

## 特別講演 2

## エバーメクチンの発見とその後の展開

大村 智

## はじめに

“マクロライド”なる名称は1954年にR. B. WOODWARDにより12~16員環ラク톤を有する抗菌抗生物質につけられたものであるが、現在では大環ラク톤を有する化合物の一般名称となり、8員環のオクタラクチンAから始まり62員環を有するゾオキサントラトキシニンAまで2,200種余り知られている<sup>1)</sup>。

報告されているマクロライドの生物活性を見ると、抗菌活性を始め、抗腫瘍活性、抗昆虫・抗寄生虫活性など抗生物質の範疇に入るものの他に免疫抑制作用、血管新生抑制などと、実に多岐にわたる。

ここでは、抗寄生虫活性を有する代表的なマクロライドのエバーメクチンについて発見の経緯、生物活性、用途および生産菌のゲノム解析と生合成研究について総括する。

## エバーメクチンの発見

筆者の提案により、1973年に北里研究所抗生物質研究グループと米国メルク社の研究所MSDRL (Merck Sharp & Dohme Research Laboratories)とで、微生物代謝産物を対象にした探索研究の共同研究プロジェクトが開始された。この過程で、1979年にW. CAMPBELLらにより開発された*N. dubius*を感染させたマウスを用いるスクリーニング系を用いて筆者らが分離した放線菌*Streptomyces avermectinius* (以前は*S. avermitilis*と命名されていた。Fig. 1)が生産する抗寄生虫薬エバーメクチンが発見された<sup>2)</sup>。

16員環マクロライド構造のエバーメクチン (Fig. 2)には8成分があるが、この中でB1aとB1b成分が最も強い活性を示した。エバーメクチンの

Fig. 1. Avermectin-producing strain *Streptomyces avermectinius* (former name: *S. avermitilis*).



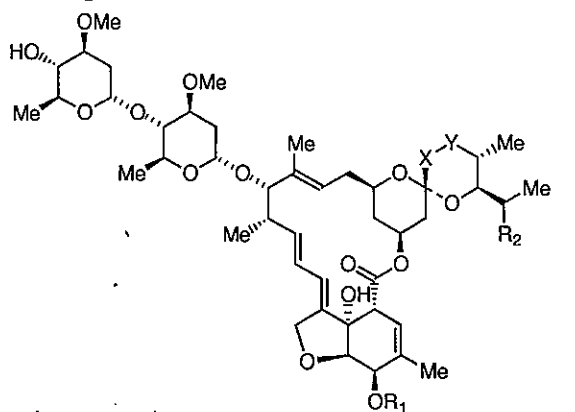
生物活性としては、細菌、真菌などには活性を示さないが、鉤虫、回虫、肺虫、糸状虫などの線虫類やダニ、ハエの成虫やウジなどの節足動物類にきわめて少量で強い活性を示した (Fig. 3)。

なお、その後多くの研究機関で探索研究を行っているが、現時点でも*Streptomyces avermectinius*がエバーメクチンを生産する唯一の微生物であることは特筆すべきことである。

## エバーメクチンの作用機序

本剤の作用機序は、神経、筋細胞に存在すグルタミン酸、あるいは作動性クロライドイオンチャネルに選択的かつ高い親和性をもって結合し、これにより、クロライドイオンに対する細胞膜の透過性が上昇して神経または筋細胞に過分極が生じ、寄生虫や節足動物類が麻痺を起こして死に至るものである。しかも、哺乳類のクロライドイオ

