

博士論文

微生物が生産する新規抗白癬菌抗生物質

AS2077715 に関する研究

大隅 恵介

目次

略号一覧

序論	1
本論 微生物が生産する新規抗白癬菌抗生物質 AS2077715 に関する研究	
第1章 抗白癬菌抗生物質のスクリーニング	
1.1 実験方法	13
1.2 実験結果	
1.2.1 白癬菌培養条件の検討	15
1.2.2 微生物培養サンプルからの抗白癬菌抗生物質スクリーニング	18
1.3 考察	19
第2章 AS2077715 生産菌の菌学的性質	
2.1 実験方法	22
2.2 実験結果	
2.2.1 生産菌 No.339855 株の形態学的性質と同定	23
2.2.2 No.339855 株の培養特性	24
2.3 考察	25
第3章 AS2077715 の培養生産および単離精製	
3.1 実験方法	29
3.2 実験結果	
3.2.1 No.339855 株の液体培養化検討	34
3.2.2 生産培地組成検討	34
3.2.3 No.339855 株の培養および AS2077715 の生産	37
3.2.4 AS2077715 の単離精製	39
3.3 考察	41

第4章 AS2077715 の物理化学的性質および構造解析	
4.1 実験方法	42
4.2 実験結果	43
4.3 考察	44
第5章 AS2077715 の生物学的性質	
5.1 実験方法	50
5.2 実験結果	
5.2.1 AS2077715 の <i>in vitro</i> 抗真菌活性	57
5.2.2 AS2077715 の <i>in vitro</i> 抗細菌活性	57
5.2.3 AS2077715 のシトクローム <i>bcl</i> 複合体阻害活性と細胞毒性	61
5.2.4 AS2077715 の <i>T. mentagrophytes</i> に対する ATP 産生阻害活性	64
5.2.5 AS2077715 の抗白癬菌時間一殺菌曲線試験	65
5.2.6 AS2077715 のマウス急性毒性	68
5.2.7 AS2077715 のモルモット白癬菌感染モデルにおける評価	68
5.2.8 AS2077715 の薬物動態	88
5.3 考察	84
総括	92
参考文献	95
謝辞	103

略号一覧

ATP :	adenosin 5'-triphosphate
AUC :	area under the curve
BSG :	Buffered saline gelatin
C0 :	initial serum concentration
CFU :	colony forming unit
CLt :	total body clearance
Cmax :	maximal plasma concentration
DNA :	deoxyribonucleic acid
ED ₅₀ :	50% effective dose
EDTA :	ethylenediaminetetraacetic acid
F :	bioavailability
GAM :	Gifu anaerobic medium
HPβCD :	2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin
HPLC :	high performance liquid chromatography
HR-ESI-MS :	high resolution-electrospray ionization-mass spectrometry
IC ₅₀ :	50% inhibition concentration
i.d. :	inside diameter
i.p. :	intraperitoneal
IR :	infrared spectroscopy
LD ₅₀ :	50% lethal dose
LSU :	Large Subunit
MIC :	minimal inhibitory concentration
MHA :	Mueller-Hinton agar
MHB :	Mueller-Hinton broth

NMR :	nuclear magnetic resonance
MOPS :	3-Morpholinopropanesulfonic acid
MSD :	modified Sabouraud Dextrose
ODS :	octadecylsilyl
PAS :	periodic acid-Schiff
PBS :	phosphate buffered saline
PD :	pharmacodynamics
PG :	propylene glycol
PK :	pharmacokinetics
PMV :	packed mycelial volume
p.o. :	per os
QOL :	quality of life
Rf :	rate of flow
ROS :	reactive oxygen species
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute medium
SD :	Sabouraud Dextrose
$t_{1/2, \beta}$:	half-life at terminal phase
T_{max} :	time to C_{max}
$T_{>MIC}$:	time above MIC
UV :	ultraviolet
V_{dss} :	volume of distribution at steady state
YM :	yeast mold

序論

爪に白癬菌が感染・増殖して爪甲の混濁、肥厚、変形などの病変を生じる疾患を爪白癬症と称する。ケラチンタンパクを栄養源にして生息する白癬菌は足白癬（水虫）を生じ、その病変より連続して足の爪甲に感染して爪白癬を発症することが多く、親指が好発部位である。時に手白癬や足白癬などから感染して手指の爪白癬を生じることもあるが、発症頻度は足の爪白癬と比べて低い[1]。

爪白癬は通常例では疼痛やかゆみといった自覚症状がなく、爪甲に変化を認めていても外傷や加齢のためと考えて医療機関を受診せずに放置されていることが多く、爪白癬患者の罹患率を正確に算定することはできない。日本においては、爪白癬は人口の約 10%に罹患していると推計されている[2] [3]。欧米、アジアでの最近の調査でもほぼ同様の成績となっている[4] [5] [6] [7] [8] [9]。高い罹患率を示す理由として、白癬菌は普遍的に存在し、ヒトに高い感染性を持つことがあげられる。また、爪内の白癬菌は宿主防御系の攻撃から免れて簡単には排除されないことが慢性化につながり、さらに、爪に抗真菌薬（とくに外用薬）が到達しにくいため根治治療が難しい。以上の理由から、爪白癬症治療薬は複数上市されているが、爪白癬の患者数は減少していない[10]。爪白癬は加齢とともに増加する疾患であり[11]、年齢が増すにつれて罹患率が上昇する。日本においても高齢化が進むにつれてその罹患率はさらに増加してゆくと推測される。爪白癬を発症しやすくさせる危険因子として、加齢以外に、男性であること、テニスや陸上競技など足に急激に力が加わるスポーツ、水泳や体操など素足になるスポーツが知られている。爪甲に微小な外傷を生じ白癬菌が爪甲に侵入しやすくなると推測されている。また、糖尿病、HIV 感染・免疫抑制薬の長期投与などの免疫不全状態、末梢循環不全などの患者間では爪白癬の罹患率が高い。これらの疾患の合併患者に爪白癬を生じると多くの指の爪が侵され

たり、重症化することが多い[12] [13]。

原因菌としては、白癬菌属 (*Trichophyton* spp.) の *Trichophyton mentagrophytes* と *Trichophyton rubrum* が原因菌のおおよそ 80~90%を占める[14] [15] [16] [17] [18]。

診断としては、爪疾患の約半分が爪白癬といわれているため、爪甲の病変、特に混濁・肥厚・変形などを伴っている場合には、爪白癬の罹患を疑う。次に以下のような真菌学的な検査を施行し、実際に白癬菌が存在することを確認して爪白癬の診断を確定する。この検査の中では、直接鏡検と培養が **golden standard** とされている。直接鏡検法では、KOH 鏡検法やパーカーインク法等がある。KOH 鏡検法は、採取した検体に 20~30% DMSO を含む KOH 液を数滴加えて、数分~数十分加熱した後、コンデンサーの光量を絞って観察する。主として菌糸が確認される。菌要素をより鮮明に判別する方法として、KOH 液にパーカーインクやクロラゾール液を添加する方法や、KOH 法に PAS 染色を合わせて行う方法なども推奨されている[19] [20] [21]。培養検査では、感染部位から採取した検体を通常サブローデキストロース寒天培地、Mycosel 寒天培地上で培養を行う。25 °C ないし室温にて 7~14 日培養すると白色~黄白色~白褐色調の絨毛~綿毛~粉末状の集落を形成する。

治療の必要性については議論が分かれるところである。足の爪白癬では人目にさらされるわけではないので、外観的な問題だけで抗真菌内服薬による高額な治療費を使う必要があるかという疑問がある。しかしながら、以下の観点から、できるだけ積極的に治療をすべきと考えられている。一つは身体的な障害であり、もう一つは患者の QOL を低下させることである。身体的障害としては、爪白癬患者では、特に手指の場合には触覚などの知覚が低下してパソコンなどのキーボード操作、楽器の演奏など指先で扱う仕事に支障を生じる例も見られる。足爪の場合でも病変が高度になると陥入爪や爪甲肥厚を伴い疼痛を認

め、歩行、起立、運動に支障を生じる。履物が合わなくなることや靴下が引っかかりすぐに破れるなどの問題を生じることもある。QOLとして、Lubeckら[22]が調査した結果では、爪白癬症グループ患者の QOL は爪白癬症でない患者群より統計学的に有意差をもって劣っていた。Schein ら[23]の調査では、爪白癬症患者は外観の問題と同様に不快感など身体的な苦痛を有していた。54%の患者が足に不快感、36%が歩行時に疼痛、40%が履物を履くときに何らかの障害を認めていた。また、67%の患者がこの病気のために悩んでいると報告した。以上のごとく、爪白癬は単に外観的な障害のみの疾患ではなく、肉体的ないし精神的な負担も大きく、QOL を大きく損ねる疾患であることを認識すべきである。

爪白癬に対する治療として、内服療法、外用療法、局所療法があるが、症例によっては併用療法を行う。病状が進行し、爪内部や爪床に感染が認められる場合には、外用薬を爪の外側から塗布しても白癬菌が存在する爪内や爪床まで薬剤が浸透しないことから[24]、内服療法が選択される。現在、日本で認可されている爪白癬症の経口治療薬は、図 1 に示す 3 薬剤のみであり、細菌感染症治療薬と比べると選択肢が少ないのが現状である。

1939 年に発見されたグリセオフルビン（Griseofulvin、図 1）はアオカビ *Penicillium griseofulvum* が生産する抗真菌薬で、爪白癬症の経口薬として 1959 年に認可され、一番古くから使用されている[25]。作用機序としては、真菌の微小管に結合して脱重合を阻害し、有糸分裂を阻害する[26]。これとは別に、体内で合成中のケラチンに結合する特徴を有するため、皮膚・爪・毛髪に蓄積し、その部位に感染している真菌に効果を発揮する[27]。真菌のうち皮膚糸状菌（*Trichophyton* 属、*Microsporum* 属や *Epidermophyton* 属）に抗菌スペクトルを示すが、*Phytophthora* などの藻菌類、*Saccharomyces* 属、*Candida* 属などの酵母や *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属などの糸状菌には抗菌作用を示さない[28]。ま

た、静菌的な作用のため、爪甲の伸長により白癬菌が先端より排除される期間中服用を継続する必要がある、指爪の場合は約半年、足爪の場合は約1年以上必要とされている[29]。しかしながら、頭痛、腹痛、下痢、などの副作用があり、治療を中断してしまう場合も多い。1錠の薬価は約11円と安価な薬剤であり、コストパフォーマンスの高い薬剤であったが、他2薬剤の普及に伴い、第一選択薬ではなくなったため、2008年に国内での製造・発売は終了となった。

