

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590467

研究課題名（和文）アスコフラノンを用いた新規クリプトスポリジウム症治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of a new chemotherapy for cryptosporidiosis

研究代表者

藪 義貞（YABU YOSHISADA）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70080083

研究成果の概要（和文）：未だ特効薬のないクリプトスポリジウム症治療薬開発のため同症マウスモデルを用い新規抗生物質アスコフラノンの治療効果を調べた。感染マウスにアスコフラノン（100 mg/kg）を経口、腹腔内および静脈内に投与しその治療効果を検討した。アスコフラノンは6日間連続投与した。治療効果は排出するオーシスト数で判定した。経口、腹腔内および静脈内投与群共に投与期間中オーシスト排出数の抑制は認められたが治癒効果は得られず投与期間が終わるとオーシストの排出量は再び増加した。

研究成果の概要（英文）：Chemotherapeutic effect of ascofuranone, a new antibiotic, was determined using *Cryptosporidium parvum*-infected SCID mice. The drug was administrated to infected mice by oral, intraperitoneal, and intravenous route. A suspension of ascofuranone (100mg/kg) was given every 24 h for 6 consecutive days to infected mice and efficacy was evaluated by oocysts reduction in the feces of treated mice by fluorescent microscopically. Oocysts in the feces were over $2 \times 10^5/g$ at the beginning of oral administration, the numbers of oocysts were gradually decreased to $8 \times 10^3/g$ on day 6. After stopping the treatment, numbers of oocysts were increased to over $4 \times 10^5/g$ on day 10. Almost same results were observed in intraperitoneally and intravenously administrations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：クリプトスポリジウム・アスコフラノン・経口投与・腹腔内投与・静脈内投与

1. 研究開始当初の背景

水系感染症であるクリプトスポリジウム症はクリプトスポリジウム属のオーシストの

経口摂取で起こり主な症状は激しい下痢と腹痛及び吐き気である。健康人では自然治癒するが免疫機能が低下する臓器移植やエイ

ズ患者では脱水症状で死亡する例も多い。現在、免疫不全症患者のクリプトスポリジウム症にはニタゾキサニドが使われているがその効果は不十分といわれている。申請者は長年のアフリカトリパノソーマ研究の中で *Trypanosoma b. brucei* 宿主感染型である血流型原虫のミトコンドリアに特異的に存在するシアン耐性末端呼吸酵素 (alternative oxidase, AOX) に対し nM レベルでしかも原虫特異的に作用する新規抗生物質アスコフラノンを見出し本剤を用い新規抗トリパノソーマ薬の開発を進めている。また、アスコフラノンの標的分子である AOX がクリプトスポリジウムにも存在することが明らかになり大腸菌を用いた組み替え酵素はアスコフラノンにより強力に阻害されることからクリプトスポリジウム治療薬としても期待されている。本研究ではクリプトスポリジウム感染 SCID マウスにアスコフラノン (100mg/kg) を経口、腹腔内および静脈内投与を行い排出オーシスト数からその治療効果を検討した。

2. 研究の目的

クリプトスポリジウム症は

Cryptosporidium 属原虫感染による人獣共通感染症である。本症は1971年ウシに下痢を引き起こすことが報告されていたが医学的にはわずかに注目されていたにすぎなかった。しかし、1976年に米国でクリプトスポリジウム症患者の最初の症例報告がなされ、1982年には米国のCDCが米国内で21例のAIDSの男性患者における激しい長期間にわたる下痢がクリプトスポリジウム感染によって引き起こされることを報告後重要な日和見感染症の一つとして認識されるようになった。クリプトスポリジウムは有性生殖により丈夫な殻に包まれたオーシストを形成しこれが下痢便と共に体外に排出される。丈