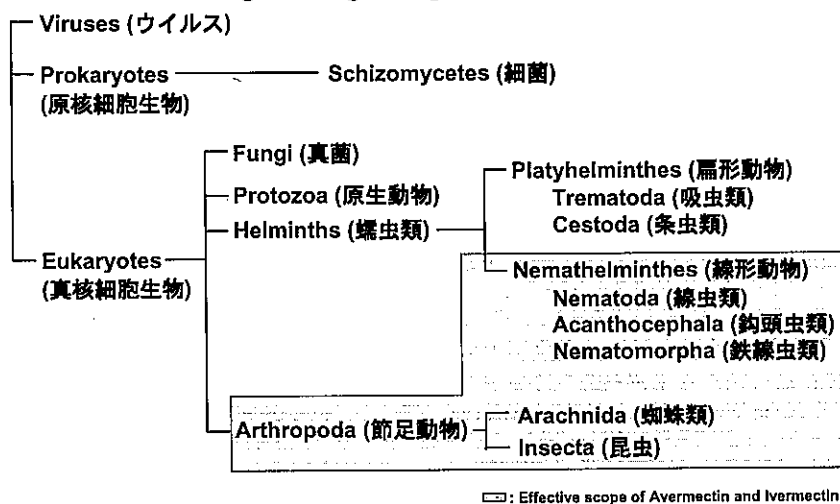
Fig. 2. Structures of avermectins and ivermectin.



Avermectin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X-Y
A1a	Me	Et	CH=CH
A1b	Me	Me	CH=CH
A2a	Me	Et	CH <sub>2</sub> -CH(α-OH)
A2b	Me	Me	CH <sub>2</sub> -CH(α-OH)
B1a	H	Et	CH=CH
B1b	H	Me	CH=CH
B2a	H	Et	CH <sub>2</sub> -CH(α-OH)
B2b	H	Me	CH <sub>2</sub> -CH(α-OH)

Ivermectin=22,23-dihydroavermectin B1a:B1b=>80%:<20%

Fig. 3. Pathogenic organisms (病原生物)



ンチャンネルには親和性が低く、中枢神経系には浸透しないために、ヒトのGABA依存性神経伝達は阻害しない。S. P. ROHRERらによって*C. elegans*のエバーメクチン結合タンパクが同定され、同蛋白はグルタミン酸作動性クロライドチャンネルであることが判明した<sup>3)</sup>。次いでD. F. CULLYらにより*C. elegans*および*Drosophila melanogaster*の同チャンネルのcDNAが得られ、両者の構造が比較された。両者のクロライドチャンネルのアミノ酸配列の相同性が高いことが明らかになり、これによって線虫のみならず、昆虫にも活性を示す本質が明らかになった<sup>4,5)</sup>。

#### エバーメクチンのジヒドロ誘導体アイバメクチン(メクチザン)

毒性を軽減し、活性を高める目的で開発されたアイバメクチンは経口投与または皮下注射によるウシ、ヒツジ、ブタなどの寄生虫駆除や経口投与によるイヌのフィラリア症の予防に用いられている。アイバメクチンは1981年に動物薬として発売され、その2年後の1983年以降、動物薬売り上げ世界一を保っている。その後、ヒトのオンコセルカ症に著効を示すことが明らかとなった。後述するように目下、アイバメクチンのヒト用製剤メクチザンはメルク社から無償供与され、オンコセルカ症およびリンパ系フィラリア症の予防、治療薬として、WHOの指導の下に、アフリカを中心とした流行地域での大掛かりな撲滅作戦に使用されている<sup>6)</sup>。また、最近では、東南アジアや沖縄で流行している糞線虫の治療および疥癬の治療にもメクチザンが用いられている<sup>7,8)</sup>。

#### オンコセルカ症制圧プログラム(OCP)とメクチザン

オンコセルカ症は、回旋糸状虫(*Onchocerca volvulus*)の感染によって皮膚の痒み、皮下の浮腫、オンコセルカ腫瘤形成などの症状を起こす。本症で特に問題となるのは、幼虫(マイクロフィラリア)が目に侵入し、角膜炎、虹彩毛様体炎を起こし重症のときには失明に至るものである。それ由本熱帯病は、河川盲目症(river blindness)とも呼ばれている。1980年当時は主としてアフリカの

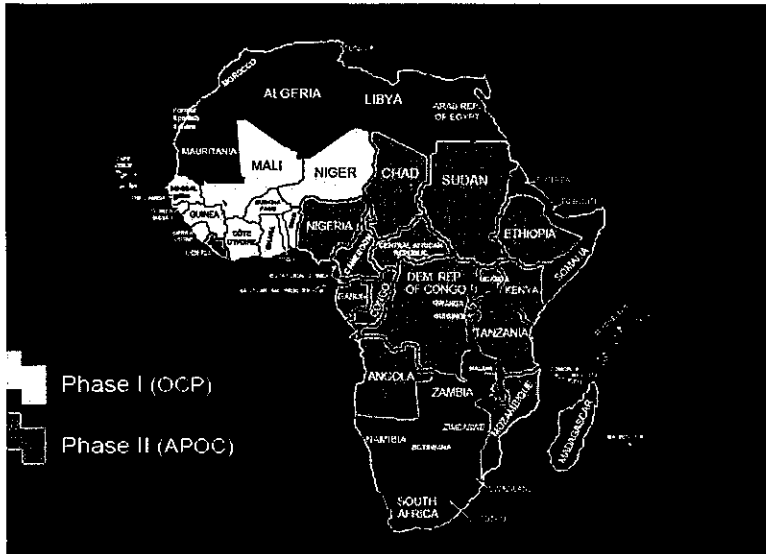
サハラ砂漠以南の国々の他、中南米にもみられ、世界で35ヶ国がこの蔓延地域であった。当時のWHOの報告によると、これらの地域に住む1億2千万人がこの危機に曝されており、そのうち感染者数は1,800万人で、本症による失明者または重度の視力障害者は77万人に達していた。

WHOでは1974年からセネガル、ガーナ、ブルキナファソを含む西アフリカ11ヶ国で、オンコセルカ症制圧プログラム(OCP)を開始した。(Fig. 4)。初期は回旋糸状虫を媒介するブユを殺虫剤で駆除するという方法が展開されていたが、効果は思わしくなかった。WHOは1987年に仏政府の認可を得た米国メルク社からメクチザンの無償供与を受け、1988年からOCPに本剤を導入し制圧プログラム作戦を展開した。本プログラムの特色は、各集落に配布責任者を置いて、その地域の病院や保健所の担当者と連携しながら、集落ごとに年1回集団でメクチザンを服用することである。本剤は150 $\mu$ g/kgという微量を1回経口投与することにより、ヒトに感染した回旋糸状虫のマイクロフィラリアの数と運動性を減少させ、殺滅させる。さらに、成虫からのマイクロフィラリア放出を阻止し、6~12カ月間は皮膚と眼部のマイクロフィラリアの数を効果的に抑制する。本剤は1年に一度投与し、これを毎年繰り返す。本剤の副作用は線虫のマイクロフィラリアが死滅することに伴う皮膚の痒み程度であり、特に問題となる副作用は生じていない。2002年までにOCP地域ではメクチザンによって、60万人が失明から救われ、4,000万人がオンコセルカ症の感染を免れ、その間に生まれた新生児1,800万人の食糧確保も可能になったとWHOは宣言している。そして、オンコセルカ症の蔓延している地域の人々に、年1回のメクチザンの集団投与が毎年続けられる体制が整ったことによって、OCP地域のオンコセルカ症は公衆衛生上ほぼ制圧されたとのWHOの見解が表明された<sup>6)</sup>。

#### アフリカオンコセルカ症制圧プログラム(APOC)

WHOはOCPでの成果を基に、残るアフリカ19ヶ国を対象にしたアフリカオンコセルカ症制圧プログラム(APOC)を1995年から始めた(Fig. 4)。

Fig. 4. Participating nations in the Onchocerciasis Control Program (OCP) and the African Program for Onchocerciasis Control (APOC)



それ以来、年1回のメクチザンの集団投与が毎年続けられている。ちなみに2004年の1年間で日本の人口の約半分の数にあたる6,200万人がその恩恵を受けている。現在は約8万の集落(人口500~600人)でAPOCが実施されており、近未来に10万集落となる目標を立てている。WHOはこのような計画の中で、2010年までにAPOC地域で年間4万3千人の人々を失明から救うことができ、そしてアフリカ全土でオンコセルカ症は、公衆衛生上はほぼ制圧されるであろうと推測している。

メクチザンによって成功を収めている要因として経口投与により年1回で著効を示し、かつ副作用の少ないことで、投与時に医師や看護師の立会いを必要としないという本剤の特質に負うところが大きいと言われている。その上、抗生物質で問題となっている耐性についても、使用開始後25年になるが、投与量も投与回数も少ないことから耐性線虫の報告はない。

北里大学生命科学研究所の正面玄関左側にオンコセルカ症で失明した大人を子供がエスコートする銅像が設置されている。これは2004年9月に筆者らがエバーメクチン発見25周年を記念してアフリカ西部のガーナおよびブルキナファソの現地視察を行った折に首都ワガドークに建立されている

写真



銅像を見て、これと同じ作者に現地で鑄造を依頼して東京へ運んだものである。(写真)

#### リンパ系フィラリア症撲滅世界同盟

リンパ系フィラリア症は、バンクロフト糸状虫 (*Wuchereria bancrofti*) およびマレー糸状虫 (*Brugia malay*) の感染によってリンパ腺炎、リンパ管炎などの熱発作やアレルギー性の全身症状を起こし慢性化し、次いでリンパ管閉塞による滞留したリンパ液が皮下組織に浸透し、皮下組織が増殖し、やがて皮膚が肥厚化し、象の皮膚のようにな

る熱帯病で、象皮病 (elephantiasis) とも呼ばれている。本症はアフリカ、中南米および東南アジアを中心に世界の80カ国で1億2千万人が感染していると言われている。一般に、バンクロフト糸状虫による象皮病は足先から大腿部までを侵すが、マレー糸状虫の場合は膝から下に局限している。さらにバンクロフト糸状虫特有の慢性症状として乳び尿 (chyluria) や男性の陰嚢水腫 (hydrocele) があり、これらはマレー糸状虫ではみられない。

WHOでは1997年からリンパ系フィラリア症撲滅世界同盟 (GAELF) を発足させた。無償供与されているメクチザン(メルク社)とアズベンダゾール(グラクソスミスクライン社)、またはメクチザンとジエチルカルバマジン(ピナックス社)の併用療法が行われており、今後の成果が期待されている<sup>6)</sup>。

#### 糞線虫症の治療薬として

糞線虫症には経皮感染と自家感染がある。経皮感染の場合は、患者の糞便中に排出された糞線虫 (*Strongyloides sterooralis*) のラブジチス型幼虫 (R型) が土壤中で发育し、感染性のあるフィラリア型幼虫 (F型) となり、これが裸足の皮膚から侵入し、静脈、肺、肺胞内、気管、咽頭と移行し、さらに消化管を下降して小腸上部に至る。十二指腸および空腸に寄生し成虫となり産卵し、この卵が孵化してR型幼虫となり、これを繰り返す。経皮感染の症状は、感染度の軽重により、軽度の消化器症状(腹痛、軟便など)から、重度のばいには胃潰瘍を疑わせるような腹部症状や下痢(粘血便)を呈する。さらに免疫能の低下した患者の場合には本線虫が過剰感染し、吸収不良症候群、麻痺性イレウスを呈することがある。一方、自家感染の場合は、腸管内等に残存したR型幼虫がF型幼虫に发育し、これが腸管壁から侵入し、前述の循環系に入り、腸に寄生する。この自家感染が繰り返されると、寄生成虫の数が著しく増加し、きわめて消耗性の肺炎などの肺症状を伴う全身播種性糞線虫症となり、死に至ることがある。

糞線虫症は主として熱帯、亜熱帯地方に広く分布し、我が国では沖縄、奄美地方に多く見られる。WHOの推定では世界に約2億人の感染者が

いると言われ、また国内の患者数は2~3万人と推定されている。琉球大学の斎藤厚教授らのグループにより、本症に対するアイバメクチンの効果が確かめられた<sup>7)</sup>。糞線虫症への適応は日本では2002年12月に承認された。

