

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～ 2008 年度

課題番号：19590104

研究課題名（和文）*In vivo* 評価系を用いた天然由来新規抗真菌薬の創薬研究研究課題名（英文）Antifungal screen using silkworms as an *in vivo* infection model from natural resources

研究代表者

内田 龍児（Uchida Ryuji）

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：60280632

研究成果の概要：

重篤型深在性真菌症対策の一つとして、哺乳動物を用いない生体内評価系を利用し、微生物の培養液・キノコの抽出液などの天然資源を素材とした新規抗真菌剤の探索を行った。昆虫（カイコ）に病原真菌カンジダを感染させ、その治療効果を指標とした評価系により、微生物の培養液約 7,500 サンプルを評価した結果、カイコに毒性を示すことなく抗真菌活性を示す 10 サンプルを選択した。そのうち、交付期間内に 4 サンプルから生体内でも有効な抗真菌活性物質を単離した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬科学

キーワード：真菌症、抗真菌剤、天然物化学、天然資源、カイコ、*in vivo*

1. 研究開始当初の背景

真菌症にはカンジダ、アスペルギルスなどの病原真菌が皮膚から進入し病変を引き起こす表在性真菌症（水虫、タムシ等）と、呼吸や経口で体内に侵入し障害を引き起こす深在性真菌症が存在する。近年、わが国では高度先端医療の影響で免疫力の低下などによる易感染状態に陥った患者が増

加し、重篤型深在性真菌症の発症率が特に高くなっている。この重篤型深在性真菌症は、脳、肺、血液などの 3 臓器以上で病変が確認され、全身感染に至った場合の 1 年生存率は約 20% と極めて低い。さらに、多種の抗真菌剤が功を奏さない多剤耐性真菌症も合わせて出現して来ているため、真菌症治療法の確立は急務とされている。し

かしながら、適用可能な抗真菌剤は少なく、現行の治療法が奏効しない症例が多数存在するために問題がさらに深刻化している。このため真菌症対策の一つとして、新たな薬剤開発の必要性が考えられた。

2. 研究の目的

これまで臨床で用いられている主な抗真菌剤はアムホテリシン B およびアゾール系抗真菌剤など極めて少ないことから、新たな抗真菌剤の開発が必要な状況である。2002 年に導入されたミカファンギンは、既存薬剤とは作用機序の異なる薬剤として治療効果が期待されているが、依然として薬剤の絶対数は少なく、世界の抗真菌剤の研究開発に目を向けて見ても、アゾール系薬剤の誘導体合成に重点が置かれ、新規骨格あるいは新たな作用機序を持つ薬剤の開発は遅れているのが現状である。その理由として、①コンビナトリアル・ケミストリーやハイスループット・スクリーニングを用いても活性中心に成り得るような基本構造を創製することが難しい、②真菌が哺乳類と同じ真核生物であるために、選択毒性を有する化合物の開発が困難なことなどが挙げられる。

そこで、本研究では抗真菌剤のスクリーニングを開始するにあたって、哺乳動物を用いない生体内 (*in vivo*) 評価系の導入を試みた。2002 年東京大・関水らは抗生物質の評価系としてカイコがマウスの代替動物となり得る可能性を報告したことから (Kaito C. *et al.*, *Microb Pathog*, **32**: 183-90, 2002)、これを抗真菌薬のスクリーニングに応用した。これにより ①倫理的な問題がクリアーされ、②薬物の安定性および選択毒性を同時に且つ早期に判断でき、③薬物代謝等により本来抗菌性を示さない化合物が生体内で何らかの変換を受け抗真菌活性を發揮するような、これまででない作用を示す化合物の発見も期待した。

このよう背景のもと、真菌症対策の一つとして新たな抗真菌剤の供給を目的とし、

微生物の培養液を中心とした天然資源より、カンジダ感染モデルカイコを利用した簡易 *in vivo* 評価系を導入することで、生体内で効果を示す可能性の高い抗真菌活性を有する新規候補化合物を探索した。

3. 研究の方法

(1) カンジダ感染モデルカイコの作製

本研究では、抗真菌薬の創製における問題点を早期解決する目的で、スクリーニングの初期段階で *in vivo* 評価系を用い、そのモデル動物として昆虫 (カイコ) を利用した。カイコ (*Bombyx mori*; 系統: Fuyo Tukubane) の蚕種卵 (1,000 個/週) を購入し、感染実験に使用可能な 5 齢虫まで約 20 日間飼育した。このカイコの背脈管 (ヒトの血管に相当) に試験菌: 臨床分離カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans* TIMM1768 株) 接種することでカンジダ感染モデルカイコを作成した。

