久美子、増田剛太、山田圭一、片貝良一、鈴木守：マラリア原虫エノラーゼの研究 (I) 抗エノラーゼ人工合成ペプチドの分子設計と患者血清における抗原性について：第 70 回日本寄生虫学会大会、山形、2001 年 4 月
5. 佐藤久美子、狩野繁之、奥浩之、増田剛太、山田圭一、片貝良一、鈴木守：マラリア原虫エノラーゼの研究 (II) マラリア患者血清における解糖

系酵素エノラーゼ人工合成ペプチドの抗原性の比較：第 70 回日本寄生虫学会大会、山形、2001 年 4 月

6. 畑生俊光、石川浩之、駒木加奈子、水野泰孝、福田利夫、鈴木守、河津信一郎、狩野繁之：P. berghei XAT 感染 baige マウスにおける肝臓および脾臓浸潤細胞の免疫組織学的検討：第 70 回日本寄生虫学会大会、山形、2001 年 4 月
7. 杉山宗弘、池田英司、川合覚、樋口徹也、張宏、M Nasim Khan、市川聡裕、富吉勝美、井上登美夫、山口晴保、片倉賢、遠藤啓吾、鈴木守：サル・重症マラリア疾患モデルにおける脳内糖代謝の解析：第 42 回日本熱帯医学会大会、東京、2001 年 8 月
8. 池田英司、杉山宗弘、川合覚、樋口徹也、張宏、M Nasim Khan、市川聡裕、富吉勝美、井上登美夫、山口晴保、片倉賢、遠藤啓吾、鈴木守：サル・重症マラリア疾患モデルにおける脾臓糖代謝の亢進：FDG-PET による検討：第 42 回日本熱帯医学会大会、東京、2001 年 8 月
9. 椋清美、林清華、片倉賢、鈴木守：抗マラリア剤との併用によるミノサイクリンのネズミマラリアに対する治療効果：第 42 回日本熱帯医学会大会、東京、2001 年 8 月
10. 鈴江一友、小林正規、鈴木守、竹内勤、小安重夫：リーシュマニア感染後の Th1/Th2 分化における樹状細胞の役割：第 31 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2001 年 12 月

#### F. 知的所有権の取得状況

特許出願 (特願 2001-176044 号)：マラリア感染診断材及びマラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原

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

マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究

狩野 繁之 国立国際医療センター研究所 適正技術開発・移転研究部長

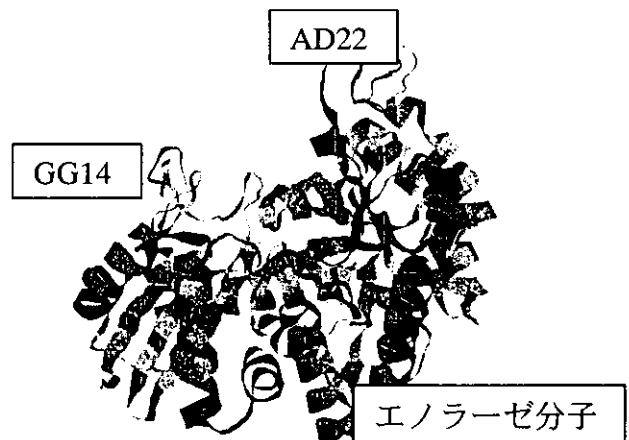
**研究要旨** 熱帯熱マラリア原虫は宿主赤血球よりグルコースを取り込み自らの栄養分とするが、そのときに解糖系の酵素エノラーゼを使用する。熱帯熱マラリア患者血清のエノラーゼ分子に対する反応性を調べたところ、この酵素の機能上・構造上重要な部位に対する抗体を持つ患者は少なかった。一方、このような重要部位に対して高い反応性を示す血清を持つ患者の病状は極めて軽度であることが認められた。さらにこの重要部位の合成ペプチドに対するウサギ免疫血清は試験管内で熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害することも観察された。ワクチンターゲットとなりうる分子構造の選定には、その分子の免疫学的特徴を詳細に検討する必要がある。

A. 研究目的

本研究は熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼを標的としたワクチンの開発研究を最終目的とし、その候補分子の機能と構造を詳細に検討することで、マラリアの病態解明・その疫学的意味論の展開、さらには同分子の遺伝的変異の解析による感染症の発生動向や流行予測に至るゲノム疫学解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

熱帯熱マラリア原虫全タンパクの粗抽出抗原、大腸菌への遺伝子導入の手法により作成した熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの組換えタンパク（リコンビナント熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ：rPfEno）、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの特定部分の人工合成ペプチド（AD22 及び GG14）をそれぞれ抗原として、熱帯熱マラリア患者の血清抗体の反応性を ELISA 法を用いて測定した。なお、AD22 はエノラーゼの基質結合部位の一部であり、立体構造を保つ上でも重要と考えられる部分である。GG14 はその相同性が植物に見られる部位でもあるが、熱帯熱マラリア原虫が進化の過程で藻類の二次共生を受けた際に藻類との遺伝子交換が行われたものと考えられる。（AD22 及び GG14 の部分は図を参照）



rPfEno、AD22 及び GG14 に対する免疫血清をウサギ（日本白色種）で作成した。それぞれの抗原を初回 600 $\mu$ g をフロイドの完全アジュバントとともに背部に 20 カ所皮内接種した。追加免疫は3週間目毎に 300 $\mu$ g、150 $\mu$ g、100 $\mu$ g をフロイドの不完全アジュバントとともに初回同様に接種した。最終免疫終了後 1 週間目にケタラルールによる全身麻酔導入後全身採血を行った。血清は実験に供する前に Protein A による精製を行い IgG として使用している。

熱帯熱マラリア原虫の試験管内増殖抑制試験は、原虫を D-ソルビトールで同調培養して、輪状体の熱帯熱マラリア原虫を用意した。次に 96 穴培養プレートに赤血球寄生率を 4~6%



