

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：30108

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22778

研究課題名(和文)アニサキス駆虫薬の探索とDDS創製：魚生食文化継承のため先人の研究挫折を克服する

研究課題名(英文)Discovery of Anisakis anthelmintic components and development of oral formulations that deliver them to Anisakis

研究代表者

丁野 純男(CHONO, Sumio)

北海道科学大学・薬学部・教授

研究者番号：90347790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DDS技術により駆虫候補成分を消化管内に感染したアニサキスの虫体内に送り込み、駆虫効果の最適化を図る戦略を掲げている。研究期間前半には、アニサキス駆虫候補成分の探索を行い、いくつかの食品添加物成分に駆虫効果を見出した。また、研究期間後半には、駆虫効果を見出した食品添加物成分を虫体内に送達しつつDDS製剤の設計・調製を行い、アニサキスを胃に感染させたラットに経口投与したところ、投与後わずか1時間で虫体を100%殺滅し、製剤投与による消化管障害も認められなかった。以上、本研究では、消化管に感染したアニサキスを駆虫する目的で食品添加物成分のDDS製剤を創製し、その有効性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果と学理は、これまでにないDDSを基盤とする斬新さゆえ、アニサキス駆虫研究のあり方に一石を投じ、アニサキス食中毒の予防・治療にブレイクスルーをもたらすものである。医薬品に比べて上市へのハードルが低い食品添加物成分にアニサキス駆虫効果を見出し、それらを経口製剤化した点が本研究の大きな特徴かつ利点であり、実用面での社会的な意義は大きい。今後は、魚生食の直前や直後に予防的かつ気軽に摂取できる飲料等の製品開発を進める。

研究成果の概要(英文)：In this study, Anisakis anthelmintic components were discovered, and several food additives showed anthelmintic effects. Oral formulations were designed and prepared to deliver food additives with anthelmintic effects to Anisakis. When oral formulations was administered to rats with gastric infection with Anisakis, 100% of Anisakis died just 1 hour after administration, and gastrointestinal damages was not observed due to administration of formulations. In summary, oral formulations that delivers anthelmintic components to gastrointestinal-infected Anisakis were developed, and their high anthelmintic efficacy has been demonstrated.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：アニサキス 駆虫 DDS

### 1. 研究開始当初の背景

アニサキス食中毒は、鮭や秋刀魚などの食用魚を生食した際に、魚体に寄生していたアニサキスがヒトの消化管内に経口的に侵入し、消化管壁に刺入することで発症する病態であり、腹痛、悪心および嘔吐などの激しい症状を呈する。アニサキスは胃壁に刺入することがほとんどであり、胃内視鏡下で虫体を摘出する以外に根本的な治療法はない。稀ではあるが、アニサキスが小腸以下の消化管壁に刺入あるいは腹腔内に侵入することがあり、腸閉塞や腸穿孔などの重篤な症状に至るケースも見られる。

我が国特有の魚生食文化に加え、グルメ志向や鮮魚流通機構の発達により、近年では、アニサキス食中毒の症例報告が急増している。しかしながら、現在のところ、アニサキスに対して有効な駆虫成分は開発・上市されていない。それゆえ、胃から腸にわたる消化管全域で著効をもたらすアニサキス駆虫成分の探索はもちろん、アニサキス食中毒を予防・治療できる経口製剤を設計・実用化することが喫緊の課題である。

昨今、マスコミ報道を通じてアニサキス食中毒が特に話題となったことから、人々の関心が高く、また研究代表者もアニサキス食中毒に二度も苦しめられた経験があり、本研究は自他共に認める学術的かつ社会的ニーズに即した研究課題である。

### 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らがこれまでに積み上げてきたドラッグデリバリーシステム(DDS)の学理を基盤とした提案であり、胃から腸にわたる消化管全域で著効をもたらすアニサキス駆虫成分を探索し、アニサキス食中毒を予防・治療できる経口 DDS 製剤を創製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) アニサキスの採取

