

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07086

研究課題名(和文)新しいマラリア外用剤の開発研究

研究課題名(英文)Development of new antimalarial transdermal agent

研究代表者

金 惠淑 (Kim, Hye-Sook)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70314664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗マラリア薬候補として見出された過酸化物質・N-89及びN-251を徐放化可能な経皮吸収型製剤として製剤学的工夫を行い、抗マラリア製剤としての有用性を高める知見を得た。軟膏基剤としてpolyethylene glycol (PEG) 400とPEG4000を8：1の割合で配合した基剤を最終的に選抜し、この条件でN-89を含むPEG軟膏製剤を用いて動態解析と薬効評価を行った結果、60 mg/kgのN-89を含む軟膏製剤を1日2回の3日間の4Cm²塗布することで優れた抗マラリア薬効と完治効果が得られた。1.5%以上の感染率を示す実験系では既存抗マラリア薬との併用が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアによる死亡の9割は5歳未満の乳幼児である現状から、経口投与による治療は難しく、注射器等を用いる治療は現地の状況を鑑みて、推奨出来ない。我々は経口投与で優れた抗マラリア薬効と完治効果を示す新規抗マラリア薬候補として見出した有機合成化合物・N-89、N-251が非侵襲性で乳幼児へのマラリア治療に適用可能であることを見出した。即ち、N-89とN-251の薬効を長期間持続しながら副作用が発現した時に対処しやすい剤形である経皮吸収型製剤がin vivo実験でマラリアを完治することを明らかにした。この結果は単剤で安価でかつ簡便に重症マラリアで死亡するアフリカの乳幼児の救命に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：I found the usefulness for slow-released transdermal agent of new antimalarial endoperoxides (N-89 and N-251) found as our new antimalarial drug research. As a suitable base of ointment of end-peroxide's, polyethylene glycol (PEG) 400 and PEG4000 in a ratio of 8:1 was selected and pharmacokinetic analysis and antimalarial efficacy evaluation was performed using a ointment preparation containing N-89 under same conditions. As a result, an excellent antimalarial effect and a complete cure effect were obtained by applying an ointment preparation containing 60 mg / kg of N-89 twice a day for 3 days at 4 Cm² of transdermal area. All mice completely cured until infection rate of 1.5% in malaria group, but in mice with an infection rate of more than 1.5% will be propose to be used in combination with an clinically used antimalarial drugs which long half-life.

研究分野：感染症制御、医薬品開発

キーワード：マラリア 過酸化物質 外用剤 経皮吸収 新薬候補

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは年間3～5億人が感染し、60万人が死亡する世界最大の寄生原虫感染症である。薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の蔓延と地球温暖化により、マラリア制圧に向けた新規抗マラリア薬の開発は世界的に急務となっている。最近、世界保健機構 (WHO) が推奨する ACT (アルテミシニンを中心とした併用療法: Artemisinin-based Combination Therapy) に耐性を示すアルテミシニン耐性マラリア原虫がタイ-カンボジア国境付近で出現したことが報告されており、マラリア制圧において深刻な問題となっている¹。

申請者らはこれまでの新規抗マラリア薬の開発研究から、環状過酸化化合物・N-89 及び N-251 に優れた抗マラリア活性があることを見出している^{2,3}。これらの化合物は不斉炭素を持たない簡単な化学構造であり、安価に大量に合成できる利点を有している。また、脂溶性の高い化合物である (水への溶解性: 化合物1gを溶かすのに必要な水の量は10L以上)。N-89 と N-251 は分子量がそれぞれ 273、373 の低分子化合物で、脂溶性が高く、抗マラリア効果を示すのに必要な有効血漿中濃度は 6 ng/mLである。これら化合物は静脈内投与及び経口投与において単剤でネズミマラリア、及びサルマラリアに対して完治効果を示し、次世代の抗マラリア薬候補として期待されている。

現在、マラリア治療の第一選択薬であるアルテミシニンは単剤ではマラリアの再燃 (薬剤の投与により一旦は原虫が血中内から消失するが、後日再び血中に出現し病気が再発すること) が問題となっている。他方、我々が開発した N-89 及び N-251 はマラリアの再燃を起こさず、治療効果が高いことがわかっている。N-89 と N-251 の経口投与時と静脈内投与時のマウスにおける薬物体内動態解析から、半減期が短く、生物学的利用能 (Bioavailability; BA) が10～20%であることより、BA の改善が望まれている。また、肝臓での代謝による肝臓初回通過効果が大きい予備結果より、皮下投与 (肝臓初回通過効果の影響を受けない) を行ったところ、高い BA と低用量で強い抗マラリア活性が得られた。死亡症例の9割が乳幼児であるマラリア流行地での重症マラリア治療を考えた時、注射器の使い回しがおこる皮下投与は保健衛生上の観点から推奨出来ない。そこで、非侵襲的で乳幼児への適用が簡単で薬効を長期間持続させ、副作用が発現した時に対処しやすい剤形である経皮吸収型製剤を用いた経皮投与がより有用であると考え、本研究課題に着目した。