に調整し、培養開始後無処置群原虫は経時的にギムザ染色観察し、分裂体期の原虫にそろったことを確認した時点で実験群（抗 rPfEno IgG、抗 AD22 IgG、抗 GG14 IgG 添加群）、対照群（Normal Rabbit IgG 添加群）のすべての群より薄層塗抹標本を作製し、顕微鏡下で分裂体期まで増殖することができた原虫数をカウントした。対照群での分裂体期原虫数を 100% としたときの実験群における分裂体期原虫率から増殖阻害率を計算した。

（倫理面への配慮）

マラリア患者血清採取にあたっては、すべて患者からインフォームドコンセントを書面で得た。また動物実験に関しては、国立国際医療センター研究所動物実験ガイドラインに従い、同研究所実験動物委員会の許可を得た。

### C. 研究結果

フィリピン人熱帯熱マラリア患者 30 名の血清を使用し、原虫粗抗原に対する反応性を調べたところ、それらの反応性は極めて高かった。しかしながら rPfEno、AD22 に対して高い反応性を示す血清は非常に少ないことが明らかとなった。一方、AD22 と部位は異なるが同じ熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの一部である GG14 に対しては、すべての患者血清と、それどころか対照群である健常人血清とも高い反応性を示した。rPfEno、AD22 に対して高い反応性を示したいくつかの血清の患者の末梢血中の原虫血症を調べてみると、寄生率は極めて低いことも明らかとなった。これらの抗原に対するウサギ免疫血清を用いた *in vitro* 原虫増殖抑制試験の結果、患者血清と反応性の低い rPfEno、AD22 に対する免疫ウサギ抗体は、原虫増殖抑制能が高いことがわかった。一方、患者血清と反応性の高い GG14 に対する免疫ウサギ抗体は、原虫の増殖を *in vitro* の系で抑制することができなかつた。また、ここで観察された原虫増殖抑制能は組換え蛋白で中和することができ、増殖抑制は抗体による特異的な作用であると考えられた。

### D. 考察

熱帯熱マラリア原虫の解糖系酵素エノラーゼは、原虫の生存にとって必要不可欠な酵素であるが、熱帯熱マラリア患者はマラリアの自然感染によってこの分子に一定の抗体を産生することとなる。しかしながら本研究でエノラーゼの部分ペプチドを作製し、それぞれ

の抗原ポリペプチドに対する患者血清の反応性を詳細に検討すると、患者はエノラーゼ分子の機能や構造上重要な部位に対して十分な抗体量を産生しない場合があることが認められた。一方、構造上あまり重要とは考えられない様な部位に対して、非常に大量の抗体が産生されることもあることが分かった。このように、原虫にとってアキレス腱ともなる部位に対して宿主が抗体を作りにくいような原虫側の仕掛けや、抗体が産生されても酵素活性に影響がない部分には大量に宿主に抗体を作らせるような抗原を配置するなど、いわゆる免疫学的スモークスクリーンと呼ばれる戦略を原虫が獲得している可能性もある。

### E. 結論

エノラーゼを候補分子としたワクチン開発を行う上では、マラリア原虫が宿主の免疫系を効果的に回避し host-parasite relationship をより原虫有利に運ぶための戦略を良く理解し、酵素の機能上・立体構造上重要な部位を選定しなくてはならない。増殖を有効に阻害する抗体は、熱帯熱マラリアの自然感染によっては患者は獲得しづらいことが観察され、むしろ宿主に対してその抗原性が低いと考えられるような部位がワクチンターゲット分子となりうるのではないかと結論された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Nonaka R, Oku H, Sato K, Kano S, Suzuki M and Katakai R: Synthesis of small domain peptides of glycolytic enzyme enolase, *In: Peptide Science*, T. Shioiri ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 301-304, 2001

#### 2. 学会発表

- 1) Ishikawa H, Kawazu S, Hatabu T, Komaki K, Oku H, Katakai R, Suzuki M, Kano S, Antibody reaction to the *Plasmodium falciparum* enolase, a glycolytic enzyme. 第 50 回アメリカ熱帯医学会, Atlanta, 2001
- 2) 石川 浩之, 河津信一郎, 畑生俊光, 駒木加奈子, 池ノ上望, 鈴木守, 狩野繁之: 熱帯熱マラリア原虫由来解糖系酵素、エノラーゼをターゲットとした原虫増殖抑制能に関する基礎的研究 第 70 回日本寄生虫学会、山形、2001.

厚生科学研究費補助金（振興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドによる疫学調査用抗原の開発

分担研究者 片貝良一 群馬大学工学部材料工学科教授

**研究要旨：**昨年度までに確立した4種類（GG14, AA13, GL16, AD22）の水溶性人工抗原ペプチドを用いて、（1）<sup>1</sup>H-NMR スペクトルによる3次元ナノ構造の解析と、（2）疫学調査用検査キット開発を開始した。その結果、AA13 については3次元立体構造を決定し、抗原-抗体相互作用には正しいペプチドコンフォメーションが必須であることを明らかにした。また GL16 については疫学検査に適した高分子量化と水溶性化学修飾の組み合わせを見出した。

**A. 研究目的**

本年度はこれまでに得られた熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ部分ペプチド4種類による病態疫学調査用抗原の開発を目的とした。

**B. 研究方法**

4種類（GG14, AA13, GL16, AD22）の抗原配列はそれぞれ<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し、AA13, GL16 について詳細なスペクトル解析を行った。更に AA13 については、NOESY スペクトルから得られた距離情報を Simulated Annealing にかけることで3次元立体構造を得た。