アニサキスは北海道沿岸海域で捕獲されたホッケおよびニシンから得た。採取後、生理食塩水中に 4°C で保存した。実験には、採取後 7 日以内のアニサキスを用いた。

#### (2) アニサキスの運動性評価

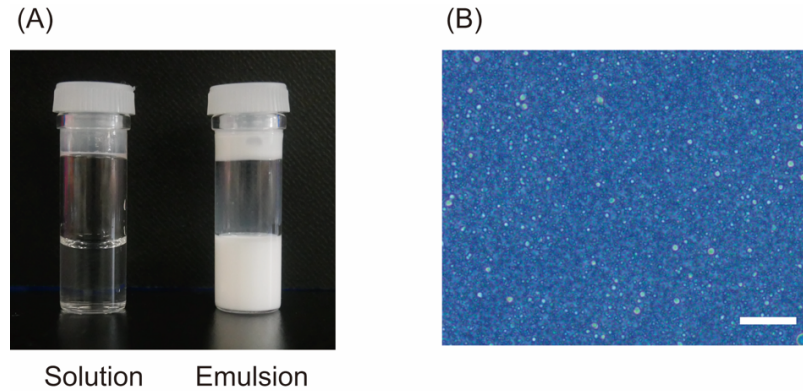
駆虫候補成分を各 pH (1.2、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 および 6.8) 溶媒に溶解し、適用液とした。なお、pH 1.2、2.0 および 3.0 の溶媒は塩酸水溶液、pH 4.0 および 5.0 の溶媒は 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.0 および 6.8 の溶媒は 10 mM MES 緩衝液とし、それぞれ塩化ナトリウム (140 mM) を加えて調製した。各適用液 2 mL を入れた 12 ウェル細胞培養プレートにアニサキスを 1 匹/well 入れ、37°C でインキュベートした。適用 24 時間までのアニサキスの運動性を、ピンセットでアニサキスを刺激した後の反応から Table 1 に示す 4 段階で評価し、-と判定したものを死滅したとみなした。

Table 1 Evaluation criteria of *Anisakis* motility

判定	アニサキスの運動性
+++	自発的に運動している又はピンセットで刺激するとすぐ丸まる
++	ピンセットで刺激すると丸まらないが動く
+	ピンセットで刺激してもわずかにしか動かない
-	反応なし又は虫体が壊れている

#### (3) 駆虫候補成分の経口 DDS 製剤化

成分 X (本邦で食品添加物に指定されている成分) は、常温において疎水性の油状成分であるため、そのままの形ではヒトに対して経口投与しにくく、また水よりも比重が小さいため、経口投与しても胃液表面に浮上する可能性が高く、アニサキス虫体に成分 X が十分に曝露されないことが考えられる。そのため、本研究では、ヒトに経口投与しやすく、かつアニサキス虫体に成分 X を送達しうる DDS 製剤として、水性の液剤および水中油型の乳剤を調製した。すなわち、液剤は、成分 X を有機溶剤 A で溶解した 30 mg/mL 溶液を精製水で 10 倍希釈することで調製した。乳剤は、成分 X (25 mg)、植物油 B (250 mg) および乳化剤 C (300 mg) に、精製水を加えて全量 2.5 mL とし、超音波処理 (50 W, 20 sec × 3 回) することで調製した。液剤 (Fig.1A) は、油状成分である成分 X が可溶化された透明な液状の製剤となった。一方、乳剤 (Fig.1A) は、白濁した液体であり、その粒子径は約 230 nm、多分散指数は 0.25 未満であった。なお、メチレンブルーを用いた色素法にて乳剤型を判別したところ、分散媒が青色に着色されていることが観察され、水中油型であることを確認した (Fig. 1B)。



**Fig. 1** Appearance of component X solution and emulsion (A). Optical microscopy images of oil-in-water emulsion that aqueous phase is stained with methylene blue (B). Scale bar corresponds to 20  $\mu\text{m}$ .

