

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 29 年 5 月 30 日

採択番号	28-共同-4		
研究部門	高度診断学研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	五十嵐 郁男
研究課題名	抗生物質など天然由来化合物の抗バベシア活性評価と 新規治療・予防薬への応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いしやま あき 石山 亜紀	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・特任助教	
研究分担者	いわつき まさと 岩月 正人	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・准教授	
	ほかり れい 穂苺 玲	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・研究員	
	きよはら ひろあき 清原 寛章	北里大学北里生命科学研究所 大学院感染制御科学府 和漢薬物学 研究室・教授	
	おとぐろ かずひこ 乙黒 一彦	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・研究員	
	いがらし いくお 五十嵐 郁男	帯広畜産大学原虫病研究センター・高度診断学部門・教授	
研究期間	平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日		
目的・趣旨	<p>北里大学 北里生命科学研究所 熱帯病研究センター(以下、北里大)では微生物代謝産物などの天然物を創薬資源として <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> で有効な抗マラリアおよび抗トリパノソーマ原虫活性物質を取得し、一部は創薬リード化合物として種々の合成展開を進めて創薬研究を行っている。抗原虫活性物質ライブラリーはこれらの化合物群から構成されており、随時更新している。</p> <p>動物の neglected disease の一つとしてバベシア症が畜産領域で注目されてきている。バベシアもマラリア原虫やトリパノソーマ原虫と同様に住血原虫であり、一部の抗マラリア剤および抗トリパノソーマ剤が抗バベシア効果を示すことが明らかになっている。</p> <p>このような背景のもと、北里大の保有する抗原虫活性物質ライブラリーからバベシア治療薬のリード化合物を見出すことを目的に <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> マウス実験系での抗バベシア活性評価を本助成により継続してきた。H28年度は(1)北里大の保有する抗原虫活性物質ライブラリーを用いた抗バベシア活性物質のスクリーニングを継続するとともに、(2)特許を出願した化合物(CLF)及び、北里大で見出されたclofazimine(CLF)関連化合物(<i>in vitro</i>抗バベシア活性評価済)について小型動物(マウス、犬など)を用いた検討を実施することで有用性および安全性を確認する。また、(3)相乗相加効果を目的とした他薬剤(有効成分)との併用実験も検討する。</p>		

受理年月日	受理番号

研究経過の
概要

本共同研究はH23年度より北里大で見出された抗原虫活性物質ライブラリーについて、帯広畜産大学（五十嵐教授）の下、以下の原虫種で抗バベシア活性評価を行うことで新たな治療薬シードの発見を目指すために開始した。

- ・ *in vitro* 培養牛バベシア (*Babesia bovis* および *B. bigemina*)
- ・ *in vitro* 培養馬バベシア (*T. equi* および *B. caballi*)
- ・ *in vivo* マウスバベシア (*B. microti*) 感染モデル

(1) *In vitro* 培養原虫での評価の継続

これまでに数種類の先行評価化合物の *in vitro* 抗バベシア活性評価がなされており、H28年度も抗原虫活性物質ライブラリーの抗バベシア活性評価は継続して行っている。

今年度は北里大の保有する天然物ライブラリーのスクリーニングにより見出された抗マラリア活性物質 (NP-023) が新たに抗原虫活性物質ライブラリーに追加され、NP-023について抗バベシア活性の評価を行った。

抗原虫活性物質ライブラリーの拡充は継続して行っており、先のNP-023の合成展開を進め、種々の誘導体を作成し、抗マラリア活性評価、一部抗トリパノソーマ活性評価を終えライブラリーに追加した。また、微生物培養液から抗マラリア活性物質等のスクリーニングを継続し、活性物質生産菌の大量培養、溶媒抽出、各種クロマトグラフィー、HPLCなどによる精製を行い化合物の取得を進めている。取得した化合物の構造決定 (NMR, MSなど)、各種生物活性などの評価を行い構造および活性プロファイルを明らかとした後、抗バベシア活性評価に進む予定である。

(2) CLF および類縁体の検討

先行評価化合物のうちCLFが20mg/kg（経口）で標準薬Ganazeg（25mg/kg, 皮下）と同等の *in vivo* 抗バベシア活性を示すことを見出した（共同出願：国内特許13-138824, PCT出願）。本化合物はバベシアに対して高い原虫特異性を有する可能性が示唆されたが、*in vivo* マウス感染実験においてはバベシアを完全に排除できないことが明らかとなった。このため、本化合物単剤ではなく他の抗バベシア活性物質との組み合わせによる検討が必要である、としてまとめた論文を Antimicrob. Agents Chemother. (AAC) に投稿し論文が掲載された*。