病態疫学検査に適した抗原は4種類について高分子量化しても水溶性が良い、Glu オリゴマーに Lys 分岐型デンドリマーを組み合わせることで探索した。

**C. 研究結果**

<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにより GL16 抗原はエノラーゼ上と同様なループ-ヘリックス構造をとっていることがわかった。また AA13 は

安定な $\alpha$ ヘリックスであることが3次元立体構造よりわかった。

次に AA13 のアミノ酸置換を行った。変異は Val<sup>6</sup>->Pro<sup>6</sup> と Ser<sup>7</sup>->Ala<sup>7</sup> を行った。その結果患者血清への ELISA 反応が完全に消失することを確認した。

アミノ酸置換体についても<sup>1</sup>H-NMR スペクトルによる構造解析を行った。Ser<sup>7</sup>->Ala<sup>7</sup> 置換体については3次元立体構造が得られた。未置換での $\alpha$ ヘリックスが置換体ではループ-<sub>3<sub>10</sub></sub>ヘリックス- $\alpha$ ヘリックスに変化した。Val<sup>6</sup>->Pro<sup>6</sup> 置換体についてはランダム若しくは伸びきり構造になっており3次元立体構造は得られない。

ELISA 反応性の消失原因は以下のように考えられる。AA13 でのアミノ酸置換は、何れもヘリックス上の側鎖配向をそれぞれ大きく、小さく変化させた。抗体との抗原の結合力は主に電荷相互作用であることを考慮すると、前半の Lys<sup>5</sup> と後半の Tyr<sup>9</sup>-Lys<sup>10</sup>-Tyr<sup>11</sup> に

おけるの電荷の配向が変化し、患者血清中の抗エノラーゼ抗体と結合できなくなったと考えられる。即ち抗原-抗体相互作用には正確なペプチドコンフォメーションが必須であることとわかった。即ち AA13 は構造エピトープである。

疫学検査に適した水溶性抗原は上記4種類について GL16 について適していることがわかった。更に検査に適した高分子量化 (Lys 分岐型デンドリマー) と水溶性化学修飾 (Glu オリゴマー) の組み合わせを見出した。これはほうき状の Lys 分岐型デンドリマーに位置する疎水性配列 GL16 が親水性配列 Glu オリゴマーによって囲まれることでコンフォメーションが安定化したためであると円偏光二色性スペクトルよりわかった。

#### D. 考察

(1) AA13 抗原は構造エピトープであることがわかった。これは今後のワクチンや検査薬の開発に際して、分子設計の大切な指針になる。

(2) GL16 抗原の検査キット化は14年度初頭に、群馬大学医学部保健学科応用検査学教室・佐藤久美子教授と協力して行う。現在キット化に必要な抗原ペプチドの追合成を行っている。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ohyama, T.; Oku, H.; Yoshida, M.; Katakai, R. Crystal Structure of a Depsipeptide, Boc-(Leu-Leu-Lac)<sub>3</sub>-Leu-Leu-OEt. *Biopolymers* **2001**, 58, 636-642.

2) Kokubo, M.; Oku, H.; Yamada, K.; Sato, K.;

Kano, S.; Suzuki, M.; Katakai, R. In *Peptide Science 2001*; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2002; in press.

##### 2. 学会発表

1) 奥 浩之、狩野繁之、佐藤久美子、増田剛太、山田圭一、片貝良一、鈴木 守：マラリア原虫エノラーゼの研究 (I) 抗エノラーゼ人工ペプチドの分子設計と患者血清における抗原性について、平成13年4月、第70回日本寄生虫学会大会、山形

2) 佐藤久美子、狩野繁之、奥 浩之、増田剛太、山田圭一、片貝良一、鈴木 守：マラリア原虫エノラーゼの研究 (II) 患者血清に於ける解糖系酵素とエノラーゼ人工合成ペプチドの抗原性について、平成13年4月、第70回日本寄生虫学会大会、山形

3) 小久保美穂、奥 浩之、山田圭一、佐藤久美子、狩野繁之、鈴木 守、片貝良一：Synthesis of Multiple-Antigenic Peptides Having Partial Sequence of Enolase Synthesis of Multiple-Antigenic Peptides Having Partial Sequence of Enolase、平成13年10月、第38回ペプチド討論会、長崎市

4) 奥 浩之、野中敬祐、小久保美穂、石黒 正、佐藤久美子、狩野繁之、鈴木 守、山田圭一、片貝良一：熱帯熱マラリア原虫解糖系酵素を標的としたペプチド抗原の合成と性質、平成14年3月、日本化学会第81春期年会、東京

##### F. 知的所有権の取得状況

1) 特願2001-176044 (平成13年6月11日出願)「マラリア感染診断材及びマラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原」

平成 13 年度 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

タンザニアの薬剤耐性マラリアの材料収集

分担研究者 桑野 信彦

九州大学大学院医学研究院分子常態医学部門生化学講座医化学分野 教授

研究要旨：

マラリアの薬剤感受性の分子的背景、耐性機構を把握して、マラリア感染症の薬物治療の向上に貢献するために、薬剤排出ポンプ、ATP 結合カセット (ABC) トランスポーターに注目した。マラリアの新規 ABC トランスポーターの同定と薬剤耐性への関与を明らかにするために、本年度アフリカ、タンザニアにおける検体採取の計画を実施し、薬剤感受性の異なる検体を収集した。一方、耐性克服のために ABC トランスポーター拮抗阻害薬の開発と基礎的実験を行った。