#### (4) 消化管内における経口 DDS 製剤のアニサキス駆虫効果の評価

Wistar 雌性ラット (9 週齢、140 g) を 1 日絶食させたのち、ラット 1 匹あたりアニサキス 6 匹 / 0.6 mL をゾンデで胃内注入した。アニサキス注入後直ちに、液剤 1 mL、乳剤 1 mL または 0.25 mL を、また比較例として生理食塩水 1 mL、または 1.6 mg の正露丸 (大幸薬品) を生理食塩水に懸濁した液 1 mL をゾンデで経口投与した。1 時間後、ラット消化管内のアニサキスを回収し、ピンセットで刺激を与えて運動性を判定し、Table 1 に示す判定方法で一と判定された虫体数を計測して死滅率を算出した。

#### (5) 経口 DDS 製剤の消化管傷害性の評価

Wistar 雌性ラット (9 週齢、140 g) を 1 日絶食させたのち、ラット 1 匹あたり液剤 1 mL、乳剤 1 mL を、また比較例として生理食塩水 1 mL、または 99.5% エタノール 1 mL をゾンデで経口投与した。6 時間後、ラットから消化管を摘出し、内壁の様子を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 駆虫候補成分のアニサキスに対する駆虫効果

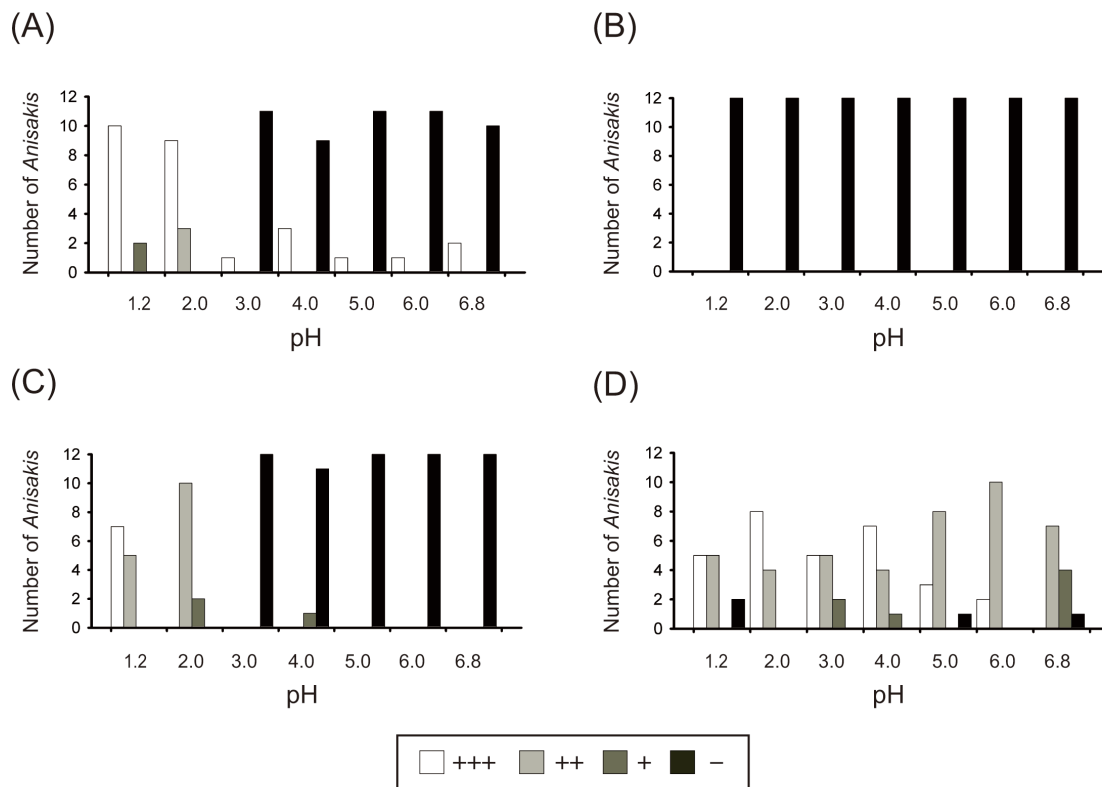
各駆虫候補成分のアニサキス駆虫効果に及ぼす pH の影響を Fig. 1 に示す。適用 24 時間後において、プロメラインおよびゲラニオールは、pH 3.0 以上において大半のアニサキスを死滅させた。成分 X は、いずれの pH においてもすべてのアニサキスを死滅させた。一方、レバミゾールでは、いずれの pH においても大半のアニサキスが生存していた。