(2) 天然資源を用いた抗真菌剤のスクリーニングの実施

抗真菌剤の探索の素材として多種・多彩な構造を含んだ化合物源であり、その構造の多様性と多くの生理活性から、これまで医薬、農薬、研究用試薬などの探索源として有効利用された天然資源を用いた。北里生命科学研究所より供給された天然資源 (放線菌、糸状菌および細菌の代謝産物、キノコ、生薬の抽出物) を、1 サンプルあたりカンジダ感染モデルカイコ 3 頭の背脈管に投与し、試験菌液のみを注射したカイコより延命効果が認められるものを検討候補サンプルとして選択した。

また、これと並行して、従来、抗菌活性を測定するために用いられてきたペーパーディスク法 (生体外評価系: *in vitro*) でも抗真菌活性を評価した。

(3) 活性物質の単離精製

検討候補サンプルは、その菌株を三角フラスコあるいはジャーファーメンター等を

用いて培養し、この培養液から抽出操作 (溶媒、各種吸着剤)、各種クロマトグラフィー (液々分配、カラム: 吸着、イオン交換、順相、逆相、分配、HPLC) 等の精製手法を組み合わせることによって目的とする抗真菌活性を有する化合物の単離を行なった。

(4) 活性物質の構造解析

単離した化合物は各種機器分析 (質量分析、赤外吸収スペクトル、紫外外部吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルなど) の測定および解析を行ない、化学構造を明らかにすると共に、その新規性を化合物検索システムにより調査した。

4. 研究成果

(1) 天然資源からの抗真菌活性サンプルの選択

交付期間中に微生物の培養液を中心とした天然資源より、抗真菌活性を示すサンプルをカンジダ感染モデルカイコ評価系およびペーパーディスク法を用いてスクリーニングを実施した結果を Table 1 に示した。真菌および放線菌の培養液 7460 サンプルを評価した結果、カンジダ感染モデルカイコ評価系において 10 サンプル (真菌由来: 9 サンプル、放線菌由来: 1 サンプル) が延命効果を示し、その選択率は 0.13% と非常に低かった。一方、並行して行ったペーパーディスク法においては 204 サンプル (選択率: 2.7%) が抗真菌活性を示したが、そのうちの 95% がカンジダ感染モデルカイコ評価系で活性を示さない、すなわちペーパーディスク法で選択されたもののほとんどがカイコの生体内では効果を示さないことが明らかとなった。

Table 1 スクリーニング結果

	サンプル数	ペーパーディスク法	カイコモデル
真菌	6,060	172 (2.8%)	9 (0.15%)
放線菌	1,400	32 (2.3%)	1 (0.07%)
合計	7,460	204 (2.7%)	10 (0.13%)

これまで抗生物質開発の大きな問題点として、*in vitro* 評価法では効果を示す化合物であっても *in vivo* 評価法では必ずしも効果を示すとは限らない事が挙げられてきた。しかし、本簡易 *in vivo* 評価系はスクリーニングの初期段階で生体内で有効なサンプルか否かを迅速に判断でき、より実用的な化合物の選択が期待できると判断された。

(2) 抗真菌活性物質の単離精製および構造

カンジダ感染モデルカイコ評価系で抗真菌活性が認められた 10 サンプルのうち、これまでに真菌由来の 5 サンプルについて検討した。以下にその結果を述べる。

①真菌 FKI-3987 株からは抗真菌活性を有する化合物を 1 成分単離し、本化合物を Godtfrdson らにより発見された trichodermin (Fig. 1) と同定した (*Acta. Chem. Scand.*, **19**, 1088-1102, 1965)。Trichodermin はカンジダ感染モデルカイコ評価系において、50 μg /幼虫の濃度で延命効果を示した。

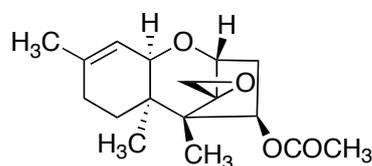


Fig. 1 Trichodermin の構造

②真菌 FKI-4238 株の培養液はペーパーディスク法では抗真菌活性を示さず、カンジダ感染モデルカイコ評価系においてのみ効果を示すことから、プロドラック様成分が生産されている可能性が予想された。本活性物質は、ペーパーディスク法などの *in vitro* 評価方法では選択される可能性は極めて低く、*in vivo* 評価系を導入した本研究によってのみ選択されたことが考えられる。

現在、本真菌から抗真菌活性成分の単離精製を試みているが、培養の再現性が得られにくいことが問題点である。しかし新しい作用点を有する化合物である可能性も十分考えられることから、継続して検討を行