夫な殻に包まれているので環境の変化に強い耐性を示し水道の消毒に用いられる塩素にも強く飲料水供給における大きな問題になっている。1993年の米国ミルウォーキー、1994年の平塚、1996年の埼玉県越生町の集団発生は記憶に新しい。さらに、本感染症における大きな問題は特効薬が存在しないことである。特に、AIDS患者がクリプトスポリジウムに感染すると治療薬がなく激しい下痢のため脱水症状に陥り死に至る危険性が高く早急な治療薬の開発が待たれている。著者らは長年のアフリカトリパノソーマ研究の中で *Trypanosoma b. brucei* 宿主感染型である血流型原虫のミトコンドリアに特異的に存在するシアン耐性末端酸化酵素 (alternative oxidase, AOX) に対し nM レベルで、しかも原虫特異的に作用する新規抗生物質アスコフラノン (Ascofuranone) を発見した (Minagawa ら, Mol. Biochem. Parasitol. 1997)。本剤はアフリカトリパノソーマ症マウスモデルを用いた治療実験において腹腔内投与 (25mg/kg) 経口投与 (100mg/kg) 共に有効性を示した (Yabu ら, Parasitol. Int. 1998)。アスコフラノンのマウスに対する急性毒性は腹腔内投与 (IC_{50} 950mg/kg) 経口投与 (IC_{50} >5g/kg) 共にきわめて低く安全な新規の抗生物質である。本剤は新規のアフリカトリパノソーマ症治療薬として注目され実用化に向けてケニア共和国ナイロビにある国際家畜研究所 (International Livestock Research Institute, ILRI) における家畜を用いた治療実験でもその有効性が確認されている。著者らはアスコフラノンの標的分子であるシアン耐性末端酸化酵素 (AOX) がクリプトスポリジウムにも存在することを cDNA クローニングにより証明し、大腸菌を用い発見した組み替え酵素はアスコフラノンにより強

方に阻害されることからアスコフラノンにはアフリカトリパノソーマ治療薬だけでなくクリプトスポリジウム症の治療薬としても有効性を示すに違いないと考えている (Suzuki ら、Bichem. Biophys. Res. Comm. 2004)。AOX 遺伝子は宿主である哺乳動物には存在しないことから新規クリプトスポリジウム症治療薬として有望と考え研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) クリプトスポリジウム

使用した原虫は大阪市立大学より分与された *Cryptosporidium parvum* NHJ-1 株を用いた。

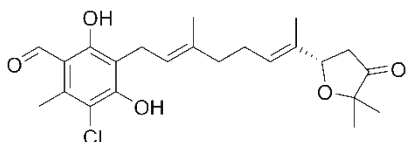
(2) 糞便中に排出されるクリプトスポリジウムのオーシスト量の測定法

糞便採取用のマウスケージに濾紙を引き少量の水道水を入れ毎日糞便を集めた。その糞便から蔗糖浮遊法によりオーシストを精製した。精製したオーシストは 4%パラフォルムアルデヒドにて固定、洗浄後、FITC 標識抗クリプトスポリジウム抗体 (Waterborne 社)にて染色し蛍光顕微鏡を用い計測して OPG (Oocyst per gram)を算出した。

(3) 薬剤調整法

アスコフラノン (図 1) は *Ascochyta visie* から抽出し精製し、テフロン・ホモゲナイザーを用い 0.1 % Tween 20 加 PBS の浮遊液とした。

図 1. アスコフラノンの化学構造



(4) アスコフラノンによる治療効果の検討
SCID マウス (オス 19–22 g) にクリプトスポリジウムのオーシストを 5×10^5 /mouse 経

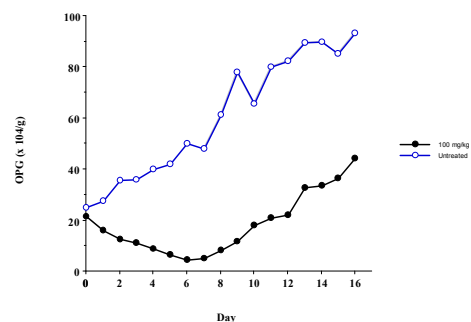
口接種し、糞便中にオーシスト 10^5 /g 以上排出するマウスを用い治療実験を開始した。アスコフラノン 100mg/kg を 6 日間経口、腹腔内および静脈内投与した。対照群として 0.1% Tween 20 加 PBS を同様に投与した。使用した SCID マウスは各群 5 匹とした。

本実験は名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物倫理委員会の審査を受けて開始した。感染マウスは毎日排出オーシスト数、肉眼的健康度を調べた。

4. 研究成果

アスコフラノン (100mg/kg) 経口投与においてオーシスト排出数の減少がみられたが完全に消失はみられず投与を終えると再びオーシスト排出量は増加を示した (図 2)。

図 2. アスコフラノン経口投与におけるクリプトスポリジウム感染マウスのオーシスト排出数の変化

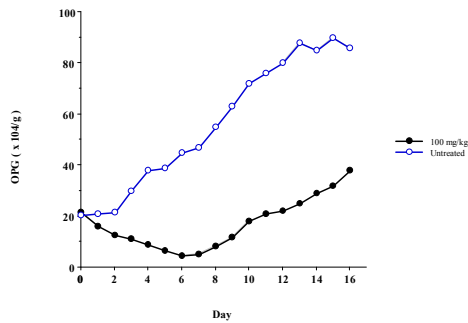


●; アスコフラノン経口投与群、○; 0.1% Tween 20 加 PBS 経口投与対照群。クリプトスポリジウムを感染後 OPG が 10^5 /g 以上になったマウスにアスコフラノン (100mg/kg) を経口投与し毎日糞便中のオーシスト数を計測した。