A. 研究目的

マラリアの薬剤感受性の分子背景と薬剤耐性機構を把握して、マラリア感染症の向上に貢献する。本研究では特に、薬剤排出ポンプ、ATP 結合カセット (ABC) トランスポーター遺伝子群に焦点を絞ってマラリア治療薬の薬剤感受性に関与する遺伝子群とその基質特異性の把握およびマラリア ABC トランスポーターを標的とした耐性克服薬の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 我々はヒト ABC 遺伝子群で塩基配列がよく保存されているカセット部分にプライマーを設計し、RT-PCR 法により新規ヒト ABC トランスポーター、MRP2、MRP3 および MRP7 の単離に成功した。本研究ではこの方法を、ヒト MDR サブファミリー遺伝子のマラリアオルソログに加え、MRP サブファミリーの遺伝子群の単離を試みる。NBD ドメインはバクテリアからヒトまで高度に保存されており、マラリアゲノム計画の進展に伴いマラリアに発現する ABC トランスポーター遺伝子群の単離、同定を試みる。

2. マラリア ABC トランスポーターの強制発現動物細胞株を樹立し、抗マラリア薬に対する基質特異性を明らかにする。

3. 2.において樹立した細胞株を用いて、ヒト ABC トランスポーターに対して我々が開発中の拮抗阻害薬による阻害効果を評価する。

4. 倫理面への配慮

マラリア患者の末梢血より総 DNA を分離し、マラリア ABC トランスポーターの発現を解析する。計画 1 および 4 では、タンザニア在住の患者から採血済みである。採血に当たっては研究目的と意義の説明を現地医師より行い、同意を得た上で採血した。

C. 研究結果

1. 計画 1 および 4 を行うためにマラリア患者よりの

採血が必要となるが現地医師への計画説明はタンザニア在住の外務省職員川原尚行と宮武一志に依頼済みである。本年度、タンザニアにおいて種々の薬剤投与プロトコールの異なる患者より血液を採取した。

2. ABC トランスポーターはその構造が種を越えて、良く保存されており、ヒト ABC トランスポーターに対する克服薬が、マラリアの薬剤克服薬の開発のためのリード化合物として期待される。既存のカルシウム拮抗剤、ベラパミール、サイクロスポリン A とその誘導体である PSC833 などに加え、我々はセファランチン、イソプレノイド誘導体、ジハイドロピリジン誘導体、NK250 および NK252 を開発し、ヒトがん細胞の P-糖蛋白質を分子標的とした耐性克服に関する基礎的な知見を集積した。

3. ヒトに対して、薬物療法を行う場合、がんやマラリアに発現している薬剤感受性制御因子に加え、宿主に発現している解毒、排泄機構についての理解が薬効と副作用を考える上で必須となる。我々は、ABC トランスポーターの中でも、MDR1 や MRP サブファミリーに属する異物・薬物排出ポンプが、薬物の体内動態に重要な影響を及ぼさうという知見を蓄積しつつある。

D. 考察

薬物の体内動態、副作用に関与する ABC トランスポーターについての知見はマラリア薬物療法を考える上で必ず必須のものとなると信じている。

1. ゲノムデータベース上には既にヒト MRP2 に相同性のある *P. falciparum* 遺伝子（うち 1 つは膜蛋白質）が 4 つ存在し、クロロキン耐性には MDR 様遺伝子が関与する事も明らかになっている。マラリアのゲノムプロジェクトが進んでおり、ゲノムデータベースから、マラリア ABC トランスポーターを同定する方法も有効と考えられる。

2. 多くの ABC トランスポーター拮抗阻害薬が開発さ

れているので、この中から、マラリア薬剤耐性克服薬を開発するための足がかりを得るためには、マラリアに発現している ABC トランスポーターの同定とその強制発現の細胞株を用いた、阻害薬のスクリーニング薬の開発が必須と考えられる。

## E 結論

マラリア薬物治療の向上のためにマラリア薬剤耐性関与における ABC トランスポーターの位置付けを把握することが必須と考えられる。また、耐性克服剤の開発のためにもマラリア ABC トランスポーター群の同定と、強制発現系の構築が必要と考えられる。

## F 健康危険情報

特になし

## G 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tasaka, S., Ohmori, H., Gomi, N., Iino, M., Machida, T., Kiue, A., Naito, S. and Kuwano, M., Synthesis and structure-activity analysis of novel dihydropyridine derivatives to overcome multidrug resistance. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 11:275-277, 2001
2. Kawakami, A., Tomofumi, M., Higuchi, R., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Van Soest, R. W. N., Structure of a novel multidrug resistance modulator, irciniasulfonic acid, isolated from a marine sponge, *Ircinia* sp. **Tetrahedron Lett.**, 42: 3335-3337, 2001
3. Haga, S., Hinoshita, E., Ikezaki, K., Fukui, M., Scheffer, G. L., Uchiumi, T. and Kuwano, M., Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. **Jpn. J. Cancer Res.**, 92: 211-219, 2001
4. Nagayama, J., Iino, M., Tada, Y., Kusaba, H., Kiue, A., Ohsima, K., Kuwano, M. and Wada, M., Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance (*mdr1a*) gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. **Blood**, 97: 759-766, 2001
5. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K. and Kohno, K., YB-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acid and exhibit 3'-5' exonuclease activity. **Nucl. Acids Res.**, 29: 1200-1207, 2001
6. Hinoshita, E., Taguchi, K., Inokuchi, A., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Shimada, M., Tsuneyoshi, M., Sugimachi, K. and Kuwano, M., Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. **J. Hepatol.**, 35: 765-773, 2001
7. Harris, M. J., Kuwano, M., Webb, M. and Board, P. G., Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). **J. Biol. Chem.**, 276: 20876-20881, 2001
8. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Machara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K. and Kuwano, M., Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small-cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.**, 7: 3151-3155, 2001
9. Inokuchi, A., Hinoshita, E., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T., Enhanced expression of human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes: a transcriptional control of plausible bile acid transporter. **J. Biol. Chem.**, 276: 46822-46829, 2001
10. Goto, H., Kohno, K., Sone, S., Akiyama, S., Kuwano, M. and Ono, M., Gamma interferon-dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet derived endothelial growth factor through gamma-activated sequence-like element in human macrophages. **Cancer Res.**, 61: 469-473, 2001
11. Kuwano, M., Fukushi, J., Okamoto, M., Nishie, A., Goto, H., Ishibashi, T. and Ono, M., Angiogenesis factors. **Int. Med.**, 40: 565-572, 2001
12. Migita, T., Oda, Y., Naito, S., Morikawa, W., Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M., The accumulation of angiotensin-like fragments in human prostate carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, 7: 2750-2756, 2001
13. Okamoto, M., Ono, M., Uchiumi, T., Ueno, H., Kohno, K., Sugimachi, K. and Kuwano, M., Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor b in human cancer cells-transcriptional activation and messenger RNA stabilization. **Biochim. Biophys. Acta.**, 93595: in press, 2002
14. Hirata, T., Ogawa, S., Kometsani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M., ZD1839 ('Iressa') induces antiangiogenic effects through inhibition of EGFR tyrosine kinase. **Cancer Res.**, in press, 2002
15. Itokawa, T., Nokihara, H., Nishioka, Y., Sone, S., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Cherrington, J., McMahon, G., Shibuya, M., Kuwano, M. and Ono, M., Antiangiogenic effect by SU5416 is partly due to inhibition of Flt-1 receptor signaling. **Molec. Cancer Therapeutics**, in press, 2002

