

## 原虫感染症に有効な生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とその作用機序の解析

申請代表者	加藤 健太郎	帯広畜産大学 原虫病研究センター	准教授
所外共同研究者	野中 基弘	帯広畜産大学 原虫病研究センター	学部生
所外共同研究者	韓 永梅	帯広畜産大学 原虫病研究センター	特任研究員
所内共同研究者	門脇 真	病態制御研究部門 消化管生理学分野	教授

### ■背景・目的

本研究の対象であるマラリア原虫とトキソプラズマは、ともにアピコンプレックス門原虫に分類されている。マラリアは、結核、エイズとともに世界三大感染症の一つに数えられる。蚊の吸血によってヒトに感染する原虫による循環器疾患であり、赤血球内での原虫の増殖・破壊による貧血を主症状とする。その感染者は、亜熱帯・熱帯地域に多く存在し、年間約 2 億人、死亡者は約 60～70 万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。既存の抗マラリア剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マラリア剤が開発され、また、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マラリア撲滅には至っていない。

一方で、トキソプラズマ症はネコを終宿主とする人獣共通感染症である。感染動物由来の食肉を加熱不十分のまま生食したり、ネコの糞中のオーシスト（虫卵）が口の中に入ることによって感染する。臨床上問題となるのは妊婦の初感染であり、胎児に経胎盤感染することにより流産や胎児の脳症等を引き起こす。2012 年に我が国において患者会が設立され、NHK でもその被害が取り上げられた。ユッケやレバ刺しの食用等の近年の食習慣の変化に伴い、先天性トキソプラズマ症が拡大し、思春期に症状が出ることもあることから無自覚のものも含めると我が国の新生児において年間数百件の被害があると推定されている。現在のトキソプラズマ薬では病態を引き起こす急性感染虫体（栄養型）を潜伏感染虫体（休眠型）へと移行させるだけで根本的な駆虫に至らない。

我々の研究グループは、富山大学和漢医薬学総合研究所の平成 27 年度の探索研究において、「トキソプラズマ原虫の増殖及び潜伏感染を抑制する生薬由来化合物及び生薬エキスの探索」という研究課題で採択された。この研究成果から、抗トキソプラズマ薬のシーズとして、いくつかの有望な生薬由来化合物及び生薬エキスを同定することに成功した。

このような背景から、一般研究 I の目的は、探索研究で同定された生薬由来化合物及び生薬エキスについて、それらの抗トキソプラズマ効果の作用機序の解析を行う。さらに、マラリア原虫も対象とすることで、抗マラリア効果を持つ生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とそれらの作用機序の解明を行うことである。

### ■結果・考察

本研究は、和漢医薬学総合研究所から分与された和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物、生薬エキス）を使用して行った。

#### 1) 抗トキソプラズマ効果を持つ生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とそれらの作用機序の解明

##### i) 抗トキソプラズマ原虫活性を持つ生薬の選抜

【方法 1】抗トキソプラズマ原虫活性の評価

バクテリア型  $\beta$ -Galactosidase を発現した原虫株である RH\_2F 株 (ATCC:50839) をヒト初代繊維芽細胞である HFF 細胞に感染させ、生薬由来化合物 10 $\mu$ M または生薬エキス 100 $\mu$ g/ml 存在下で 48 時間培養し、溶媒対照である DMSO 群と比較した際の  $\beta$ -Galactosidase 活性の減少を、生薬による原虫増殖阻害効果として測定した。

#### 【方法 2】 宿主細胞毒性の評価

HFF 細胞を方法 1 と同じ濃度の生薬由来化合物および生薬エキス存在下で 48 時間培養し、宿主細胞数を測定した。

#### 【結果】

生薬由来化合物 96 種類のうち、原虫数を反映する  $\beta$ -Galactosidase 活性を 70% 以上低下させた化合物は 7 種類であった (表 1)。また、生薬エキス 120 種類の中で同様に 70% 以上低下させたものは 6 種類であった (表 2)。これらのうち、同濃度で宿主細胞に対して 50% 以上の毒性を示したものは、原虫数の減少は宿主細胞の死滅によるものと考えられるため、Timosaponin A-III とゴウカンピについては、以降の検討からは除外した。その結果、6 種類の生薬由来化合物および 5 種類の生薬エキスを抗トキソプラズマ原虫活性をもつヒット化合物として同定した。