CLFの類縁化合物の一つであるBF90477 (*B. caballi*, *B. bigemina*, *B. gibsoni*** に対する *in vitro* 抗バベシア活性: $IC_{50} = 6.4 \mu M, 1.7 \mu M, 0.07 \mu M$) についてマウスバベシア (*B. microti*) 感染モデル系を用いての評価を計画中である。

(3) 相乗相加効果を目的とした他薬剤 (有効成分) との併用実験

昨年度までに得られた結果から、今年度は、CLFと標準薬ganazegを組み合わせることにより、*in vitro*における相乗効果、相加効果、*in vivo*において治療効果 (バベシアの完全排除に至るか) を検討した。

* AAC 60:2739-2746(2016).

**北里大獣医学部にて評価 (筏井博士)

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>プロジェクト毎にH28年度の成果と今後の予定を以下に示す。</p> <p>(1) <i>In vitro</i> 培養原虫での評価の継続</p> <p>抗原虫活性物質ライブラリーの抗バベシア活性評価は継続して行っている。次候補化合物を選択するために抗原虫活性物質ライブラリーの拡充をすべく抗マラリア活性を中心に北里大の天然物ライブラリーについてスクリーニングを行ない、新たに <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> で効果を示す化合物を数種得ることができた。このなかで、抗マラリア活性物質 (NP-023) が <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> 経口投与で優れた抗マラリア活性を示すことを明らかとした ($IC_{50}=20-25$ nM、ED_{50} ca. 30mg/kg 経口)。NP-023について抗バベシア活性の評価を行ったところ、<i>in vitro</i> で抗バベシア活性は認められなかった (> 50 μM) が、NP-023の創薬過程においては新たな知見が得られた。</p> <p>抗原虫活性物質ライブラリーの拡充は継続して行っており、先のNP-023を原料に合成展開を進め、種々の誘導体を作成 (19化合物) しライブラリーに追加した。また、微生物培養液のスクリーニングで選択された一系状菌の培養液について発酵、精製を行った結果、抗マラリア活性物質 (IC_{50} ca. 15 nM) を取得した。化合物の構造決定 (NMR, MSなど)、各種生物活性などの評価を行い構造および活性プロファイルを明らかとした後、抗バベシア活性評価に進む予定である。</p> <p>(2) CLF および類縁体の検討</p> <p>CLFに良好な抗バベシア活性が認められたことから同様のphenazine 骨格を有する化合物として北里大で購入もしくは発酵法による調製した 3 化合物については帯広畜産大学において引き続き <i>in vitro</i> 評価を進めている。</p> <p>CLFの類縁体の一つであるBF90477は、<i>B. caballi</i>、<i>B. bigemina</i>、<i>B. gibsoni</i> に対しては $IC_{50} = 0.07- 6.4$ μMであったが、<i>B. bovis</i>、<i>T. equi</i> に対してはそれぞれ $IC_{50} = 17.8$ μM、52.7 μMであり、活性スペクトルが狭いため他の関連化合物の活性を確認した後に <i>in vivo</i> 実験の優先順位を決めることとした。</p> <p>(3) CLFと他剤の併用効果</p> <p>CLFと標準薬ganazegの併用により、単剤よりも低濃度で <i>in vitro</i> における相乗あるいは相加効果が確認され、<i>in vivo</i> においても同様に 2 剤併用により原虫の完全排除 (再燃無し、PCR(-)) に至る結果が得られた。作用機序解析として mRNA、DNA に対する影響を検討したところ、CLFとganazegがDNAに結合することで、上記の活性を発現したと推定された。本成果について論文を投稿中である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>CLF と Ganazeg の併用効果について論文を投稿中。</p> <p>Chemotherapeutic efficacies of clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites as AT-rich DNA-binding drugs</p> <p>Author(s): Tuvshintulga, Bumduuren; AbouLaila, Mahmoud; Sivakumar, Thillaiampalam; Tayebwa, Dickson; Gantuya, Sambuu; Naranbaatar, Khandsuren; Ishiyama, Aki; Iwatsuki, Masato; Otoguro, Kazuhiko; Ōmura, Satoshi; Terkawi, Mohamad; Guswanto, Azirwan; Rizk, Mohamed; Yokoyama, Naoaki; Igarashi, Ikuo</p>