塩酸テルビナフィン（以下テルビナフィン、図1）はスイスのサンド（現ノバルティス）によって開発された合成抗真菌剤である。国内では1993年にアリルアミン系抗真菌薬としてはじめてラミシールという商品名でクリーム剤が承認され、1997年には錠剤が承認された。テルビナフィンは真菌細胞内のスクアレノエポキシダーゼを選択的に阻害し、スクアレノの蓄積並びにエルゴステロール含量の低下をもたらす抗真菌作用を示す[30]。皮膚糸状菌に対しては低濃度で細胞膜構造を破壊し、殺真菌的に作用する[30] [31]。テルビナフィンは広い抗真菌スペクトルをもち、皮膚糸状菌（*Trichophyton* 属、*Microsporum* 属、*Epidermophyton* 属）、*Candida* 属、*Sporothrix* 属及び黒色真菌に対して優れた抗真菌活性が認められている[32] [33] [34] [35]。テルビナフィン内服による爪白癬症の標準治療スケジュールは通常1日125mgを初期用量として、3～6か月間1日1回食後服薬する。臨床効果は治癒率が60-80%にまで達する[36]。テルビナフィンの登場により爪白癬の治療は改善されたが、投与中に肝障害（肝不全・肝炎・黄疸など）や血液障害（汎血球減少・無顆粒球症など）が現れ、死亡に至った例もあり、投与前と投与中には肝機能検査や血液検査が必要とされる。以上の理由から、テルビナフィンは外用抗真菌剤で治療が困難な場合にのみ処方され、必ずしも使いやすい薬剤とは言えない。

イトラコナゾール（図1）はトリアゾール系の抗真菌薬で、皮膚糸状菌（*Trichophyton* 属、*Microsporum* 属、*Epidermophyton* 属）、*Candida* 属、*Malassezia*

属、*Aspergillus* 属、*Cryptococcus* 属、*Sporothrix* 属、ホンセカエア属に抗菌作用を示し、スペクトラムが広いことから深在性真菌症薬としても使用されている[37]。本剤は真菌の細胞内のシトクローム P450 酵素である lanosterol 14- α dimethylase を抑制することにより真菌の細胞膜合成過程のラノステロールからエルゴステロールへの移行を阻害し、細胞膜の合成が阻止されることにより抗真菌作用を発揮する[38] [39]。爪白癬治療に用いる場合は、薬剤の爪への集積性と副作用の観点から、以下のパルス療法が標準となっている。1回 200mg を1日2回(1日量 400mg) 食直後に1週間経口投与し、その後3週間休薬する。これを1サイクルとし、3サイクル繰り返す[37]。臨床効果は治癒率が 60-80% にまで達する[36]。治療効果に関しては、テルビナフィンと同等であるとの報告とテルビナフィンの方が優れるという報告がある[40] [40] [41]。現在、テルビナフィンと共に爪白癬症への内服処方第一選択薬となっており、短期間で治療を完了したい場合はイトラコナゾールのパルス療法を、時間がかかっても高い治癒率を期待する場合はテルビナフィンの連続投与を選択することになる[42]。イトラコナゾールはヒトの CYP3A4 及び P 糖蛋白に対して阻害作用を示すことから、P-450 により代謝される薬剤と併用すると、併用薬の薬物代謝に影響を与えてしまう[43]。いわゆる、薬物相互作用に注意する必要がある。また、副作用として肝機能障害がおこる危険性があることから、治療前に血液検査をして、肝機能に障害がないかを検査する必要がある。

テルビナフィン、イトラコナゾールの承認により、爪白癬症は治療可能な感染症となったが、治療完了後の長期フォローアップ試験の結果から、これらの治療後数年後の再発率は 20%以上と高いことが判明している[44] [45] [46]。これら再発は、再感染も含んでいる数字と考えられるが、爪に感染している白癬菌が完全に殺菌されていないことを示唆している。テルビナフィンやイトラコナゾールは *in vitro* の試験において、生育中の白癬菌に対し低濃度で生育阻害活

性を示す。しかし、感染した爪内の白癬菌は生育中の菌もいれば、孢子など生育を休止している菌も存在する。細胞膜合成阻害を作用機序とするこれら薬剤は、細胞膜合成を盛んに行っている生育中の菌に対しては効率よく生育阻害活性を示すが、生育をしていない休眠期の菌には作用できない。従って、これら薬剤では、爪中の白癬菌を完全に殺菌できていないのではないかと示唆されている[47]。それゆえ、これら薬剤の作用機序で爪白癬の根本治療を行うには限界がある。さらに、上述のようにこれら薬剤は薬物相互作用や副作用の問題もあることから、必ずしも使いやすい薬剤とは言えない。従って、薬効面や副作用面の問題を克服できる新規作用機序を有する新しい薬剤の開発が強く望まれている[48]。

本研究は、新規経口抗白癬症治療薬の創製を目的として、微生物培養物を対象に抗白癬活性を有する化合物の探索を行った。

本研究で単離された AS207715 物質はミトコンドリアシトクローム *bc1* 複合体の阻害剤であることが判明したため、以下に、ミトコンドリアシトクローム *bc1* 複合体とその阻害剤に関する概略を述べる。

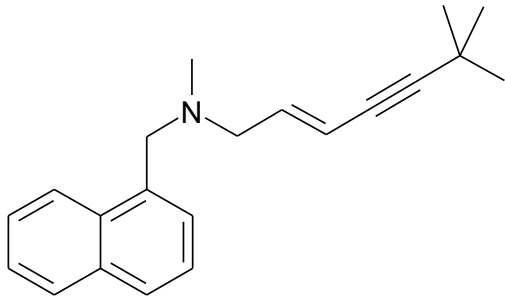
ミトコンドリアでは、内膜に存在する電子伝達系が電子を内膜に伝達させて、水素イオン（プロトン）を膜間スペースに輸送し、生じるプロトン濃度勾配を用いて、ATP 合成酵素が共役的に ATP を合成する（酸化的リン酸化；図 2）。電子伝達系は 5 つの複合体と、CoQ（補酵素 Q、ユビキノロン）、シトクローム *c* で構成されており、3 番目の複合体（複合体 III）はシトクローム *bc1* 複合体、シトクローム *c* 還元酵素とも呼ばれる。還元型 CoQ（CoQH₂、ユビキノール）は、シトクローム *bc1* 複合体のシトクローム *b* に、2 個の電子を伝達し、2 個の水素イオンを膜間スペースに汲み出し、酸化型 CoQ に戻る。この際、2 個の電子の内、1 個は、シトクローム *bc1* 複合体のシトクローム *c*₁ を経て、ミトコンドリア内膜の膜間スペース側に存在するシトクローム *c* に伝達される。もう 1

個の電子は、シトクローム *b* 内を移動して、酸化型 CoQ に伝達され、一電子還元する。この還元型 CoQ は、マトリックス側から 2 個の水素イオンを取り込み、膜間スペースに水素イオンを汲み出す (Q サイクル) (図 2)。

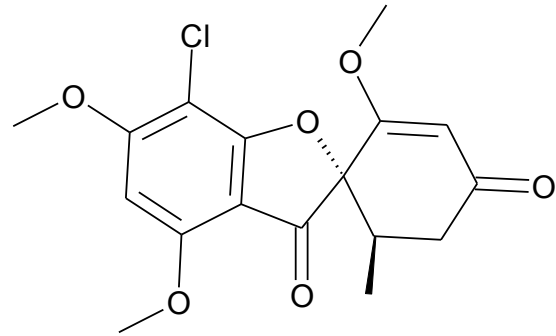
ミトコンドリア電子伝達系と酸化的リン酸化を阻害する物質、いわゆる呼吸鎖阻害剤は、これまでに微生物代謝産物として数多く単離されている[49]。代表的なシトクローム *bc1* 複合体阻害剤の構造を図 3 に示す。アンチマイシンは最も有名なシトクローム *bc1* 複合体阻害剤であり、最もよく解析されている。アンチマイシンはシトクローム *bc1* 複合体を構成するシトクローム *b* のユビキノ還元サイト (Q_n サイト) に結合し、シトクローム *c* の還元反応を阻害することが明らかとなっている。Q_n サイトに結合する他のシトクローム *bc1* 複合体阻害剤としては、*Penicillium funiculosum* Thom が生産する funiculosin[50]、*Cylindrocladium iliciola* strain MFC-870 が生産する ilicicolin H[51]などが知られている。Myxothiazol はシトクローム *b* のユビキノール酸化サイト (Q_p サイト) に結合する阻害剤である[49]。これらシトクローム *bc1* 複合体阻害剤は電子伝達系を阻害することにより抗真菌活性を示すことが知られているが、哺乳類のシトクローム *bc1* 複合体に対する阻害活性も有するため、哺乳細胞への障害性や哺乳動物への毒性も示す[49]。これは、電子伝達系は生命活動の根幹のシステムであり、それを構成するタンパク質が種を越えて高度に保存されていることに由来する。既存のシトクローム *bc1* 複合体阻害剤のほとんどが非特異的に真菌と哺乳類の複合体を阻害するが、真菌の複合体に選択性を示す阻害剤も存在する。Ilicicolin H は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のシトクローム *bc1* 複合体を 3-5 nM で阻害するのに対し、ウシ心臓由来の複合体に対する阻害活性は 200-250 nM と弱く、酵母の複合体に選択性を示す阻害剤である[51]。しかし、誘導体研究も行われているが、臨床に用いるレベルの誘導体の創出までには至っていない[52]。このように、シトクローム *bc1* 複合体をターゲットとした

抗真菌薬の創出は現在までに成功していない。

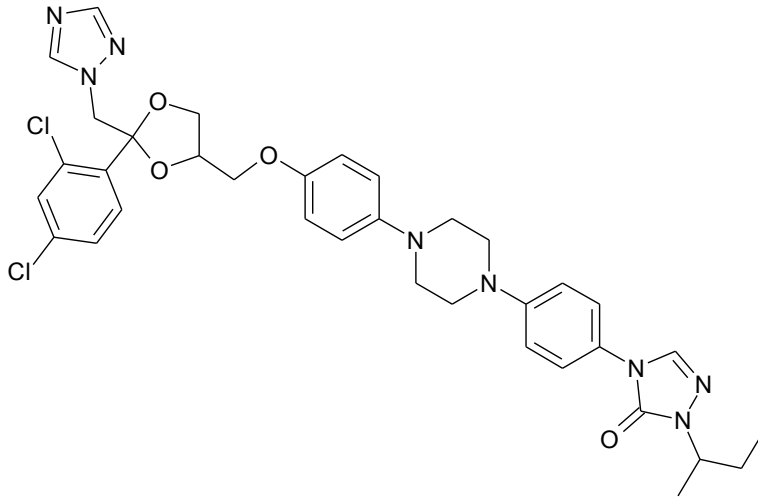
単離された AS2077715 は構造解析の結果、funiculosin と類似の構造を有する新規なポリケチド化合物であることが判明した (図 4)。本物質は白癬菌のミトコンドリアシトクローム *bcl* 複合体を阻害し、抗白癬菌活性を示した。一方で、哺乳類のシトクローム *bcl* 複合体に対しては白癬菌のシトクローム *bcl* 阻害活性より 500 倍以上弱く、白癬菌に選択性が高い阻害剤であることが判明した。さらに、テルビナフィンより短時間の作用時間で殺白癬菌活性を示し、足白癬モデルを用いた評価系で、テルビナフィンと同等以上の白癬菌減少効果を示した。以下に、抗白癬抗生物質のスクリーニング、本物質生産菌株の特徴、培養、精製、物性、生物学的性質についての研究の詳細について述べる。