### 2. 学会発表

1. Masuda, K., Nishie, A., Otsubo, M., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Naito, S. and Kuwano, M., The role of the hypoxia-inducible cap43 gene in malignancy and tumor growth of human renal cell carcinoma 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28(New Orleans)
2. Tada, Y., Nagayama, J., Motida, Y., Wada, M., Naito, S. and Kuwano, M., Simultaneous hypermethylation of multiple genes including *dap-kinase* and *MDR1* genes is associated with recurrence in bladder cancer 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)2001/3/24-3/28(New Orleans)
3. Mochida, Y., Hinoshita, E., Tada, Y., Nagayama, J., Harada, T., Machara, Y., Kuwano, M. and Wada, M., Expression of P-glycoprotein coded by *MDR1* gene, a possible determinant for distinct carcinogenesis pathway, in the colorectal cancer in association with microsatellite

Instability 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)

4. Uchiyama, T., Hinoshita, E., Taguchi, K., Inokuchi, A., Nakamura, T., Wada, M. and Kuwano, M. The expression of human ABC superfamily MRP2 in association with differentiation in human colorectal carcinoma-experiment and clinical Approach. 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)

5. Ashizuka, M., Uchiyama, T., Nakamura, T., Okamoto, T., Fukuda, T., Kohno, K. and Kuwano, M., Isolation of proteins associated with the Y-Box binding protein (YB-1) and their expression in malignant cancers 92th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 2001/3/24-3/28 (New Orleans)

6. 永山淳、原寿郎、和田守正、桑野信彦 "レトロウイルス挿入と多剤耐性遺伝子 *mdr1a* の活性化" 第7回九州山口小児血液・腫瘍研究会 (一般演題) 2001年5月12日 (鹿児島)

7. 中尾新太郎、福士純一、小野真弓、桑野信彦 "インターロイキン4 (IL-4) と IL-13 による血管新生誘導と可溶性 VCAM-1 の関与" 第10回日本がん転移学会総会 (ワークショップ) 2001年6月14日-15日 (徳島)

8. 岡本正博、小野真弓、桑野信彦 "トロンボスポンジン1の新しい発現調節機構" 第10回日本がん転移学会総会 (ミニシンポジウム) 2001年6月14日-15日 (徳島)

9. 芦塚慈美、内海健、中村崇規、岡本龍郎、福田隆男、河野公俊、桑野信彦 "転写因子 YB-1 と相互作用する蛋白の機能と悪性腫瘍における発現" 第5回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 2001年6月21日-22日 (東京)

10. 増田克明、西江昭弘、大坪路弘、小野真弓、桑野信彦 "腎癌における Cap43 遺伝子の発現と機能に関する検討" 第5回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 2001年6月21日-22日 (東京)

11. 中尾新太郎、福士純一、小野真弓、桑野信彦 "インターロイキン4 (IL-4) と IL-13 による血管新生誘導と可溶性 VCAM-1 の関与" 第5回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 2001年6月21日-22日 (東京)

12. 多田靖弘、和田守正、内藤誠二、桑野信彦 "ヒト膀胱腫瘍における DNA メチル化の異常と膀胱内再発" 第5回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 2001年6月21日-22日 (東京)

13. 内海健、和田守正、桑野信彦 "ヒト大腸癌の分化と ABC トランスポーター MRP2 遺伝子の発現" 第5回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 2001年6月21日-22日 (東京)

14. 桑野信彦 "がんの血管新生と間質応答" 第1回神奈川頭頸部癌フォーラム (特別講演) 2001年7月6日 (神奈川)

15. 多田靖弘、和田守正、持田泰、谷口秀一、内藤誠二、桑野信彦 "ヒト表在性膀胱腫瘍における異常なメチル化と膀胱内再発" 第60回日本癌学会総会 (セッション) 2001年9月26-28日 (横浜)

16. 芦塚慈美、内海健、中村崇規、福田隆男、岡本龍郎、芝原幸太郎、河野公俊、桑野信彦 "YB-1 (Y-box Binding protein) による翻訳制御 [I] YB-1 結合蛋白の単離とフェリチン蛋白合成の調節" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

17. 持田泰、和田守正、日下英司、田口健一、恒吉正澄、赤木一成、多田靖弘、谷口秀一、桑野博行、前原喜彦、杉町圭藏、高木幸一、桑野信彦 "大腸の発がん と P 糖蛋白質/MDR1 遺伝子の関与" 第60回日本癌学会総会 (セッション) 2001年9月26-28日 (横浜)