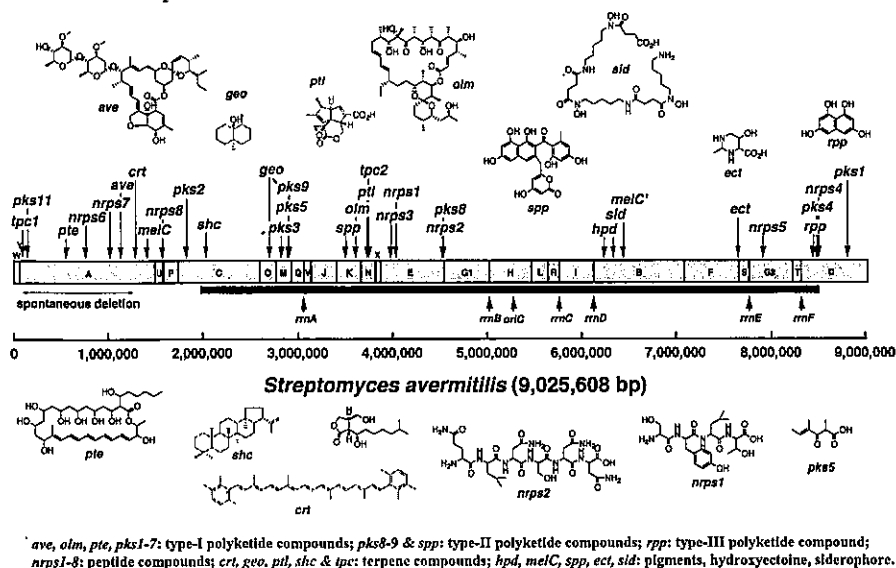
#### 疥癬の治療薬として

疥癬はヒトヒゼンダニ (*Saroptes scabiei* var. *hominis*) による皮膚感染症であり、開発途上国を中心に世界で年間3億人が感染していると言われている。感染は主としてヒトからヒトへの接触感染による。病型として通常疥癬とノルウェー疥癬(角化型疥癬)がある。ヒゼンダニの幼虫や若虫は皮膚の毛包内に生息しているが、雌の成虫は皮膚の角質層内に横穴(疥癬トンネル)を開けて産卵しながら生涯を過ごす。通常疥癬の症状は感染約1カ月後に虫体に対するアレルギー反応としての激しい搔痒を伴う皮疹や結節を認める。一方、ノルウェー疥癬は老衰、重症感染症、悪性腫瘍、AIDS、成人T細胞白血病等の免疫低下、不全の患者に発生する。寄生するヒゼンダニ数が100万匹以上であり、通常疥癬の1000倍以上に達する。感染部位の皮膚は肥厚化し、角質層が容易に落屑するため感染力は極めて高い。近年の特別養護老人ホーム、老人健康施設などの高齢者施設での集団発生の原因はほとんどがこのケースである。これらの疥癬の治療薬として、アイバメクチンがフランス、メキシコ、オランダなどで適応承認されており、昨年日本でも認可された<sup>8)</sup>。

#### エバーメクチン生産菌のゲノム解析

エバーメクチン生産菌 *Streptomyces avermectinarius* (旧名 *S. avermitilis*) のゲノム解析プロジェクトを石川 淳博士(感染研)、菊池 久博士(製品評価機構)、柴 忠義博士(北里大、理)、榎 佳之博士(東大医科研)および服部正平博士(北里大生命研)らと共同で立ち上げ、プロジェクトリーダーを筆者が務めた。当研究所の池田治生教授の多大な尽力により研究を推進した結果、放線菌としてはイギリスのD. A. HOPWOOD教授のチームの *S. coelicolor* A3(2) に次いでゲノム解析が完了した<sup>9,10)</sup>。 *S. avermectinarius* の染色体は大腸菌のほぼ2

Fig. 5. Asel-Physical maps and distribution of gene clusters for secondary metabolite biosyntheses in *Streptomyces avermectinius* (*oriC*, replication origin; *rrnA-F*; rRNA operons)



倍に当たる。9,025,608bpからなる線状構造を有しており、そのGC含量は70.7%であった。蛋白質をコードする7,527個の遺伝子の存在が推定された。これは染色体の86.2%を占める。本菌の第二次代謝産物の生合成に関与する遺伝子群は30個見つかっている。これら遺伝子群の塩基配列の総和は染色体の6.6%を占めている。Fig. 5に染色体に第二次代謝産物の生合成遺伝子群の位置と推定される生産物質の構造を示す。ちなみに、先の*S. coelicolor*では20個の第二次代謝産物の生合成に関与する遺伝子群が報告されている<sup>11)</sup>。