Terbinafine



Griseofulvin



Itraconazole

図1 日本で認可されている爪白癬症の経口治療薬

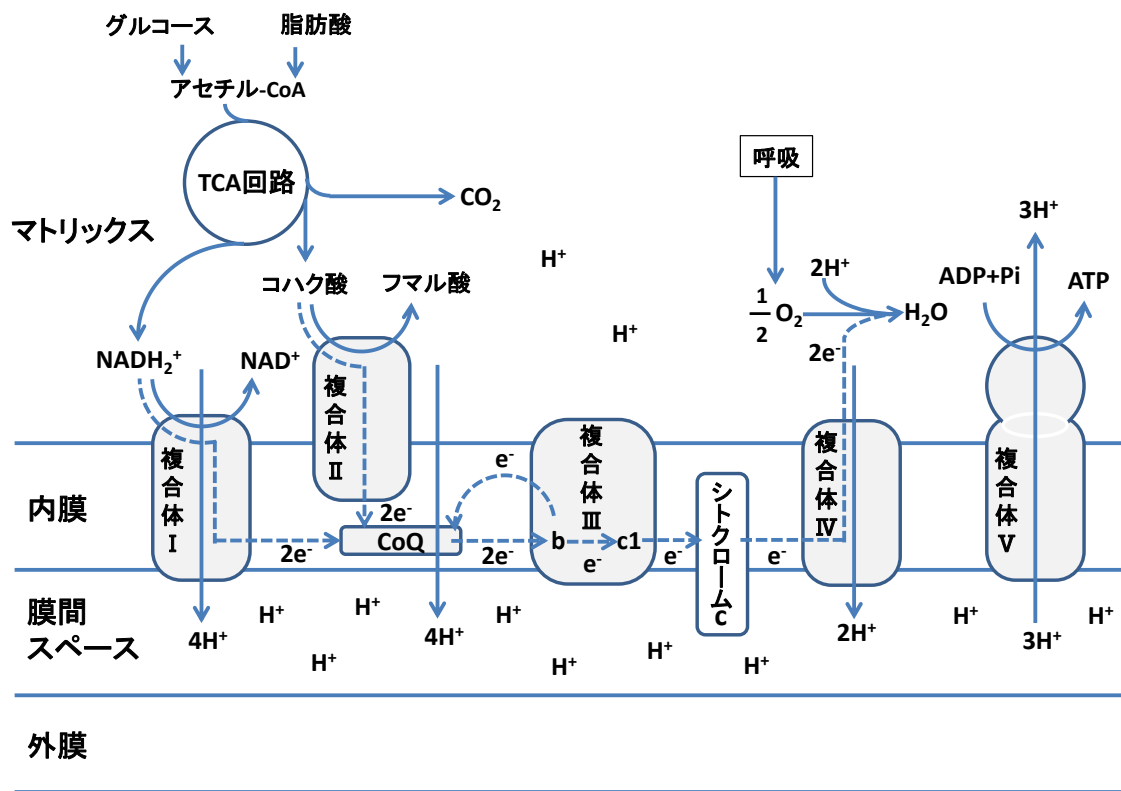
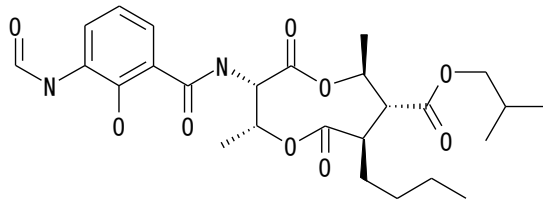
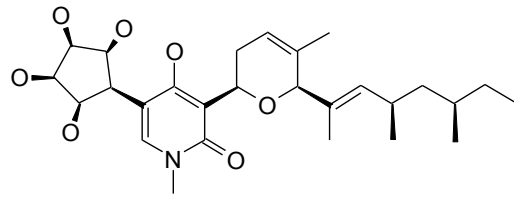


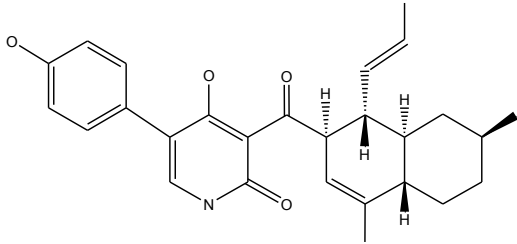
図2 ミトコンドリアの電子伝達系と酸化的リン酸化 (ATP 合成)



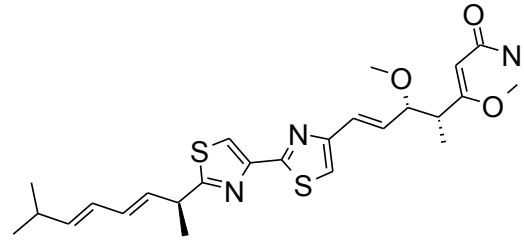
Antimycin A3



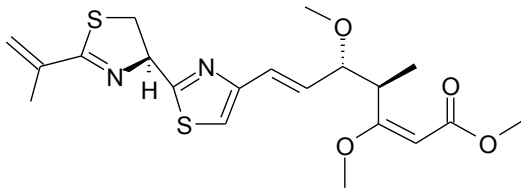
Funiculosin



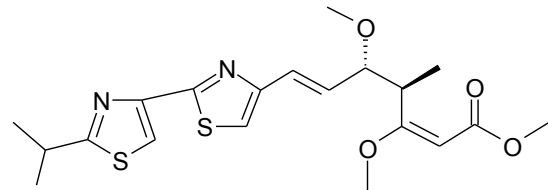
Ilicolin H



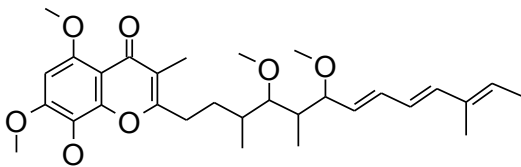
Myxothiazol



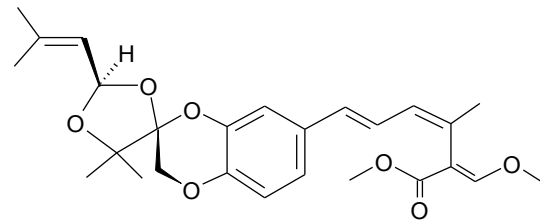
Melithiazol A



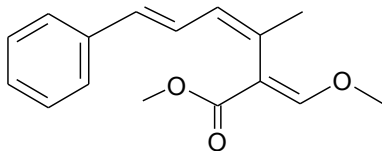
Cystothiazol A



Stigmatellin

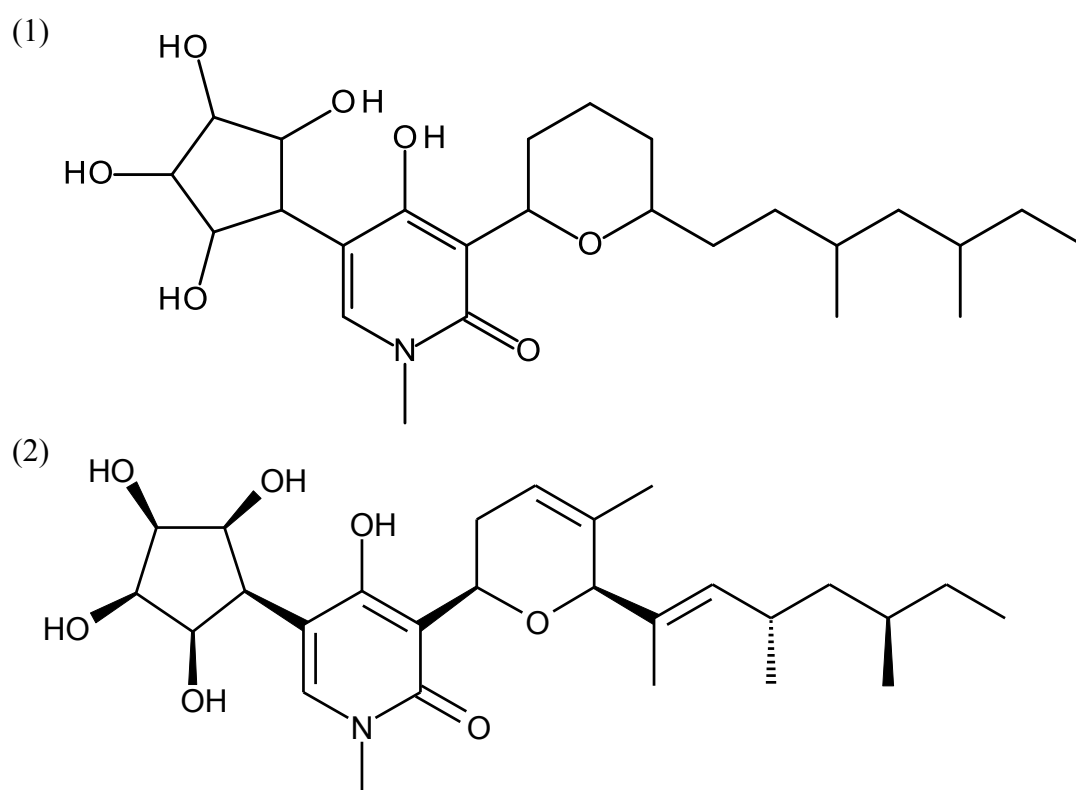


Strobilurin E



Strobilurin A

図3 シトクローム *bcl* 阻害剤



☒ 4 Chemical structure of AS2077715 (1) and funiculosin (2)

第1章 抗白癬菌抗生物質のスクリーニング

本章では、白癬菌の生育条件の検討を中心に行ったスクリーニング系の構築、及び、微生物代謝産物からの抗白癬菌抗生物質のスクリーニング結果について述べる。

Trichophyton 属を生育させる際に用いる培地として、ポテトデキストロース培地やサブローデキストロース培地が頻用される。しかしながら、これらの培地は主に菌の同定を目的に用いられるものであり、抗白癬物質の抗白癬活性を測定する目的には最適化されていない。微生物培養サンプル中に含まれる抗白癬菌物質を検出するためには、液体培養下における抗白癬活性の感度が重要となる。スクリーニングを開始するにあたり、抗白癬菌活性の感度向上を目的として、培地組成を中心に白癬菌生育条件の検討を行った。