表 1. 生薬由来化合物のスクリーニング結果

compound	Parasite inhibition (%)	Host cell inhibition (%)
shikonin	87.3	43.4
Alkannin	86.9	-0.3
<del>Timosaponin A-III</del>	81.4	98.3
Berberine Chloride	85.5	-3.0
Baicalein	80.1	3.3
Luteolin	74.3	-7.9
Coptisine Chloride	73.3	6.4

表 2. 生薬エキスのスクリーニング結果

extract	Parasite inhibition (%)	Host cell inhibition (%)
オウゴン	86.7	-4.4
マンケイシ	83.5	22.7
カンゾウ	83.1	-3.4
<del>ゴウカンピ</del>	82.6	97.6
オウバク	81.5	11.7
オウレン	76.6	14.7

#### ii) 生薬由来化合物及び生薬エキスの原虫に対する選択性評価

##### 【方法】

i) と同様の原虫株および宿主細胞に対する生薬の 50% 増殖阻害濃度をそれぞれ算出し、比較した。50% 原虫増殖阻害濃度 / 50% 宿主細胞増殖阻害濃度の値が 10 以上である化合物を新規薬剤候補とした。

##### 【結果】

6 種類の生薬由来化合物のうち、50% 原虫増殖阻害濃度 / 50% 宿主増殖阻害濃度の値 (選択性) が 10 倍以上である化合物は 4 種類であった。Shikonin は原虫に対する選択的阻害があるが、宿主に対しても比較的低い濃度でも毒性を示すため除いた。また、Baicalein, Luteolin, Coptisine Chloride は今回のアッセイで最高濃度の 50 $\mu$ M でも宿主に対して毒性を示さなかったことから、原虫に対して高い選択的阻害を持つと考えられる (表 3)。

5 種類の生薬エキスは、いずれも今回のアッセイで最高濃度である 500 $\mu$ g/ml で宿主細胞毒性を示さなかった。カンゾウは選択性が 10 倍以下であったため、除いた。オウゴン、マンケイシ、オウバク、オウ

レンは原虫に対する 50%阻害濃度が低く、原虫に対する選択的な毒性が強いことが分かった (表 4)。

表 3. 生薬由来化合物の原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

Compound	IC <sub>50</sub> for parasite growth (μM)	IC <sub>50</sub> for host cell (μM)	選択性
Shikonin	1.4	17.8	12.7
Alkannin	1.3	5.4	4.1
<del>Berberine Chloride</del>	2.2	2.8	1.3
Baicalein	5.0	50<	>10
Luteolin	5.7	50<	>8.8
Coptisine Chloride	2.1	50<	>23.8

表 4. 生薬エキスの原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

Extract	IC <sub>50</sub> for parasite growth (μg/ml)	IC <sub>50</sub> for host cell (μg/ml)	選択性
オウゴン	7.1	500<	70.4
マンケイシ	14.9	500<	33.6
<del>カンゾウ</del>	96.9	500<	5.2
オウバク	14.6	500<	>34.2
オウレン	7.3	500<	>68.5

## 【考察】

以上の結果より、生薬由来化合物である Baicalein, Luteolin, Coptisine Chloride の 3 種および、生薬エキスである オウゴン、マンケイシ、オウバク、オウレンの 4 種を新規の抗トキソプラズマ原虫活性をもち、今後薬剤として使用できる可能性のある物質として同定した。今後は、感染動物実験や潜伏感染虫体への薬剤効果の解析を行っていきたい。