アスコフラノン (100mg/kg) 腹腔内投与においてもオーシスト排出数のなだかな減少がみられたが完全に消失はみられず投与を終えると再びオーシスト排出量は増加

を示した (図3)。

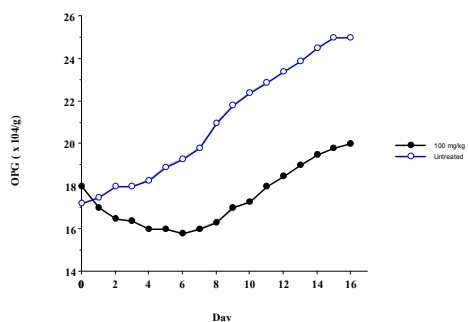
図3. アスコフラノン腹腔内投与におけるクリプトスポリジウム感染マウスのオーシスト排出数の変化



●; アスコフラノン腹腔内投与群、○; 0.1% Tween 20 加 PBS 腹腔内投与対照群。クリプトスポリジウムを感染後 OPG が $10^5/g$ 以上になったマウスにアスコフラノン (100mg/kg) を腹腔内投与し毎日糞便中のオーシスト数を計測した。

アスコフラノン (100mg/kg) を左右の尾静脈から毎日交代で投与した。結果は図4の様にオーシストの排出は減少を示した。しかし投与を止めると経口投与、腹腔内投与と同じようにオーシストの排出数は増加した。

図4. アスコフラノン静脈内投与におけるクリプトスポリジウム感染マウスのオーシスト排出数の変化



●; アスコフラノン静脈内投与群、○; 0.1% Tween 20 加 PBS 静脈内投与対照群。クリ

プトスポリジウムを感染後 OPG が $10^5/g$ 以上になったマウスにアスコフラノン (100mg/kg) を静脈内投与し毎日各群の排出オーシスト数を計測した。

クリプトスポリジウム症治療薬の実用化にはアスコフラノンのドースは 100mg/kg が最大値と考えられるのでこのドースを選択したが経口、腹腔内および静脈内投与共にその治療効果は不十分であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Kido Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura F., Ohmori D., Moore A., Harada S., Kita K. Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Biochim. Biophys. Acta 査読有、1797 巻 2010、443-450. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056101>
- ② Nakamura K., Fujioka S., Fukumoto S., Inoue N., Sakamoto K., Hirata H., Kido Y., Yabu Y., Suzuki T., Watanabe Y., Saimoto H., Akiyama H., Kita k. Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. Parasit. Int. 査読有、59 巻、2010、560-564. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688188>
- ③ Ohshima S., Ohashi-Suzuki M., Miura Y., Yabu Y., Okada N., Ohta N., Suzuki T. TbUNC119 and its binding protein complex are essential for propagation, motility, and morphogenesis of *Trypanosoma brucei* procyclic form cells. PLoS ONE、査読有、5 巻、2010、1-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3008729/?tool=pubmed>
- ④ Ohashi-Suzuki M., Yabu Y., Ohshima S., Nakamura K., Kido Y., Sakamoto K., Kita K., Ohta N., Suzuki T. Differential kinetic activities of glycerol kinase among African trypanosomes species: phylogenetic and therapeutic

implications. J. Vet. Med. Sci. 査読有、73 巻、2010、615–621.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/73/5/73_10-0481/_article

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 原田倫世、*Cryptosporidium parvum* シアン耐性酸化酵素（Alternative oxidase, AOX）の酵素学的解析、第 80 回日本寄生虫学会、平成 23 年 7 月 18 日、東京慈恵会医科大学（東京）
- ② 鈴木高史、アフリカトリパノソーマ原虫の動き関連分子、TbUNC199 の解析、第 80 回日本寄生虫学会、平成 23 年 7 月 18 日、東京慈恵会医科大学（東京）
- ③ 原田倫世、「ミトコンドリア」を持たない寄生原虫・クリプトスポリジウムにおける呼吸鎖の生化学的解析、第 82 回日本生化学会、平成 21 年 10 月 22 日、神戸ポートランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪 義貞 (YABU YOSHISADA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70080083

(2) 研究分担者（該当者なし）

(3) 連携研究者

齋本博之 (SAIMOTO HIROYUKI)
鳥取大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20186977