*S. avermectinius*のゲノム解析が行われる以前には本菌の生産する二次代謝産物として知られていたものはエバーメクチン以外にオレアンドマイシンのみであった。

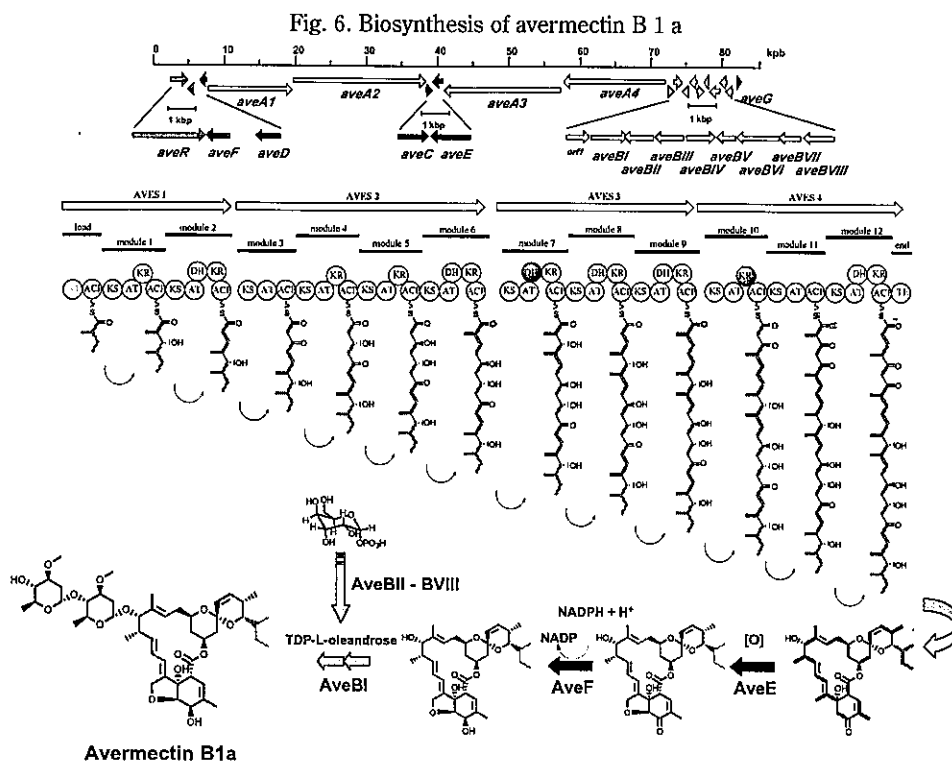
#### エバーメクチンの生合成

先の生産菌のゲノム解析に先立って、1999年にエバーメクチンの生合成遺伝子群がクローニングされ、生合成の詳細が遺伝子レベルで解析されるようになった<sup>12,13)</sup>。同生合成遺伝子群は90kbpにわたって存在し、18個の遺伝子によってエバーメクチンの生合成とその調節が行われていることが

判明した。そのうち、4個の遺伝子(*aveA1*~*aveA4*)に基づいて作られる4種の多機能酵素(AVES1~AVES4)によってラクトン骨格(ポリケチドと呼ばれる)が形成され、その他の遺伝子*aveE*, *aveF*, *aveD*, および*aveB1*~*aveBVIII*はその骨格の修飾とオレアンドロースの生合成とそのグルコシル化に関っている。その様子をエバーメクチンB1aを例にとりFig. 6に示す。ラクトン形成は基本的にはType I 脂肪酸生合成と同じくモジュール型の酵素反応によって進行する。

エバーメクチンのポリケチド生合成はAVES1に2個, AVES2に4個, AVES3に3個, そしてAVES4に3個, 計12個のモジュールに存在する52個のドメイン(触媒活性単位)とAVES1に存在するローディングドメインおよびAVES4の末端に存在するTEドメインによって達成される。その後AveEによるフラン環形成AveFによるカルボニル還元, そしてAveBII~AveBIIIおよびAveBIの働きによりグルコースからオレアンドロースの生合成とグルコシル化を経てエバーメクチンB1aとなる。

