

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010 ～ 2012 年度  
 課題番号：22590013  
 研究課題名（和文）カンジダ感染モデルカイコを利用した天然由来の新規抗真菌剤の開拓

研究課題名（英文）Screening for antifungal agents from microbial origin using a silkworm model of *Candida* infection

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（和文）：

真菌症対策の一環として、病原真菌カンジダを感染させたカイコをスクリーニングの初期段階に利用し、天然資源より抗真菌剤のリードと成り得る新規化合物の発見を目的に探索研究を実施した。微生物の培養液 9,307 サンプルを評価した結果、17 サンプル（真菌：10 サンプル、放線菌：7 サンプル）に延命効果が確認され、このうち真菌 *Penicillium* sp. BF-0003 株の培養液中より新規抗真菌物質 BF-0003C 物質の発見に成功した。本物質はカイコカンジダ感染モデルにおいて、毒性を示すことなく治療効果を示した。

研究成果の概要（英文）：

The *in vivo*-mimic assay system using silkworm larvae was performed as the primary screening tool to discover antibiotics against *Candida albicans*. Microbial culture broths were screened in this *in vivo*-mimic assay system, and a new antifungal compound, designated BF-0003C, was isolated from the culture broth of *Penicillium* sp. BF-0003. BF-0003 had potent anti-*C. albicans* activity by the agar diffusion method with an inhibition zone of 22 mm at 10  $\mu$ g/6 mm disk. Furthermore, *C. albicans*-infected silkworms survived when BF-0003C was injected at 25 to 100  $\mu$ g/larva.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
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・天然物化学

キーワード：抗真菌剤、天然資源、天然活性物質、カイコ、*in vivo* スクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

近年、国内の抗細菌・抗真菌剤の承認件数は激減しており、これらの薬剤開発の低迷が危惧されている。特に臨床で使用される抗真菌剤は、アムホテリシン B、アゾール系抗真菌薬およびキャンディン系抗真菌剤など数種で、依然として薬剤の絶対数は少ない。

しかし世界の抗真菌剤の研究開発に目を向けてみると、アゾール系薬剤の誘導体開発に重点が置かれ、新規骨格あるいは新たな作用機序を持つ薬剤の開発は抗細菌剤と比較して遅れているのが現状である。この理由として、真菌が動物細胞と同じ真核生物であるために、選択毒性を持たせることが極めて困難

なことが挙げられる。また、期待されていたコンビナトリアル・ケミストリーやハイスループット・スクリーニングではファーマコアに成り得るような新たな基本構造を創製することが難しいことも考えられる。したがって、5年、10年先の真菌症対策を見据えた新たな抗真菌剤の供給が急務と考えられた。

## 2. 研究の目的

近年、高度先端医療などの影響で免疫力が低下した易感染者の増加に伴い、真菌症、特に1年生存率が極めて低い重篤型深在性真菌症の発症率が高くなっている。さらに、多剤耐性真菌症の出現も増加傾向であるため、新たな真菌症治療法の確立は急務とされている。しかし、適用可能な抗真菌剤が少ないため、現行の治療法が奏効しない症例が多数存在し、問題が一層深刻化している。そこで本研究では、真菌症対策の一環として新規な薬剤開発を目的に、病原真菌を感染させたカイコを簡易的な *in vivo* 評価系としてスクリーニングの初期段階に導入し、探索源としては古くから多くの化合物が有効利用された実績を持つ天然資源（微生物の培養液等）より抗真菌剤の新規リード化合物の発見を目指した。

## 3. 研究の方法

申請期間中下記の実験項目(1)~(5)を繰り返し実施し、可能な限り多くの抗真菌活性を有する化合物の取得を行った。

### (1) カイコの飼育

モデル生物として用いるカイコの飼育を行った。具体的には蚕種 ボンビックス・モリ: *Bombyx mori* (系統: Fuyo Tukubane) の卵を養蚕業者から購入し(1,000個/週)、感染実験に使用可能となる5齢虫まで約20日間飼育した。

### (2) 天然資源(微生物培養液)の供給

スクリーニングのサンプルには、天然資源の中でこれまで申請者が様々な生物活性物質の探索源として用いて来た微生物代謝産物を用いた。独自および外部研究機関(北里生命科学研究所、富山県立大学、秋田県立大学、OPバイオファクトリー等)より提供された真菌、放線菌および細菌をそれぞれ2~4種類の培地で培養した培養液あるいは、その分画濃縮サンプルをスクリーニングに供した。

### (3) カンジダ感染モデルカイコの作製および抗真菌剤のスクリーニングの実施

試験真菌に臨床分離カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans* TIMM1768株)を用い、これを5齢幼虫にまで飼育したカイコの背

脈管(ヒトの血管に相当)に注射することでカンジダ感染モデルカイコ(カイコ評価系)を作製した。この感染モデルカイコにサンプルを同様にして接種し、2~3日後に抗真菌効果を確認した。この時の判定基準は薬剤無投与群と比較して延命効果が認められるものとし、効果の確認されたサンプルは項目4の培養および精製過程へ進めた。

### (4) 抗真菌活性物質の生産および単離精製

項目(3)で有効と判断されたサンプルは、三角フラスコあるいはジャーファーメンター等を用いた大量培養を行い、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・分配および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物質の単離を行なった。

### (5) 抗真菌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、紫外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル(NMR)等)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

真菌症対策の一環として、カイコ評価系を用い、天然資源より抗真菌剤のリードと成り得る新規化合物の発見を目的に探索研究を実施した。スクリーニングは、まずペーパーディスク法で抗カンジダ活性を示した真菌および放線菌などの微生物の培養液を選択し、これをカイコカンジダ感染モデル(カイコ評価系)で評価を行い、治療効果(延命効果)が認められる培養液を精製候補株とした。共同研究機関より提供された微生物の培養液9,307サンプルを評価した結果、17サンプル(真菌:10サンプル、放線菌:7サンプル)に延命効果が確認された。さらにこれらのうち、これまでの研究成果においてカイコ評価系で延命効果を示すことを明らかにした化合物(トリコテセン類2株およびポリエーテル系化合物:5株)を除く真菌の選択株8サンプルおよび放線菌の選択株2サンプルについて検討を進めた。

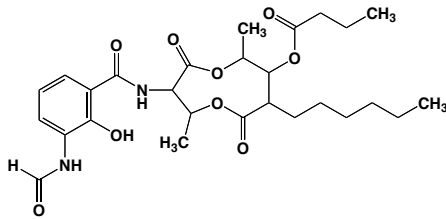
### (1) 真菌 FKI-6203株および6314株

真菌 FKI-6203 および 6314 株の培養液中より HPLC の分析結果、それぞれアザフィロン系およびモノルデン系の化合物と同定したが、いずれの化合物もカイコ評価系での延命効果は非常に弱かった。

### (2) 放線菌 K10-0382 株

本放線菌の培養液中より antimycin A2

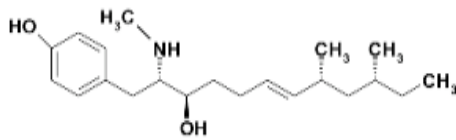
(Harada Y. *et al.*, *J Antibiot*, **11A**, 32, 1958)を単離し、カイコ評価系において 0.05~0.5 mg/幼虫の濃度では延命効果が認められたが、高濃度では毒性を示した。



Antimycin A2 の構造

(3) 真菌 OPTF-00177 株

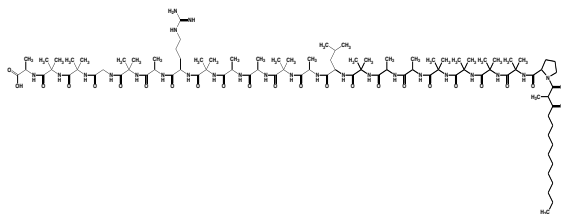
本真菌の培養液中より tyrocherin (J. *Antibiot.*, **57**, 634-8, 2004) およびその類縁化合物 2 成分を単離し、ペーパーディスク法において *C. albicans* ATCC 64548 に対して、それぞれ 20、23 および 9 mm の阻止円 (10 µg/6 mm ペーパーディスク) を示した。このうち、tyrocherin はカイコ評価系において、1.5~150 µg/larva の濃度で延命効果を示した。



Tyrocherin の構造

(4) 真菌 BIYAKU-94 株

本真菌の培養液中よりペプチド系化合物 SCH643432 (J. *Antibiot.*, **56**, 437-447, 2003) を単離し、ペーパーディスク法において *C. albicans* ATCC 64548 に対して、18 mm の阻止円 (10 µg/6 mm ペーパーディスク) を示した。また、カイコ評価系では 25 µg/larva の濃度で延命効果を示したが、それ以上の高濃度では毒性を示した。

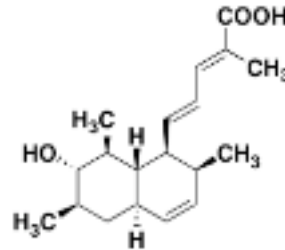


SCH643432 の構造

(5) 真菌 FKI-5190 株

本真菌の培養液中よりジテルペン化合物 2-methyl-5-[(1S,2S,4aR,6R,7S,8S,8aS)-1,2,4a,5,

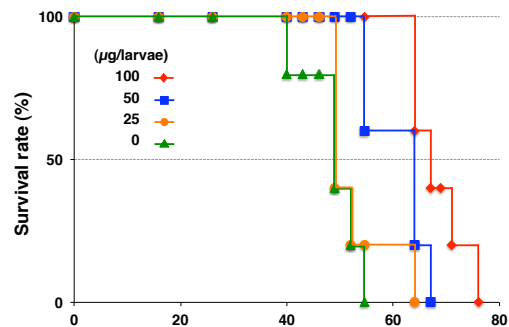
6,7,8,8a-octahydro-7-hydroxy-2,6,8-trimethyl-1-naphthalenyl]-(2E,4E)-2,4-pentadienoic acid (PCT/JP04/019402) を単離し、ペーパーディスク法において *C. albicans* ATCC 64548 に対して、18 mm の阻止円 (10 µg/6 mm ペーパーディスク) を示した。カイコ評価系では高濃度ではあるが 50 µg/larva の濃度で延命効果を示した。



ジテルペン化合物の構造

(6) 真菌 BF-0003 株

新規物質 BF-0003C 物質の発見に成功し、本物質はペーパーディスク法において抗細菌活性を示すことなく *C. albicans* ATCC 64548 に対して、22 mm の阻止円 (10 µg/6 mm ペーパーディスク) を示した。またカイコ評価系においては、25 ~ 100 µg/幼虫の濃度で延命効果を示し、この範囲では毒性を示さなかった (下図)。今後、本物質については詳細な抗真菌スペクトルの測定および作用点の解明を進める予定である (特許出願予定)。



カンジダ感染モデルカイコ評価系における BF-0003C 物質の効果

なお、以下の3株については、申請期間終了後も継続して検討を進める。

(7) 放線菌 K10-0569 株

活性物質 1 成分を単離し、現在構造解析を進めている。

(8) 真菌 FKI-5302 株

活性物質 1 成分を単離し、現在構造解析を進めている。

(9) 真菌 BF-0041 株

活性物質 1 成分 (BF-0041 物質) を単離し構造解析を行っている。本菌株は BF-0041 物質の抗カンジダ活性を増強する物質も同時に生産していることも明らかになっている。現在、活性増強物質の単離を進めており、併用による治療効果に興味を持たれる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 内田龍児, 供田 洋

カイク細菌感染モデルを利用した感染症治療薬の探索  
日本薬学会第 133 年会 (横浜)

② 内田龍児, 供田 洋

カイク簡易感染症モデルを利用した治療効果を示す抗生物質の探索  
第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム (大阪)

[その他]

ホームページ

[http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbchem/wei\\_sheng\\_wu\\_yao\\_pin\\_zhi\\_zao\\_xue/Welcome.html](http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbchem/wei_sheng_wu_yao_pin_zhi_zao_xue/Welcome.html)

6. 研究組織

(1) 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