1.1 実験方法

・材料

硫酸マグネシウムは硫酸マグネシウム・7水和物を、塩化カルシウムは塩化カルシウム・2水和物を用いた。

・白癬菌培養検討

白癬菌はアステラス製薬臨床分離株コレクションから *Trichophyton mentagrophytes* FP2103 株と *Trichophyton rubrum* FP596 株を用いた。胞子液は、ポテトデキストロース寒天培地斜面培養物に滅菌生理食塩水を加え懸濁し、その懸濁液をガーゼ濾過後、滅菌水にて 1×10^8 個/mL に調整した。この胞子懸濁液を培地で希釈し、96-well 平板 microtiter plate の各 well に接種した（最終菌量/最終液量/well : 1×10^4 個/100 μ l/well）。24 時間培養後、等量の CellTiter-Blue Cell

Viability Assay (プロメガ株式会社) を各 well に添加し、試薬のプロトコールに従い、プレートリーダーにて菌の生存性を測定した。

- ・ 1 次評価系 (抗白癬菌活性)

白癬菌は *T. mentagrophytes* FP2103 株を用いた。菌液は前述と同様の方法で調製した。微生物培養物抽出液濃縮物 (ブロス) は予め平板 microtiter plate 上で滅菌水にて希釈系列を作製しておいた (384 ウェルプレート : 20 μ l/well、96 ウェルプレート : 50 μ l/well)。孢子懸濁液を MSD 培地 (0.2% Bacto tripton、0.1% グルコース、0.005% 硫酸マグネシウム、0.005% 塩化カルシウム、0.2% リン酸水素二カリウム) を 2 倍濃度に調整した培地で希釈し、平板 microtiter plate の各 well に接種した。384 ウェルプレート : 5 $\times 10^3$ 個/40 μ l/well、96 ウェルプレート : 1 $\times 10^4$ 個/100 μ l/well (最終菌量/最終液量/well)。30 °C で 40 時間培養後、CellTiter-Blue Cell Viability Assay、もしくは顕微鏡観察にて、菌の生存性を測定した。

- ・ 2 次評価系 (EL-4 細胞増殖抑制活性)

EL-4 (マウス T リンパ腫細胞株) は ATCC から購入した。培養培地として 10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS)、100 μ g/mL streptomycin、100 units/mL penicillin、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI 1640 培地 (Gibco) を用いた。ブロスは予め 96-well 平板 microtiter plate 上で培地にて 2 倍希釈系列を作製しておいた (50 μ l/well)。細胞懸濁液を 50 μ l ずつ薬剤希釈済みの各 well に接種し (最終菌量/最終液量/well : 1 $\times 10^4$ 細胞/100 μ l/well)、37 °C で 3 日間静置培養した。生存率を CellTiter-Blue Cell Viability Assay 試薬を用いて測定した。

1.2 実験結果

1.2.1 白癬菌培養条件の検討

白癬菌の標準培地として用いられるサブローデキストロース (SD) 培地の組成は製品により含量が異なる場合もあるが、2% ペプトン、1% グルコースが標準である。薬剤感度を向上させるためには、薬剤の培地成分への吸着を少なくすることが重要である。そこで、SD 培地の組成を基に各成分の含量を 10 分の 1 に減量した培地 (1/10 SD 培地: 0.2% ペプトン (Bacto トリプトン; Difco)、0.1% グルコース) における *Trichophyton mentagrophytes* と *Trichophyton rubrum* の生育を検討した。顕微鏡観察の結果、両菌株とも孢子から菌糸を発芽し生育していたが、菌糸の状態は弱々しく、良い生育ではなかった。また、*T. rubrum* より *T. mentagrophytes* のほうがよい生育を示したため、微生物培養サンプルのスクリーニングには *T. mentagrophytes* を用いることとし、以降の検討は *T. mentagrophytes* のみで行った。成分を 1/10 に薄めた SD 培地における生育が良くなかった原因として、塩濃度が不足していると考え、硫酸マグネシウムと塩化カルシウムの濃度を振って生育検討を行なった。両塩の様々な濃度を添加した時の生育を図 5 に示す。塩未添加より塩添加のほうが良い生育を示し、さらに、両塩の濃度比がほぼ 1:1 のときに最大の生育促進効果を示した。この結果から、硫酸マグネシウムと塩化カルシウムの添加量を 0.005% と設定した。0.005% の塩を含む 1/10 SD 培地の pH は 5.8 と酸性であったため、pH 調整を目的に 0.2% リン酸水素二カリウムと 0.1M MOPS バッファー (pH7.0) の添加時の生育を検討した。バッファー添加時の生育を図 6 に示す。まず、1/10 SD 培地に 0.005% の塩を添加した培地 (2 番) は未添加の培地 (1 番) より生育が良好であることが再現された。2 番培地に 0.2% リン酸水素二カリウムを添加した培地 (3 番; pH7.6) は、未添加の 2 番培地より良い生育を示した。顕微鏡でも生育が良くなっていることが観察された。2 番培地に 0.1M MOPS (pH7.0) を添加し

た培地（4番）の生育は、顕微鏡では未添加の2番培地より生育が良くなっていることが観察されたが、CellTiter-Blue Cell Viability Assay では同等の生育を示した。米国 Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）の糸状菌感受性試験の標準法[53]で用いられる培地である RPMI+0.165M MOPS バッファー

（pH7.0）における生育も検討したが（5番）、生育が悪く、標準法の培地は *T. mentagrophytes* の生育には適さないことが判明した。以上の検討から、抗白癬菌抗生物質のスクリーニングに用いる白癬菌として *T. mentagrophytes* FP2103 株を選択し、培地組成として、0.2% ペプトン、0.1% グルコース、0.005% 硫酸マグネシウム、0.005% 塩化カルシウム、0.2% リン酸水素二カリウムを選択した。この培地を改変 SD 培地（MSD）と称した。また、生育条件として、37℃ と 30℃ における生育を比較したところ、30℃の方が生育が良好であったことから（データ略）30℃を採用した。

		CaCl ₂ 濃度(%)											
		0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008	0.0039	0.002	0.001	0.0005	0.0002	0
MgSO ₄ 濃度(%)	0.25	185	750	697	695	383	250	264	245	261	258	260	150
	0.125	160	782	773	678	698	432	292	381	271	259	277	191
	0.063	112	655	983	865	931	568	503	422	308	290	290	198
	0.031	158	800	1135	1056	1048	852	770	678	609	476	380	241
	0.016	103	254	755	1048	1185	944	980	883	842	760	553	254
	0.008	133	201	274	605	901	1093	1129	1116	1019	1000	928	206
	0.0039	106	179	158	364	714	938	1213	1101	1235	1100	1076	304
	0	47	78	72	84	121	128	88	102	117	126	135	100

図 5 硫酸マグネシウムと塩化カルシウム添加時の *T. mentagrophytes* の生育
0.2%トリプトン、0.1%グルコースを含む培地にて 37 °C, 28 時間生育後、
CellTiter-Blue Cell Viability Assay を等量添加し、プレートリーダーにて測定。塩未添加
の生育（右下）を 100 とした時の各 well の値を示す。1000 以上の値を網掛けした。

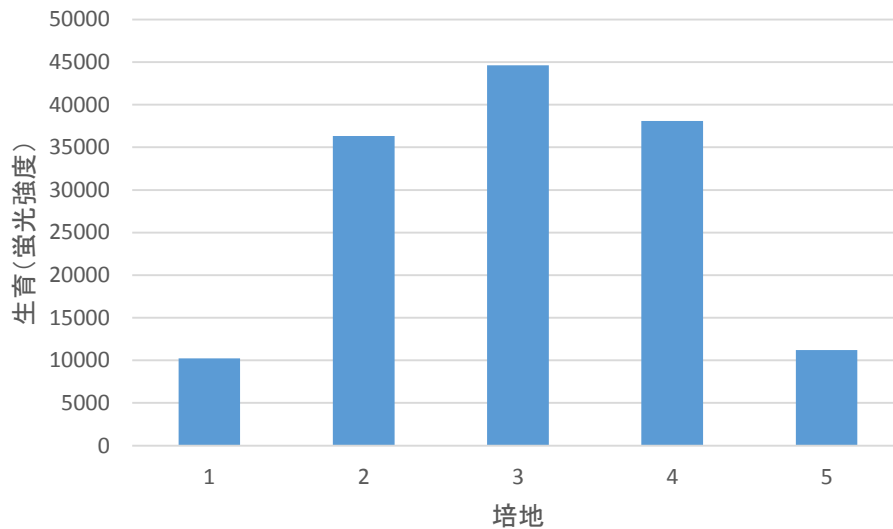


図 6 バッファー添加時の *T. mentagrophytes* の生育
37 °C, 24 時間生育後、 CellTiter-Blue Cell Viability Assay を等量添加し、プレートリー
ダーにて測定

1. 0.2%トリプトン, 0.1%グルコース
2. 1 + 0.005%硫酸マグネシウム, 0.005%塩化カルシウム
3. 2 + 0.2%リン酸水素二カリウム
4. 2 + 0.1M MOPS バッファー(pH7.0)
5. RPMI 培地 + 0.165M MOPS バッファー(pH7.0)

1.2.2 微生物培養サンプルからの抗白癬菌抗生物質スクリーニング

スクリーニングカスケードを表 1 に示す。まず、1 次評価系にて、抗白癬活性を示す微生物培養（ブロス）サンプルを選択した。1 次評価系の詳細を図 7 に示す。多サンプルを評価するため、プレスクリーニングとして 384 ウェルプレートでのアッセイを行った。40 時間培養後に CellTiter-Blue を添加し、プレートリーダーにて生育をモニターし、70%以上の生育阻害活性を示すサンプルを選択し、次に、希釈アッセイにて評価した。顕微鏡観察にて、胞子の発芽を阻止している希釈段数が 4 段以上（160 倍希釈以上）を示すサンプルを 1 次評価系のヒットサンプルとした。非特異的な毒性を示す物質を除外する目的で、2 次評価系として、細胞傷害性試験を行い、EL-4 細胞増殖阻害活性が抗白癬菌活性の 1/10 以下であるサンプルを選択した。2 次評価系で選択したブロスサンプルから抗白癬菌活性を指標に活性物質の単離同定を行った。

スクリーニング結果を表 2 に示す。バクテリア、放線菌、カビの培養サンプル合計 84800 検体のスクリーニングを行い、2 次評価系のクライテリアを満たしたサンプル 114 検体から抗白癬菌活性を示す物質の単離同定を行い、結果として、13 物質を同定した。その 13 物質は、WF177082、FR900848、ilicicolin H [51]、griseofulvin、pyrrolnitrin、menisporopsin A[54]、tauranin[55]、FR901459[56]、nidulin[57]、antimycin A3[58]、antimycin A4[58]、funiculosin[50]、WF204588B であった。WF177082 以外は既知物質であったが、griseofulvin や pyrrolnitrin などの既存の抗白癬菌剤が単離されたことにより、本スクリーニング系の妥当性が示された。単離した 13 物質の抗白癬菌活性と細胞毒性を測定したところ、10 倍以上の活性幅を有していたのは、WF177082 と FR900848 の 2 物質であった。FR900848（図 8）は jawsmycin とも呼ばれる既知物質であり、*T. mentagrophytes* FP2103 に対する MIC は 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と強いものであった。しかし、細胞壁キチン合成阻害剤である polyoxin 類[59]と類似構造を持ち、胞子を swelling（膨張）さ

せる作用が観察されたことから、細胞壁キチン合成阻害剤であることが示唆され、殺菌性に課題があると考えた。また、マウスを用いた経口吸収性試験の結果、経口吸収性を有しないことが明らかとなり（データ略）、以上の検討から、FR900848 の以降の検討は中止とした。WF177082 は MS スペクトルによる分子量解析では既知物質に該当せず、新規物質の可能性が示唆された。WF177082 に化合物番号 AS2077715 を付して、以降の検討を継続した。

1.3 考察

培地検討の結果、液体培養における白癬菌の生育を改善し、生育速度を早めることができた。今回、SD 培地の成分含量を 10 倍薄くした MSD 培地のほうが SD 培地より良い生育を示すことを見出した（データ略）。通常、培地成分の濃度を高くし、栄養を豊富にすることで、菌の生育を促すのが一般的だが、白癬菌に関しては逆の結果であった。白癬菌は角質層、毛、爪を構成するケラチン嗜好性の菌であり、プロテアーゼを分泌してケラチンを資化する。つまり、グルコースやアミノ酸等の栄養が存在しない貧栄養の環境に適応しているため、培地成分の過度の添加が逆に生育に悪影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

スクリーニングの結果、新規物質 AS2077715 を含む 13 物質を単離することができた。培地成分の濃度を低くしたことで活性物質の培地成分へ吸着が抑制され、抗白癬菌活性の感度が向上し、この結果として、多くの活性物質を検出できたと考えられる。また、384 ウェルプレートを採用したことによるハイスループット化により、8 万以上の多検体サンプルを評価できたことも多くの活性物質を単離できた要因である。

表 1 抗白癬菌抗生物質スクリーニングカスケード

	評価系	クライテリア
1次	抗白癬菌アッセイ	菌糸伸長を完全に抑制@サンプル 200 倍希釈
2次	細胞傷害性試験	EL-4 細胞増殖阻害活性が抗白癬菌活性の 1/10 以下

● プレスクリーニング (384 ウェルプレート)

サンプル終濃度が 80 倍と 320 倍のプレートを作製し、*T. mentagrophytes* FP2103 の孢子を懸濁した培地を分注して 30 °C、40 時間培養

- 判定法：プレートリーダーにて Cell-titer blue の蛍光を測定
- クライテリア：70%以上の阻害

↓プレヒットを希釈アッセイへ

● 希釈アッセイ (96 ウェルプレート)

1 列目のサンプル終濃度 20 倍希釈から 2 倍希釈で 8 列目まで希釈したプレートを作製し、*T. mentagrophytes* FP2103 の孢子を懸濁した培地を分注して 30 °C、40 時間培養

- 判定法：顕微鏡観察
- クライテリア：最小孢子発芽阻止段数が 4 段以上 (160 倍希釈以上)

↓

1 次ヒット

図 7 1 次評価系 (抗白癬菌アッセイ) の詳細

表 2 スクリーニング結果

	評価サンプル数
1次 (抗白癬菌作用)	84800
2次 (細胞傷害性)	11254
単離同定	114
単離物質	14

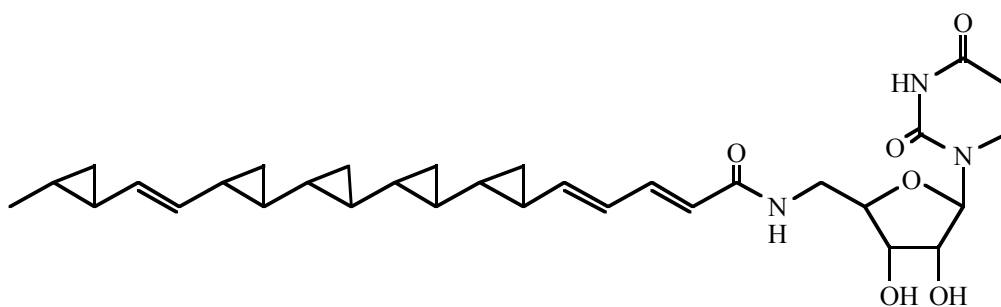


図 8 FR900848 (HP891, Jawsmycin) の構造

第2章 AS2077715 生産菌の菌学的性質

第1章で構築した抗白癬菌抗生物質のスクリーニング系において、千葉県夷隅郡大多喜町の養老溪谷で採集した落葉試料から分離したカビ No.339855 株の培養液中に強力な抗白癬菌活性をもつ物質を見出した。本菌株は第3章から第5章で述べる新規ミトコンドリア シトクローム *bc₁* 複合体阻害物質 AS2077715 を生産することが明らかとなった。本章では、定法に従いカビ No.339855 株の形態学および培養特性について述べる。

2.1 実験方法

AS2077715 を生産する No.339855 株は、千葉県夷隅郡大多喜町の養老溪谷で採集したケヤキの落葉から湿室法により分離した。菌学的性質を調べるための培地は Difco ブランド (BD 社製) を用いた。麦芽抽出寒天培地、ツァペック・ドックス寒天培地、MY20 寒天培地の組成は、JCM カタログ (Japan Collection of Microorganisms, the Institute of Physical and Chemical Research, Saitama, Nakase, T. 6th ed. Pp.617, 1995 年) に従った。形態学的観察はコーンミール寒天培地上で 25 °C、14 日間培養後に光学顕微鏡にて行った。色調の記載は、メチューン・ハンドブック・オブ・カラーをもとにして行った[60]。

リボゾーム DNA Large subunit (LSU 領域) の塩基配列は、O'Donnell らの方法に従って決定した[61]。標準株の LSU 領域の塩基配列は DDBJ データベース (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) から取得し、系統樹は MEGA program (version 5.22, <http://www.megasoftware.net/>) を用いて作成した。No. 339855 株の LSU 領域の塩基配列の DDBJ/GenBank/EMBL アクセッション番号は AB894361 である。

本菌株は独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8) に受託番号 NITE P-735 (受託日 2009

年4月16日)として寄託した。

2.2 実験結果

2.2.1 生産菌 No.339855 株の形態学的性質と同定

カビ No. 339855 株のポテトデキストロース寒天培地上での生育はややゆっくりで、25 °C で2週間培養後のコロニーの直径は23–26 mmであった。コロニー表面はフェルト状 (felty) であり、部分的に羊毛状 (floccose) であった。コロニー周縁は円状 (entire) であり、中央部から周縁部に数本の放射状の溝を生じた。コロニーの色はフェルト状の部分が灰緑色 (grayish green, 30F8) で羊毛状の部分が薄灰緑色 (dull grayish green, 29E4) であった。コロニー裏面の色は全体的に濃灰緑色 (dark grayish green, 28F4) であった。30 °C で2週間培養後のコロニーの直径は6–7 mmであった。5 °C と37 °C では生育は認められなかった。

コーンミール寒天培地上での生育もゆっくりで、25 °C で2週間培養後のコロニーの直径は22–24 mmであった。コロニー表面はビロード状 (velvety) であった。コロニー周縁は円状 (entire) でコロニーに溝は生じなかった。コロニーの色は灰緑色 (grayish green, 29F8-29F4) であった。コロニーは起伏が無く平坦であった。コロニー上にシンネマタス (synnematos) 分生子柄が観察され、分生子柄の先端にドロップ状の分生子の形成が見られた。コロニー裏面の色は全体的に濃灰緑色 (grayish green, 28F4) であった。30 °C で2週間培養後のコロニーの直径は6–9 mmであった。5 °C と37 °C での生育は認められなかった。

本菌の生育可能温度は12 °C–30 °C で、最適生育温度は20 °C–25 °C であった (ポテトデキストロース寒天培地)。生育可能 pH は、2.0–11.5 で、最適生育 pH は、5.5–6.2 であった (YM ブロス)。

コーンミール寒天培地上で25 °C、14日間培養した時の顕微鏡写真を図9に

示す。栄養菌糸は褐色で太さは 2.3–4.0 μm であった。厚膜胞子は観察されなかった。分生子柄は分枝せず明確なシンネマ (synnemata) を形成した。全長は 200–260 μm であり、太さは 8–10 μm であった。シンネマの基部はストローマを形成して広がり、幅は 30–40 μm であった。シンネマの上部で菌糸束がやや膨潤し、先端部分で再び狭くなっていた。更に先端部を取り囲むように 20 μm 程の数本のセタ (setae) が形成された。狭まった先端部分内で無色の分生子が形成され、シンネマの上部でドロップ状になった。分生子は楕円形～円筒形で大きさは 3.2–3.6 \times 1.7–1.76 μm であった。表面は光学顕微鏡による観察 (400 倍) では滑面であった。

本菌の形態的特徴から *Leptoxyphium* 属[62]、もしくは、*Capnodium* 属[63][64] に類似していた。両方の菌属は植物病原菌として知られる。そこで、No. 339855 株のリボゾーム DNA の LSU 領域の塩基配列を決定し (図 10)、データベースから取得した標準株の LSU 領域の塩基配列を基に系統樹を作成した (図 11)。系統樹解析の結果は、No. 339855 株がカプノディウム属 (*Capnodium*) の分岐群に属することを示しており、本菌を *Capnodium* sp. No. 339855 と同定した。

2.2.2 No.339855 株の培養特性

培養特性は、ポテトデキストロース寒天培地、サブローデキストロース寒天培地、Emerson YpSs 寒天培地、コーンミール寒天培地、オートミール寒天培地、麦芽抽出寒天培地、ツァペック・ドックス寒天培地、MY20 寒天培地を用いて判定した。ポテトデキストロース寒天培地、サブローデキストロース寒天培地、オートミール寒天培地、麦芽抽出寒天培地、ツァペック・ドックス寒天培地、MY20 寒天培地ではほぼ類似の性状を示した (上記、ポテトデキストロース寒天培地の特徴を参照)。また、唯一コーンミール寒天培地でのみ孢子形成が確認された (培養特性は、上記参照)。

2.3 考察

カビ No.339855 株は、形態的特徴から *Leptoxyphium* 属、もしくは、*Capnodium* 属であることが推察され、リボゾーム DNA の塩基配列の相同性から、*Capnodium* 属であることが判明した。

本菌の生産する抗白癬菌抗生物質 AS2077715 は、既知天然物である *funiculosin* と類似の構造を有していた（第 3 章参照）。*funiculosin* の生産菌は *Penicillium funiculosum* であり、*Capnodium* 属とは同じ子囊菌門に属するが、*Penicillium funiculosum* はユーロチウム菌綱（Eurotiomycetes）、*Capnodium* 属はクロイボタケ綱（Dothideomycetes）であり分類学的な決して近くはない。分類学的な距離が遠い菌が類似物質を生産しているのは興味深い現象である。両菌ともに植物病原菌として知られており、生育環境の類似性が生産物の類似性に寄与している可能性が考えられる。



図 9 カビ No.339855 株の顕微鏡写真（コーンミール寒天培地、25 °C、14 日間培養）

LOCUS AB894361 600 bp DNA linear PLN 22-FEB-2014
 DEFINITION Capnodium sp. 339855 genes for internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA, partial sequence.
 ACCESSION AB894361
 VERSION AB894361.1 GI:586941097
 KEYWORDS .
 SOURCE Capnodium sp. 339855
 ORGANISM Capnodium sp. 339855
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
 Dothideomycetes; Dothideomycetidae; Capnodiales;
 Capnodiaceae; Capnodium.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Masaki,T., Ohsumi,K., Takase,S., Watanabe,M. and Fujie,A.
 TITLE AS2077715, a novel antifungal antibiotic produced by
 Capnodium sp. 339855
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 600)
 AUTHORS Masaki,T. and Ohsumi,K.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-DEC-2013) Contact:Teruhisa Masaki Astellas
 Research Technologies Co., Ltd, Fermentation Research
 Div.; 21, Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-8585, Japan
 URL :http://www.astellas.com
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..600
 /organism="Capnodium sp. 339855"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="339855"
 /host="Zelkova serrata"
 /db_xref="taxon:1463562"
 /country="Japan"
 /collection_date="2004-05-15"
 /collected_by="T. Masaki"
 /PCR_primers="fwd_name: its5, fwd_seq:
 ggaagtaaaagtcgtaacaagg, rev_name: nl4, rev_seq:
 ggtccgtgtttcaagacgg"
 misc_RNA <1..>600
 /note="contains internal transcribed spacer 2 and 28S
 ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gaccttttat tctctaaggt ttgacctcgg atcaggtggg gataccgct gacttaagca
 61 tatcaataag cggaggaaaa gaaaccaaca gggattgcc tagtaacggc gagtgaagcg
 121 gcaacagctc agatttgaaa tctggcgtct ttggcgtccg agttgtaatc tgtagaggat
 181 gcttttggtt agccaccggt ctaagtcccc tggaaacgggg cgtcacagag ggtgagaatc
 241 ccgtatgtga ccggaagggc accctccaca tagctccttc gacgagtcga gttgtttggg
 301 aatgcagctc taaatgggag gtaaattcct tctaaagcta aataccggcc agagaccgat
 361 agcgcacaag tagagtgatc gaaagatgaa aagcactttg gaaagagagt taaaaagcac
 421 gtgaaattgt tgaaagggaa gcgcttgcaa ccagacttgt tggcgggtgtt ccgccggtct
 481 tctgaccggt tcactcaccg tctgcaggcc agcatcatct ggggcccgcg gataaaagcg
 541 aggggaatgt ggctcccccg ggagtgttat agcccctcgt gcaatacggc ggagtctcgg

図 10 カビ No.339855 株のリボゾーム DNA の LSU 領域の塩基配列

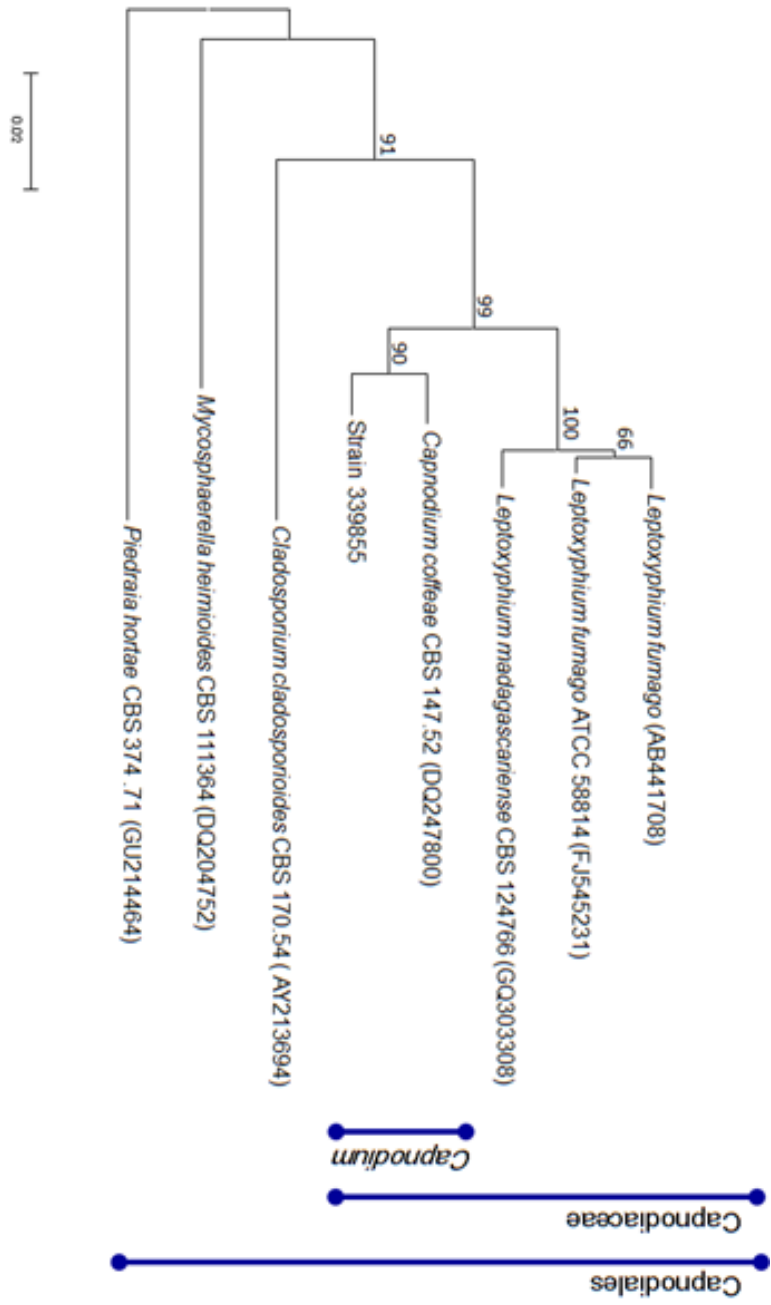


図 11 リボゾーム DNA の LSU 領域の塩基配列を用いた系統樹

第3章 AS2077715 の培養生産および単離精製

千葉県夷隅郡大多喜町の養老溪谷で採集した落葉資料から分離したカビ No.339855 株の培養液に強力な抗白癬菌活性を見出した。そこで、本菌株の生産する活性物質の構造、生物活性を明らかにするために、本菌株の培養検討と大量培養および培養物からの活性物質の単離・精製を試みた。本章においては、その培養検討と生産培養および精製過程の結果について述べる。

3.1 実験方法

3.1.1 培養培地検討

①液体培養化（液培化）検討

2% コーンスターチ、1% グリセリン、1% ショ糖、1% グルテンミール、1% ファーマメディア(Archer Daniesl Midland, Decatur, IL, USA)、0.25% Tween80 からなる前培養培地を 100mL 容エルレンマイヤーフラスコに 30mL 注入し、121°C で 30 分間滅菌した。この培地にカビ No.339855 株の斜面培養物を一白金耳ずつ接種し、ロータリーシェーカー（220 rpm, 5.1 cm-throw）にて 25 °C で 4 日間振盪培養した。液体培養化（液培化）検討培地として、表 3 の組成を用いた。100mL 容エルレンマイヤーフラスコに液培化培地を 30mL 注入し、121 °C で 30 分間滅菌した。この培地に前培養物を 2%接種し、ロータリーシェーカー（220 rpm, 5.1 cm-throw）にて 25 °C で振盪培養した。

②生産培地組成検討

1 回目の生産培地の組成検討には、表 4 の組成を用いた。2 回目の生産培地の組成検討には、表 5 の組成を用いた。液培化検討と同じ条件で培養を行った。

③AS2077715 の定量

培養中の AS2077715 物質の量は、HPLC にて測定した。検定サンプルは、培養液に等量のアセトンを添加し、14,000 rpm で 5 分間遠心後の上清を用いた。HPLC の条件は、カラム : Mightysil RP-18 GP 150-4.6 [5 μ m] (関東化学)、移動相 : 30%アセトニトリル水、検出 : UV210nm、流速 : 1mL/min にて行った。

3.1.2 AS2077715 物質の培養生産

AS2077715 物質の単離精製時の培養は、以下の条件で行った。

① 種培養

2% コーンスターチ、1% グリセリン、1% ショ糖、1% グルテンミール、1% ファーマメディア (Archer Daniesl Midland, Decatur, IL, USA)、0.25% Tween80 からなる前培養培地を 100mL 容エルレンマイヤーフラスコに 30mL 注入し、121°C で 30 分間滅菌した。この培地にカビ No.339855 株の斜面培養物を一白金耳ずつ接種し、ロータリーシェーカー (220 rpm, 5.1 cm-throw) にて 25 °C で 4 日間振盪培養した。次に、同じ組成の培地を 3 つの 500mL 容エルレンマイヤーフラスコに 150mL ずつ分注し、121°C で 30 分間滅菌した後、先に得た培養物を 2% 接種し、ロータリーシェーカー (220 rpm, 5.1 cm-throw) にて 25 °C で 3 日間振盪培養した。

② 生産用培養

次に、6% 可溶性デンプン、4% グルコース、2% 酵母エキス、1% K_2HPO_4 、0.02% $MgSO_4$ 、0.05% アデカノール LG-109 (ADEKA, Tokyo, Japan)、0.05% シリコン KM-70 (信越化学工業 Co., Ltd., Tokyo, Japan) からなる本培養培地を調整しておき、この本培養培地 20L を 30L 容ジャーフェーマンターに注入した。

これを 121 °C で 30 分間滅菌した後、先に得た培養物全量を接種し、25 °C で 6 日間培養した。攪拌は 200rpm、通期量は 20L/分、内圧は 1.0kg/cm² で行った。培養液中の菌体含量の目安として遠心培養液固形物含量(PMV)を測定した。10 mL の培養液を 15 mL 遠沈管に入れ、3,000 rpm で 10 分間遠心し、培養液中の沈殿物の容量の割合(%)を計測した。

表 3 液体培養化培地組成 (%)

培地 No.	1	2
可溶性デンプン (ナカライテスク)	6	-
グルコース	-	4
パインデクス#3 (松谷化学工業)	2.5	-
酵母エキス	-	2
粉末 CSL-HPP	1	-
β-サイクロデキストリン	1	1
KCl	0.02	0.02
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.02	0.02
K ₂ HPO ₄	-	1
KH ₂ PO ₄	0.1	-
pH	6.5	無修正(5.7)

表 4 生産培地組成 (1 回目) (%)

培地 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MS#3600	3	6	4	6	6	-	3	-	-	-	-	-	-
パインデックス#3	-	-	-	-	-	3	6	-	5	-	-	-	-
シュクロース	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
グルコース	-	1	1		0.5	1	-	-	-	4	4	4	4
可溶性デンプン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	6	6
グリセリン	-	-	-	-	8.5	-	-	-	0.5	-	-	-	-
CSL	-	6	6	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-
粉末 CSL-HPP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ファーマメディア	2	1	2.5	-	-	1	1		3	-	-	-	-
きなこ	-	1	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルテンミール	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
小麦胚芽	0.2	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-
乾燥酵母	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-
酵母エキス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2
ヒーナッツパウダー	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ホテトプロテイン 75	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-
イロイシ	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
NaNO ₃	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-	0.02	0.02
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6	-	2	-	-	-	0.05	0.5	-	-	-	-	-
MgSO ₄ -7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-	0.02	0.02
KH ₂ PO ₄	1.6	1.6	1.2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	1.2	1.2	0.9	-	-	-	0.5	-	0.75	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1
β-サイクロデキストリン	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	1	1	-
CaCO ₃	-	-	0.2	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-

pH は無修正

表 5 生産培地組成 (2 回目) (%)

培地 No.	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11
シュークロース	-	-	-	-	-	4	4	4	4	-	-
グルコース	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	1
可溶性デンプン	6	6	6	6	6	-	-	-	-	-	-
パインデックス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-
MS3600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
酵母エキス	2	2	2	2	4	2	-	-	-	-	-
乾燥酵母	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	0.5	-	0.5	0.5	0.5
KCl	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-サイクロデキストリン	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween80	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

pH は無修正

3.2 実験結果

3.2.1 No.339855 株の液体培養化検討

AS2077715 を含む No.339855 株の培養物サンプルは、寒天培地にて生育させた培養物の抽出物であった。そこで、AS2077715 の取得を目的とした大量培養を可能にするために、No.339855 株の液体培地における生育と生産性を検討した。抽出物作製時に用いた 2 種の寒天培地の組成から寒天を除いた培地で培養を行い、AS2077715 生産量の推移を測定したところ、No.339855 株はこれら 2 種の培地でよく生育し、液培化培地 No.2 の培養 10 日目で 289 $\mu\text{g/mL}$ の生産性を示した (表 6)。

表 6 液培化培地での AS2077715 生産量推移 ($\mu\text{g/mL}$)

液培化培地	培養日数		
	4	7	10
No.1	76	85	89
No.2	203	279	289

3.2.2 生産培地組成検討

No.339855 株の液体培地での生産培養が可能となったため、生産量の向上を目的に、生産培地の組成検討を行った。13 種の培地組成を用いて培養を行い、AS2077715 生産量の比較を行った (表 7)。生産培地 No.8、10、11、12、13 での培養で 250 $\mu\text{g/mL}$ 以上の生産量が達成された。生産培地 No.10 は液培化培地 No.2 と同じ組成であり、生産培地 No.11、12、13 はそれぞれ、No.10 から KCl と $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 K_2HPO_4 、 β -サイクロデキストリンを除去した培地である。No.11、12、13 は No.10 より高い生産量を示したことから、これら成分は AS2077715

の生産に必須でないことが示された。

次に、高い生産量が得られた No.8 と No.10~13 の組成を基にして、組成濃度と他炭素源の検討を行った。結果を表 8 に示す。No.2-1, 2-2 より No.2-3, 2-4 の生産量が高かったことから、KCl、MgSO₄·7H₂O、K₂HPO₄、β-サイクロデキストリンは AS2077715 の生産に必須ではなく、むしろ抑制していることが再現された。また、Tween80 を添加した No.2-2 は未添加の No.2-1 と比較して生産量に変化がなかったことから、ジャーフェーマンターを用いた大量培養時の消泡剤として Tween80 を添加することが可能であることが示された。酵母エキスを 4%に増量した No.2-5 や炭素源をシュクロースに変更した No.2-6 の生産量は元培地である No.2-3, 2-4 より低かった。No.2-7 (No.8 と同組成) から硫酸アンモニウムを除いた No.2-8 の生産量は低かったことから、硫酸アンモニウムはこの培地組成では必須であることが示された。そのほか、乾燥酵母の増量や炭素源の変更は元培地の生産量と同等以下であった。

以上の検討から、一番高い生産量を示した 4% グルコース、6% 可溶性デンプン、2% 酵母エキスの組成の培地を大量培養用の生産培地として設定した。

表 7 13 種の生産培地での AS2077715 生産量 (μg/mL)

培養日数	培地 No.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
4	10	138	55	23	44	8.9	34	606	48	282	414	528	363
7	11	167	51	18	49	20	134	668	80	285	456	525	362

表 8 2 回目の生産培地検討結果 AS2077715 生産量 (μg/mL)

培養日数	培地 No.										
	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11
4	264	253	769	780	384	290	432	110	478	248	183

3.2.3 No.339855 株の大量培養および AS2077715 の生産

AS2077715 の取得を目的に 30 L 容ジャーフェーマンター4 基を用いて No.339855 株の大量培養を行った。図 12 に培養 4 日目と 5 日目の培養液 pH と遠心培養液固形物含量(PMV)と生産量のデータを示す。4 基の生産量はほぼ同様に推移し、5 日目の平均生産量は 639 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。6 日目に培養を終了し、培養液を次に示す単離精製工程に供した。

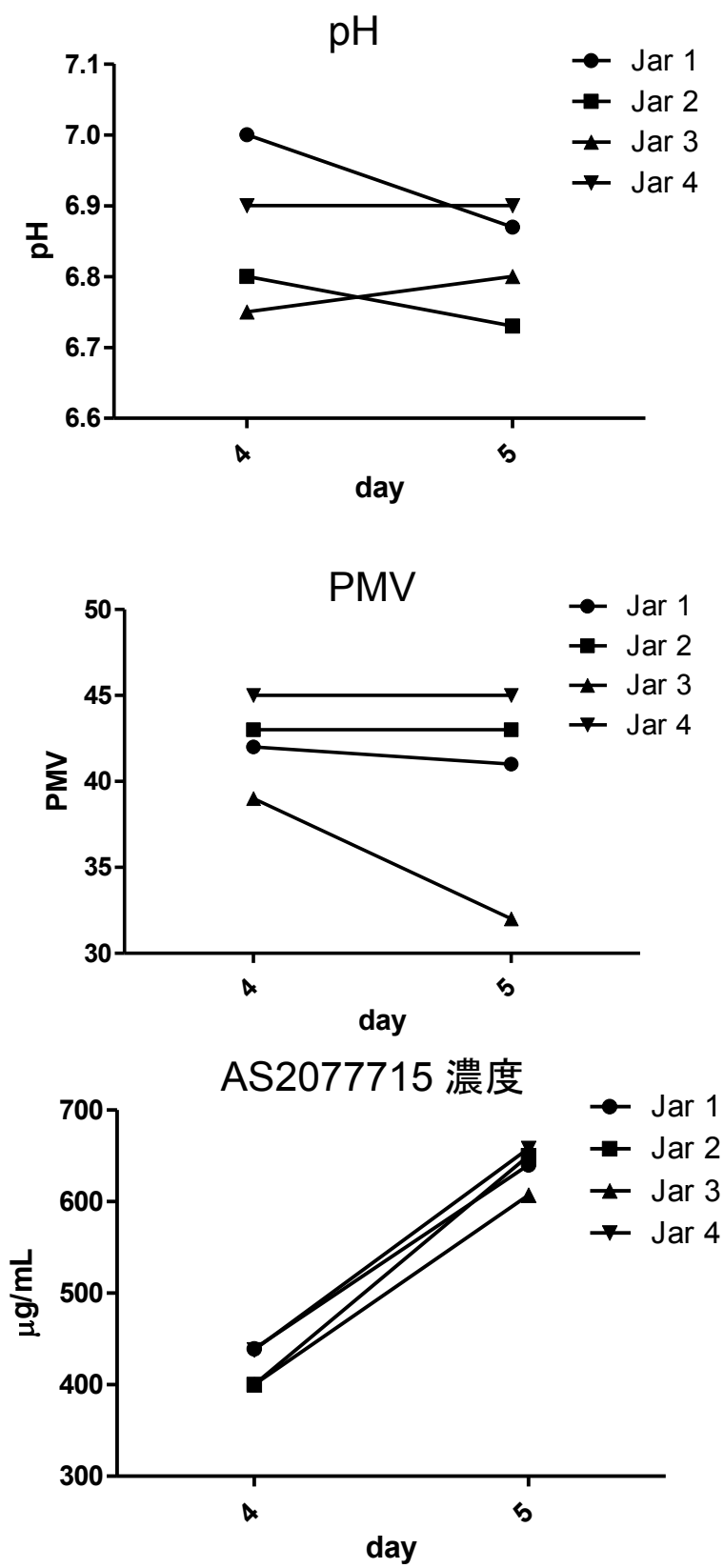


図 12 大量培養時の培養パラメーター

3.2.4 AS2077715 の単離精製

AS2077715 の単離精製工程を図 13 に示す。上記の培養方法で得られた培養物 60 L に等量のアセトンを加え、攪拌後、1 時間放置後、濾過することで培養抽出物 120 L を得た。その抽出液に水を加え、225 L とし、水で平衡化した 6.0 L の HP20 (三菱化学) に通液した。カラムを 35%アセトン水で洗浄した後、60%アセトン水で目的物質を溶出した。溶出液 25 L に水を加え 50 L とし、25%アセトニトリルで平衡化した逆相系担体 Daisogel SP-120-ODS-B カラム (15/30 μm , 8.0 L; ダイソー Daiso Co., Ltd., Osaka, Japan) に通液し、カラムを 0.01N 塩酸を含む 50%アセトニトリル水で展開し目的物質を溶出した。この活性画分 25 L に水を加え 40 L とし、25%アセトニトリル水で平衡化した 1.0 L の Sepabeads SP850 (三菱化学) に通液した。水でカラムを洗浄後、酢酸エチルにて目的物質を溶出した。この溶出液 1 L を減圧下にて濃縮乾固し、5 mL のメタノールに溶解した。これに 5 mL の酢酸エチルを添加後、50 mL のヘキサンを添加することにより、結晶を析出させた。結晶を濾過し乾燥することにより、AS2077715 物質を白色粉末として 17.6g 得た。