#### (2) 経口 DDS 製剤の *in vivo* アニサキス駆虫効果

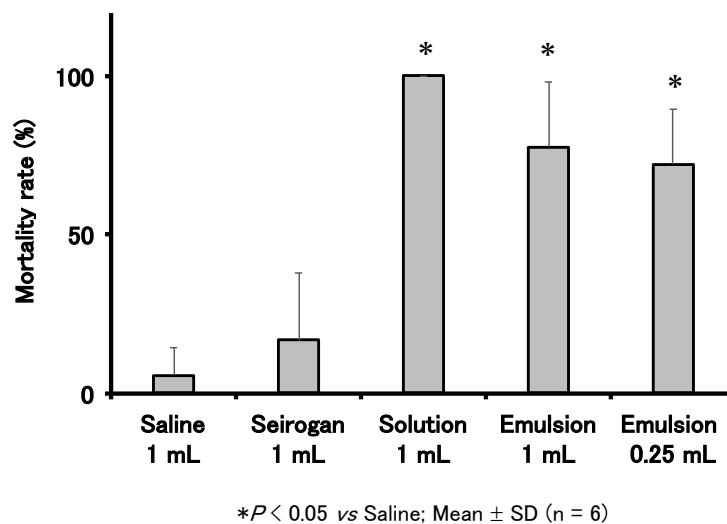
ラット消化管内における経口 DDS 製剤のアニサキス駆虫効果を Fig. 2 に示す。液剤は 1 mL (成分 X: 3 mg 相当) の投与で 100% のアニサキスを死滅させた。乳剤は 0.25 mL (成分 X: 2.5 mg 相当) 以上の投与で約 75% のアニサキスを死滅させた。いずれの製剤を投与した場合も、アニサキスの大半は胃内で死滅していたが、腸内で死滅しているものも見られた。ラットに投与した液体の総量から算出された成分 X のラット胃内濃度は、液剤 1 mL 投与の場合は 1.875 mg/mL、乳剤 0.25 mL 投与の場合は 2.94 mg/mL、乳剤 1 mL 投与の場合は 6.25 mg/mL であった。

#### (3) 経口 DDS 製剤の *in vivo* 消化管傷害性

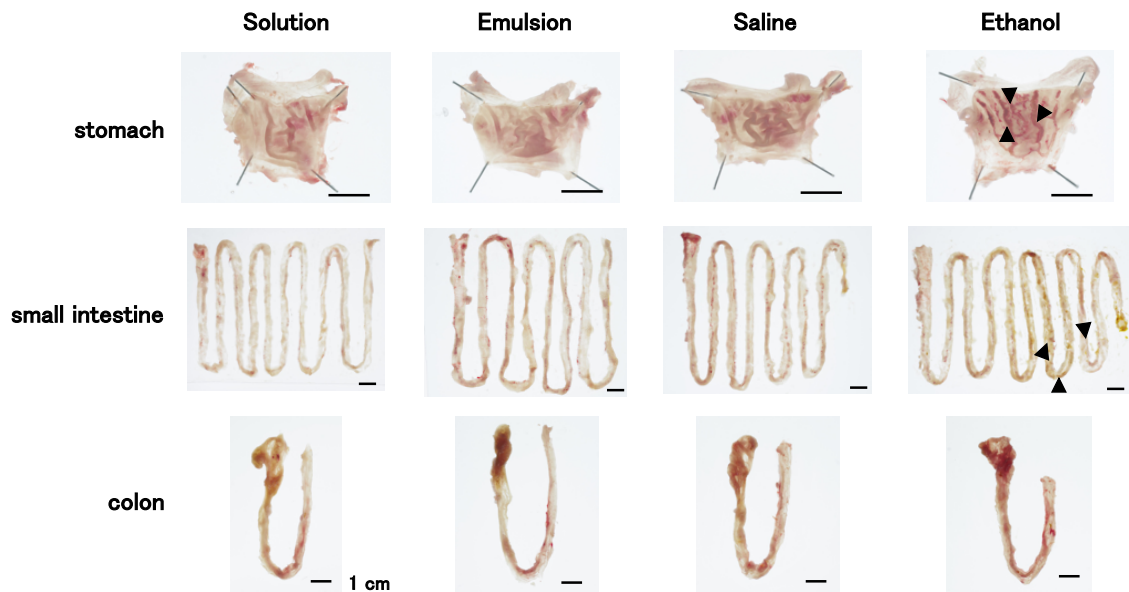
経口 DDS 製剤をラットに投与したときの消化管壁の様子を Fig. 3 に示す。液剤を投与したラット、乳剤を投与したラットのいずれも、ネガティブコントロールである生理食塩水を投与したラットと同様に、消化管の傷害は認められなかった。一方、ポジティブコントロールであるエタノールを投与したラットでは、胃が赤くただれ、小腸でも傷害が確認された (図中、▲で示す箇所)。