う。

③真菌 FKI-4330 株からは抗真菌活性を有する化合物を 1 成分単離し、本化合物を Clutterbuck らにより発見された mycophenolic acid (Fig. 2) と同定した (Biochem. J., 27, 654-657, 1965)。本化合物はカンジダ感染モデルカイク評価系において、弱いながらも延命効果を示した。

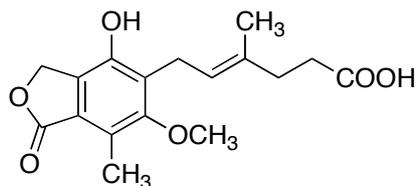


Fig. 2 Mycophenolic acid の構造

④真菌 FKI-5047 株からは 8 成分 (A~H 成分) の抗真菌活性物質を単離し、このうち F および G 成分がカンジダ感染モデルカイク評価系において延命効果を示した。G 成分は Tate らにより発見された roridin E (Fig. 3) と同定し (J. Biol., 248, 7970-7972, 1973)、また F 成分はその類縁化合物と推定している。F および G 成分はいずれもトリコテセン類に属するマイコトキシンではあるが、真菌 FKI-3987 株が生産する trichodermin (トリコテセン類の基本構造を有する) と同様にカイクに対して毒性を示すことなく、それぞれ 15 および 50 μg /幼虫の濃度で延命効果を示した。

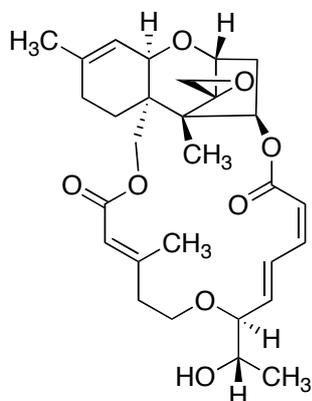


Fig. 3 Roridin E の構造

また、その他の成分についても、各種機器分析の結果よりトリコテセン類と推定しているが、これらはカンジダ感染モデルカイクにおいて延命効果を示さない、もしくは毒性を示すことから、構造活性相関にも興味を持たれる。なお、真菌 FKI-5044 株もトリコテセン類の生産が確認されたが、本真菌は水溶性の抗真菌物質も生産していることから継続して検討を行う。

⑤ 残りの選択株 5 株 (真菌 4 株および放線菌 1 株) についても、今後順次検討を行う予定である。

⑥ 交付期間中に新規抗真菌剤のリードと成り得るような化合物を発見することはできなかつたが、本研究においてカンジダ感染モデルカイク評価系は抗真菌活性のみでなく、化合物の代謝、安定性および毒性を同時に且つ迅速に判断可能なスクリーニング系であることが示唆された。現在も実用的な抗真菌剤の発見を目的とし、本研究を継続している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

M. Iwatsuki, R. Uchida, Y. Takakusagi, A. Matsumoto, CL. Jiang, Y. Takahashi, M. Arai, S. Kobayashi, M. Matsumoto, J. Inokoshi, H. Tomoda, S. Ōmura: Lariatins, novel anti-mycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171., *J Antibiot.* **60**: 357-63 2007

[学会発表] (計 4 件)

1. 内田龍児、金容必、岩月正人、松本厚子、高橋洋子、供田洋、大村智: *Streptomyces* sp. K04-0144 株の生産する新規抗生物質 nosokomycin 類の抗 MRSA 活性 (2007 年度日本放線菌学会・広島県尾道市・2007 年 5 月 31 日)

2. H. Tomoda, R. Uchida: Antimicrobial screen using silkworms as an in vivo infection model

(2007 SIM Annual Meeting and Exhibition · Denver, USA · 2007 年 7 月 30 日)

3. 内田龍児、鈴木聡、山口史哲、関水和久、大村智、供田洋: カイコを利用した感染簡易 *in vivo* 評価による抗真菌剤探索研究 (日本薬学会第 128 年会・横浜市・2008 年 3 月 26 日)

4. R. Uchida, Y. P. Kim, M. Iwatsuki, A. Matsumoto, Y. Takahashi, S. Omura, H. Tomoda: Nosokomycins, Novel Anti-MRSA Antibiotics, Produced by *Streptomyces* sp. K04-0144 (JCMW-DDT 2008 · Tokyo, Japan · Sep. 29, 2008)

5. 内田龍児、浪口慎吾、柳澤千穂、大村智、供田洋: カイコを宿主とする簡易 *in vivo* 評価系を用いた微生物由来抗感染症薬の探索 (日本薬学会第 129 年会・京都市・2009 年 3 月 28 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 龍児

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし