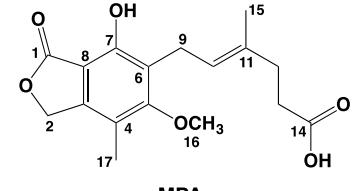


受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 28 年 6 月 30 日

採択番号	27 共同-1		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター内共同研究担当教員	五十嵐 慎 教授
研究課題名	天然有機化合物ならび合成化合物からの新規抗原虫薬の探索		
研究代表者	(ふりがな) 氏名 みつはし しんや 三橋 進也	所属部局等・職名 University of Texas Health Science Center at Tyler Postdoctoral fellow	
研究分担者	うぶかた まこと 生方 信	北海道大学大学院農学研究院・教授	
	Albertus Eka Yudistira Sarwono	北海道大学・大学院農学院応用生物科学専攻	
	(原虫研共同研究担当教員名)	帯広畜産大学原虫病研究センター・五十嵐 慎	
研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	原虫感染症は畜産・獣医学領域のみならず、医学領域においても甚大な被害を与えており、根本的な原虫病の撲滅のためには、原虫独特の生理機構の解明と、優れた抗原虫薬の開発が求められる。本研究では、樹木樹皮抽出物、既存薬、そして化合物ライブラリーを用いて、トキソプラズマ原虫、クリプトスボリジウム原虫、トリパノソーマ原虫に対する抗原虫活性化合物を探査し、得られた化合物をリードとして誘導体を合成し、新規抗原虫薬開発へと繋げる。またこれまでの研究で見出された抗トリパノソーマ化合物 5-hydroxy-mycophenolic acid (5-hydroxy-MPA) を動物への感染実験に供し効果を調べる。		
研究経過の概要	<p>【樹皮からの抗原虫化合物の単離】ミズナラ外樹皮から抗トキソプラズマ活性を示す化合物を単離・構造決定するために、ミズナラ樹皮から抗トリパノソーマ活性化合物を単離した。</p> <p>【MPA 誘導体の抗トリパノソーマ活性】 IMPDH は核酸生合成経路で重要な役割を担っている。Mycophenolic acid (MPA) (右図) は IMPDH の阻害剤である。これまで MPA のメトキシ基を脱メチル化した 5-hydroxy-MPA がヒト培養細胞には作用が弱いがトリパノソーマには強い活性を示すことを見出した (Selectivity index: >10)。そこで 5-hydroxy-MPA が <i>in vivo</i> でも選択性を示すか感染マウスを用いた動物実験を行った。</p> <p>【High-throughput screening (HTS) 系システムの確立】 クリプトスボリジウム (<i>Cp</i>)IMPDH 阻害剤の探索のために HTS 系測定法を検討し確立した。</p>		



受理年月日	受理番号

研究成果の概要	<p>【樹皮からの抗原虫化合物の単離】 北海道大学苫小牧研究林にて採集したミズナラ外樹皮を用い、メタノール抽出、酢酸エチル抽出を順次行った。その後フラッシュ自動精製装置を用いて分画を行い、TLC で得られた結果から 12 の画分に分離した。得られた 12 画分を、サンドウィッヂ ELISA 法を用いて活性評価したところ、画分 4、画分 9 でそれぞれ抗トキソプラズマ活性が見られた。さらに画分 4 に関する逆相 HPLC を用いた分画を試みた結果、溶離液組成 MeOH:H₂O=90:10において 4-0 から 4-6 の 7 区分に分離した。このうち画分 4-4 と画分 4-5 において抗トキソプラズマ活性が見られたため、画分 4-5 を用いてスペクトル解析を行った。その結果、EI によるライブラリサーチによって画分 4-5 にはトリテルペノイドの一種である olean-12-en-28-oic acid 並びに構造異性体である olean-12-en-29-oic acid が約 1:2 の割合で含まれていることが示唆された。今後は画分 4-5 に含まれる両異性体を HPLC を用いて分離し、抗トキソプラズマ活性を持つ物質を確定させる。</p> <p>【MPA 誘導体の抗トリパノソーマ活性】 マウスに <i>T. congolense</i> を感染させ (Day 0)、数時間後、MPA または 5-hydroxy-MPA を腹腔内投与した。それぞれの化合物で低容量 40 µg/head、高容量 400 µg/head の二群を設け(各 N=3)、24 時間毎に血中パラシテミア数をスメア法で計数した。コントロール及び投与群ともにパラシテミア増殖は 3 日目から確認でき 7 日後まで測定した。結果、薬剤の有意な効果は見られなかった。</p> <p>【High-throughput screening (HTS) 系システムの確立】 クリプトスピリジウム(<i>Cp</i>)はゲノム DNA の情報等から特に IMPDH への依存度が高いと考えられるため、前年度、<i>Cp</i>IMPDH 選択的阻害剤のスクリーニングを確立することができた。本年度は偽陰性ならびに擬陽性を除くためアッセイ系の改良を行った。またコストダウンのための条件見直しも行った。</p>
研究成果の発表	<p>1 Keisuke Saganuma, Albertus Eka Yudistira Sarwono, Shinya Mitsuhashi, Marcin Jąkalski, Tadashi Okada, Molefe Nthatisi, Junya Yamagishi, Makoto Ubukata, and Noboru Inoue: "Mycophenolic Acid and Its Derivatives as Potential Chemotherapeutic Agents Targeting Inosine Monophosphate Dehydrogenase in <i>Trypanosoma congolense</i>." <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>, Vol. 60 (7), 4391-4393, 2016</p> <p>2 遠藤 麻理奈、重富 顕吾、三橋 進也、五十嵐 慎、生方 信「ミズナラ外樹皮由来の抗トキソプラズマ活性物質の単離・構造決定」日本農芸化学会 2016 年度（平成 28 年度）大会、一般講演、2016 年 3 月 27 日～3 月 31 日、札幌市、大会プログラム集・大会講演要旨集 [PDF] 講演番号：3B023</p> <p>3 遠藤 麻理奈、重富 顕吾、三橋 進也、五十嵐 慎、生方 信「ミズナラ外樹皮由来のトキソプラズマ症治療薬シードの探索」日本木材学会北海道支部・平成 27 年度研究発表会、ポスターセッション、2015 年 11 月、旭川市、日本木材学会北海道支部講演集 p17-19</p>