2. 研究の目的

薬物の経皮投与は次に示す利点を有している。(1)皮膚から吸収された薬物は直接体循環に移行するため、肝臓での初回通過効果を受けず、投与部位での代謝も非常に少ない。(2)経口投与時のように食事やpH変化などに影響されない。(3)薬物の適用が簡単で、薬物の投与速度のコントロールが可能であり、連続的に適用することが出来る。(4)副作用の発現など、必要に応じて投与を中断することが出来る。

私たちが新規抗マラリア薬候補として見出した有機合成化合物・N-89 及び N-251 はこれら利点を応用できる物性を有しており、経皮吸収型製剤とする事で乳幼児のマラリア治療に有用であると考えた。我々の予備的研究から、N-89 と N-251 の経皮吸収型製剤はマラリアの治療効果が見られたので、これら化合物をマラリア患者の治療に実用化できるように製剤の最適化研究を行い、単剤での完治効果を示す新しいマラリア剤形を提案することを研究目的とする。

3. 研究の方法

種々の溶媒と基剤を用いてN-89及びN-251経皮吸収型製剤(軟こう型外用製剤)を調製し、マウスマラリアモデルにおいてその抗マラリア効果を評価する。調製した製剤をマウスの毛を剃った背中に塗布する。塗布面積は8 cm²~4 cm²まで実用化可能な最適塗布面積の検討も並行して行う。抗マラリア薬効と体内動態を行うときは軟こう製剤で研究を行うが、最終的な剤形は企業と連携してテープ剤、調布剤などを想定している。

の研究から抗マラリア効果の強い基剤を含む製剤を用いてマウスを用いた薬物の体内動態解析を行う。

と の研究を繰り返し行う。4-day suppressive test による抗マラリア薬効、単回及び複数回の塗布による化合物の動態解析を行い、これら結果を総合的に評価して最適な機材条件と塗布面積を決定する。

までの研究で得られた軟こう製剤の最適条件を用いてマラリア治療効果と完治効果を評価する。マラリア原虫は抗マラリア薬効を示す化合物でも、完全に血中原虫を抑制しない場合、薬剤治療を終了すると生き残ったマラリア原虫は再び増殖して治療失敗に繋がる。そのため、薬物の完治効果までを評価することは重要である。

の研究で用いた塗布条件でマラリアの予防効果の有無について検討する。事前に薬剤を塗布したマウスに本製剤を塗布して塗布前後の治療効果に相違があるかどうかを評価する。これはマラリア患者の治療に加え、流行地を訪れる訪問者の予防剤としての使用可能性を評価するためである。

過酸化構造を有する有機合成化合物及び天然生薬資源の中から次世代の抗マラリア候補の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 種々の溶媒と基剤を用いて N-89 及び N-251 経皮吸収型製剤(軟こう型外用製剤)を調製し、ネズミマラリア原虫感染マラリアモデルにおいてその抗マラリア効果を評価した。検討条件の結果、マウス1匹当たり 6~8cm² の塗布面積、塗布基剤は両親媒性の polyethyleneglycol (PEG) 400 と PEG 4000 を 8:1 の割合で混合したものを使用し、全量 100 mg の塗布で薬効解析が可能であった。この条件を用い、ネズミマラリア原虫感染マウスに 2回/日×4日間の連続塗布を行なった結果、マラリア感染マウスはすべて完治した。この時の塗布面積は 6cm² と 8cm² の両方で実施し、両方ともマラリアを完治させることができた。また、塗布期間は 3日、あるいは 4日間の塗布で完治する結果を得た。従来のワセリンの代わりに分子量の異なる両親媒性の PEG を用いる事で塗布量を 1/3 に軽減させる事が出来、また、体内動態解析でもPEG 混合基剤を用いる事で過酸化物の血中濃度が 10~100ng/ml の範囲で維持する結果を得た。この結果は従来の基剤と比較して血中濃度が低濃度で維持する事から過酸化物の蓄積による副作用の問題は回避できると考えられる。

(2) 塗布量の最適化のために、PEG の代わりに他の基剤の検討を行った。脂肪酸をメインにして塗布可能な固さを保つために高分子の PEG 4000 との混合基剤を試みた。その結果、脂肪酸とPEG 4000 (1:1)の混合基剤で塗布可能な固さと塗布量の軽減できる基剤を見出した(PEG 基剤と比較して 1/4~1/3 まで軽減可能)。ネズミマラリア原虫感染マウスに対する抗マラリア薬効が脂肪酸基剤でも影響される事無く維持される事が判った。

(3) 親水クリーム基剤を用いて N-89 及び N-251 経皮吸収型製剤(軟こう型外用製剤)を調製し、ネズミマラリア原虫感染マラリアモデルにおいてその抗マラリア効果を評価した。その結果、

親水クリームを用いることでさらにマウス 1匹当たり 4cm² の塗布面積 (N-89含有量: 1.5%) まで減らすことができた。同条件で 4-day suppressive test の結果、ED₅₀ 値、ED₉₀ 値はそれぞれ、18 mg/kg、50 mg/kg となり、従来の塗布面積と同等あるいはそれ以上の抗マラリア薬効を示すことが判った。

(4) 新スクリーム基剤で混合した N-89 を投与量 60 mg/kg (4cm² の塗布面積) で単回塗布し、経時的に血漿中濃度を LC-MS/MS により測定したところ、N-89 の T_{max} は 2hr、T_{1/2} は 3.1 hr となった。C_{max} と AUC はそれぞれ 85 ng/mL と 513 ng/mL・hr になり、抗マラリア効果を示す濃度 (6.8 ng/mL) より高い濃度を 12 hr 維持し、PEG (8:1) 基剤と同様の動態解析結果を示した。

(5) 重症マラリア患者を想定した実験モデルとして、感染率 0.2% のネズミマラリア原虫感染マウスに親水クリームの N-89 製剤 60 mg/kg を 1日2回、4日間経皮投与して感染率の推移を調べた結果、N-89 クリーム製剤を塗布した実験群は塗布開始から感染率が低下し、塗布 3日目でマウスの血中からマラリア原虫は完全に消失し、30日までに再燃や皮膚のトラブル等が生じないことから、従来の PEG 製剤と同様に親水クリーム製剤も環状過酸化物の配合剤として使用可能であると考えられる。

(6) マウスマラリアモデルで抗マラリア効果が得られた polyethylene glycol (PEG) 400 と PEG4000 を 8:1 の割合で配合した基剤を最終軟膏基剤として選抜し、化合物を溶解する方法に加温など改良して軟膏製剤の塗布面積と塗布量の最適化を行った。その結果、上記の PEG 基剤で塗布面積を 2cm x 2cm (4cm²) まで減らすことができた。また、抗マラリア薬効と完治効果も同様に見られたので、過酸化製剤は外用剤としてマラリア治療に適用可能であることが示唆された。

(7) (6) と同様の基剤条件で過酸化物の体内動態解析の結果、初年度に得られた研究成果と同様の有効血漿中濃度と、化合物の蓄積は見られず一日2回の塗布で抗マラリア薬効が維持された。この結果は従来の過酸化物を経口投与した時の結果と同様であり、経口投与が難しい乳幼児のマラリア治療に軟膏製剤の有用性が示唆された。

(8) これら PEG 軟膏製剤は感染率 0.5%~1.5% の重症マラリアモデル系で完治効果が見られ、2% 以上の感染マウスでは完治に至らないものの優れた抗マラリア活性を示した。感染率の高い重症マラリアにおいては、今後、半減期の長い既存抗マラリア薬と併用することで完治有無の検討が必要になる。

(9) 次世代の新規抗マラリア薬候補探索研究でベトナム産天然資源由来の抽出物より優れた抗マラリア活性を見出したので、再現性を含め確認研究を計画している。また、過酸化構造を有する有機合成化合物の中から *in vitro*, *in vivo* の両実験系で優れた抗マラリア活性を示す化合物を見出し、論文として投稿する予定である。

参考文献

- 1: Dondorp et al. *N. Engl. J. Med.*, 361, 455-467, 2009.
- 2: Kim et al. *J. Med Chem.*, 44, 2357-2361, 2001.
- 3: Sato et al. *Parasitol. Int.*, 60, 270-273, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Okada Kazuaki, Sato Akira, Hiramoto Akiko, Isogawa Rena, Kurosaki Yuji, Higaki Kazutaka, Miyoshi Shin-Ichi, Chang Kyung-Soo, Kim Hye-Sook	4. 巻 47
2. 論文標題 Pharmacokinetic analysis of new synthetic antimalarial N-251	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41182-019-0167-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Morita Masayuki, Hayashi Kosuke, Sato Akira, Hiramoto Akiko, Kaneko Osamu, Isogawa Rena, Kurosaki Yuji, Miyoshi Shin-ichi, Chang Kyung-Soo, Wataya Yusuke, Kim Hye-Sook	4. 巻 716
2. 論文標題 Genomic and biological features of Plasmodium falciparum resistance against antimalarial endoperoxide N-89	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144016 ~ 144016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2019.144016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kwofie Kofi Dadzie, Sato Kai, Sanjoba Chizu, Hino Akina, Shimogawara Rieko, Amoa-Bosompem Michael, Ayi Irene, Boakye Daniel A., Anang Abraham K., Chang Kyung-Soo, Ohashi Mitsuko, Kim Hye-Sook, Ohta Nobuo, Matsumoto Yoshitsugu, Iwanaga Shiroh	4. 巻 13
2. 論文標題 Oral activity of the antimalarial endoperoxide 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol (N-251) against Leishmania donovani complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0007235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakata Yosuke, Yabunaka Kosuke, Kobayashi Yuko, Omiya Hirohisa, Umezawa Naoki, Kim Hye-Sook, Wataya Yusuke, Tomita Yoshimi, Hisamatsu Yosuke, Kato Nobuki, Yagi Hirokazu, Satoh Tadashi, Kato Koichi, Ishikawa Haruto, Higuchi Tsunehiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Potent Antimalarial Activity of Two Arenes Linked with Triamine Designed To Have Multiple Interactions with Heme	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 980 ~ 985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.8b00222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Blay Emmanuel Awusah, Kumagai Takashi, Yamabe Masafumi, Hino Akina, Shimogawara Rieko, Kim Hye-Sook, Sato Akira, Ichimura Koichiro, Ayi Irene, Iwanaga Shiroh, Ohta Nobuo	4. 巻 67
2. 論文標題 Insights into the mode of action of 1,2,6,7-tetraoxaspiro [7.11] nonadecane (N-89) against adult Schistosoma mansoni worms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 403 ~ 412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ueda Youki, Gu Weilin, Dansako Hiromichi, Kim Hye-Sook, Yoshizaki Sayaka, Okumura Nobuaki, Ishikawa Tomohiro, Nishitsuji Hironori, Kato Fumihiko, Hishiki Takayuki, Satoh Shinya, Ishii Koji, Masuda Michiaki, Shimotohno Kunitada, Ikeda Masanori, Kato Nobuyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Multiple antiviral activities of the antimalarial and anti-hepatitis C drug candidates N-89 and N-251	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 井黒 香奈子、五十川 怜奈、池田 奈々子、黒崎 勇二、Kyung-Soo Chang、金 恵淑
2. 発表標題 新しいマラリア治療薬の開発 過酸化物をベースにした軟膏剤の基礎研究
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井黒 香奈子、五十川 怜奈、池田 奈々子、黒崎 勇二、Chang Kyung-Soo、金 恵淑
2. 発表標題 新しいマラリア治療薬の開発-軟膏剤としての実用化に向けた基礎研究-
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hye-Sook Kim, Akira Sato, Rena Isogawa, Yuji Kurosaki, Kyung-Soo Chang
2. 発表標題 Comparative proteome analysis of Plasmodium falciparum resistance against antimalarial endoperoxide N-89
3. 学会等名 大韓寄生虫・熱帯医学会第60周年記念秋の学術大会および総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rena Isogawa, Kyung-Soo Chang, Akira Sato, Hye-Sook Kim
2. 発表標題 Pharmacokinetic study of synthetic antimalarial N-251
3. 学会等名 大韓寄生虫・熱帯医学会第60周年記念秋の学術大会および総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井涼香、越智彩乃、三次真悠子、五十川怜奈、佐藤 聡、黒崎勇二、Kyung-Soo Chang、金 惠淑
2. 発表標題 経皮吸収型抗マラリア製剤の開発研究
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金 惠淑
2. 発表標題 マラリアの創薬研究－過酸化物を用いた抗マラリア薬開発の現況－
3. 学会等名 第59回日本熱帯医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井 涼香、越智 彩乃、三次 真悠子、五十川 怜奈、王野 さくら、佐藤 聡、黒崎 勇二、Kyung-Soo Chang、金 恵淑
2. 発表標題 過酸化物を用いた非経口マラリア治療剤の開発研究
3. 学会等名 第74回 日本寄生虫学会 西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hye-Sook Kim, Ayano Ochi, Ryoka Ishii, Mayuko Miyoshi, Yuji Kurosaki, Kyung-Soo Chang
2. 発表標題 Development of transdermal type-antimalarial endoperoxide research
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 HYe-Sook Kim
2. 発表標題 Current situation of synthetic endoperoxides: Schistosomiasis, protozoan diseases, malaria and others
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	釜山カトリック大学			