18. 福田隆男、内海健、中村崇規、芦塚慈美、芝原幸太郎、桑野信彦 "YB-1 による翻訳制御 [II] YB-1 蛋白合成の自己調節" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

19. 井口明彦、内海健、日下英司、和田守正、桑野信彦 "ヒト大腸細胞における ABC トランスポーター MRP3 の胆汁酸による発現上昇と機序" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

20. 増田克明、西江昭弘、岡本正博、森河亘、大坪路弘、内藤誠二、小野真弓、桑野信彦 "腎癌における Cap43 遺伝子の発現と機能に関する検討" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

21. 中尾新太郎、福士純一、岡本正博、小川聡一郎、小野真弓、桑野信彦 "可溶性 VCAM-1 の血管新生における機能とシグナル伝達" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

22. 糸川高史、小野真弓、山田雄次、渋谷正史、桑野信彦 "SU5416 による VEGF 受容体 Flt-1 のキナーゼ阻害と血管新生阻害の機序" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

23. 岡本正博、小野真弓、河野公俊、上野光、桑野信彦 "がん細胞の TGF $\beta$  と EGF によるトロンボスポンジン-1 発現上昇の機序" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

24. 谷口秀一、持田泰、蛭原卓哉、多田靖弘、桑野信彦、和田守正 "MDR1 遺伝子の遺伝子多型および DNA メチル化による発現レベルの個人差" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

25. 内海健、日下英司、田口健一、中村崇規、前原喜彦、和田守正、恒吉正澄、杉町圭藏、桑野信彦 "ヒト大腸癌の分化と ABC トランスポーター MRP2 遺伝子の発現変化と機序" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

26. 今野俊和、久枝哲史、芳賀整、橋本健吉、中村崇規、内海健、和田守正、桑野信彦 "MDR1 と MRP2 の細胞膜局在と抗癌剤を認識するドメインの同定" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

27. 久枝哲史、内海健、芳賀整、橋本健吉、和田守正、桑野信彦 "ヒト脳血管内皮細胞による管腔構築と ABC トランスポーターの局在" 第60回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001年9月26-28日 (横浜)

28. 平田晃、小川聡一郎、桑野隆史、米谷卓郎、桑野

信彦、小野眞弓 "EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤 ZD1839 の血管新生阻害作用" 第 60 回日本癌学会総会 (ポスター討論) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)

29. 和田守正、桑野信彦 "大腸および膀胱腫瘍における抗がん剤感受性関連遺伝子のメチル化異常" 第 60 回日本癌学会総会 (シンポジウム) 2001 年 9 月 26-28 日 (横浜)

30. 橋本健吉、内海健、中村崇規、開庭史雄、植田和光、天知輝夫、和田守正、桑野信彦 "Dubin-Johnson 症候群における MFP2 遺伝子変異による蛋白成熟異常と機能活性異常" 第 24 回日本分子生物学会年会 (ポスター討論) 2001 年 12 月 9-12 日 (横浜)

31. 芦塚慈美、内海健、中村崇規、福田隆男、岡本龍郎、河野公俊、桑野信彦 "YB-1 (Y-box binding protein) による翻訳制御-YB-1 結合タンパクの単離とフェリチン蛋白合成の調節" 第 24 回日本分子生物学会年会 (ポスター討論) 2001 年 12 月 9-12 日 (横浜)

32. 今野俊和、芳賀整、久枝啓史、中村崇規、内海健、和田守正、桑野信彦 "MFP サブファミリーの細胞内局在および基質認識ドメインの同定" 第 24 回日本分子生物学会年会 (ポスター討論) 2001 年 12 月 9-12 日 (横浜)

33. Kuwano, M. "ATP binding cassette (ABC) transporters and Y-box protein as cancer therapeutic targets" The UICC-JSCO Joint Fukuoka Cancer Symposium on Molecular Diagnosis and Treatment in the 21st Century (symposium) 2002/3/14-16 (Fukuoka)

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

マラリア薬剤耐性消去に関する研究

分担研究者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室教授  
研究協力者 高柳弘明 北里大学薬学部・薬化学教室教授

研究要旨 クロロキン耐性マウスマラリア原虫 : *Plasmodium chabaudi* (AS strain: chloroquine-resistant (3CQ)) を対象としてクロロキン耐性消去を指標に合成された種々のジベンゾスベリル誘導体およびジフェニルアセチルピペラジン誘体の耐性消去効果をスクリーニングした。その結果ジベンゾスベリル誘導体の新規化合物5種に期待された効果を認めた。薬効とジベンゾスベリル誘導体の構造については1) 側鎖の長い化合物より、側鎖の炭素鎖が炭素数4以下の短い化合物 2) 不飽和結合を有する化合物、に高い消去活性が見られた。また三重結合を有する化合物の方が二重結合化合物よりも活性が高く、不飽和結合をもたないもので副作用が見られたことから副作用を軽減する作用も示唆された。水酸基については薬理作用、副作用について現時点で明らかでないが、水酸基を有することで化合物は結晶化するため、その導入は重要と考えられた。また、ジベンゾスベリル誘導体は15mg/kg以下では耐性消去作用が顕著に低下することからさらに活性の高い置換基の検討および投与量の減量、副作用の軽減などが期待できる水溶性の向上も試みている。

A. 研究目的

薬剤耐性マラリア克服の一手段としてマラリア原虫の薬剤への感受性を回復させる作用を有する化合物を合成することで、耐性株の出現により棄却されつつある優れた抗マラリア薬の再利用を可能にすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 化合物基本骨格と誘導体：多剤耐性癌およびMRSAなど薬剤耐性となった病原微生物の薬剤感受性を回復させる作用をもつジベンゾスベリルピペラジン系化合物の誘導体にマウスのクロロキン耐性マラリア株のクロロキン感受性を回復させる作用を認めたことから、ジベンゾスベリルピペラジンを基本骨格としてピペラジン部分の窒素に様々な置換基を導入することで種々誘導体を合成した。