## 2) 抗マラリア効果を持つ生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とそれらの作用機序の解明

## i) 抗熱帯熱マラリア原虫活性を持つ生薬の選抜

## 【方法 1】抗原虫作用の測定

一次スクリーニングとして D-sorbitol 処理により初期トロホゾイトに同調させた熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum* 3D7 株) を 0.3% parasitemia、1% hematocrit に調製し、化合物 10μM or エキス 100μg/ml となるように候補薬剤を添加した培養液 150μL を用いて 37°C、5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> の条件で 96 時間培養した。途中 48 時間で培養液を 50μL 加えた。96 時間後に回収して塗抹を作成し、検鏡によって parasitemia を測定し、薬剤添加群とコントロール群と比較することで抗原虫作用を評価した。陽性コントロールには Pyrimethamine、陰性コントロールには滅菌水を用いた。

一次スクリーニングで抗原虫作用を示した化合物について、より低濃度での抗原虫作用を評価するため、薬剤濃度を複数段階 (化合物 : 50、10、2、0.4μM / エキス : 100、20、4、0.8μg/ml) にふった培養液を用意し、一次スクリーニングと同様の実験を二次スクリーニングとして行なった。二次スクリーニングにおいて低濃度で抗原虫作用を示した化合物およびエキスについては IC<sub>50</sub> (50%阻害濃度) を測定した。

## 【方法 2】宿主細胞生存率の評価

熱帯熱マラリア原虫の宿主であるヒトの細胞のうち、ヒト胎児腎臓上皮由来 293T 細胞に薬剤を添加した 10%FBS 含 DMEM 培地で 37°C、5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub> の条件で 48 時間培養し、溶媒対照群と比べた際の細胞数の変化を宿主細胞生存率として測定した。

## 【結果】

スクリーニング実施済みである 96 化合物および 120 エキスは抗熱帯熱マラリア作用を示し、そのうち

90%以上の増殖阻害率を示した 9 化合物および 19 エキスが抗熱帯熱マラリア活性を示す化合物として選択された。選ばれた 9 化合物および 19 エキスについて、化合物については全 9 種類、エキスについては上位 9 種類を選抜し、以下の実験を進めた。9 化合物および 9 エキスについて、低濃度 (0.4 $\mu$ M および 20 $\mu$ g/ml) での抗原虫作用を検討した。その結果低濃度においても 80%以上の抗原虫作用を示す 4 化合物および 4 エキスを得た。この 4 化合物および 4 エキスについて原虫に対する IC<sub>50</sub> を測定した (表 5, 6)。

4 化合物および 4 エキスについては宿主細胞への毒性を評価し、宿主細胞生存率の分布が得られた。薬剤濃度 1 $\mu$ M 以下および 1 $\mu$ g/ml 以下では、4 化合物および 4 エキスのすべてで宿主細胞の生存率は 70%以上であった。

#### ii) 生薬由来化合物及び生薬エキスの原虫に対する選択性評価

4 化合物および 4 エキスについて、宿主細胞に対する IC<sub>50</sub> を測定した (表 5, 6)。これらの結果より、4 化合物および 4 エキスの原虫への選択性指標 (宿主細胞生存 50%阻害濃度 /原虫増殖 50%阻害濃度) を計算した (表 5, 6)。選択性指標が 10 倍以上である化合物は 4 種類、エキスは 2 種類であった。チョウジ、モツヤクについては、選択性指標が 10 倍未満であるため、除外した。

表 5. 生薬由来化合物の原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

生薬由来化合物	原虫 IC <sub>50</sub> (nM)	宿主 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	選択性
Berberine Chloride	34.6	7.5	217
Coptisine Chloride	34.1	>10	>293
Dehydrocorydaline Nitrate	76.0	>10	>132
Palmatime Chloride	51.5	>10	>194

表 6. 生薬エキスの原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

生薬エキス	原虫 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	宿主 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	選択性
オウバク	0.3133	30.9	99
オウレン	0.5942	6.4	11
チョウジ	11.9	30.6	3
モツヤク	23.4	>100	>4

#### 【考察】

以上の結果より、生薬由来化合物である Berberine Chloride, Coptisine Chloride, Dehydrocorydaline Nitrate, Palmatime Chloride の 4 種および、生薬エキスであるオウバク、オウレンの 2 種を新規の抗マラリア原虫活性をもち、今後薬剤として使用できる可能性のある物質として同定した。

#### iii) 選抜された生薬由来化合物及び生薬エキスの効果のある原虫ステージの解析

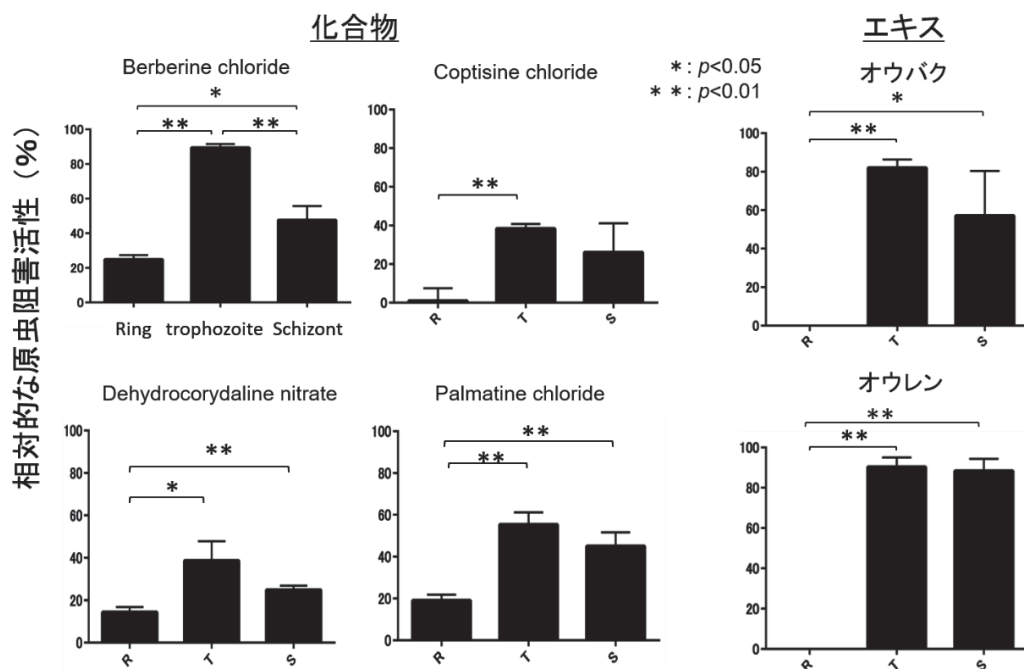
【方法】薬剤を添加した各原虫ステージでの原虫感染率の測定

ここまで選抜された化合物 4 種類、エキス 2 種類について、マラリア原虫の赤内型の各ステージ (Ring, Trophozoite, Schizont) のどのステージの虫体に効果を示しているか解析を行った。同調培養したマラリア原虫について、Ring 期 (侵入後 0-24 時間)、Trophozoite 期 (侵入後 24-36 時間)、Schizont 期 (侵入後 36-48 時間) において薬剤を添加し、侵入後 48 時間後に感染率の計測を行った (図 1)。

#### 【結果】

選抜された化合物 4 種類、エキス 2 種類については、各々の阻害率に差があるものの Trophozoite 期及び Schizont 期において原虫に対する増殖阻害効果があることが明らかとなった (図 1)。

図 1. 生薬由来化合物及び生薬エキスの効果のある原虫ステージの解析



【考察】

以上の結果から、選抜された化合物 4 種類、エキス 2 種類は、原虫の増殖に関わる遺伝子発現や DNA 複製を阻害していると考えられる。今後は薬剤耐性株での薬剤効果について解析を行っていききたい。

■結論

抗トキソプラズマ原虫活性を持つ生薬由来化合物、生薬エキスと抗マalaria原虫活性を持つ生薬由来化合物、生薬エキスの同定を行った。両者で同定された化合物とエキスには重複したものが明らかに多かったため、原虫類において共通の増殖抑制機構がある可能性がある。このことから、今後はクリプトスポリジウム原虫等、他の原虫についても今回同定された薬剤での増殖阻害効果を解析していききたい。さらに、同定した薬剤のターゲットとなっている原虫蛋白質の同定とこれらの遺伝子発現機構について解析を行う必要がある。