

第81回総会シンポジウム

II. 抗結核薬開発の現況と展望

座長 ¹富岡 治明 ²難波 憲司

キーワード：抗結核薬，薬剤ターゲット，バイオインフォマティクス，ドラッグデリバリー，免疫補助療法

地球規模で見ると、現在、全世界の人口の約3分の1の人々が結核に感染しており、新患者は発展途上国の若年者層を中心に800～1000万人を数え、死亡者数は約200万人と推定されており、単一の病原体の感染症による死亡者数としては、結核はHIV感染症・マラリアに次いで第3位となっている。特に、肺結核症は伝染性がきわめて強く死亡率も高く、加えてHIV感染者における高頻度での結核発症は、世界的に見ても由々しき問題になっている。さらに、近年先進国・発展途上国の如何を問わず、多剤耐性結核の増加が顕著である。こうした状況、特に再興感染症としての結核の世界的な規模での増加と急激な多剤耐性結核の出現・増加を考えた場合、まずもって、新規抗結核薬の開発と、さらには既存の抗結核薬をより有効な形で臨床に供するためのプロトコルの開発とが重要な課題となることには言を俟たない。新規抗結核薬の開発にあたっては、以下の3つの観点が必要である。一つには、薬効が長時間持続するタイプの抗結核薬の開発であり、DOTSの施行と患者のコンプライアンスの改善に有効である。また一つには、多剤耐性結核菌に有効な抗結核薬の登場が強く希求されている。さらに一つには、代謝の低下した結核菌、可能ならば休眠型結核菌に有効な新規抗結核薬の開発が必要であり、これは既感染者からの結核発症の防止にきわめて有効である。ところが困ったことに、今以上の治療期間の短縮と多剤耐性結核への対応に欠かせない新しい抗結核薬、特に休眠型の結核菌に有効な薬剤の開発が遅々として進まない。リファンピシンの導入後40年の長きにわたり、リファブチンとリファペンチンを除いては、新しい抗結核薬は市販されるに至っていないという厳し

い現状があることは周知のとおりである。

WHOの調査では、製薬企業が抗結核薬の開発に消極的な理由は、①開発に要する費用（米国で1薬剤につき3～5億ドル）と時間（米国での臨床試験で約10年）、②開発研究そのものの困難さ（研究施設や動物感染モデルなどの研究手法の問題、さらには、元々結核に著効を示す既存の薬剤があるうえに、新規抗結核薬の薬効の判定は他剤との併用の系で行わざるをえないという不利を抱えているといった問題）、③患者の95%以上は発展途上国で発生しているために開発費に見合うだけの収益が望めないこと、の3点に尽きるようである。

このシンポジウムでは、4つのグループの研究者の先生方に以下のタイトルのご講演をお願いした。その詳細については、各演者がまとめられた論文を読みたい。また、座長の緒言の英文抄録にも座長から見ての大略を記述させて頂いているのでご一読願いたい。

1. 新規抗酸菌症治療薬開発の現状および企業戦略との関連からの展望
難波憲司（第一製薬株式会社創薬第一研究所）
2. ケミカルゲノミクスによる新規創薬ターゲット検索とその結核病治療薬開発における可能性
*諏訪頼正（リバース・プロテオミクス研究所）、鈴木洋二（帝人株式会社）
3. 抗酸菌症治療薬と drug delivery
*泉川公一、大野秀明、河野 茂（長崎大学医学部第二内科）
4. 抗酸菌感染症の免疫補助療法
*清水利朗、佐藤勝昌、富岡治明（島根大学医学部）

¹島根大学医学部微生物・免疫学教室，²第一製薬（株）創薬第一研究所

連絡先：富岡治明，島根大学医学部微生物・免疫学教室，〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1
(E-mail: tomioka@med.shimane-u.ac.jp)
(Received 23 Aug. 2006)

微生物・免疫学)

今回のシンポジウムでは、主に新規抗結核薬開発の将来展望に的を絞った形で上記のようなタイトルでの基調報告と討論を行ったが、結核菌をはじめとする抗酸菌に対する抗菌活性の増強、PK/PD特性の改善、副作用の軽減といった目標に沿っての新規抗結核薬の開発研究には多くの困難が待ち受けているという厳しい現状が浮き彫りにされた。こうした新規抗結核薬の開発を進めるに

あたって、結核とMAC感染症、特にHIV感染に伴って見られるこれら抗酸菌感染症の化学療法をより有効なものとするべく、われわれが先ずもって目指さねばならない目標は、抗菌活性が高く、かつ安価な薬剤を開発していくことにある。なぜならば、これらの新規抗結核薬は、先進国だけでなく、難治性結核症とMAC症のAIDS患者での発症が急激に増加してきている発展途上国でもそのニーズが高いからである。こうした有用な抗結核薬開発のための今後の研究の進展に期待したい。

1. 新規抗酸菌症治療薬開発の現状および企業戦略との関連からの展望

第一製薬株式会社創薬第一研究所 難波 憲司

はじめに

1998年の結核菌全ゲノム配列公表、2000年のGlobal Alliance for TB Drug Development (GATB) の設立以降、新しい分子標的を模索しながら従来の抗結核薬とは作用機序の異なる抗結核薬の探索・臨床開発研究が顕在化している。GATBは2010～15年までに新しい結核治療薬の発見と開発促進を目的として、WHOの後援や私的財団、製薬企業からの資金援助で運用されている非営利組織である(図1)。

今回、GATB事業参画によって活発化してきた新規抗酸菌症治療薬開発研究の現状と展望について企業戦略の視点も踏まえて述べる。

新規抗酸菌症治療薬の開発現況とGATB

抗酸菌群に対して抗菌力を有する低分子化合物の情報に関しては、富岡¹⁾やBallell²⁾らの総説を参照されたい。これら化合物の中には新規的作用機序や化学構造として発見された探索段階から臨床段階にある化合物まで網羅されている。とくに、ニトロイミダゾール誘導体PA-824³⁾、ジアリルキノリン誘導体R207910(現TMC207)⁴⁾、ピロール誘導体LL-3858、ジアミン誘導体SQ-109、Moxifloxacin (MFLX) は多剤耐性結核菌に対して高い抗菌力を示す。

抗酸菌薬の創製では、宿主-抗酸菌薬-抗酸菌の相互関係を常に考慮しつつ、それぞれの高いハードルをクリアしていかねばならない(図2)。非臨床段階で見

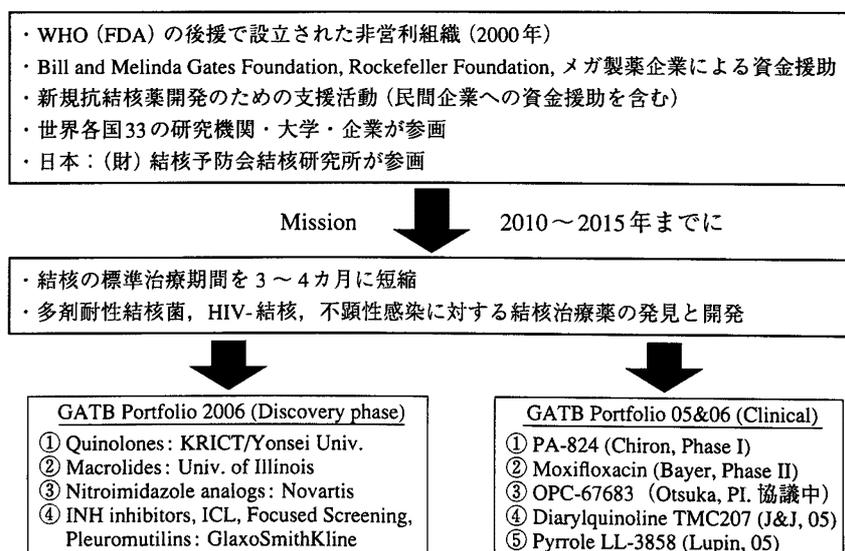


図1 Global Alliance for TB Drug Development (GATB) について

極めねばならない重要項目として、新規の抗菌作用機序に基づく化合物であっても単に抗菌活性の強弱だけではなく、①実験動物において経口吸収された後に抗菌活性値以上の薬剤濃度が感染病巣の細胞内に到達し、感染菌に曝露できる体内動態的資質があるか、②感染モデルで薬効が確保できる用量範囲で長期投与に耐えうる安全性面の資質やそのリスクが明確になっているか、が挙げられる。さらに、薬剤耐性化抑制、既存抗結核薬との薬物相互作用リスク回避、低合成コストなどの付加的価値が加われば臨床開発移行への弾みとなる。例えば GATB が臨床開発に参画している化合物として、PA-824 は結核菌の蛋白合成や細胞壁脂質合成を阻害し休眠期の結核菌にまで作用する。TMC207 は結核菌の ATP 合成によるエネルギー産生経路を阻害、非定型抗酸菌にも活性を示し、MFLX は核酸合成阻害で殺菌する。2005 年 12 月の第 45 回 ICAAC では、大塚製薬から OPC-67683⁶⁾ が発表された。OPC-67683 は PA-824 と同類で、ニトロイミダゾール誘導体の有する遺伝毒性の陰性化に成功した化

合物である。肝毒性や心毒性が懸念される PA-824 に比して、OPC-67683 は非臨床での高い安全性と抗結核菌活性が確認されている (表)。以上の化合物は、実験的結核感染モデルにおいて良好な薬効およびヒトでの経口吸収性が確認されている。今後、上述の化合物の臨床試験においては、①臨床効果の確認 (どの抗結核薬と置き換えを図るのか)、②他剤との長期併用投与となることから小児～高齢者、基礎疾患や HIV 感染など様々な病因背景をもつ患者に対して安全性が確保されるのか注目していきたい。

現在、最もグローバル開発が進行している MFLX の第 I 相では、本薬単独による喀痰中の菌減少率を指標とした Early Bactericidal Activity (EBA) 試験を実施、isoniazid (INH) に次ぐ短時間殺菌力が確認され次相に進んだ。第 II 相試験では Sterilization potential の見極めとして、結核治療の標準薬である INH やエタンブトールの 1 つを MFLX に置き換えた併用群と結核治療標準薬併用群による EBA 試験を実施し、MFLX の有効性が

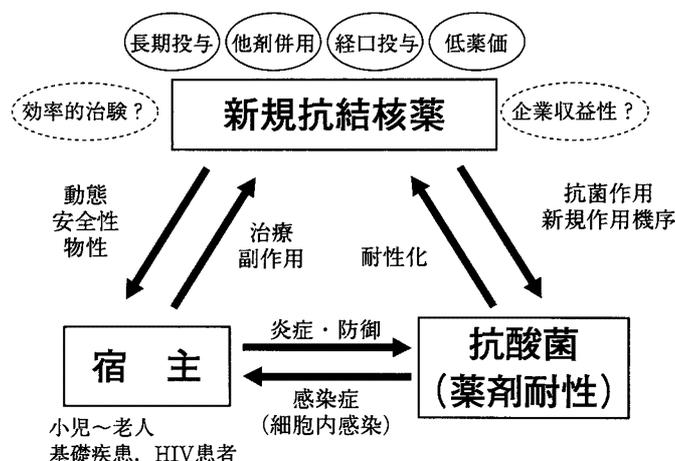


図2 新規抗結核薬開発の考え方について

表 ニトロイミダゾール誘導体 OPC-67683 と PA-824 について

	OPC-67683 (大塚製薬)	PA-824 (Chiron)
作用機序	細胞壁脂質ミコール酸の生合成阻害	
抗菌スペクトル	結核菌 (対数増殖期 & 分裂増殖停止期)	
ADME	動物 BA: 35～60% 肺移行性良好	良好 BA: 40%
薬物相互作用	CYP 阻害 (P450 関連 CYP3A4) なし 抗 HIV 薬: プロテアーゼ阻害薬と併用可能	
安全性その他	変異原性, 遺伝毒性, 中枢, 肝毒性なし 化学構造上で不斉炭素 含む	遺伝毒性なし 肝毒性 (Phase I) 心毒性リスク? 耐性獲得が高い?

