

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659041

研究課題名(和文)カイコ病原性真菌感染モデルを用いた新規感染症治療薬の探索系の確立

研究課題名(英文) Establishment of screening system for antifungal drugs using silkworm fungus infection model

研究代表者

関水 和久 (SEKIMIZU, Kazuhisa)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90126095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、真菌感染症の起因菌のアスペルギルス、及びCandida kruseiの体液内への注射により、カイコが殺傷されることを見出した。また、アスペルギルス感染カイコに対する、抗真菌薬の定量的な治療効果を評価できた。さらに、カイコにおける抗真菌薬の薬剤濃度推移を解析により、哺乳動物と同様な分布相と消失相の二相性がみられ、定常状態における半減期、及び、定常状態における分布容積についてもよく一致していた。カイコにおける抗真菌薬の治療効果と蛋白結合率の関係も、これまで知られている哺乳動物での結果とよく一致していた。従って、カイコを用いた真菌感染症に対する治療薬の評価系が確立できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：When *Aspergillus fumigatus* and *Candida krusei* was injected into hemolymph, all silkworms were killed. Furthermore, antifungal agents showed quantitative therapeutic effect and gave similar ED50 values against silkworm *A. fumigatus* infection model. We next analyzed drug concentration after injection of antifungals into hemolymph of silkworm. These antifungals in silkworm hemolymph could be explained by two-compartment model. In addition, antifungal activities of externally used antifungals were lost by addition of hemolymph, and these antifungals showed low therapeutic activity in silkworm infection models. Meanwhile, antifungal activity of fluconazole, which could use by intravenous injection, was not decreased compared to above three compounds by addition of silkworm hemolymph and fluconazole showed good therapeutic effect on silkworm model. These results suggest that therapeutic effect of antifungals could be evaluated using silkworms, which reflected pharmacokinetics as mammals.

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：真菌 動物モデル カイコ 体内動態

### 1. 研究開始当初の背景

近年、耐性菌が急増しており有効な抗生物質が少ない、カンジダ属やアスペルギルスに対する新規治療薬の開発が望まれている。しかしながら、細菌と真菌では、生物の基本システムが真菌の方がより高等動物に近いために、動物個体に対して毒性を示す確率が高く、実際に毒性が少なく治療効果を示す化合物の探索は非常に困難である。

研究代表者らはカイコを利用した細菌、及びカンジダ(*C. albicans*)感染症モデルを確立し、臨床で用いられている感染症治療薬の治療効果の評価が可能であることを明らかにしていた。実際に、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルを用いて、土壌細菌の培養抽出物から治療効果を指標に探索を行い、新規リポペプチド系抗生物質「カイコシン」を見いだしている。カイコシンは、多剤耐性菌を含むグラム陽性菌に有効であり、マウス黄色ブドウ球菌感染モデルにおいても既存の抗生物質に比べても少ない用量で治療効果を示し、かつ急性毒性も示さないなど臨床応用可能な特長を有する。このように、カイコモデルは、ほ乳類にも治療効果を示す抗生物質を発見できることから、病原性細菌に対する新規治療薬の発見に有効であると考えられる。さらに、カイコモデルは、毒性も同時に評価可能であることから、カイコ真菌感染モデルを利用した治療効果を指標とした探索により、真菌特異的に作用する新規真菌感染症治療薬の探索が可能であると考えられ、本研究において検討を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、カイコを用いた以下の系を確立し、実際に新規抗真菌化合物の探索を実施した。

- (1) アスペルギルスや、*C. albicans* 以外の他のカンジダ属を用いた感染モデルの確立と、抗真菌治療薬の評価系の確立
- (2) 新規抗真菌化合物の治療効果を指標とした探索系の確立

### 3. 研究の方法

#### (1) 試薬と、使用した動物

培地、及び、抗生物質は試薬グレードとして、購入したものを使用した。カイコは卵を愛媛蚕種から購入し、4令までシルクメイト2Sを与えて27°Cで飼育した。4齢眠を分離した翌日、抗生物質無し餌を1日与え、感染実験に利用した。

#### (2) 真菌感染モデルの確立

5令2日目のカイコの体液中に、*Candida krusei* の一晚培養液、又は、アスペルギルスを生理食塩水中に懸濁したサンプルを投与した。アスペルギルスはポテトデキストロース寒天培地で培養したものを利用した。投与後、経時的にカイコの生存数を測定した。抗