**Fig. 1** pH-dependent effects of bromelain (A), component X (B), geraniol (C), and levamisole (D) on the *Anisakis* motility. Bromelain (200  $\mu$ M), component X (100  $\mu$ g/mL), geraniol (100  $\mu$ g/mL), and levamisole (50 mg/mL) at different pH (1.2-6.8) were applied to 12 *Anisakis*, followed by incubation at 37°C for 24 h. After incubation, the *Anisakis* motility was evaluated.



**Fig. 2** *Anisakis* anthelmintic effects of oral formulations in the gastrointestinal tract. Component X solution and emulsion were administered to rat stomach with 6 *Anisakis*. After 1 h, the *Anisakis* were collected from the gastrointestinal tract, and then the mortality rate was calculated.



**Fig. 3** Appearance of gastrointestinal tract following administration of oral formulations. Component X solution and emulsion were administered to rat stomach. After 6 h, the stomach, small intestine and colon were extracted, and then state of the inner wall was observed.

本研究では、上述の通り、所定の成果を収めることができ、DDSを基盤とするアニサキス駆虫研究の新しい学理が創出された。この学理は、他種寄生虫の駆除にも応用可能な概念となり、公衆衛生・寄生虫学・食文化・医学・薬学・水産学・食品衛生学そして社会への多大な波及効果が期待できる。本研究の成果は、特許出願済みであり、今後、優先権主張出願を予定している。アニサキス食中毒を予防・治療する経口製剤は未だ上市に至っていないことから、本研究の成果が知的財産化される可能性は大きく、近い将来の実用製品化を目指して企業等との連携を図る方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中谷日向子, 戸上紘平, 丁野純男
2. 発表標題 アニサキスを駆虫可能な化合物の探索およびその製剤化
3. 学会等名 第35回北海道薬物作用談話会（札幌）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中谷日向子, 戸上紘平, 丁野純男
2. 発表標題 胃内環境を想定したアニサキスの効率的な駆虫方法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第149回支部例会（札幌）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中谷日向子, 戸上紘平, 丁野純男
2. 発表標題 アニサキス駆虫効果を有する化合物の探索および虫体内への移行性に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 カルバクロールを含有する抗アニサキス組成物	発明者 丁野 純男; 戸上 紘平; 中谷 日向子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2023-032571	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分担者	戸上 紘平  (Togami Kohei)  (20582357)	北海道科学大学・薬学部・准教授    (30108)	
研究 分担者	板垣 史郎  (Itagaki Shirou)  (00360925)	札幌医科大学・その他部局等・准教授    (20101)	

	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
研究 協力者	中谷 日向子  (Nakaya Hinako)	北海道科学大学	

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