確認されている。現在、2カ月治療による喀痰培養陰性化というエンドポイントで試験が進行しており、2010年にはFDAに申請する予定だという。

臨床開発戦略からの展望

GATBによれば結核標準療法による6カ月の治療期間をMFLXは3~4カ月間に、他の新規抗結核薬の追加でさらに2カ月間に短縮できる可能性があるという。この推測を科学的見地から実証すべくGATBと製薬企業は質の高い試験計画をいかに策案し、その開発コストの低減化・開発期間の短縮化を図ろうとしているのか、Bayer社によるMFLXの事例を紹介し、臨床開発戦略について展望してみたい。MFLXは既に抗酸菌を除く細菌感染症治療薬として国内外で承認取得・上市されており、第I相試験で重要とされる経口投与時の薬物動態や安全性(心毒性リスクなど)が確認されているのが開発期間短縮の強みであった。対照的に、PA-824の場合は肝毒性リスクが明らかとなり第I相試験が遅延しているという。第I相試験をいかに短期間でその抗結核薬としての資質を見極めていくことができるのか。これが臨床開発成功の鍵となろう。

GATBの報告⁷⁾によると、第I相から第III相までの臨床試験(約7~10年)に必要な欧米での開発コストは順調に進んで約30億円、当該試験を開発途上国で実施した場合は低人件費などを反映して約10億円と3分の1のコスト低減が可能と試算されている。ただし、開発途上国での質の高い臨床試験を企業単独で進めていくには限界があり、やはりGATBあるいはWHOの強力な支援や事業参画がきわめて有効な手段の一つとなろう。事実、MFLXの臨床第II相試験は、GATBの支援下で米国、ブラジル、カナダ、南アフリカ、スペイン、タンザニア、ウガンダおよびザンビアで計2,500人の結核患者を対象に実施し、良好な試験成績を獲得している。MFLXの事例のように、GATBと連携した試験成績(質)、開発効率性(スピードアップ、コスト低減)が、今後の新規抗結核薬の臨床開発戦略の上で貴重な情報になると考えられる。

日本では、近年、新薬の開発効率(スピードとコスト

低減)と成功確率を上げるための企業戦略として、海外試験データを有効活用したブリッジング試験(原則として海外と同一用法・用量)を実施する製薬企業が増加している。その背景には、開発業務受託機関や試験コーディネーターの普及、試験広告実施など試験インフラが整いつつある一方で、国内試験コストが欧米の約2倍、アジア諸国の約4倍高いという現状がある。そこで、臨床試験をまず欧米・アジア諸国で開始し、有効性や安全性データに関する情報の蓄積を図る戦略である。

ま と め

現在、臨床試験が開始されている新規抗結核薬(候補化合物)が、海外のみならず本邦の結核症患者への福音となるためには、日本も官民がより連携を深めGATB等による国際的な抗結核薬の臨床試験に参画し、日本人患者における新規抗結核薬の有効性と安全性に関するデータの蓄積を図っていく必要があるのではなかろうか。

文 献

- 1) 富岡治明: 新しい抗結核薬開発の展望. 結核. 2002; 77: 573-584.
- 2) Tomioka H: Present status and future prospects of chemotherapeutics for intractable infections due to *Mycobacterium avium* complex. Current Drugs Discovery Technologies. 2004; 1: 255-268.
- 3) Ballell L, Field RA, Duncan K, et al.: New small-molecule synthetic antimycobacterials. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2153-2163.
- 4) Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, et al.: A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 2005; 307: 223-227.
- 5) Stover CK, Warrenner P, VanDevanter DR, et al.: A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. Nature. 2000; 405: 962-966.
- 6) Matsumoto M: *In vitro* and *in vivo* efficacy of novel antituberculous candidate OPC-67683. 45th ICAAC (Washington DC). 2005; Abstract No. F-1462.
- 7) Global Alliance for TB Drug Development.: The Economics of TB Drug Development. October 2001.

2. ケミカルゲノミクスによる新規創薬ターゲット探索とその結核病治療薬開発における可能性

株式会社リバース・プロテオミクス研究所 諏訪 頼正
 帝人株式会社 鈴木 洋二

近年、新しい創薬研究技術としてケミカルゲノミクス

が世界的に注目され、USでは2005年から巨額の研究費

を投じた国家的プロジェクトがスタートした。株式会社リバーズ・プロテオミクス研究所 (REPRORI) では、このような世界的な動向に先駆けてケミカルゲノミクスの中核的な技術開発とその活用を図ってきた。本稿では、REPRORIの成果を中心としてケミカルゲノミクスについて概説するとともに、その結核病治療薬開発への適用可能性について考察する。

1. ケミカルゲノミクスの世界的な動向

1990年代半ば以降、多くの動植物種についてゲノム解析が進み、2003年にはヒトの全ゲノム情報の解析が達成された。これに伴い、ゲノム情報に基づく新しい創薬研究 (ゲノム創薬) が指向されてきたが、最近になって特に注目されているのが、ケミカルゲノミクスと呼ばれる研究方法である。USでは、2005年からNIHを中心としてケミカルゲノミクスプロジェクトが開始され、莫大な研究費の投入が行われている。その目的とするところは、大規模かつハイスループットな化合物スクリーニングを行うことにより、従来知られていない創薬標的を一網打尽に明らかにしようとするところにある¹⁾(図1)。そして、これに追随するかのようになり、日本でも今年度以降の公的研究プロジェクトの主要テーマのひとつにケミカルゲノミクスが掲げられている。

この状況は、創薬等の研究動向に3つの大きな影響を与えるように思われる。その第1は、ゲノム解析においてUSに大きく後れをとった日本が、それを活用する創薬研究においても後れをとることがほぼ確実であろうこと、その第2は、ゲノム解析において提唱されたデータ公開の原則が、ケミカルゲノミクスにおいても成果の公共データベース化 (PubChem²⁾) という形で継承され、従来のように製薬企業が新規創薬標的を知的財産として長期にわたり囲い込むことは困難になったと思われることである。そして、もうひとつの影響として、従来は生化学、分子生物学あるいは細胞生物学等のバイオリジストが主役であった創薬標的の探索研究に、合成化学研究者が積極的に関与するようになり、また、バイオリジスト側も化合物に対する深い知識をもつことが要求されるようになるということが挙げられる。

ところで、ケミカルゲノミクスは、やはり1990年代半ばにHarvard大のShreiberによって提唱されたケミカルバイオロジー³⁾から派生したものであるが、単にその大規模化したものと考えただけでは不十分である。Bredelらはその総説⁴⁾のなかで、ケミカルゲノミクス (ケモゲノミクス) を次のように明確に定義付けしている。

The focused exploitations of target gene families, in which small molecule leads—identified by virtue of their interac-

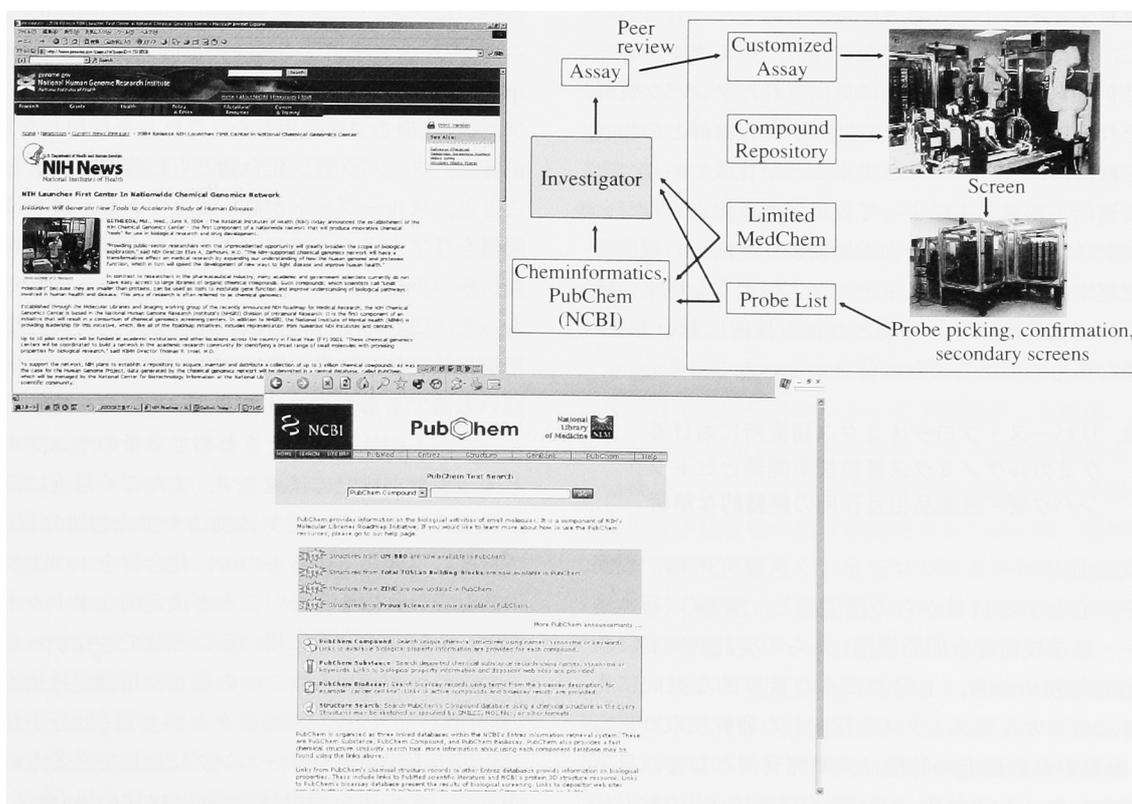


図1 NIHホームページにおけるケミカルゲノミクスプロジェクトの告知、概略説明とPubChem

tion with a single member of gene family—are used to study the biological role of members of that family, the function of which is unknown.

すなわち、ゲノム解析によって明らかになったあるタンパク質ファミリーの、1つのタンパク質に対して特異的に結合する低分子化合物をまず見出し、これをリードとして合成展開することにより、それら新規合成化合物群をプローブとして、同じファミリーに属する他の機能未知なタンパク質群の機能を網羅的に明らかにしようというものである。ここでキーワードとなるのは、遺伝子ファミリー、低分子化合物、および相互作用の3つである。

ケミカルゲノミクスと似た言葉として、ケミカルジェネティクスがあり、ケミカルバイオロジーの著名な研究者でも、この2つをほとんど区別せずに用いている場合がある。しかし私は、長い歴史をもつジェネティクス(遺伝学)と、近年になってゲノム情報の集積により確立されたゲノミクス(ゲノム科学)とは、明確に区別されるべきであると考え。梅澤濱夫らによるカナマイシン、ブレオマイシン等の抗生物質の発見とその作用機構研究もケミカルジェネティクスであったとも考えられるし、またその後も、吉田稔らのトリコスタチンAの標的としてのヒストン脱アセチル化酵素HDACの発見とその阻害機構の解析⁵⁾⁶⁾等にもみるように、従来から日本ではケミカルジェネティクス研究が盛んであったといえる。しかし、上記の定義で明らかのように、ケミカルゲノミクスはゲノム情報により新たに見出されたタンパク質群と、それらに特異的に結合する低分子化合物群との相互作用を直接的に解析しようとするのが特徴であり、人工的な遺伝子変異導入によって表現型の変化をみるジェネティクス、あるいは化合物添加により遺伝子の機能変化を惹起するケミカルジェネティクスのような従来の研究とは、方法論的にも、必要とされる技術においても、全く異なるものであることに留意するべきである。

2. リバース・プロテオミクス研究所におけるケミカルゲノミクス基盤技術開発とヒトタンパク質-医薬品相互作用の網羅的な解析

株式会社リバース・プロテオミクス研究所は、製薬企業を中心とする11社からの拠出金と、NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)からの委託研究費により、2002年初めから、上記のような世界的な動向に先駆けて、ケミカルゲノミクスを指向した研究に取り組んだ⁷⁾。われわれの研究の特徴は、研究資源として、日本で構築されたヒト完全長cDNAライブラリー⁸⁾の数万に及ぶクローンから発現させたタンパク質と、これまで世界で医薬品として使用されてきた2000種に及ぶ低分子

化合物をできるかぎり収集し、それらの相互作用を網羅的に解析しようとするところにあった。その際まず、研究を始めるにあたって、タンパク質-医薬品相互作用の網羅的スクリーニングにどのような方法を用いるかが問題であった。

前述したBredelらの総説⁴⁾では、ケミカルゲノミクス研究の2方向のアプローチ方法を紹介している。すなわち、まず細胞アッセイ等で見出した活性化合物について、*in silico*で定量構造活性相関(QSAR)研究を行って、最適化した化合物を取得し、次にこれをアフィニティー樹脂に固定化するなどしてその結合タンパク質を探索同定することにより、新規の標的タンパク質を獲得するフォワードケミカルゲノミクスと、まず個々の遺伝子からタンパク質を発現し、これと化合物ライブラリーの結合スクリーニングを行って特異的に結合する化合物を取得し、やはりQSAR研究を行って化合物構造を最適化することにより、活性化合物を見出すというリバースケミカルゲノミクスである(図2)。われわれの研究方法はリバースの方法にあたるわけであるが、われわれの研究開始時には、フォワードの方法に用いられるアフィニティー樹脂については技術的にはほぼ確立されていたが、リバースの方法における相互作用スクリーニング技術については、まだ確立された技術がなかった。

幾つかの相互作用解析技術について調査した後、結果的にはタンパク質-医薬品相互作用の網羅的スクリーニング方法として、Size-exclusion chromatography-mass spectrometry (SEC-MS)法とSurface plasmon biosensor(ビアコア)法の2つを採用した。これらを採用した理由は、前者は、タンパク質、化合物ともに修飾を必要としないことと、スループットが高いこととであり、後者は、結合解離をリアルタイムで測定することができ、比較的短時間、かつ少量のサンプルで結合強度を決定できることとであった。これら2つの方法と比較して、古典的な相互作用解析法で結合強度の決定においてはきわめて信頼度の高い方法でもあるカロリメトリーや超遠心分離法は、スループットが低いこととわけて多量のサンプルを必要とする点で本研究には適さず、またごく最近に確立された多重キャピラリー電気泳動法や蛍光相関分析法等は、感度的には優れているものの、化合物を1つ1つ蛍光ラベルしなければならないことが決定的なボトルネックとなり、やはり本研究に用いることはできなかった。

われわれが採用した2つの相互作用測定技術も、研究の開始時点では、ただちにタンパク質-低分子化合物相互作用の大規模スクリーニングに適用できるものではなかった。その主な理由は、SEC-MS法の場合は、従来報告されていた方法⁹⁾では、必要とするタンパク質サンプル量がきわめて大量であり、多種類のタンパク質を対象

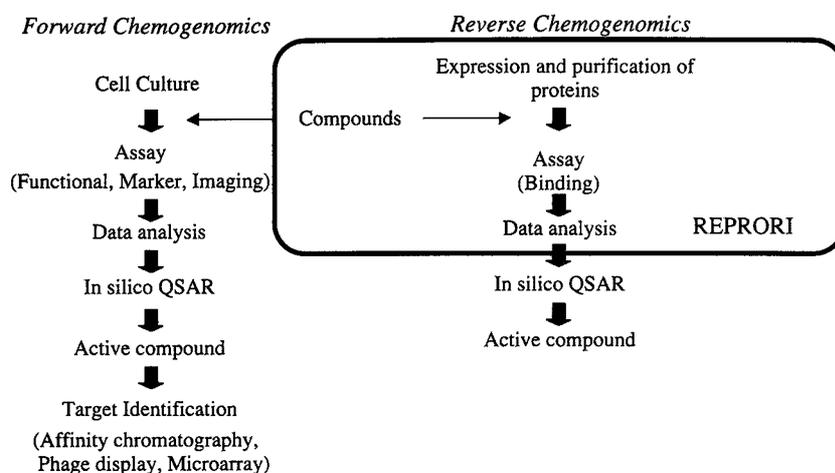


図2 フォワードケミカルゲノミクスとリバースケミカルゲノミクス。REPRORIでは枠で囲んだ部分の基盤技術を確立した。

とするスクリーニングには適さなかったことである。また、ピアコア法の場合には、タンパク質をセンサーチップに固定化することが必要であり、従来から数種類の固定化方法が開発されていた¹⁰⁾¹¹⁾が、タンパク質の種類によらず適用できるような汎用的な固定化方法がなかったことにある。そこで、われわれは、前者については従来の96-well spin columnに替えて384-well spin columnを自作して導入する等の徹底的な微小化を図ることにより、後者については汎用的なタンパク質固定化法を新規開発することにより、それぞれに改良を加えて、測定効率を10倍以上に高め、タンパク質-医薬品相互作用の網羅的なスクリーニングに適用可能な手法とすることに成功した¹²⁾¹³⁾。

さらに、相互作用スクリーニング実施にあたって、もっとも多大な労力を要したのは、対象とするタンパク質の発現精製であった。本研究では、主にヒト完全長cDNAクローンから発現させた組換えタンパク質を対象としたが、SEC-MS法では、技術改良により低減できたものの、依然として比較的大量の精製タンパク質が必要であった。たとえば、平均的な分子量3万のタンパク質と800種の医薬品との相互作用スクリーニングを実施しようとすると、精製タンパク質は約1mg必要になる。1,000種類のタンパク質についてこれだけの量を取得しようとする場合、コストと時間を考慮すると、発現系としては最も汎用的で安価な大腸菌*in vivo*法を用いざるをえない。しかし、大腸菌発現系で発現可溶化するタンパク質はきわめて限定されてしまう。本研究では約17,000個のcDNAクローンについて発現検討を行ったが、SEC-MS法に適用できるだけの精製タンパク質を確保できたのは、そのうちの約900個程度にすぎなかった。一方、

近年開発されたコムギ胚芽抽出液無細胞発現系¹⁴⁾では、GPCRのような多重膜結合型タンパク質を除けば、80%以上が可溶性タンパク質として得られることがわかった。ただし、この系では発現量が少ないことと、試薬のコストが非常に高いことが問題であった。そこで、本研究では、大腸菌で大量に発現可溶化できたタンパク質をSEC-MS法スクリーニングに適用し、それ以外で、特に薬剤標的としての有用性が高いと考えられるタンパク質については、コムギ胚芽抽出液無細胞系で発現して、微量のタンパク質でもセンサーチップへの固定化と相互作用スクリーニングが可能なピアコア法スクリーニングに適用することで、スクリーニング対象タンパク質を拡大すべく努めた(図3)。

また、GPCR等の膜受容体タンパク質については、これらの方法では発現させることが不可能であるため、動物細胞で発現させ、膜成分ごと可溶化した後に、ピアコアセンサーチップに固定化する方法を試みた。ケモカイン受容体CCR1をモデルとして予備検討した結果、活性を維持したCCR1をセンサーチップ上に固定化することには成功した¹⁵⁾が、このような固定化膜タンパク質に対する低分子化合物の結合を測定するためには、現状のピアコア装置では感度が不足していることが明らかになったため、本研究では膜受容体に対する相互作用スクリーニングは実施しなかった。

以上のように相互作用解析手法とタンパク質発現法を組み合わせ、約4年3カ月間のプロジェクト実施中に、約1,000種類のタンパク質と350~1,200種の医薬品の相互作用データの網羅的な取得を行った(図4)。これらのデータのなかから抽出され、再現性の確認された相互作用ポジティブペア約640個については、タンパク質、医

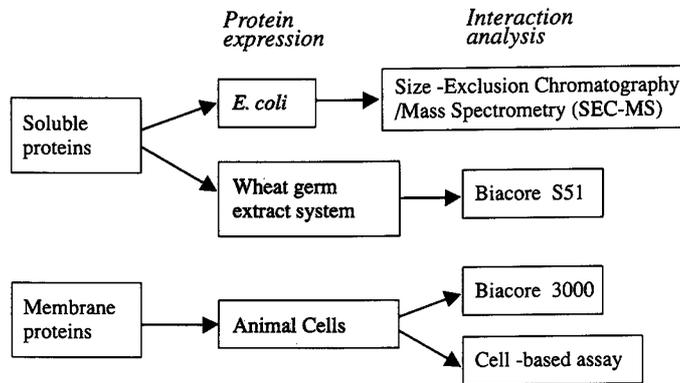


図3 REPRORIにおけるタンパク質発現系と相互作用スクリーニング系の関連付け

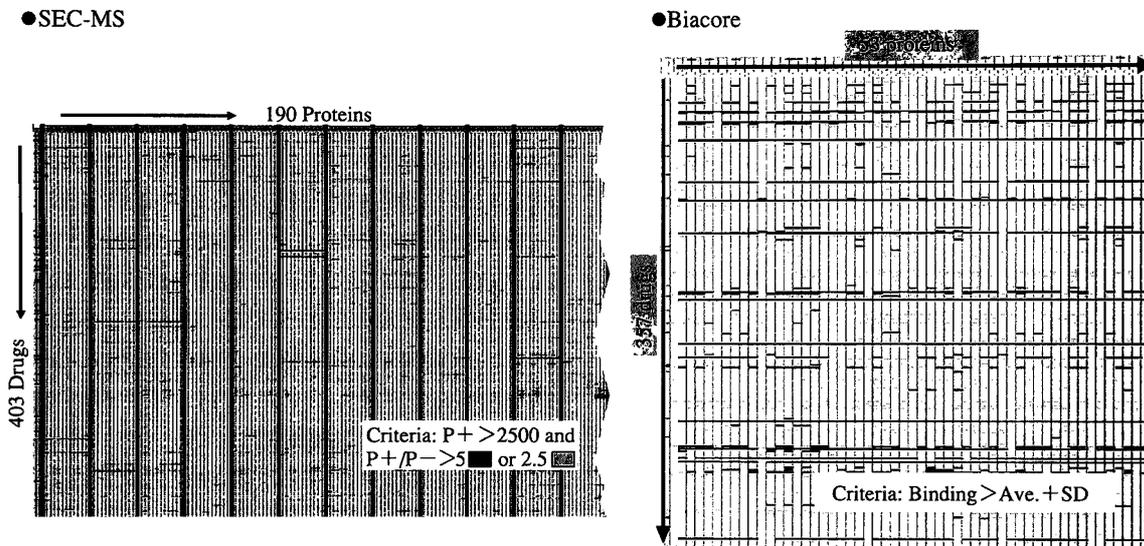


図4 SEC-MS法スクリーニングおよびピアコア法スクリーニングのマトリックス化したデータ。一定の基準で相互作用ありと判断されるタンパク質-医薬品ペアを色付けして示している。

薬品それぞれについての各種情報を併せた統合データベースを作成し、さらには種々のバイオインフォマティクス手法により、相互作用するタンパク質および医薬品の特徴を解析し、その結果を集約した新規創薬標的探索のための知識ベース構築を目指した。

本研究はNEDOからの委託研究期間終了に伴い、2006年3月末をもって終結した。作成されたヒトタンパク質-医薬品データベースには、従来になく新規の創薬標的に関連する情報が多数含まれている。本データベースは当面の間、REPRORI出資企業に優先的に開示され、各社それぞれが新規創薬テーマ創出に活用することになるが、近い将来には公共データベースとして公開されるものと考えられる。

3. ケミカルゲノミクスを用いた結核病治療薬探索の可能性

さて、周知のように結核菌についても1998年に全ゲノム配列が決定され¹⁶⁾、ゲノム長4.4 Mbのなかに、約4,000個の遺伝子が存在することが明らかになっている。また、結核菌ゲノムは機能を有する遺伝子の割合が高いことが特徴である。すなわち、たとえばハンセン病菌では機能をもつORFが全ゲノムの49.5%にすぎないのに対し、ヒト結核菌はORF全体の90.8%もが機能を有するORFである¹⁷⁾。

一方、これまで結核菌の細胞壁合成、必須アミノ酸合成、あるいはDNA代謝等に関与する約40種のタンパク質を標的とした創薬研究が行われている¹⁸⁾(表1)。また、そのうち *inhA*, *lysA*, *def*, *ramA* ~ *D*, *icl*, *pyrR*, *dfhrA* 等数種

表1 これまで薬剤標的として研究されてきた結核菌タンパク質¹⁸⁾

Cell wall biosynthesis	
Peptidoglycan biosynthesis	alanine racemase D-Ala-D-Ala ligase 2C-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate synthase
Arabinogalactan and liparabinomannan biosynthesis	arabinosyl transferase (EmbAB) galactofuranosyl transferase (Glf) mannosyl transferase inositol 1-phosphate synthase
Fatty acid metabolism and Mycolic acid biosynthesis	acyl carrier protein malonyl-CoA : AcpM transacyclase (FadD) b-ketoacyl-ACP synthases (FabH, KasA, KasB) ketoacyl reductase (MabA) enoyl-ACP reductase (InhA) mycolic acid cyclopropane synthase mycolyl transferases
Biosynthesis of essential amino acids and cofactors	shikimate kinase shikimate dehydrogenase 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase diaminopimelate decarboxylase (LysA) dihydrodipicolinate reductase glutamine synthetase regulator of glutamine synthetase dihydroforate reductase quinolic acid phosphoribosyl transferase NAD (+) synthetase
DNA metabolism	thymidine monophosphate kinase DNA polymerase (DnaE2)
Glyoxalate Bypass	isocitrate lyase
Regulatory proteins	regulator of glutamine synthetase regulator of a two-component regulator pair iron responsive regulator serine/threonine protein kinase-like (PknB)
Miscellaneous	deacetylase (MshB) CYP15-like 14-a-sterol demethylase

表2 これまで構造的な解析が行われた結核菌タンパク質¹⁹⁾

Target of Isoniazid	NADH-dependent enoyl-ACP reductase (InhA)
Amino acid biosynthesis	meso-diaminopimelate decarboxylase (LysA)
Protein synthesis	peptide deformylase (Def)
Cell wall biosynthesis	rahnose pathway (RmlA, RmlB, RmlC, RmlD) UDP-galactopyranose mutase (Glf)
Persistence	isocitrate lyase (Icl) protein that regulates expression of genes and operons of pyrimidine nucleotide biosynthesis (PyrR) dihydroforate reductase (DhfrA)

の結核菌遺伝子に由来するタンパク質に対しては、立体構造に基づく化合物とのドッキング解析が行われてきている¹⁹⁾(表2)。これら多大な努力が行われているとはいえ、対象とする遺伝子の数から考えれば、いまだ全体の1%にすぎないわけである。したがって、新規の結核病

治療薬がなかなか創出されないという状況のなかで、ケミカルゲノミクスの手法による標的タンパク質探索を検討することは意義あることではないだろうか。ここでいうケミカルゲノミクスの手法とは、前述したように、病原菌由来のタンパク質を個々に発現精製し、化合物との

相互作用を直接スクリーニングする方法を指す。そのためには、病原菌遺伝子に由来するタンパク質を網羅的に発現可溶化し、相互作用測定に必要な量を取得する必要がある。

前項で述べたように、コムギ胚芽抽出液無細胞発現系を用いれば、多重膜貫通型タンパク質を除外するかぎり80%以上のタンパク質を可溶性で取得することが可能である。現在まで、結核菌のタンパク質をコムギ胚芽抽出液無細胞系で網羅的に発現させる試みは未だなされていないようであるが、病因が細菌ではなく原虫であるという違いはあれ、疾患としての社会的な位置づけとしては結核菌と類似するマラリアについては、その原虫由来のタンパク質をコムギ胚芽抽出液無細胞系で網羅的に発現しようとする試みが、既に行われている²⁰⁾。今後この研究により、未知の薬剤標的タンパク質が発見されるか、大いに注目されることである。

また、病原菌由来のタンパク質を対象とする場合、細胞壁にインテグレートするタンパク質と化合物との相互作用解析が可能か否かも問題となろう。Coultonらは大腸菌タンパク質ではあるが、細胞壁タンパク質のFhuA受容体と、それに共役するタンパク質複合体の成分である細胞質膜タンパク質TonBとの結合をピアコアセンサーチップ上で再構成し、その結合様式を解析した結果を報告している²¹⁾。前述したように、残念ながら現状のピアコア装置では、このような細胞膜上のタンパク質複合体に対する低分子化合物の結合を測定するためには感度が不足しているが、ピアコアと類似の光学的相互作用解析技術で、その10倍以上の感度を有する装置も開発されてきており、近い将来に膜タンパク質を対象とした解析も可能になるものと予想される。

ところで、前項で述べたわれわれが取得した相互作用データにおいても、抗菌薬として使用されてきた化合物とヒトタンパク質との新規相互作用が多数見出されている。抗菌薬は本来ヒトタンパク質を標的として開発されたものではないため、当初はスクリーニングの対象から除外するという考え方もあったが、最近、ある種のβ-ラクタム系抗生物質がヒト神経細胞の保護作用があることが報告され²²⁾、医薬品としての新たな可能性が注目されていること等もあって、スクリーニングを実施した経緯がある。これらの相互作用は、抗菌薬のヒトへの投与時に惹起される副作用の原因に関わるものであるかもしれないし、さらには上記のdfhrAのように、ヒトタンパク質のオルソログである結核菌タンパク質との結合を示唆するものであるかもしれない。われわれの研究は終結したが、最初の項で紹介したように、世界的な動向として、今後、タンパク質-低分子化合物相互作用データが大量に取得され、データベース化されていくものと考え

られる。それらを活用したケミカルゲノミクスによる創薬への試みのなかで、有効な新規結核病治療薬が生み出されることを期待したい。

なお、株式会社リバース・プロテオミクス研究所における研究は、前述したようにNEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)からの研究委託により実施した。また、研究を実施するにあたり、独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センターの野村信夫先生、五島直樹先生、東海大学医学部の平山令明先生より多大なるご支援とご助言をいただいた。ここに深く感謝したい。

文 献

- 1) <http://nihroadmap.nih.gov/>
- 2) <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 3) <http://www.broad.harvard.edu/about/bios/bio-schreiber.html>
- 4) Bredel M, Jacoby E: Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. *Nature Reviews*. 2004; 5: 262-275.
- 5) Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al.: HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002; 417: 455-458.
- 6) Yoshida M, Kijima M, Akita M, et al.: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J Biol Chem*. 1990; 265: 17174-17179.
- 7) http://www.pref.chiba.jp/business/kazusa/hotline/vol39/pdf/39_6.pdf
- 8) <http://www.nedo.go.jp/kankobutsu/focus/21/3-2.pdf>
- 9) Moy FJ, Haraki K, Mobilio D, et al.: MS/NMR: a structure-based approach for discovering protein ligands and for drug design by coupling size exclusion chromatography, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Chem*. 2001; 73: 571-581.
- 10) Johnsson B, Lofas S, Lindquist G: Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem*. 1991; 198: 268-277.
- 11) Gershon PD, Khilkos S: Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *J Immunol Method*. 1995; 183: 65-76.
- 12) Yamauchi T, Tsuchiya K, Sueoka H, et al.: High-throughput screening system for evaluation of the interactions between small molecule drugs and proteins expressed from cDNA Gateway clones using size-exclusion chromatography coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2004; 3: S199.
- 13) Inomata N, Inagawa J, Tsutsumi T, et al.: Stable immobilization of His-tagged proteins with successive Ni²⁺-nitrilotriacetic acid-chelating and amine-coupling. *Mol Cell Pro-*

- teomics. 2003 ; 2 : 865.
- 14) Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, et al.: A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 ; 97 : 559-564.
- 15) 廣木孝典, 猪股則行, 末岡英明, 他: SPR バイオセンサーによる汎用的な GPCR リガンドスクリーニング方法の検討. 第27回日本分子生物学会年会要旨集. 2004, 897.
- 16) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998 ; 393 : 537-544.
- 17) 林 英生: 病原細菌ゲノム配列解析が明らかにした微生物科学の新たな可能性. 実験医学. 2003 ; 21 : 1591-1597.
- 18) Duncan K: Identification and validation of novel drug targets in tuberculosis. Curr Pharm Des. 2004 ; 10 : 3185-3194.
- 19) Kantardjieff K, Rupp B: Structural bioinformatics approaches to the discovery of new antimycobacterial drugs. Curr Pharm Des. 2004 ; 10 : 3195-3211.
- 20) <http://www.ehime-u.ac.jp/~cellfree/proteomedical/malaria.html>
- 21) Khursigara CM, De Crescenzo G, Pawelek PD, et al.: Enhanced binding of TonB to a ligand-loaded outer membrane receptor: Role of the oligomeric state of TonB in formation of a functional FhuA·TonB complex. J Biol Chem. 2004 ; 279 : 7405-7412.
- 22) Rothstein JD, Patel S, Regan MR, et al.: Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. Nature. 2005 ; 433 : 73-77.

3. 抗酸菌症治療薬と drug delivery

長崎大学医学部第二内科 泉川 公一, 大野 秀明, 河野 茂

はじめに

WHOの報告では, 結核に対する対策を強化しないかぎり, 全世界的に2002年から2020年までの間に, 3600万人が結核死するであろうと警告している。一方, わが国における2003年度の統計では, 全結核の新登録患者数は31,638人(罹患率24.8)と報告されており, 結核はわが国を含め依然として重要な感染症である。

様々な医療技術が発達, 改良される一方, 結核症に対する抗菌薬の開発はきわめて遅れており, 過去30数年以上も新規の化学構造と作用機序を併せもつ抗結核薬がほとんど開発, 臨床応用されていないのが現状である。また, 近年, 問題となっている多剤耐性結核に対し現時点では有効な抗菌薬が存在しないことや, わが国でも患者数の増加傾向が認められる *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症に対し有用な抗菌薬が少ないなど, 抗酸菌感染症の治療には様々な問題がある。さらに, 抗酸菌症が他の多くの感染症と大きく異なる点としては, 長期にわたり複数の薬剤を使用しなければならない特殊な治療が必要で, 患者の服薬コンプライアンスがきわめて不良であることも重要な問題である。コンプライアンスが不良なために, 単剤治療や, 短期で治療を中断すると, 菌の薬剤耐性化につながり, 治療を困難にするのみならず, 公衆衛生上もきわめて問題である。

新規抗結核薬に関しては, diarylquinoline (R207910), nitroimidazopyran (PA-824) や rifalazil (KRM-1648) などの抗菌薬や, すでに臨床使用可能な 8-methoxyquinolone,

oxazolizone などが新たな抗酸菌薬として期待されている。抗酸菌薬に求められる要件として, ①長期間投与による毒性が少ないこと, ②比較的抗酸菌のみに対し抗菌活性をもつこと, ③体内動態において細胞内移行性・肺内移行性に優れていること, ④既存の薬剤と交差耐性がないことなどが重要であるが, これらの点をすべて備えた薬剤はいまだ存在しない。

薬剤輸送システム (drug delivery system: DDS) は, 様々なテクノロジーを駆使し既存の薬剤を修飾し, 標的臓器における抗菌薬の濃度上昇や, 服薬回数を減らしてコンプライアンスを向上させ, より少量の薬剤で, より短時間に, 安全, 簡単, かつ効果的な治療につながるものとして期待されている。

本稿では, 抗酸菌症治療薬の DDS について, 現在までの報告を中心に, われわれの検討も一部紹介しながら総説する。

Drug Delivery System

DDSとは, 「薬物治療の最適化を目的として, 生体を物質動態の視点よりひとつのシステムととらえ, その特性解析を通じて薬物体内動態の精密制御をはかる薬物投与技術」をいう。具体的には, 目標とする患部(臓器や組織, 細胞, 病原体など)に薬物を効果的かつ集中的に送り込む技術や, 薬剤を膜などで包み, 途中で吸収・分解されることなく患部に到達させ, 患部で薬剤を放出して治療効果を高める技術の総称であり, 「薬物送達システム」, 「薬物輸送システム」などとも呼ばれる。これら

システムの応用により、効果の増強・発現（投与量削減、適用拡大）は言うまでもなく、副作用が軽減され、安全域が拡大（QOLの改善）し、使用性の改善（患者負担の軽減、コンプライアンス向上）、薬理活性の分離（新規医薬品の創出）、経済性（医療費削減、研究・開発の効率化）向上につながると考えられる。現在、主要なシステムとしては Fig. 1 に示すような技術、方法がある。大別すると、①放出技術、②標的化技術、③吸収抑制技術などであり、このうち、抗酸菌治療に応用されている主なシステムとしては、薬剤放出ならびに標的化を狙ったリポゾーム技術、薬剤放出の中でも特に効果的放出を狙った微粒化技術（マイクロ粒子、ナノ粒子）などであり、基礎的なデータも蓄積されつつある。

Liposome 製剤

リポゾームは、リン脂質を主体とした二重の被膜をもつ小球状分子で、被膜に化学的な修飾を付加することにより、より良好な細胞内移行性を目指したものである。水溶性物質、脂溶性物質など種々の薬剤を封入することが可能で、近年、最も研究の進んだ技術の一つである。感染症領域では、抗真菌剤である amphotericin B (AMPH-B) のリポゾーム製剤が、すでに実用化されており、2006年に日本でも上市された。AMPH-Bは古典的な抗真菌剤で、安価なうえに、抗真菌スペクトルが広く、かつ良好な抗真菌活性を示す優れた薬剤である。しかし、悪寒、発熱、悪心、血管炎、電解質異常、腎機能異常などの重篤な副作用が高頻度に出現する。実際の診療においては、これら副作用のために至適治療域で治療で

きないことが多い。AMPH-Bのリポゾーム製剤 (Ambisome®) は、AMPH-B使用の臨床的な limiting factorである腎機能障害の発現が AMPH-Bの約半分であると報告¹⁾されており、腎機能異常以外の副作用発現についても大幅に軽減されており、投与を中止せざるをえないような症例はまれで、ほとんどが可逆性であったと報告されている²⁾。深在性真菌症治療において非常に期待されている薬剤である。

抗酸菌治療におけるリポゾーム製剤の検討について、われわれの教室ではリポゾーム封入ストレプトマイシンとアミカシンの実験的マウス結核症における治療効果について検討した。リポゾーム化していない50 mg/kg/日のストレプトマイシン、アミカシンそれぞれの単剤による治療群に比較して、同量のリポゾーム化製剤による治療群で、有意に生存率が延長しており良好な治療成績を示した (Fig. 2)。また、Labanaらの報告では、key drugであるイソニアジド (INH)、リファンピシン (RFP) をリポゾーム化した薬剤を使用し検討している。すなわち、*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rvのマウス感染モデルに、stealth liposomeに封入したINHとRFPを、1回/週、6週間、経静脈投与し治療を行った。リポゾーム製剤による治療群において、治療後の肺、肝臓、脾臓における菌量が、非リポゾーム製剤による治療群に比較して統計学的に有意に減少し、有効な治療成績を示した³⁾ (Fig.3)。

リポゾーム製剤は、すでに抗真菌剤でも応用されている技術であり、動物モデルにおける検討も様々な角度から行われており、投与回数の減少、投与量の減量、毒性の軽減などが認められ、有用性が高いことを支持する報

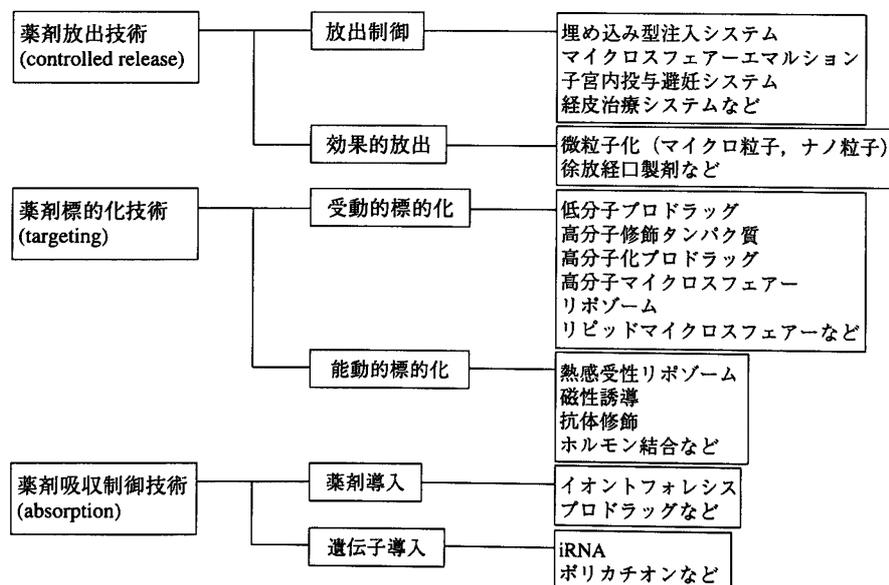


Fig. 1 Drug delivery system

告が多く見受けられる。

Polymer based DDS

Polymer based DDSとは、microparticleやnanoparticleなどの生体内で分解する高分子物質であるマトリックスを用いた製剤であり、この微小球体中に薬剤、酵素、抗体などを分散させたものである。マトリックスは、thermo-plastic aliphatic poly (esters), poly lactide (PLA), poly glycolide (PGA), copolymer of lactide and glycolide, poly (lactide-co-glycolide) (PLGA)などのsynthetic matrix, より生体への副反応が抑えられたalginate acid, chitosan, gelatinなどのnatural matrixに分類される。これらpolymer based DDSの最大の特徴は、良好な細胞内移行を示すこと、薬剤放出を制御することが可能になった点である。抗酸菌は、肺胞マクロファージ内に寄生・増殖するため、その治療において抗菌薬が増殖の場である細胞内に十分に移行することはきわめて重要である。microparticleやnanoparticleは文字どおり、その径がそれぞれ1~1000 μm , 10~1000 nmであるものを指す。一般的に径が1~10 μm であれば、マクロファージに取り込まれるサイズであり、このサイズを用いた製剤は経口、静脈投与に適すると考えられている⁴⁾。さらに、その径が7 μm 以下になれば、Kupper細胞や肺胞マクロファージにも貪食されるサイズとなり、投与経路としては吸入も可能となる⁵⁾。

経口 microparticle製剤

Ul-Ainらは、INH, RFP, ピラジナミド (PZA) を含有したmicrosphere製剤を用いた検討を行い、*M. tuberculosis* H₃₇Rvマウス感染モデルにおいて、PLG-microsphereを用

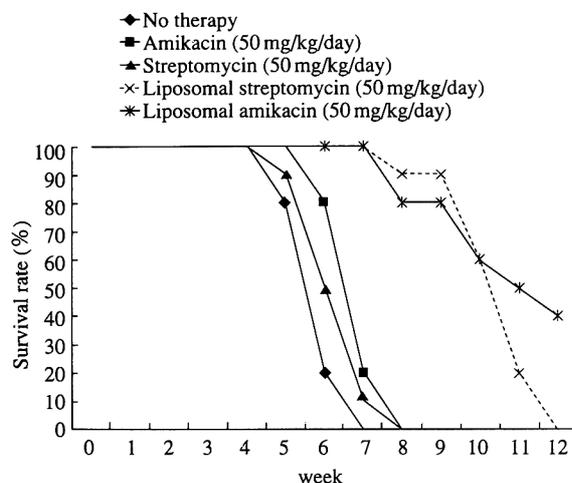


Fig. 2 Efficacy of liposomal streptomycin and amikacin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice

い、1回/週、5週間、経口投与した群と、被修飾薬を連日、5週間、経口投与したコントロール群とで比較した。治療後の肺、肝臓、脾臓における菌量にて比較したところ、PLG-microsphere製剤を使用した群は、わずか5回の投与で、コントロール群とほぼ同等の治療成績を示した⁶⁾ (Fig. 4)。また、より副反応の少ないと思われるalginate-chitosan microsphere製剤による*M. tuberculosis* H₃₇Rvモルモット感染モデル実験による検討では、INH, RFP, PZAを被修飾薬とし、1回/10日、計5回、経口投与した群と、被修飾薬の含有量を半量にし、1回/7日、計7回、経口投与した群、ならびに、被修飾薬を連日、46日間、経口投与したコントロール群とで比較した。治療後の肺、脾臓における菌量の比較では、microsphere製剤投与群においても、コントロール群とほぼ同等の菌量の減少を認め、非劣性が確認できた⁷⁾ (data not shown)。これらのデータはいずれも、microparticle製剤

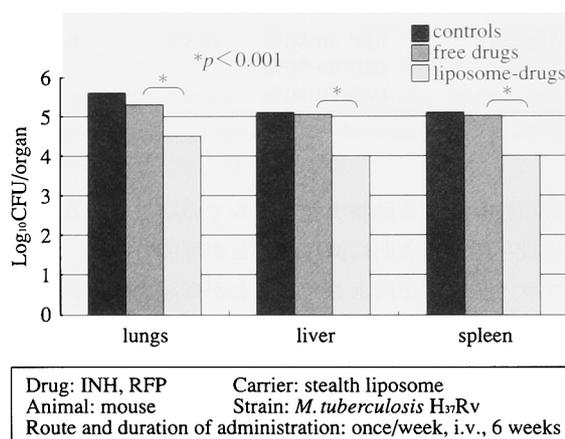


Fig. 3 Efficacy of liposomal isoniazid and rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice

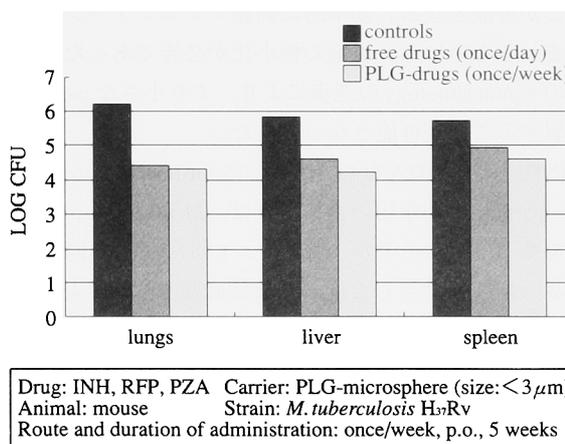


Fig. 4 Efficacy of (lactide-co-glycolide) microparticles containing isoniazid, rifampin and pyrazinamide *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice

Table Salient features of inhalable anti-tubercular drugs delivery system in experimental animal models

	Drug loading	Respirable aerosols	Median aerodynamic diameter (μm)	Animal	Duration of sustained drug release		Referene
					Plasma	Lungs	
Liposomes							
Conventional	RFP 22% INH 14%	94%	0.96	guinea pigs	2 days	5 days	JAC. 2005 ; 55: 430.
Ligand-appended	RFP 40%	NR	NR	rats	NR	≥ 1 days	Int J Pharm. 2004 ; 269 : 37.
Microparticles							
PLG	RFP 30%	NR	2.76	guinea pigs	<3 days	3 days	Pharm Res. 2001 ; 18 : 1315.
PLA	RFP 11% INH 4%	38%	6.2	rats	NR	NR	Pharm Res. 2004 ; 18 : 1405.
DPP	PAS 95%	63%	7.07	rats	<3 h	≥ 3 h	Tuberculosis. 2003 ; 83 : 379.
Nanoparticles							
PLG	RFP 60-70% INH 60-70% PZA 60-70%	96%	1.88	guinea pigs	6-8 days	9-11 days	JAC. 2003 ; 52 : 981.
Lectin-PLG	RFP 60-70% INH 60-70% PZA 60-70%	88%	2.8	guinea pigs	6-14 days	15 days	JAC. 2004 ; 54 : 761.
Solid lipid	RFP 40-50% INH 40-50% PZA 40-50%	95%	1.8	guinea pigs	5 days	7 days	Tuberculosis. 2005 ; 85 : 227.
Alginate	RFP 80-90% INH 70-90% PZA 70-90%	80.5%	0.4-2.1	guinea pigs	10-14 days	15 days	Int J Antimicrob Agents. 2005 ; 26 : 298.

の経口投与による動物実験モデルでの結果であるが、ともに投与回数を著明に減らすことが可能であり、服薬コンプライアンスを向上させることが確認できた。

吸入 nanoparticle 製剤

抗酸菌が肺の肺胞マクロファージに感染するという点において、DDSが最も効果的に作用すると思われる投与方法は吸入療法であると思われる。すなわち、抗酸菌治療薬を含有した nanoparticle 製剤が直接的に感染の場に取り込まれ、理論的にはきわめて効率的に治療を行うことが可能となる。効率的に肺胞マクロファージに取り込まれるためには、製剤の極小化が必要であったが、最近の nanotechnology の進歩により、より小さな particle を作製することが可能となってきた。

INH, RFP, PZA を含有した lectin-functionalized PLG nanoparticle 製剤を用いた検討では、*M. tuberculosis* H₃₇Rv モルモット感染モデルにおいて、1回/2週、3回、経口あるいは経肺投与した群と、被修飾薬を連日、45日間、経口投与したコントロール群とで比較した。bioavailability の検討では、nanoparticle 製剤を経肺投与した群は、経口投与群には及ばなかったものの、コントロール群に比較してきわめて良好な成績を示した (data not shown)。また、治療成績についても、治療後の肺、脾臓における菌量の比較で、経口、経肺投与にかかわらず、わずか3回の投与で、45日間の連続投与を要したコントロール

群とはほぼ同等の除菌率を示した⁸⁾(data not shown)。また、alginate nanoparticle 製剤を用いた同様の検討においても、優れた薬剤の臓器移行性、血中停滞率を示し、かつ、投与回数を著明に減らすことができたと報告されている⁹⁾。結核感染動物モデルにおける DDS を利用した吸入治療成績のまとめを Table に示すが、マトリックスが小さいほど吸入効率が上昇し、それに伴い、血中ならびに肺内での薬剤放出期間が延長され、服薬コンプライアンスが有効になる可能性があることが多数の研究から証明されている¹⁰⁾。

まとめ

抗酸菌治療薬に DDS を応用した研究の結果について総説した。liposome 製剤、polymer based 製剤の発達により、局所、あるいは血中における高い薬物濃度を維持することが可能となった。また、放出コントロールにより、より少ない投与回数で、被修飾薬と同等の治療効果が得られるようになった。これらの DDS 技術は抗酸菌治療において、きわめて有用な技術であると思われるが、一方、本来、生体内で速やかに代謝、排泄されるべき薬剤が長時間、かつ高濃度で体内に存在することにもなる。それに伴い、副作用の発現頻度が高くなる可能性、あるいは、途中で薬剤投与を中断できないために、副作用をコントロールできなくなるジレンマも存在する。また、本稿で示した研究成果は、いずれも動物実験

によるデータであり、実際にヒトで検討された報告はないのが現状である。修飾をうける抗酸菌症薬のみならず、liposomeやマトリックスによる予期せぬ副作用も出現する可能性もある。さらには、薬剤の作製コストも無視できない問題であり、今後、DDS製剤が臨床レベルで実用化されるまでには、解決されるべき問題がある。しかしながら、DDS技術が既存の薬剤の効果を十二分に引き出す技術であることに疑いの余地はなく、今後も、より多角的な検討を進め、抗酸菌感染症の撲滅につながる新しい製剤が生み出されることを期待する。

文 献

- 堀口祐司, 岡 陽子, 前崎繁文: リポ化アムホテリシン B. 化学療法の領域. 2003; 19: 215-220.
- Roden MM, Nelson LD, Knudsen TA, et al.: Triad of acute infusion-related reactions associated with liposomal amphotericin B: analysis of clinical and epidemiological characteristics. Clin Infect Dis. 2003; 36: 1213-1220.
- Labana S, Pandey R, Sharma S, et al.: Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. Int J Antimicrob Agents. 2002; 20: 301-304.
- Barrow EL, Winchester GA, Staas JK, et al.: Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 2682-2689.
- Quenelle DC, Staas JK, Winchester GA, et al.: Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 1144-1151.
- ul-Ain Q, Sharma S, Khuller GK: Chemotherapeutic potential of orally administered poly (lactide-co-glycolide) microparticles containing isoniazid, rifampin, and pyrazinamide against experimental tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 3005-3007.
- Pandey R, Khuller GK: Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. J Antimicrobial Chemother. 2004; 53: 635-640.
- Sharma A, Sharma S, Khuller GK: Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized anti-tubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. J Antimicrobial Chemother. 2004; 54: 761-766.
- Zahoor A, Sharma S, Khuller GK: Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. Int J Antimicrob Agents. 2005; 26: 298-303.
- Pandey R, Khuller GK: Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. J Antimicrobial Chemother. 2005; 55: 430-435.

4. 抗酸菌感染症の免疫補助療法

島根大学医学部微生物・免疫学 清水 利朗, 佐藤 勝昌, 富岡 治明

はじめに

近年、多剤耐性結核や AIDS などでの宿主免疫能の低下に起因する結核や MAC 症の増加、難治化に対処するために、既存のものよりも強力かつ交差耐性のない新規抗結核薬、抗 MAC 薬の開発が急務となっている。現在までに結核菌に対して抗菌活性を有する多くの新規抗菌薬が報告されてきており、開発が進められてきているが、新しい抗結核薬の将来展望は必ずしも開かれたものとは言い難い状況にある¹⁾。従って、こうした現状においては、現時点で利用しうる抗菌薬による治療効果を何らかの補助剤を用いて増強させるようなレジメンを開発してみることもまた1つの方策ではないかと思われる。このような取り組みの1つとして、既存の抗菌薬による化学療法に何らかの immunomodulator を併用して、抗菌薬の治療効果を高めようとするいわゆる免疫補助療法の試みが進められている²⁾。

抗酸菌感染宿主におけるサイトカイン (CK) ネットワークと感染抵抗性発現のメカニズム²⁾³⁾

Fig. は最近の知見をもとに抗酸菌感染宿主での様々な免疫調節 CK のカスケードを描いたものであるが、この CK ネットワークの中ではマクロファージ (MΦ) や樹状細胞などが産生する IL-12, IL-23, IL-18, IL-27, TNF- α , IL-1, IL-7, IL-15 などの CK による stimulatory signal を受けた Th1 細胞や NK 細胞の分化・活性化とそれらの細胞から産生される IFN- γ , TNF- α , GM-CSF などによる MΦ の活性化あるいはそれらの CK の直接作用による MΦ の活性化が抗酸菌感染宿主における感染免疫の成立や感染抵抗性の発現にとって重要である²⁾⁴⁾。他方、免疫抑制性カスケードについては、Th2 細胞, NK1.1⁺T 細胞あるいは CD19⁺/B220⁺B 細胞さらには好中球などからの IL-4, ならびに Th2 細胞あるいは抗酸菌感染 MΦ から産生される IL-10, IL-13, TGF- β やプロスタグランジン E が抗酸菌の滞留性あるいは抗酸菌の持続感染により招来される免疫不応性の成立に重要な役割を演ずるものと

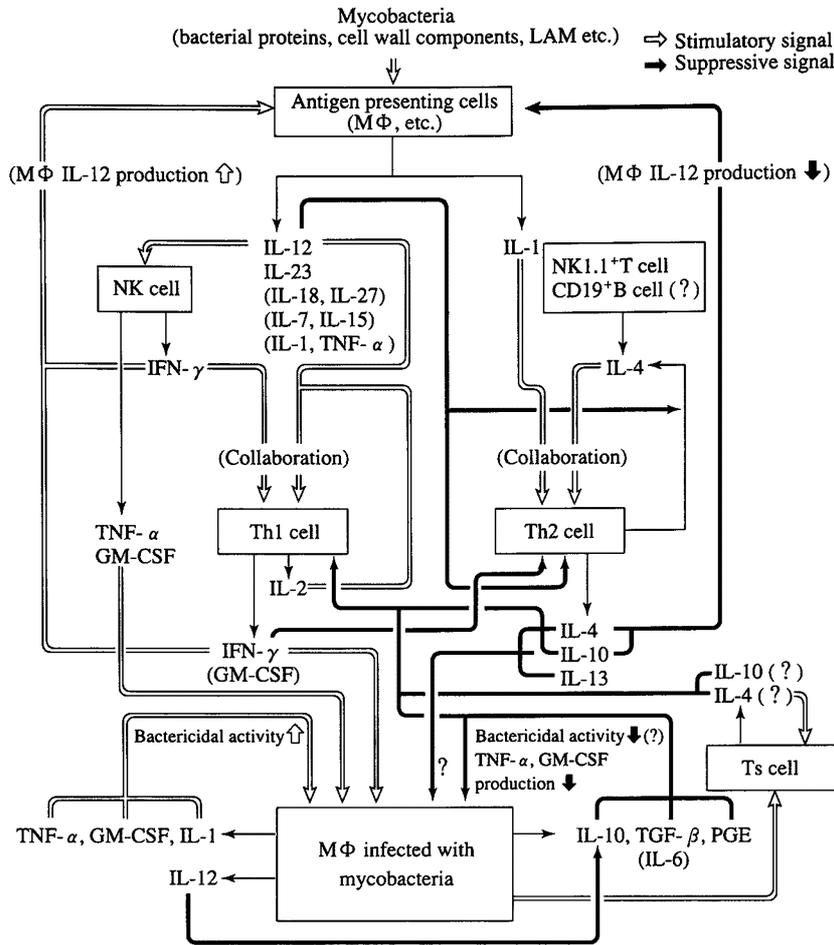


Fig. Cytokine network in the hosts with mycobacterial infection
 In this cytokine network, the cytokines such as IL-12, IL-18, which are required for the induction/activation of Th1 cells, and Type I cytokines including IFN- γ and IL-2 play crucial roles in the expression of host resistance against mycobacterial infections. In addition, immunosuppressive/M Φ deactivating cytokines or humoral factors, such as IL-4, IL-10, TGF- β and prostaglandin E (PGE), which are produced by Th2 cells, Ts cells and M Φ s, seem to play important roles in the establishment of immunodeficiency due to persistent and advanced infection with mycobacterial pathogens.