生物質の治療効果試験は、アスペルギルスだけを投与した群が、すべて死亡した時点で行った。各群における生存数をグラフにプロットし、半数の生存に必要な薬剤量(Effective doses 50: ED<sub>50</sub>)を求めた。

#### (2) 薬物体内動態の解析

抗生物質溶液を5令幼虫(1.8-2.0g)のカイコの体液中に、使い捨てシリンジで注射した。投与後、一定時間後に腹肢を切断し血液を採取し、等量のアセトンを混和した。その後15,000rpm 5min 4°Cで遠心し上清を得て、乾固した。試料を50%メタノールに再溶解し、0.45µmフィルターで濾過後にHPLCのサンプルとした。HPLCはPEGASIL ODS SP100(4.5φ 250mm)(センシユー科学)によって行った。流速は1ml/minでポンプ(Delta 600)及び検出機(PDA:2996)はWaters社製を使用した。解析はEmpower2を用いて行った。HPLCのクロマトグラムからピーク面積から検量線を作成し、サンプル中の抗生質を定量した。

#### (3) 抗真菌活性の測定

*C. albicans* をサブロー培地で一晚培養し、その培養液をRPMI1640培地で希釈した。抗真菌薬を2倍ずつ段階希釈して培養液に加え、MICはNCCL法に従って決定した。カイコ体液を加えて活性測定を行う場合には、カイコ体液を氷上で回収し3,000rpm, 5min, 4°Cで遠心後の上清に血液のメラニン化を抑制するためにフェニルチオウレア(final 1mM)とゲンタマイシン(final 50µg/ml)を加え、RPMI1640で2倍に希釈してアッセイに使用した。

#### (4) タンパク結合率の測定

カイコ体液を抗真菌活性の測定と同様に回収し、抗真菌薬を終濃度10µMとなるように加え27°Cで10分間培養した。その後、排除分子量3000MW(ミリポア社)のフィルターユニットで14,000×g 4°Cで30分間遠心ろ過した。ろ液に等量のメタノールを加え混和し遠心上清をHPLCサンプルとした。

#### (5) 治療効果を指標とした抗真菌薬の探索

サブロー培地にて30度、2日間培養した*C. albicans*を、カイコの体液中に注射し、引き続き、*C. albicans*に抗真菌活性を有した化合物を同じく体液中に注射した。投与したカイコは、27度で2日間インキュベートし、生存数を測定した。半数以上の生存を与える化合物を治療効果有り判断した。

### 4. 研究成果

#### (1) 真菌感染モデルの確立

これまでに、*Candida albicans*と*Cryptococcus neoformans*によるカイコ感染モデルを確立し、抗生物質による定量的な治療効果を定量的に評価できることを示して

いる (Hamamoto *et al.*, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2004, 48, 774-779, Matsumoto *et al.*, *J Appl Microbiol*, 2011, 113, 138-146)。本研究では、重要な真菌感染症の起原菌である、*Aspergillus fumigatus*、及び *Candida krusei* について、さらにカイコを用いた感染モデルの確立を試みた。それぞれの、真菌をカイコ体液中に投与した結果、それぞれ2日後、及び4日後にカイコが殺傷されることを見出した。病原性がないとされる *Saccharomyces cerevisiae* の注射では、4日後においてもカイコは殺傷されなかった。従って、カイコモデルは病原性真菌一般に、その病原性を評価できる系になっていると考えられる。また、マウスにおけるアスペルギルス感染モデルでは、免疫抑制剤を予め投与する必要があるが、カイコモデルではそのような必要性がない。また、50%の動物が致死するのに要する時間も、多量の胞子を注射すれば2日以内であり、マウスの系に比べると短時間で結果が得られる。また、カイコ幼虫の飼育に必要なコストは、マウスの場合に比べきわめて低い。これらの利点を考慮すると、カイコのアスペルギルス感染モデルは、抗真菌薬を探索する上で有用なモデルであると考えられる。

### (2) アスペルギルス感染カイコを用いた抗真菌薬の定量的な治療効果の評価の確立

次に、アスペルギルス感染カイコを利用した、抗真菌薬の定量的に可能であるか否かについて検討した。アスペルギルスを注射したカイコに、さらに抗真菌薬であるアムホテリシン B、ミカファンギン、イトラコナゾールを投与した。その結果、図1に示すように用量依存的な治療効果が認められた。その ED<sub>50</sub> 値を、マウスにおける文献値と比較したところ、よく一致していた。従って、アスペルギルス感染カイコを用いて抗真菌薬の治療効果を定量的に評価可能であると考えられる。

