

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

研究協力者 報告書

マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索

研究協力者 金 恵淑

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・国際感染症制御学分野・准教授

研究要旨

熱帯熱マラリア原虫に有効な新規抗マラリア薬の候補化合物を探索するために、分子内にペルオキシドを有する化合物の中から環状過酸化化合物・N-89を見出した。この化合物は *in vitro*, *in vivo* の両実験系で優れた抗マラリア活性と完治効果を併せ持つことが判った。今までの体内動態解析研究より、マラリア流行地の状況に合わせた軟膏製剤も他の懸濁剤と同様に抗マラリア薬効を発揮することを確認した。今年度は過酸化構造を有する有機合成品、及び天然生薬資源由来の化合物、計 31 種について *in vitro* での薬効評価を行った。また、*P. chabaudi* 感染マウスを用いた薬効評価系を新たに構築し、リング期の原虫、及び栄養体の原虫に阻害活性を示す化合物を特異的に選抜できることを確認した。

A. 研究目的

近年 Artemisinin をベースに他の抗マラリア薬を併用した ACT (Artemisinin-Combination Therapy) 療法が WHO を中心に展開されているが、カンボジア国境を中心にこれら ACT 耐性の熱帯熱マラリア原虫が報告され、新しい抗マラリア薬の開発の重要性が急務になっている。

私は抗マラリア新薬開発研究で得られた分子内ペルオキシド構造を含む有機合成化合物に優れた抗マラリア活性を見出し、将来抗マラリア薬として臨床の現場で使用することを念頭において研究を進めた。そこで、マラリア流行地の状況を考慮し、安価で大量に有機合成しやすい化合物を選抜する。また、*in vivo* 抗マラリア薬効解析を容易に行うことが出来る評価系を構築し、*in vitro* 評価系で見出された候補化合物の作用機序の解析研究（マラリア原虫の生育ステージを中心に）を同時に行った。

B. 研究方法

1.N-89 軟膏製剤の体内動態解析と抗マラリア薬効評価

LC/MS/MS を用いた N-89 の検出条件をもとに、新しい処方で作成した N-89 の配合率を 0~150mg/Kg まで含む種々の軟膏製剤を作成した。基剤はオイルと白色ワセリンで均一になるように混ぜた。N-89 軟膏製剤をマウスの背の毛の刈った部分に塗布し、乾燥してからケージに戻した。単回塗布、あるいは複数回塗布し、0~12 時間までの血液サンプルを用いて N-89 含有量を測定した。マウスに従来のオイル溶解した N-89 を投与する群をコントロールとした。抗マラリア薬効解析は *in vivo* 4-day suppressive test 法で行った (*P. berghei* NK65 株感染マウスを用い、1 回/日×4 日間連続薬剤投与後、次の日に感染率で阻害能を見る方法)。

2. *P. chabaudi* 感染マウスを用いた *in vivo* 薬効評価系の構築

抗マラリア薬効評価系で用いる *in vivo* 実験系は *P. berghei* NK65 株感染マウスを用いて行うが、この評価系では様々なステージの原虫が混在し、薬剤評価時に原虫の総阻害能として算出する。私たちはメラトニン添加によりマラリア

原虫の周期性が見られる論文報告から、*P. berghei* NK65 株感染マウスにメラトニン(最大 150mg/kg)を投与したが、マラリア原虫の周期性に影響する結果が得られなかった。そこで、ネズミマラリア原虫株によって周期性の相違有無を調べた。*P. chabaudi chabaudi* 感染マウスを用い、感染率の増殖カーブの作成、メラトニン添加有無による周期性の変化、及び、マラリア原虫のステージ変動を経時的に検討した。Positive control として N-89 作用時のマラリア原虫ステージの変動についても比較解析した。

2. 過酸化構造を有する化合物、及び天然生薬資源を用いた *in vitro* 薬効解析

培養熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* (FCR-3 株)を用い、初期感染率 0.3%、ヘマトクリット値 3%の条件で 24 well plate に感染赤血球浮遊液を入れ、DMSO 等で溶解した化合物を添加して 72 時間培養後、感染率の変動より阻害能を算出する。

C. 研究結果

難溶性薬物の体内動態の改善とマラリア流行地の現状を考慮した剤形として N-89 軟膏製剤の可能性について検討した。軟膏の基剤としてオイル：白色ワセリン(2:8 (v/w))で N-89 を均一となるように混ぜ、マウスの毛を刈った背の部分に塗り、乾燥後にケージに戻した。健康なマウスを用いた単回、及び複数回塗布時の体内動態解析の結果、基剤として用いた溶剤が検出法に影響したか、あるいは、体内動態の検出感度以下であったために定量することが出来ない。一方、*P. berghei* NK65 感染マウスを用いた 4-day suppressive test の結果、ED₅₀ 及び ED₉₀ 値は 30mg/kg と 45mg/kg で従来の他の投与ルートと比較して同程度か劣る値であった。延命率は 150mg/kg 投与群で実験群の 80%が生存し、60 日以上生存した。この結果より N-89 軟膏製剤は抗マラリア薬効を示し、延命効果を合わせて持つが、体内動態の解析が不十分であるため、再現性の実験が必要がある。

今まで *in vitro* の熱帯熱マラリア原虫に強い阻害活性を示す化合物は、次にネズミマラリア原虫感染マウス(*P.*

berghei NK65 株)系で薬効解析を行っていたが、この評価系ではマラリア原虫の阻害能(メロゾイト期の原虫~分裂期のスカイゾント原虫を全て含む)のみ評価出来る。そのため、私たちは特定のマラリア原虫、即ち、マラリア原虫の代謝・成長が盛んな原虫(栄養体)に作用する抗マラリア薬の開発評価系が構築できれば、マラリア原虫の阻害能とマラリア原虫の作用ステージの両方が解析できるのではと考え、研究を行った。その結果、ネズミマラリア原虫(*P. chabaudi chabaudi*)を感染させたマウスの特定時期にトロポゾイト期の原虫が全原虫の 7 割以上含まれていることが分かった。この現象は *P. berghei* NK65 株を感染させたマウス系では見られない。また、メラトニンを処理しても特定ステージの割合が増えるなどの変化は見られず、これら現象は *P. chabaudi chabaudi* 原虫由来であると考えられる。コントロールとして用いた N-89 では従来の報告通りにトロポゾイト期の原虫を特異的に阻害する予備的な結果を得た。現在、最適の評価系を構築するための条件検討(原虫の感染数、原虫ステージの変動、薬剤の処理時期など)を行っている。

In vitro 薬効評価に用いた計 31 種の化合物は、いずれも 1 μ M 程度で熱帯熱抗マラリア活性を示すか、あるいは、それ以下の濃度で阻害活性を示した。哺乳動物細胞への細胞毒性も解析したが、阻害活性は抗マラリア活性と同等、あるいは若干弱く、結果として 10 倍以下の選択毒性を示すことが分かった。そのうち、天然生薬資源由来の 2 化合物については抗マラリア活性は 1 μ M と弱いものの、化合物の基本構造が抗マラリア活性を示す論文報告があることから、活性改善のために誘導体を合成してさらに評価する。

D. 考察

分子内のペルオキシド構造を有する化合物は抗マラリア活性と安全性を同時に有しており、アルテミシニンと比較して単剤で完治能力を示した。現在 WHO はアルテミシニンを主とした併用法(Artemisinin-Combination Therapy (ACT))を推奨しているが、既にカンボジアを中心とした東南アジアで ACT に耐性

を示す熱帯熱マラリア原虫の出現が報告されている。従って、ACT 耐性の克服にも N-89 は力を発揮すると考えられる。マラリア流行地でこれら環状過酸化化合物が新規抗マラリア薬として使用されるためには、現地の劣悪な環境での化合物の投与ルートと安定性維持など解決する問題点がいくつかある。そのため、安定性を含めた安全性試験の詳細も平行していく。

薬効評価系の試みとして *P. chabaudi chabaudi* 感染マウスを用いた特異的ステージの原虫を阻害する阻害剤の開発研究も構築することができたが、日周性を引き起こす機序についての解析がさらに必要になる。加えて、*in vitro* で抗マラリア薬効を示す新規阻害剤の探索研究は論文報告をもとに効率よく阻害剤の選抜を行って行く必要がある。

E. 結論

安全で簡単な構造を有する環状過酸化化合物 (N-89) は水に難溶性であるため、体内利用率を改善させた新しい製剤として軟膏製剤としても有用であることが判った。新しいマウスの薬効評価系でも N-89 はトロポゾイト基の原虫を特異的に阻害し、抗マラリア作用を示すことが確認できた。これら結果を基にマラリア流行地で使用可能で且つ作用機序の明らかな新規抗マラリア薬を開発するための解析をさらに進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamata, M., Hagiwara, J., Hokari, T., Suzuki, C., Fujino, R., Kobayashi, S., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Applications of triphenylpyrylium salt-sensitized electron transfer photo-oxygenation reactions to the synthesis of benzo-fused 1,4-diaryl-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]octanes as new

antimalarial cyclic peroxides. *Research on Chemical Intermediate*, 39, 127-137, 2013

2. Morita, M., Sanai, H., Hiramoto, A., Sato, A., Hiraoka, O., Sakura, T., Kaneko, O., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. *J Proteome Res.*, 11, 5704-5711, 2012
3. Tanaka Y, Sakamoto A, Inoue T, Yamada T, Kikuchi T, Kajimoto T, Muraoka O, Sato A, Wataya Y, Kim H.-S. and Tanaka R. *Andirolides* HeP from the flower of *andiroba* (*Carapa guianensis*, *Meliaceae*). *Tetrahedron*, 68, 3669-3677, 2012

2. 学会発表

1. 薬剤耐性マラリアの最新の知見－新規治療薬開発研究の現況－。金 惠淑、綿矢 有佑。第60回日本化学療法学会学術集会、2012年4月26-27、長崎
2. New Antimalarial Endoperoxides - Bench to Bed for Malaria Control- Hye-Sook Kim, Masayuki Morita, Bun Kou, Akira Sato, Yusuke Wataya. New drug development research of antimalarial endoperoxide N-251. 5th Asean Congress of Tropical Medicine and Parasitology, 15-17, May, 2012, Manila
3. Morita M., Hiramoto A., Okada K., Wakimoto T., Katamoto A., Watanabe H., Takahashi T., Imada C., Sato A., Higaki K., Wataya Y., Kim H. S. Forum Cheju 15 The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar、2012年5月、Miyazaki