2) 薬剤のスクリーニング：① *Plasmodium chabaudi* (AS strain: chloroquine-resistant (3CQ)) をICRマウス（雌4-5週齢, 20-25g）に  $5 \times 10^6$  個/0.2mlのマラリア原虫感染赤血球を0.85%生理的食塩水にて調製しマウス尾静脈より、26x1/2ゲージツベルクリン針にて接種した。②化合物の調製はマウス1匹への1回当たりの投与量が5-50mg/kg/0.2mlの最終濃度になるよう1/10量のジメチルスルホキシド(DMSO)に予め溶解させた後、0.85%生理的食塩水にて希釈し、10%DMSO懸濁液とした。また、溶媒として100%DMSOや分子包接作用のあるシクロデキストリンについても検討した。③化合物およびクロロキンの投与はマラリア原虫接種2時間後に、試験化合物をマウスに21x1/2ゲージ注射針を用いて腹腔投与し、引き続き0.85%生理的食塩水にて最終濃度が0, 3, 4 mg/kg/0.1mlになるよう



調製したクロロキン溶液をツベルクリン針にて同じく腹腔投与した。コントロール群には合成化合物のみ、クロロキンのみを投与した。化合物とクロロキンはマラリア原虫接種後0, 1, 2, 3 日目に計4回の投与を行った。1次スクリーニングはそれぞれの群につき2匹のマウスを用い合成化合物50mg/kgを投与することでおこなった。④効果判定はマラリア原虫接種後1日毎に、マウス尾端を切断、出血させ血液薄層塗抹ギムザ染色標本作製し、10,000個当りの感染赤血球数をカウントしコントロール群と比較することで合成化合物のクロロキン耐性消去作用を判定した。

### C. 研究結果

1) フェノキシアルキル基およびフタルイミド基を有する誘導体のスクリーニング結果：試験した4種化合物のうち置換基に窒素を導入した化合物1種のみがクロロキン3mg/kg投与でかなり薬効回復作用を示した。

2) 飽和炭化水素を有する誘導体のスクリーニング結果：アルキル鎖の炭素数の違いによる活性の違いを6種化合物について検討した。その結果側鎖が短くなる方がクロロキン耐性消去作用が高くなる傾向を示した。特に最も短いアルキル鎖を有する化合物は50mg/kgで3日目にマラリア感染赤血球数は0となり、高い活性を示すことがわかった。しかしマウスに痙攣もみられ強い副作用も認められた。また10mg/kgと濃度を減じても感染赤血球数は4日目で2.5と高い効果を認めた。

3) 不飽和結合を有する誘導体のスクリーニング結果：水酸基と末端に不飽和結合（二重結合）を有する誘導体5種と水酸基を含まず二重結合をもつ誘導体1種、そして水酸基と三重結合をもつ誘導体1種について検討した。2)の結果と同様側鎖が短い程高い活性を有すること、そして水酸基の有無により副作用の差は見られず不飽和結合により副作用が軽減するらしいこと、また三重結合でも同様に高い活性をもつことが示された。

4) 基本骨格のスクリーニング結果：ジベンゾ

スベリルピペラジン、ジフェニルアセチルピペラジンおよびベンジドリルピペラジン骨格について検討した。その結果ジベンゾスベリルピペラジンとジフェニルアセチルピペラジン骨格はマラリア原虫数を0にすることはなかったがクロロキンの顕著な薬効作用回復を示した。ベンジドリルピペラジン骨格については投与後激しい痙攣がみられマウスに致死的效果を示した。

5) 抗バクテリア活性や抗多剤耐性バクテリア活性をもつことが知られるオキサゾリジノン骨格が多剤耐性マラリア原虫に対しても活性を有することを期待しその導入を試み、簡便高収率の新規合成法を確立した。

### D. 考察

スクリーニングの結果より、基本骨格としてジベンゾスベリルピペラジンとジフェニルアセチルピペラジンの有用性が示され、現時点では導入置換基として立体障害の小さい置換基が高い活性を示し、不飽和結合を含有することが有利であることが示された。水酸基、不飽和結合の位置および数については今後検討し、活性および副作用への影響を検討する必要がある。また窒素を含む誘導体にも薬剤感受性回復作用が期待され、これら誘導体についても検討する必要を認めた。シクロデキストリンによる包接効果もある程度みとめられた。100%DMSOを用いることで投与量の誤差は減少したが一時的な副作用もみられた。ジベンゾスベリルピペラジン骨格の塩酸塩は水溶性が高く、効果も高かったことから水溶性を高めることの有用性も示された。

### E. 結論

1) 将来、薬剤耐性消去作用が期待できるオキサゾリジノン骨格誘導体の簡便で高収率の新規合成法を確立した。

2) ジベンゾスベリルピペラジンを基本骨格とする新規合成化合物5種がクロロキンと併用する

ことで3-4日めの感染赤血球数がほぼ0となる強いクロロキン耐性除去作用を示した。

3) 薬効と構造についての相関から、①側鎖の炭素鎖が短い化合物(炭素鎖が4以下)で、②不飽和結合を有する化合物が活性が高く副作用も軽減されること、③また窒素の導入によってもクロロキン感受性の回復がみられることがわかった。④他の基本骨格の検討からジフェニルアセチルピペラジン誘導体にも薬効回復作用が見られることがわかった。

4) 水酸基の有無は薬理作用と副作用に差を生じなかったが結晶化のために導入は必要と考えられた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

1) 長由美子、佐藤容子、小林正規、鈴木友美子、竹内勤、宮田善之、坂口正一、高柳弘明. 抗マラリア活性を有するジベンゾスベリルピペラジン誘導体の合成. 第41回有機合成シンポジウム(2001)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 竹内勤、高柳弘明、小林正規、長由美子、鈴木友美子、佐藤容子、坂口正一、WO2001-JP10128,2001 (国際特許)
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

「マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動態に関する基礎的研究」

マラリア伝搬阻止ワクチンの開発に関する研究

分担研究者 鳥居本美 愛媛大学医学部教授

**研究要旨** 三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン開発を目的として、三日熱マラリア原虫の組換えオーキネート表面蛋白（yPvs25 または yPvs28）による伝搬阻止ワクチンについてタイ国の流行地患者株を用いた実験を実施して、その効果を検討すると共に、その伝搬阻止効果と原虫の抗原変異との関連性について検討した。その結果、組み換え yPvs25 および yPvs28 をワクチン抗原として作成した抗血清は抗原変異の有無に関わらず流行地の三日熱マラリア原虫の媒介蚊体内での発育を阻害することが示され、yPvs25 および yPvs28 が伝搬阻止ワクチンの抗原として有望であることが明らかとなった。

A. 研究目的

マラリア伝搬阻止ワクチンは、媒介蚊ステージの中でマラリア原虫の生活環を断つことを目的とするワクチンである。我々はアジア地域で猛威をふるっている三日熱マラリア伝搬阻止ワクチンの実用化を目的として、三日熱マラリア実験室内（Sal I）株由来のオーキネート表面蛋白遺伝子 Pvs25 及び Pvs28 から酵母を用いて作成した組み換え蛋白 yPvs25 又は yPvs28 をアルムアジュバントとともにマウスに免疫し、その血清を Sal I 株感染チンパンジー血液と混合した後、数種類のマラリア媒介蚊に吸血させ伝搬阻止活性を検討した。その結果、yPvs25 及び yPvs28 いずれに対する抗血清も三日熱マラリア原虫の蚊への伝搬を完全に阻止し、またこの抗血清が流行地分離株の三日熱マラリア原虫に対しても上記と

同様の伝搬阻止活性を有することを確認した。本年度は、この抗原をアルムまたはフロイントアジュバントとともにウサギにも免疫し、流行地分離株を用いて伝搬阻止実験を行い、またこの実験に用いた流行地株に Pvs25 及び Pvs28 の抗原変異が認められたことから、抗原変異の伝搬阻止効果に及ぼす影響についても検討した。

B. 研究方法

1. 三日熱マラリア患者血液を用いた三日熱マラリア伝搬阻止実験：三日熱マラリア原虫実験室内株（Sal I 株）由来のオーキネート表面抗原の遺伝子を基に酵母を用いて発現させた組換え蛋白（yPvs25 または yPvs28）を、アルムアジュバントを用いてマウスに3週間隔で3回免疫した。特異抗体価の上昇を確認した後、

このマウス血清を用いて以下の実験を行った。また、同じ組換え蛋白をアルムアジュバントまたはフロイントアジュバントを用いてウサギに免疫した。これらの抗血清が流行地の三日熱マラリア原虫に対しても伝搬阻止活性を有するか否かを検討するため、タイ国の三日熱マラリア患者の血液とマウスまたはウサギ抗血清を混合した後、メンブレンフィーディング法を用いてタイでマラリアを媒介している *Anopheles dirus* に吸血させ、中腸に形成されたオーシスト数を算定して伝搬阻止活性を検討した。また、同時に患者血液から Pvs25 及び Pvs28 遺伝子を PCR 法を用いて増幅し、患者毎にそれらの塩基配列を解析した。

#### (倫理面への配慮)

タイ国における三日熱マラリア患者血液の採取に当たってはタイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。動物実験は愛媛大学医学部附属動物実験施設の実施要領に基づいて実施した。

### C. 研究結果および考察

酵母の系で発現させた三日熱マラリア原虫実験室内株 (Sal I 株) 由来の組換えオーキネート表面蛋白 (yPvs25 または yPvs28) に対するマウス抗血清またはウサギ抗血清とタイの三日熱マラリア患者血液とを混合して吸血させた蚊を解剖して中腸のオーシスト数を計測したとこ

ろ、yPvs25 及び yPvs28 に対するマウス抗血清は、いずれもタイにおける患者由来の三日熱マラリア原虫の伝搬を阻止することが明らかとなった。また、これらのワクチン抗原とアルムアジュバントまたはフロイントアジュバントを用いて免疫したウサギ抗血清の伝搬阻止活性をマウス抗血清と比較すると、伝搬阻止活性はマウス (アルム) >ウサギ (フロイント) >ウサギ (アルム) の順に低下した。これらの結果は、それぞれの抗血清中の特異抗体価と相関していることが示唆された。しかし、アルムアジュバントを用いて免疫したウサギ抗血清でも蚊 1 匹あたりの平均オーシスト数を有意に低下させており、その有効性は確認された。

次に、上記の伝搬阻止実験に用いた三日熱マラリア原虫タイ分離株の DNA を用いて、Pvs25 及び Pvs28 の抗原変異を解析し、Sal I 由来ワクチン抗原による伝搬阻止活性との関連性について検討した。今回の解析にはマウス抗血清で伝搬阻止実験が実施できた 18 分離株についての結果を示す。Pvs25 では 3 カ所に点突然変異が認められたのみであり非常に保存的であったが、18 個のタイ分離株を 3 種に分類できた。一方、Pvs28 では 10 カ所に点突然変異を認め、さらに 4 番目の EGF-like ドメインと GPI アンカーとの間に存在する GSGGE/D の繰り返し配列の回数が 5 回から 7 回と Pvs25 と比べると非常に変異に富んでいた。Pvs28 の変異に基づいて 18 個のタイ分