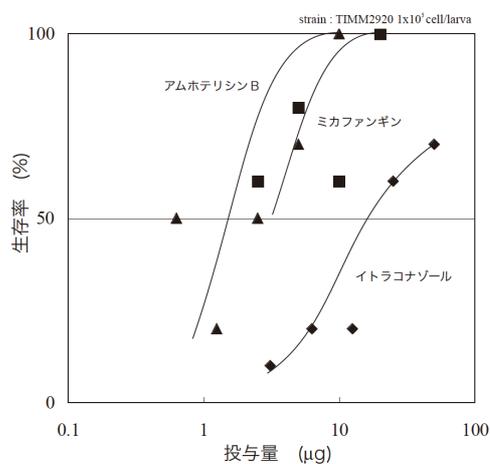


図1 各種抗真菌薬による、アスペルギルス感染カイコに対する治療効果

### (3) 抗真菌薬の体内動態の解析

カイコにおける抗真菌薬の体内動態が、哺乳動物と比較可能であるか否かを検討する目的で、カイコ体液中に抗真菌薬を投与後の血中濃度推移を検討した。抗真菌薬である、フルコナゾールとミカファンギンを、カイコ体液中に投与後、経時的に体液をサンプリングし、その濃度を HPLC にて測定したところ、哺乳動物と同様に分布相と消失相の二相性を示した (図2)。定常状態における半減期は、ミカファンギン、フルコナゾールについて、それぞれ、カイコで 12 時間、マウスでは 5 時間と 13 時間であり、おおよそカイコとマウスとで一致していた。さらに、定常状態における分布容積についても同様に、それぞれ、カイコにおいて 0.5、及び 0.4 mL/g、マウスにおいて 0.4 及び 0.7 mL/g であり、カイコとマウスとでよく一致していた。また、全身クリアランスの値もよく一致していた。従って、抗真菌薬の体内動態は、カイコと哺乳動物とで、よく保存されていると考えられる。

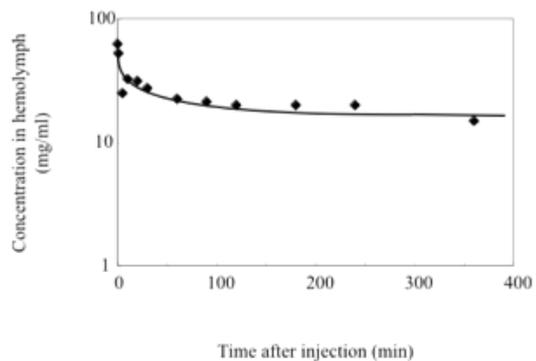


図2 フルコナゾールのカイコ体液中の濃度推移

### (4) 抗真菌薬のタンパク結合率と、治療効果の相関の解析

抗真菌薬の中には、血中タンパク結合率が高いために、治療効果が低いものがある。そこで、抗真菌薬のカイコ体液中のタンパク結合率と、カイコカンジダ感染モデルにおける治療効果の関係について検討を行った。その結果、現在外用薬として用いられている三種の抗真菌薬はタンパク結合率が高く、99%以上であった。また、カイコ体液添加によって抗真菌活性が30倍以上低下した。一方、静注で使用されているフルコナゾールはタンパク結合率が、前述の3種の抗真菌薬に比べ低く、65%であった。また、抗真菌活性の低下も8倍にとどまっていた。さらに、前者3つの抗真菌薬は、カイコ感染モデルにおける治療効果が低く、ED<sub>50</sub>/MIC 値は60倍以上であった。一方、フルコナゾールの ED<sub>50</sub>/MIC 値は1.8で、少ない用量で治療効果を示した。従って、外用薬の三種の抗真菌活性がカイコ血液の添加により顕著に低下するのは、血液中の遊離濃度が1/100以下になるためであると考えられる。これらの結果は、カイコにおいても哺乳類と同様に体液中における抗生

物質のタンパク結合率が治療効果に影響をあたえることを示している。従って、カイコカンジダ感染モデルは、哺乳動物と同様に、タンパク結合率や分布容積等の薬物動態パラメーターを反映した、抗真菌薬の治療効果の評価系になっていると考えられる。

(5) カイコカンジダ感染モデルにおける治療効果を指標とした、抗カンジダ化合物の探索

次にカイコカンジダ感染モデルを用いて、抗真菌活性を示す化合物の探索を試みた。まず、試験管内において抗カンジダ活性を示す化合物をスクリーニングしたところ、49,999化合物のうち、196化合物が増殖阻害活性を示した。それらの化合物を、カイコカンジダ感染モデルにおいて治療効果を検討したところ、治療効果を示す化合物は見いだされなかった。抗黄色ブドウ球菌感染モデルにおけるスクリーニング結果と比較して考察すると、対象となる抗真菌活性を示す化合物が少なかったために、治療効果を示す化合物が見いだされなかったのだと考えられる。抗真菌治療薬の発見のためには、より大きなスクリーニングサイズが必要であると考えられる。

#### 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3件)

- ① Hu, Y. Hamamoto, H. Sekimizu, K., Use of silkworm to evaluate the pathogenicity of bacteria attached to cedar pollen, Drug Discov Ther, 査読有, 7, 2013, 153-157  
DOI:10.5582/ddt.2013.v7.4.153
- ② Dzoyem, J. P. Hamamoto H. Ngameni, B. Ngadjui, B. T. Sekimizu, K., Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species, Drug Discov Ther, 査読有, 7, 2013, 66-72  
DOI:10.5582/ddt.2013.v7.2.66
- ③ Paudel, A. Kaneko, K. Watanabe, A. Shigeki, M. Motomu, K. Hamamoto, H. Sekimizu, K., Structure-activity relationship study of novel iminothiadiazolo-pyrimidinone antimicrobial agents, J Antibiot (Tokyo), 査読有, 66, 2013, 663-667  
DOI: 10.1038/ja.2013.69

[学会発表] (計9件)

- ① 稲垣善則、松本靖彦、浜本洋、片岡啓子、松橋直也、杉田拓也、植木拓朗、奥村秀信、関水和久、「薬剤性組織障害モデルとしてのカイコの有用性」、第25回日本動物実験代替法学会、2012年12月7日～9

日、東京

- ② 杉田拓也、植木拓朗、浜本洋、松本靖彦、関水和久、奥村秀信、「Silkworm(カイコ)を用いた急性毒性試験代替法の開発」、第25回日本動物実験代替法学会、2012年12月7日～9日、東京
- ③ 植木拓朗、杉田拓也、浜本洋、松本靖彦、関水和久、奥村秀信、「Silkworm(カイコ)を用いた急性経口毒性試験代替法の投与方法の検討」、第25回日本動物実験代替法学会、2012年12月7日～9日、東京
- ④ 松本靖彦、上野圭吾、清水公德、金城雄樹、知花博治、川本進、関水和久、「カイコを用いた真菌感染症研究」、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～20日、東京
- ⑤ 関水和久、「病原性細菌によるカイコ感染モデルを利用した新規抗生物質の探索」、東京大学大学院農学生命科学研究科微生物潜在機能探索寄付講座開設記念シンポジウム「微生物機能の多様性」～東京大学のさまざまな部局における微生物研究～(招待講演)、2012年11月28日、東京
- ⑥ 関水和久、「日本化学療法学会の将来を考える：これからの新規抗菌薬の発見と開発」、第60回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会(招待講演)、2012年10月10日～12日、東京
- ⑦ 浜本洋、石川繭子、瀬筒秀樹、坪田拓也、片岡啓子、松本靖彦、垣内力、関水和久、「カイコ病態モデルを利用した医薬品の探索研究」、日本薬学会 第133年会(招待講演)、2013年3月27日～3月30日
- ⑧ 浜本洋、「カイコ病態モデルを利用した医薬品の探索研究」、日本実験動物抱いた法学会第26回大会(招待講演)、2013年12月19日～21日、京都テレサ(京都府京都市)
- ⑨ 関水和久、「シルクワームによる挑戦」、日本実験動物抱いた法学会第26回大会(招待講演)、2013年12月19日～21日、京都テレサ(京都府京都市)

[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]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

関水 和久 (SEKIMIZU, Kazuhisa)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：90126095

(3) 連携研究者

浜本 洋 (HAMAMOTO, Hiroshi)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：80361609