考えられている²⁾。最近, Lingnauらにより, 低濃度~中濃度の IL-4は TGF- β との協同作用により IL-12によるものとは別の経路で Th1細胞の活性化に働くとする成績が報告されているが, このことは, 上述の免疫抑制性CKもまた条件によっては宿主感染防御免疫の維持に向けての正の feedback 効果を担う可能性を示すものであり, 抗酸菌感染宿主における CK ネットワークの複雑なプロフィールの一端がうかがわれる。

CK と CK 阻害剤を用いた免疫補助療法

(1) Th1, Th1 様 CK

Table 1 のような諸種免疫増強 CK を用いての免疫補助療法の試みが進められている。いずれの CK にも結核(特に多剤耐性結核)や AIDS 患者に発症した全身播種性

MAC 感染症に抗菌薬との併用で投与した場合に, 抗菌剤による治療効果のある程度の増強が認められている²⁾⁵⁾。しかしながら, これらの CK を用いての免疫補助療法には, ① CK 製剤が非常に高価であること, ②しばしば重い副作用を伴うこと, ③これらの CK の長期投与に伴い往々にして, かえって IL-10, IL-13, TGF- β などの免疫抑制 CK が強く誘導されてしまい, ひいては宿主 M Φ の感染抗酸菌に対する殺菌活性の減弱が招来される可能性が高いことなどの問題点が残されている。

(2) CK 阻害剤

免疫抑制 CK 阻害剤 (Table 1) としては, TGF- β 阻害剤である decorin や TGF- β の latency 関連ペプチドがあり, 一部の結核患者で問題となる T細胞や M Φ の細胞機能の低下を解除するような作用が報告されている²⁾⁶⁾。

Table 1 Promising cytokines and their inhibitors useful for adjunctive immunotherapy of mycobacterial infections

Agents	Remarks	References
1. Cytokines		
1) IFN- γ (sc, im, id injection)	Active against disseminated MAC infection Active against MDR-TB of the brain when given in combination with GM-CSF	Squires, 1989, 1992, Holland, 1994 Raad, 1996
IFN- γ (aerosol)	Active against MDR-TB	Condos, 1997
2) IFN- α (sc)	Active against MDR-TB	Palmero, 1999
IFN- α (aerosol)	Active against pulmonary TB	Giosue, 1998, 2000
3) IL-2 (id)	Active against MDR-TB	Johnson, 1995, 1998
4) GM-CSF (sc)	Active against disseminated MAC infection Potentiation of M Φ anti-MAC and anti- <i>M. kansasii</i> antimicrobial activity Active against idiopathic disseminated BCG infection	Appelberg, 1993, Bermudez, 1994 Bermudez, 1994, Kemper, 1998 Sanal, 2000
5) IL-12 (sc)	Active against refractory <i>M. abscessus</i> infection Up-regulation of IFN- γ production by T cells	Holland, 1998 Zhang, 1994, Doherty, 1998
6) IL-18	Up-regulation of IFN- γ production by T cells	Biet, 2002
7) Recombinant BCG secreting IL-2, GM-CSF, IFN- γ , or IL-18	Potentiation of host Th1 cell-mediated immunity specific to mycobacteria (PPD response, T cell growth, cytokine production)	Murray, 1996, Biet, 2002
2. Inhibitors of immunosuppressive/MΦ-deactivating cytokines		
1) TGF- β inhibitors		
(1) Decorin	Inactivation of TGF- β	Yamaguchi, 1990
(2) Latency associated protein of TGF- β	Restoration of T cell responses in TB patients and augmentation of M Φ effector function	Flaumenhaft, 1993, Hirsch, 1997
2) Anti-IL-10R antibody (ip)	Potentiation of the anti-MAC therapeutic activity	Silva, 2001
3) Chinese traditional medicine Yokuinin	Suppression of IL-10 production by MAC-infected host M Φ s	Tomioka, 1999
3. Inhibitors of proinflammatory cytokines		
1) Corticosteroids		
	Efficacious in controlling tuberculous meningitis, pericardial and pleural disease Active against disseminated MAC infection in AIDS patients	Horne, 1966, Alzeer, 1993 Wormser, 1994, Dorman, 1998
2) Thalidomide	Promotion of clinical improvement of pulmonary TB and tuberculous meningitis	Tramontana, 1995, Schoeman, 2000

また、抗 IL-10 受容体抗体やある種の漢方薬（ヨクイニン）に MAC 感染宿主 T 細胞の IFN- γ 産生能の増強作用や MAC 感染 M Φ による IL-10 発現の抑制作用が報告されている²⁾。他方、組織障害性・炎症性 CK に対する阻害剤（Table 1）としては、corticosteroid や thalidomide が実際に臨床の場で使用され、あるいは治験が進められている。しかしながら、抗 TNF- α 抗体製剤や TNF 受容体製剤などの使用による結核の活性化の問題点も指摘されており²⁾、宿主の抗結核免疫に重要な役割を演じている TNF- α をブロックするような治療法にはかえって結核や MAC 症の重篤化を招くといった側面もあることにも十分に注意を払う必要があるといわれている。

新しいタイプの immunomodulator を用いた免疫補助療法

現在、Table 2 にリストアップしたような immunomodulator が開発されつつあるが、いずれも強弱の差こそあれ、抗酸菌感染宿主の Th1 細胞、NK 細胞、M Φ の活性化作用、あるいは M Φ の免疫抑制 CK 産生能の阻害活性などを有している。以下に抗酸菌感染症に対する化学療法の免疫補助剤として特に有望な immunomodulator について紹介する。

(1) ATP とその誘導体

ATP およびその誘導体は P2 レセプターを介して様々

Table 2 Promising immunomodulatory agents useful for adjunctive immunotherapy of mycobacterial infections

Agents	Remarks	References
1. ATP and its analogues	Potential of M Φ activity against mycobacterial organisms via P2X ₇ or P2Y receptors Active against MAC infection in mice (ATP alone and ATP in combination with CAM/RFP)	Lammas, 1997 Sikora, 1999 Kusner, 2000 Stober, 2001 Fairbairn, 2001 Tomioka, 2003, 2005
2. Picolinic acid	Potential of M Φ anti-MAC activity of host M Φ s	Pais, 2000 Tomioka, 2006
3. Imidazoquinoline derivative S28463	Potential of host resistance to BCG infection in mice and enhancement of M Φ RNI production in collaboration with IFN- γ	Moisan, 2001
4. Diethyldithiocarbamate	Potential of antimycobacterial activity of human monocyte-derived M Φ s	Hubner, 1991
5. Poloxamer CRL-1072	Potential of M Φ anti-MAC activity and RNI producing activity	Jagannath, 1999, 2000
6. Dibenzopyran FCE 20696	Potential of host resistance to MTB infection in mice	Verini, 1989
7. α -Galactosylceramide	Potential of host anti-MTB resistance through activation of CD1d-restricted NKT cells, which in turn inhibit intramacrophage growth of MTB	Chackerian, 2002 Gansert, 2003
8. Diclofenac sodium	Potential of the therapeutic efficacy of rifalazil against MAC infection in mice by reducing TNF- α levels	Tomioka, 1999
9. Secretory leukocyte protease inhibitor	Potential of anti-MAC antimicrobial activity of host M Φ s and suppression of M Φ TNF- α production	Tomioka, 1999
10. Chinese traditional medicine Mao-Bushi-Saishin-To	Potential of the therapeutic efficacy of rifalazil against MAC infection in mice and enhancement of M Φ anti-MAC activity	Tomioka, 1999
11. Levamisole	Restoration of T cell functions in disseminated TB patients due to immune deficiency in association with chemotherapy for leukemia	Taki, 1994
12. Calcitriol	Induction of maturation of host M Φ s and down-regulation of M Φ production of TGF- β	Kruetz, 1990 Denis, 1991
13. Triton WR-1339	Potential of host resistance to mycobacterial infection in mice	Kondo, 1986
14. Glucosaminyl MDP	Potential of host resistance to MTB infection in mice and reduction of spontaneous relapse following chemotherapy	Venkataprasad, 1997
15. Synthesized bacterial oligo DNA	Potential of host resistance to MAC infection in mice and augmentation of M Φ anti-MAC activity and Th1 response	Hayashi, 2001
16. DNA vaccine expressing MTB HSP65 or IL-12	Potential of host resistance to MTB infection in mice, elimination of MTB organisms after chemotherapy, and switching host immune response from Th2 type to Th1 type	Lowrie, 1999
17. Heat-killed <i>M. vaccae</i> (SRL 172)	Efficacious in increasing treatment outcome of standard chemotherapy of TB patients, presumably by converting a pathogenic form of immune response to a protective response and switching host mycobacterial immunity toward Th1 responses	Stanford, 1990, 1994, 1995, 2001 Johnson, 2000 Dlugovitzky, 1999

な細胞に作用し、細胞機能の変化を促すことが知られている。最近、ATPには、M Φ に対してP2レセプター、特にP2X₇レセプター依存性に作用し、M Φ の結核菌やBCG菌に対する殺菌能を増強するといった作用が報告

されている⁷⁾。ATP処理をうけたM Φ では、細胞内に局在するBCG菌が速やかに殺菌されていくが、この現象はATPによって誘導されるアポトーシスと並行している⁷⁾。またこのようなM Φ 内でのBCG菌の殺菌とM Φ

のアポトーシスは、ATPやP2X₇レセプターの agonist である benzoylbenzoic ATP (BzATP) などにより強く誘導されるが、その他のヌクレオチドでは誘導されない。このような ATP の作用の発現には、どのようなシグナル伝達系が関与しているのかについては、Lammas らの検討で P2X₇や P2Y₂の活性化に連動した細胞質 Ca²⁺濃度の増加が、MΦの BCG 菌や結核菌に対する殺菌の亢進に必須であることが明らかにされている。われわれも、ATP の MΦの抗 MAC 活性に及ぼす作用についての検討を進めているが、ATP または BzATP で MΦを処理した場合、これら単独では効果はみられないが、これに Ca²⁺イオノフォアを併用して作用させることにより、MΦの抗 MAC 活性が有意に増強されることを見出している。また ATP や BzATP による処理により、細胞質型ホスホリパーゼ A₂が MΦ内局在 MAC 菌体周囲へトランスロケーションすることから、ATP 処理により MΦの遊離脂肪酸依存性の殺菌機構が動員される可能性が考えられる。さらにマウス MAC 感染症に対する抗菌薬治療への ATP の併用効果についてみてみると、肺・脾内生菌数の変化を指標としての CAM/RFP による治療効果は、ATP の併用投与で有意に増強することが明らかになっている⁸⁾。

(2) ピコリン酸

ピコリン酸は、Zn²⁺や Fe²⁺などの金属イオンに対して chelating 活性を有し、腸管からの Zn²⁺の吸収を促進する薬理作用が知られている。最近 Pais らにより、このピコリン酸を MAC 感染 MΦに作用させた場合には、アポトーシスが誘導されるが、これに連動して MΦ内局在 MAC 菌の強い増殖抑制がみられることが報告されている。われわれの検討でも、ピコリン酸には MΦ内局在 MAC 菌に対する CAM/RFP 合剤やキノロンの抗菌活性を増強する作用が認められている⁹⁾。

(3) Imidazoquinoline S28463

S28463 は抗ウイルス活性、抗腫瘍活性、アジュバント活性を有する imidazoquinoline 系薬剤であるが、in vivo で血中 IFN- α/β の誘導能、IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α の分泌の亢進作用、樹状細胞の成熟・CK 発現の誘導能、B細胞の成熟・抗体産生の誘導能などが知られている²⁾。

(4) 麻黄附子細辛湯 (MBST)

MBST はわが国では感冒や気管支炎の症状の改善を目的として使用されている漢方薬である。最近のわれわれの検討では、MAC 感染マウスにリファマイシン系薬剤 rifalazil と MBST とを併用投与した場合に rifalazil の治療効果が有意に増強されることが明らかになっているが、この薬効は部分的には MBST の宿主 MΦの MAC 菌に対する殺菌能の増強作用に依存したものであった¹⁰⁾。ヨクイニン、葛根湯、補中益気湯、十全大補湯などの他の

45種に及ぶ漢方薬にはこのような効果は認められないので、こうした薬効は MBST に特異的なものと考えられる。

(5) *M. vaccae* の加熱死菌製剤 SRL 172

SRL 172 は活動型結核患者に投与した場合、宿主の免疫を Th1 ドミナントのタイプにシフトさせることにより、抗結核薬療法の治療効果を高め、X線画像所見や細菌学的な所見の改善がみられることが多くの臨床試験により確かめられている²⁾。しかしながら、最近の厳密な盲検による治験では、SRL 172 の 1 回投与例では、患者の生存率や細菌学的な所見でみた場合の治療効果は有意なものではないことが報告されており、この製剤の有効性については今後の詳細な検討が必要である。

ま と め

抗酸菌感染症の治療にあつては、以上のような免疫補助剤の投与は必然的に長期に及ぶものと考えられるため、なるべく安価で副作用の少ないものが望ましい。さらに加えて、長期の投与を行った場合でも、宿主 MΦの免疫抑制性 CK や免疫抑制性因子の発現を誘導するような作用をもたない免疫補助剤が好都合である。現時点では、そうした条件をクリアできそうなものとしては、強いて挙げれば、ATP、ピコリン酸が該当するが、実際に MAC 感染マウスの CAM/RFP との併用抗菌薬療法に免疫補助剤として用いた場合の薬効は、今のところは特に、十分満足のいくレベルのものではなく、さらに優れた薬効を示す免疫補助剤やその投与レジメンの開発が望まれる。

文 献

- 1) Tomioka H: Present status and future prospects of chemotherapeutics for intractable infections due to *Mycobacterium avium* complex. *Curr Drug Discovery Technol.* 2004; 1: 255-268.
- 2) Tomioka H: Adjunctive immunotherapy of mycobacterial infections. *Curr Pharm Design.* 2004; 10: 3297-3312.
- 3) Hingley-Wilson SM, Sly LM, Reiner NE, et al.: The immunobiology of the mycobacterial infected macrophage. *Mod Asp Immunobiol.* 2000; 1: 96-101.
- 4) van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH: Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 739-749.
- 5) Holland SM: Cytokine therapy of mycobacterial infections. *Adv Intern Med.* 2000; 45: 431-452.
- 6) Toosi Z: Adjunctive immunotherapy of tuberculosis. *Cytokine Cell Mol Ther.* 1998; 14: 105-112.
- 7) Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, et al.: ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by

- purinergic P2Z (P2X₇) receptors. *Immunity*. 1997 ; 7 : 433-444.
- 8) Tomioka H, Sano C, Sato K, et al. : Combined effect of ATP on the therapeutic efficacy of antimicrobial drug regimens against *Mycobacterium avium* complex infection in mice and roles of cytosolic phospholipase A₂-dependent mechanisms in the ATP-mediated potentiation of antimycobacterial host resistance. *J Immunol*. 2005 ; 175 : 6741-6749.
- 9) Cai S, Sato K, Tomioka H, et al. : Antimicrobial activity of picolinic acid against extracellular and intracellular *Mycobacterium avium* complex and its combined activity with clarithromycin, rifampicin and fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother*. 2006 ; 57 : 85-93.
- 10) Shimizu T, Tomioka H, Sato K, et al. : Effects of the Chinese traditional medicine Mao-Bushi-Saishin-To on therapeutic efficacy of a new benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 ; 43 : 514-519.

————— The 81st Annual Meeting Symposium —————

DEVELOPMENT OF ANTITUBERCULOUS DRUGS: CURRENT STATUS
AND FUTURE PROSPECTS

Chairpersons: ¹Haruaki TOMIOKA and ²Kenji NAMBA

Abstract Worldwide, tuberculosis (TB) remains the most frequent and important infectious disease causing morbidity and death. One-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), the etiologic agent of TB. The World Health Organization estimates that about eight to ten million new TB cases occur annually worldwide and the incidence of TB is currently increasing. In this context, TB is in the top three, with malaria and HIV being the leading causes of death from a single infectious agent, and approximately two million deaths are attributable to TB annually. In particular, pulmonary TB, the most common form of TB, is a highly contagious and life-threatening infection. Moreover, enhanced susceptibility to TB in HIV-infected populations is another serious health problem throughout the world. In addition, multidrug-resistant TB (MDR-TB) has been increasing in incidence in many areas, not only in developing countries but industrialized countries as well, during the past decade. These situations, particularly the global resurgence of TB and the rapid emergence of MDR-TB, underscore the importance of the development of new antituberculous drugs and new protocols for efficacious clinical control of TB patients using ordinary antimycobacterial drugs. Concerning the development of new antituberculous drugs, the following points are of particular importance. (1) Development of drugs which display lasting antimycobacterial activity *in vivo* is desirable, since they can be administered with long intervals and consequently facilitate directly observed therapy and enhance patient compliance. (2) Development of novel antituberculosis compounds to combat MDR-TB is urgently needed. (3) The eradication of slowly metabolizing and, if possible, dormant populations of MTB organisms that cause relapse, using new classes of anti-TB drugs is very promising for prevention of TB incidence, because it will markedly reduce the incidence of active TB from persons who are latently infected with MTB. Unfortunately, no new drugs except rifabutin and rifapentine

has been marketed for TB in the US and other countries during the 40 years after release of rifampicin.

There are a number of constraints that have deterred companies from investing in new anti-TB drugs. The research is expensive, slow and difficult, and requires specialized facilities for handling MTB. There are few animal models that closely mimic the human TB disease. Development time of any anti-TB drug will be long. In fact, clinical trials will require the minimum six-month therapy, with a follow-up period of one year or more. In addition, it is hard to demonstrate obvious benefit of a new anti-TB agents over pre-existing drugs, since clinical trials involve multidrug combination therapy using highly effective ordinary anti-TB drugs. Finally, there is the perceived lack of commercial return to companies engaged in the development of new anti-TB drugs, because over 95% of TB cases worldwide are in developing countries.

In this symposium, we reviewed the following areas.

1. Critical new information on the entire genome of MTB recently obtained and increasing knowledge of various mycobacterial virulence genes are greatly promoting the identification of genes that code for new drug targets. In this context, Dr. Namba reviewed the status of new types of compounds which are being developed as anti-TB drug. He also discussed the development of new antimycobacterial drugs according to new and potential pharmacological targets and the best clinical development plans for new-TB drugs in relation to corporate strategy.

2. Using such findings for mycobacterial genomes, bioinformatics/genomics/proteomics-based drug design and drug development using quantitative structure-activity relationships may be possible in the near future. In this context, Dr. Suwa and Dr. Suzuki reviewed the usefulness of chemical genomics in searching novel drug targets for development of new antituberculous drugs. The authors reviewed (1) the history and present status of chemical genomics that is defined as the

systemic search for a selective small molecular modulator for each function of all gene products, (2) recent studies of the authors on profiles of the interactions between various kinds of human proteins and small molecule modulators using the new technology devised by Reverse Proteomics Research Institute, and (3) future prospects of the development of new antituberculous drugs based on chemical genomics.

3. It appears also promising to develop new types of drug administration systems using drug vehicles, which enable efficacious drug delivery to their target *in vivo*. Dr. Izumikawa, Dr. Ohno and Dr. Kohno reviewed the usefulness of liposome- and polymer-based technologies, which enable efficacious delivery of encapsulated drugs at required doses for prolonged periods of time with only a single shot without toxicity, and also enable highly targeted delivery of drugs to their target *in vivo*. They indicated that the applications of drug delivery system using conventional anti-mycobacterial agents are challenging to improve the compliance of treatment and better clinical outcome.

4. Immunoadjuvive therapy appears to be promising in improving outcome of clinical control of refractory mycobacterial infections, including MDR-TB and *M. avium* complex infection. Dr. Shimizu, Dr. Sato and Dr. Tomioka reviewed the present status of immunotherapy of mycobacterial infections in combination with antimycobacterial drugs. They indicated that the development of new classes of immunomodulators other than cytokines (IL-2, IFN- γ , GM-CSF, IL-12, etc.) particularly those with no severe side-effects, are urgently needed. Their review dealt with some promising immunoadjuvive agents, especially ATP and its analogues, which potentiate macrophage antimycobacterial activity via purinergic P2 receptors.

The aim of this symposium is to address the future prospects of the development of new drugs and drug regimens for anti-TB chemotherapy. There are a number of difficulties in drug-design for the development of new drug formulations with increased potential for antimycobacterial effects, excellent pharmacokinetics, and tolerability. It should be emphasized that the most urgent goal of chemotherapy of TB and MAC infections, especially that associated with HIV infection, is to develop highly active, low-cost drugs which can be used not only in industrialized countries but also in developing countries, since the incidences of AIDS-associated intractable TB and MAC infections are rapidly increasing in the latter. We strongly wish a great advance of fundamental and practical studies in developing such kinds of new anti-TB drugs in the near future.

1. Prospects for non-clinical or clinical development of new antituberculous drugs in relation to corporate strategy: Kenji NAMBA (New Product Research Laboratories I, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.)

Tuberculosis (TB) remains one of the deadliest threats to public health. No new anti-TB drugs have been brought into

the clinic in the past 40 years. Current non-clinical works with progressed technology and Global Alliance for TB Drug Development, a non-profit organization established in 2000, accelerate research and development of faster-acting anti-TB compounds. We reviewed the status of new types of compounds which are being developed as anti-TB drug, such as diarylquinoline (TMC 207), nitroimidazole (PA-824 & OPC-67683), and moxifloxacin (MFLX). We also discussed the best clinical development plans for new-TB drugs in relation to corporate strategy.

2. Exploring novel drug targets through the chemical genomics approach and its possible application to the development of anti-tuberculosis drugs: Yorimasa SUWA (Reverse Proteomics Research Institute Co., Ltd.), Yohji SUZUKI (Teijin Ltd.)

Recently, chemical genomics approach has been focused as an emerging technology for the drug discovery. In advance to a very large scale national project in US started last year, Reverse Proteomics Research Institute Co., Ltd. (REPRORI) has developed the core technologies for chemical genomics. Here we describe the outline of chemical genomics study, especially that of REPRORI, and discuss about its possible application to the development of anti-tuberculosis drugs.

3. Anti-mycobacterial agents and drug delivery: Koichi IZUMIKAWA, Hideaki OHNO, Shigeru KOHNO (Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine)

Mycobacterium infection is a major clinical concern in whole world. Since the newly developed anti-mycobacterial agents are few and still unavailable in clinical settings, the applications of drug delivery system using conventional anti-mycobacterial agents are challenging to improve the compliance of treatment and better efficacy. The efficacy of anti-mycobacterial agents modified by liposome or polymer based technology have been investigated and reported using various animal models. Drug delivery system increased and prolonged the drug concentrations at the blood and targeted organs and the duration of sustained drug release, respectively. These effects lead to decrease in the frequency of drug administrations dramatically and better efficacy rates. The studies, however, were performed only in animal models, the further investigations and evaluations in human are required for practical use.

4. Adjuvive immunotherapy of mycobacterial infections: Toshiaki SHIMIZU, Katsumasa SATO, Haruaki TOMIOKA (Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine)

There is an urgent need to develop new antimicrobials and protocols for the administration of drugs that are potently efficacious against intractable mycobacterial infections. Unfortunately, development of the new drugs for solving this

problem is not progressing. One promising strategy is to devise regimens to treat infected patients with ordinary antimycobacterial agents in combination with appropriate immunomodulators such as immunomodulating cytokines, inhibitors of immunosuppressive cytokines and new classes of immunomodulators other than cytokines. Therefore, it is important and urgently necessary to synthesize or screen out new low-cost and safe drugs with mild immunopotentiating activity which do not induce immunosuppressing cytokines during administration for long periods of time.

Key words: Antituberculous drugs, Drug targets, Bioinfor-

matics, Drug delivery, Immunoadjuvante therapy

¹Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine, ²New Product Research Laboratories I, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

Correspondence to: Haruaki Tomioka, Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine, 89-1, Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan. (E-mail: tomioka@med.shimane-u.ac.jp)