ここで特筆すべきはAVES3に存在するモジュール7のDHドメインが機能していないことである。



これによって13位にOH基が残り、活性に重要な働きをする2個のオレアンドロースのグリコシル化が可能になっている。ミルベマイシンやネマデクテンなど、ラクトン骨格の近似する抗生物質はこのドメインと共に、次のエノールレダクターゼが働き、13位は脱水、飽和化が進んでいるため、糖が結合できない。我々のグループの池田治生教授らはエバーメクチンのモジュール7近辺と対応するネマデクテンのモジュールの機能とを置き換え、かつオレアンドロースの生合成とグリコシル化にあずかる遺伝子 $aveB1$ ~ $aveBVIII$ を導入する遺伝子操作によって新しいエバーメクチン型のネマデクテンを生合成した<sup>14)</sup>。

#### おわりに

以上、エバーメクチンの発見から今日までの研究と応用の流れを辿ってみたが、このような学術的な流れとは別に我々がメルク社から導入した特許料はさらなる研究に向けて役立っていることは言うまでもないが、一部は社会還元を目指して、

埼玉県北本市に440床の病院を建設した。

#### 参考文献

- 1) SHIOMI, K., S. ŌMURA : Discovery of new macrolides 1~56. In "Macrolide Antibiotics-Chemistry, Biology, and Practice", 2<sup>nd</sup>, Ed. S. Omura, Academic Press, London, 2002
- 2) BURG, R. W., MILLER, B. M. BAKER, E. E. BIRNBAUM, J. CURRIE, S. A. HARTMAN, R. KONG, Y.-L. MONAGHAN, R. L. OLSON, G. PUTTER, I. TUNAC, J. B. WALLICK, H. STAPLEY, E. O. OIWA, R., ŌMURA, S. : Avermectins, new family of potent anthelmintic agents : producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 15 : 361~367, 1979
- 3) ROHRER, S. P., MEINKE, P. T., HAYES, E. C., MROZIK, H., SCHAEFFER, J. M. : Photoaffinity labeling of avermectin binding sites from *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89 : 4168~4172, 1992
- 4) CULLY, D. F., VASSILIATIS, D. K., LIU, K. K., PARESS, P. S., VAN DER PLOEG, L. H. V., SCHAEFFER, J. M., ARENA, J. P. : Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371 : 707~711, 1994

- 5) CULLY, D. F., PARESS, P. S., LIU, K. K., SHAEFFER, J. M., ARENA, J. P. : Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent ivermectin. *J. Biol. Chem.*, 271 : 20187~20191, 1996
- 6) ŌMURA, S., CRUMP, A. : The life and times of ivermectin-a success story. *Nature Reviews Microbiol.*, 2 : 984~989, 2004
- 7) SAITO, A. : Strongyloidiasis : epidemiology, clinical manifestations and new methods for diagnosis and treatment. *J. Infect. Chemother.*, 1 : 98~106, 1995
- 8) 平田哲生, 斎藤厚, 賀来清夫 : 皮膚感染症の最近の動向と対応-疥癬, 化学療法の領域 2 : 20, 855, 2004
- 9) ŌMURA, S., IKEDA, H., ISHIKAWA, J., HANAMOTO, A., TAKAHASHI, C., SHINOSE, M., TAKAHASHI, Y., HIRAKAWA, H., NAKAZAWA, H., OSONOE, T., KIKUCHI, H., SHIBA, T., SAKAKI, Y., HATTORI, M. : Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* : Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98 : 12215~12220, 2001
- 10) IKEDA, H., ISHIKAWA, J., HANAMOTO, A., SHINOSE, M., KIKUCHI, H., SHIBA, T., SAKAKI, Y., HATTORI, M., ŌMURA, S. : Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotech.*, 21 : 526~531, 2003
- 11) BENTLEY, S. D., *et al.* : Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417 : 41~7, 2002
- 12) IKEDA, H., ŌMURA, S. : Ivermectin biosynthesis. *Chem. Rev.*, 97 : 2591~2609, 1997
- 13) IKEDA, H., NONOMIYA, T., USAMI, M., OHTA, T., ŌMURA, S. : organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96 : 9509~9514, 1999
- 14) IKEDA, H., ŌMURA, S. *et al.* 未発表