

「論文の内容の要旨」

カイク感染モデルを用いた、感染症治療薬候補物質の探索

春日 寛司

【序論】

感染症の流行は、時として人間社会に甚大な被害を及ぼす。感染症に対する重要な対抗手段として感染症治療薬の投与が挙げられるが、既存の抗ウイルス薬や抗菌薬には重篤な副作用や薬剤耐性菌の出現などの問題があり、新規薬剤の開発が望まれている。

現在の感染症治療薬の開発工程は、始めに試験管内の系を用いて病原体の増殖に対する阻害効果を指標に候補化合物を精製・同定する。この段階に至るまでに膨大な労力や手間、費用を要する。次に、ほ乳動物の系における検討を行うが、殆どの候補物質は体内動態や毒性のために、治療効果を示さない。感染症に対して治療効果を示す候補物質が殆ど得られないことが、感染症治療薬開発における重要な問題とな

っている。効率よく治療効果を示す化合物を得るためには、治療効果を指標とした候補化合物のスクリーニング系の使用が有用であると考えられる。しかし、従来のようにほ乳動物のみを用いて治療効果の評価を行った場合、コストや倫理的な問題のために、治療効果を指標としたスクリーニングが困難である。私は、これらのような問題を受けないモデル動物を使用すれば、治療効果を指標としたスクリーニングが可能であると考えた。

当研究室では、安価で大量飼育が容易な実験動物としてカイコ幼虫に着目している。カイコ幼虫を用いて、臨床で使用されている抗菌薬や抗ウイルス薬の治療効果評価系が確立されており（図 1）、カイコ幼虫感染モデルにおいて、臨床で使用されている抗菌薬・抗ウイルス薬の治療効果の評価が可能であると考えられる。また、抗菌薬の治療効果評価系より得られた治療効果の ED₅₀ がマウスの感染系より得られた ED₅₀ 値とほぼ同様の値を示した。また、カイコ幼虫は CYP 分子種などの代謝酵素や、ほ乳動物の腎臓・肝臓・腸管などに対応する器官を有する。以上より、カイコ幼虫感染モデルは、治療効果を指標としたスクリーニング系として有用であると期待される。

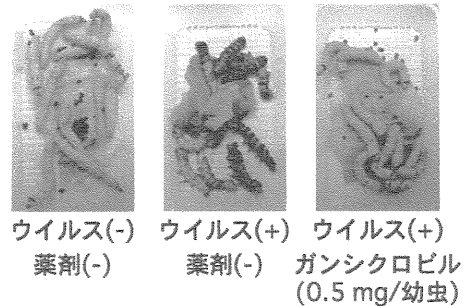


図 1 カイコ幼虫感染モデル

そこで私は、次のような感染症治療薬候補物質の探索工程（図 2）を提案する。カイコ幼虫感染モデルを用いた、治療効果を指標とした候補化合物の選抜により、感染症治療薬開発の探索の初期段階で体内動態が良好な化合物の選出が期待される。そのためにはカイコ幼虫感染モデルの有用性が示される必要がある。そのために私は、カイコ幼虫感染モデルを用いて感染症治療薬候補物質の探索を試みた。

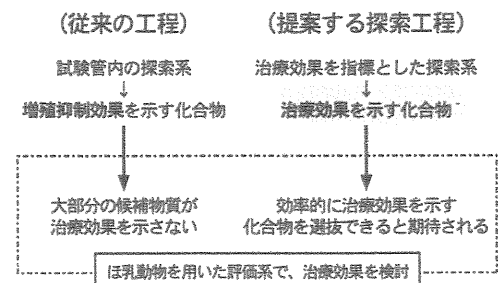


図 2 提案する探索工程

【結果と考察】

1-1. 抗ウイルス薬候補物質の、治療活性を指標とした探索

私は修士課程の研究において、漢方薬の麻黄湯に含まれる生薬であるケイヒが、カイコ幼虫・バキュロウイルス感染モデルにおいて治療活性を示すということを見出していた。そこで、ケイヒのクロロホルム抽出物

より、カイコ幼虫感染モデルにおける治療活性を指標に精製を行った(図3)。シリカゲルカラム・ゲル濾過カラム・HPLC(ODSカラム)の、数段階の分離精製の工程を経て、最終精製画分2mgを得た。

最終精製画分に含まれる化合物について、¹H-NMR、¹³C-NMR、質量分析および旋光度測定による解析を行った。NMRより得られたケミカルシフト値、分子量、旋光度は、既知物質のCinnzeylanineのものとはほぼ一

致していた。以上より、最終精製画分に含まれる化合物がCinnzeylanine(図4)であると同定した。また、最終精製画分に含まれる化合物はバキュロウイルスに対する抗ウイルス活性を示した。Cinnzeylanineは既存の抗ウイルス薬とは異なる骨格を有しており、新規の作用機序による抗ウイルス効果が期待される。

1-2. 最終精製画分の抗ヘルペスウイルス作用

Cinnzeylanineの抗ウイルス活性についての報告は知られていなかった。そこで、最終精製画分に含まれる化合物がカイコ幼虫に感染するバキュロウイルスに対して特異的に抗ウイルス効果を示すのか、それともほ乳動物に感染するウイルスに対して有効性を示すのかを検討した。結果、最終精製画分の濃度が高くなるに従って、サル腎臓由来の細胞系におけるヘルペスウイルスのプラークの形成率が減少した(図

図3 ウイルス感染症治療活性を示す化合物の精製

精製画分	治療活性 [unit]	(回収率) [%]	重量 [mg]	ED ₅₀ 値 [mg/2g幼虫]
I CHCl ₃ 抽出物	31000	(100)	11800	375
II C200カラム	11000	(35)	660	61
III LH20カラム	3800	(12)	34	9
IV HPLC	1000	(3)	2	2

1 unit; 一匹のカイコ幼虫を50%の確率で生存させる治療活性量

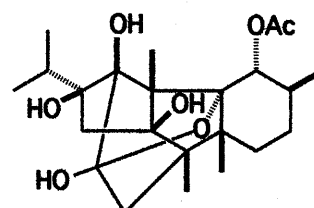


図4 Cinnzeylanine

5)。従って、Cinnzeylanine はほ乳動物に感染するヘルペスウイルスに対し、増殖抑制効果を示すと考えられる。

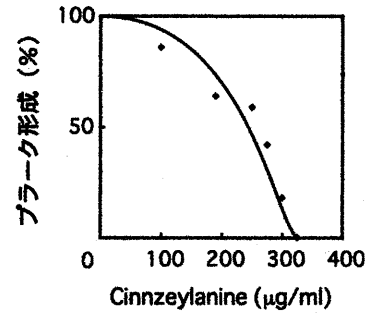


図 5 ヘルペスウイルスに対する抗ウイルス作用

2-1. 抗菌薬候補物質の、治療効果を指標とした探索

カイコ幼虫・黄色ブドウ球菌感染モデルを用いて、土壌細菌の培養液中に含まれる抗生物質に着目し、

これより抗菌薬候補物質の探索を試みた。当研究室にて独自に分離された 2979 株の土壌細菌の培養液サンプルより、MRSA に対する抗菌活性とカイコ幼虫感染モデルにおける治療活性を示す土壌細菌培養液 3 検体を得た。

私はこれらのサンプルより、カイコ幼虫・黄色ブドウ球菌感染モデルにおける治療活性を指標に、抗菌物質の精製を試みた。数段階の溶媒抽出と HPLC を含むカラムクロマトグラフィーによって得られた最終精製画分について精密質量分析を行った。カイコ幼虫の黄色ブドウ球菌感染症に対して治療効果を示す、各最終精製画分に含まれる化合物は Fusaricidin 類 (図 6)

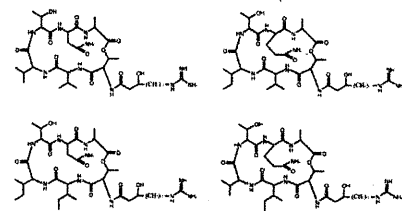


図 6 Fusaricidine 類

と Katanosin B (図 7) であると推定された。

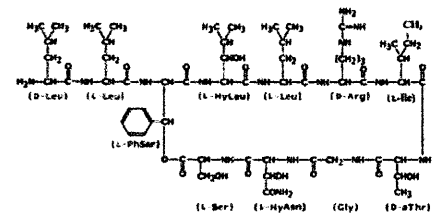


図 7 Katanosin B

2-2. カイコ感染モデルより見出された抗菌物質

Fusaricidin 類については抗菌効果のみしか知られていない。Fusaricidin 類と推定された最終精製画分は、6 つの MRSA と MSSA1 (メチシリン感受性黄色ブドウ球菌) のそれぞれに対し、ほぼ同等の抗菌活性 (MIC 値) を示した (図 8)。このことから、Fusaricidin 類は MRSA 感染症に対して有効性を示すと推定される。また、Katanosin B は既知の抗菌物質であり、マウス感染モデルにおける治療効果が確認されている。

以上より、カイコ幼虫感染モデルを用いて、ほ乳動物の MRSA 感染症に対して有効な抗菌物質を見出すことができると考えられる。今回、Fusaricidine 類の MRSA 感染症に対する有効性が示唆された。

図 8 最終精製画分 (Fusaricidine A と推定) の MSSA1, MRSA に対する抗菌効果

菌	薬剤耐性	最小発育阻止濃度 [$\mu\text{g/ml}$]
MSSA1	(-)	0.94
MRSA3	OX, FL, KM, TC, EM	0.94
MRSA4	OX, FL, KM, CP, CPLX	0.94
MRSA8	OX, FL, KM, EM, CPLX	0.94
MRSA9	OX, FL, KM, TC, EM, CPLX	0.94
MRSA11	OX, FL, KM, EM, CPLX	0.94
MRSA12	OX, FL, KM, EM	0.94

OX:オキシシリン, FL:フロモキシセフ, KM:カナマイシン, TC:テトラサイクリン, CP:クロラムフェニコール, EM:エリスロマイシン, CPLX:シプロフロキサシン

【まとめと結論】

カイコ幼虫・バキュロウイルス感染モデルを用いて、これまでに抗ウイルス効果が知られ

ていなかった Cinnzeylanine を見出した。また、最終精製画分に含まれる化合物はほ乳動物に感染する DNA ウイルスに対する増殖抑制効果も示した。Cinnzeylanine は従来の抗ウイルス薬とは異なる骨格を有するため、新規の作用機序による抗ウイルス効果が期待される。その作用機序は現段階では不明だが、異なる 2 種類の DNA ウイルスの増殖に対する有効性が見られたことから、DNA ウイルスの基本的な増殖機構を阻害するものではないかと私は考える。

また、カイコ幼虫・黄色ブドウ球菌感染モデルを用いて、細菌感染症に対して治療効果を示す抗菌薬候補物質を探索した。結果、抗菌効果のみしか知られていなかった Fusaricidin 類と推定される最終精製画分について、MRSA に対する有効性と黄色ブドウ球菌感染症に対する治療効果を今回初めて見出した。Fusaricidine 類は MRSA 感染症に対して有効な治療薬候補物質として期待される。

抗菌薬候補物質としては Katanosine B も見出された。この物質はほ乳動物の黄色ブドウ球菌感染症に対する有効性が確認されている抗菌物質である。このことから、カイコ幼虫感染モデルを用いて、ほ乳動物の感染症に対して有効な物質の探索が可能であると考えられる。

以上より、カイコ幼虫感染モデルは治療効果を示す感染症治療薬候補物質の探索系として有用であると考えられる。