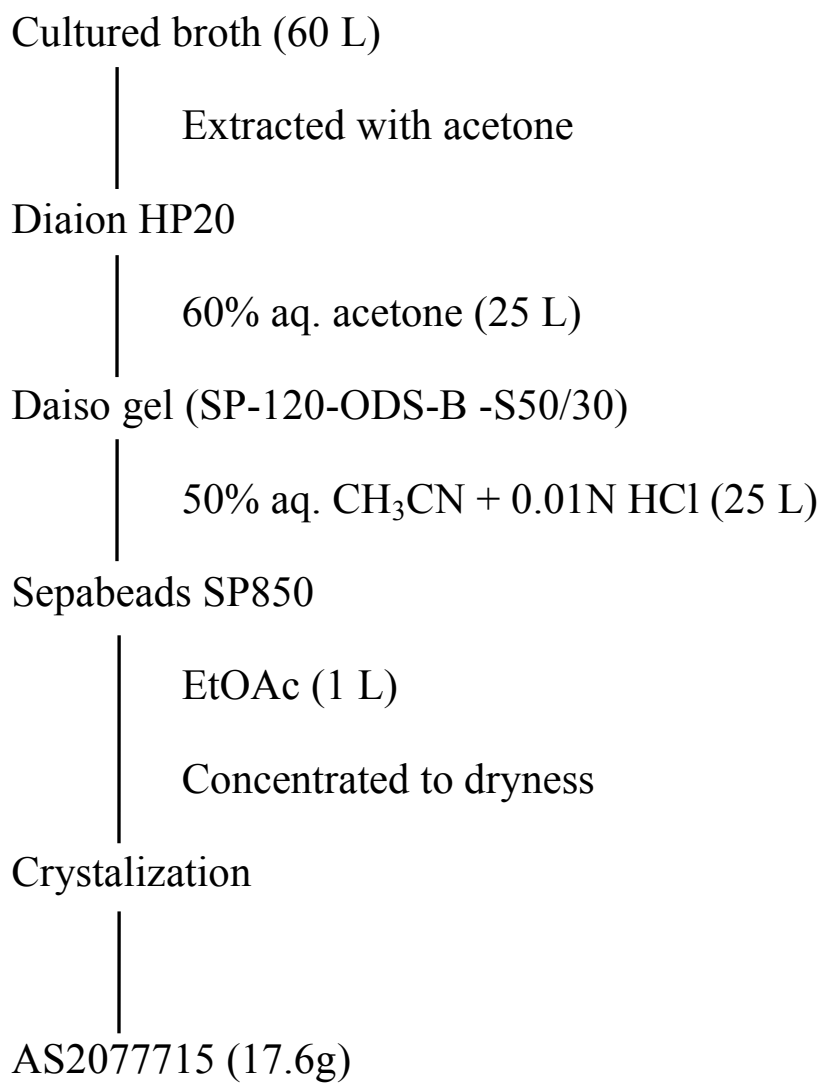


図 13 AS2077715 の精製工程

3.3 考察

Capnodium sp. No.339855 株の生産する抗白癬菌抗生物質の構造決定、生物活性研究のための試料取得を目指し、本菌株の培養および活性物質の単離精製を試みた。その結果、30L 容ジャーフェーマンター4 基を使用した培養により培養液 60 L を得て、そこから AS2077715 の高純度精製品を 17.6g 取得することができた。

培養検討の結果、生産菌の改良を行わずに培養検討のみで 600 µg/mL 以上の生産性を達成した。微生物培養生産において、寒天培養から液体培養へ、及び、フラスコ培養からジャーフェーマンター培養への適応時は、生育や生産量が低下することを多く経験するが、No.339855 株に関しては、特に生育や生産量の低下は見られなかった。また、自然界から単離した菌は、ヘテロであり、変異速度が早いため、培養するにつれて生産量の低下、ばらつきがみられることがあるが、No.339855 株はジャーフェーマンター間での生産量のばらつきが少なかったことから、すでにある程度均一化されており、変異速度が遅い安定化した菌である可能性が示唆された。今後、高力価変異株の取得によりさらなる生産性の向上が期待される。

120 L の培養抽出物には 37.9g の AS2077715 が含まれていたことから、単離までの精製収率は 47% と高いものであった。精製工程中において、分解は見られず安定性が高かったこと、また、カラムへの非特異的吸着がなくカラム収率が良好であったことが高い精製収率の要因と考えられる。現在のところ、精製における懸念要素は見当たらず、精製が容易な物質であると言える。この物質の物性は工業生産のプロセス開発においてのアドバンテージとなると考えられる。

第4章 AS2077715 の物理化学的性質および構造解析

Capnodium sp. No.339855 株を培養し、その培養物から新規抗白癬菌抗生物質 AS2077715 (1) を単離した。本章においては、本物質の物理化学的性質と構造決定について述べる。

4.1 実験方法

物理化学的性質と構造決定には以下に示す使用機器を使用した。

- ① IR スペクトル : Perkin-Elmer Spectrum 65 FT-IR spectrometer
- ② ^1H および ^{13}C NMR スペクトル : Bruker AVANCE 500 spectrometer
- ③ UV スペクトル : Shimadzu UV-2500PC spectrophotometer
- ④ 分子量スペクトル (HR-ESI-MS) : Shimadzu CMS-IT-TOF spectrometer
- ⑤ 旋光度 : SEPA-500 polarimeter (Horiba)

4.2 実験結果

4.2.1 物理化学的性質

1 の物理化学的性質を表 9 に、 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルを図 14、図 15 にそれぞれ示す。**1** はメタノール、アセトニトリル、クロロホルム、酢酸エチル、ジメチルスルホキシドに易溶、水、n-ヘキサンに不溶の白色粉末であった。UV 吸収を測定したところ、290.5 nm に吸収が認められた。**1** の UV スペクトルと赤外線吸収スペクトルをそれぞれ図 16、図 17 に示す。**1** の分子式は、HR-ESI-MS により $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_7$ (M+H; 468.2961, found 468.2965) と推定された。

4.2.2 構造決定

図 16 の ^1H スペクトルを概観すると、*Penicillium funiculosum* Thom から単離された、funiculosin (図 19) とよく似ていた[50]。**1** の ^{13}C NMR スペクトラムの 5-(2,3,4,5-テトラヒドロキシシクロペンチル)-4-ヒドロキシ-2-ピリジノン部位は funiculosin の NMR スペクトラムとよく一致した。**1** と funiculosin の違いはアルキル側鎖部分であったため、**1** の構造解明は側鎖部分に焦点を当てて行った。8- H_2 , 9- H_2 , 10- H_2 , 13- H_2 の ^1H シグナルの重なりが構造解明を難しくしていた。COSY と HSQC でカップリングさせた HSQC-TOCSY データは $\text{CH}(7)\text{-CH}_2(8)\text{-CH}_2(9)\text{-CH}_2(10)\text{-CH}(11)\text{-CH}_2(12)\text{-CH}_2(13)$ -の配列を明らかにした。4.94 ppm のオキシメチンプロトン 7-H は C-11 (δ_{C} 80.0 (d)) と HMBC 相関を、3.51 ppm の 11-H は C-7 (δ_{C} 78.1 (d)) と HMBC cross-peak を示した。これらデータからテトラヒドロピラン環が存在していることが明らかとなった。14- CH_3 (δ_{H} 0.83) から C-13 (δ_{C} 33.2 (t)) のメチレンへの HMBC coupling データから決定された側鎖の構造を図 18 に示す。C-3 と C-7 間の結合は 7-H から C-2 (δ_{C} 161.4 (s)), C-3 (δ_{C} 110.1 (s)), C-4 (δ_{C} 162.5 (s)) への HMBC カップリングによって示された。

以上の議論により、**1** の平面構造を図 19 に示す構造と決定した。¹H と ¹³C NMR データの完全帰属を表 10 に掲載する。

4.3 考察

X 線結晶構造解析に供する AS2077715 の単結晶の形成を試みたが、取得することはできなかった。それ故、絶対立体配置の決定に至らなかった。

構造決定の結果から、AS2077715 は既知天然物である *funiculosin* と類似の構造を持つ新規天然物であることが判明した。構造的な違いは、C-10 と C-12 のメチル基の有無と、C-9 と C-10 間と C-12 と C-13 間の結合が 2 重結合か単結合のみである。*Funiculosin* はミトコンドリアシトクローム *bc₁* 複合体阻害活性を有しており [65]、構造類似性から AS2077715 も同じ活性を有することが期待される。次章にて、AS2077715 の生物学的評価を行った。

表 9 Physico-chemical properties of AS2077715

<i>Appearance</i>	<i>White powder</i>
Molecular formula	C ₂₅ H ₄₁ NO ₇
Molecular weight	467
HR-MS (m/z)	
Found (M+H) ⁺	468.2965
Calcd. (M+H) ⁺	468.2961
[α] _D (23°C, MeOH)	-120° (c 0.5)
UV λ _{max} (MeOH) nm (ε)	233(sh), 290.5 (=6,100)
Solubility: Soluble	CH ₃ OH, CH ₃ CN, EtOAc, CH ₃ Cl, DMSO
Insoluble	<i>n</i> -hexane, water
HPLC retention time (min) ^a	7.0 min.
IR ν _{max} cm ⁻¹	3480, 2980, 2930, 1730, 1710, 1650, 1620, 1460, 1380, 1160, 1140

^aRetention time obtained by Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 μm, Kanto Chemical, Tokyo, Japan), 55% aq. CH₃CN, flow rate 1 mL/min.

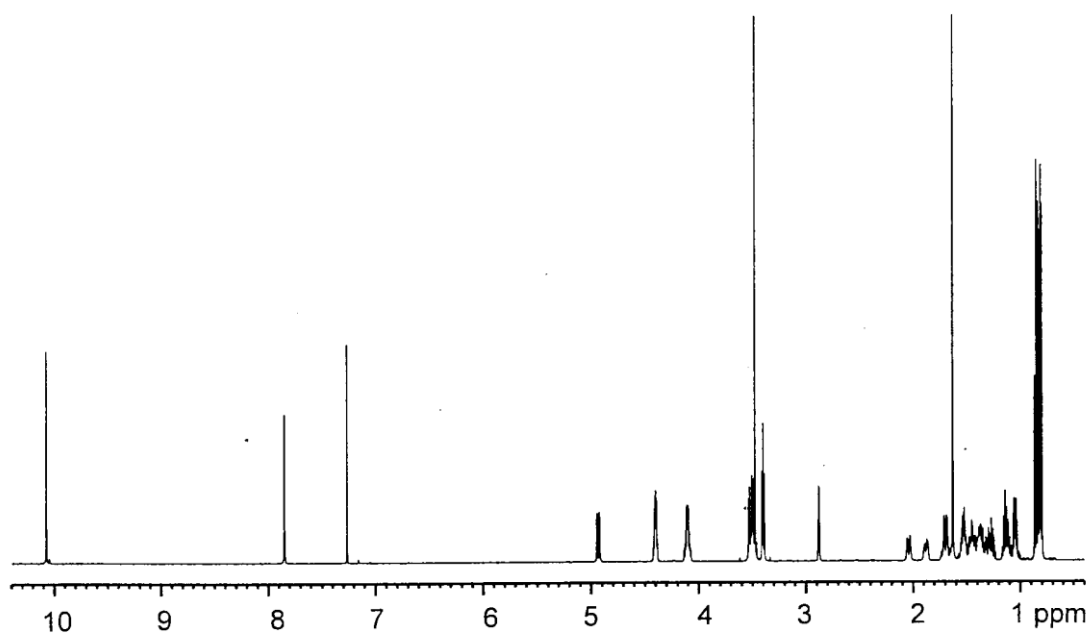


図 14 AS2077715 の ^1H NMR スペクトル

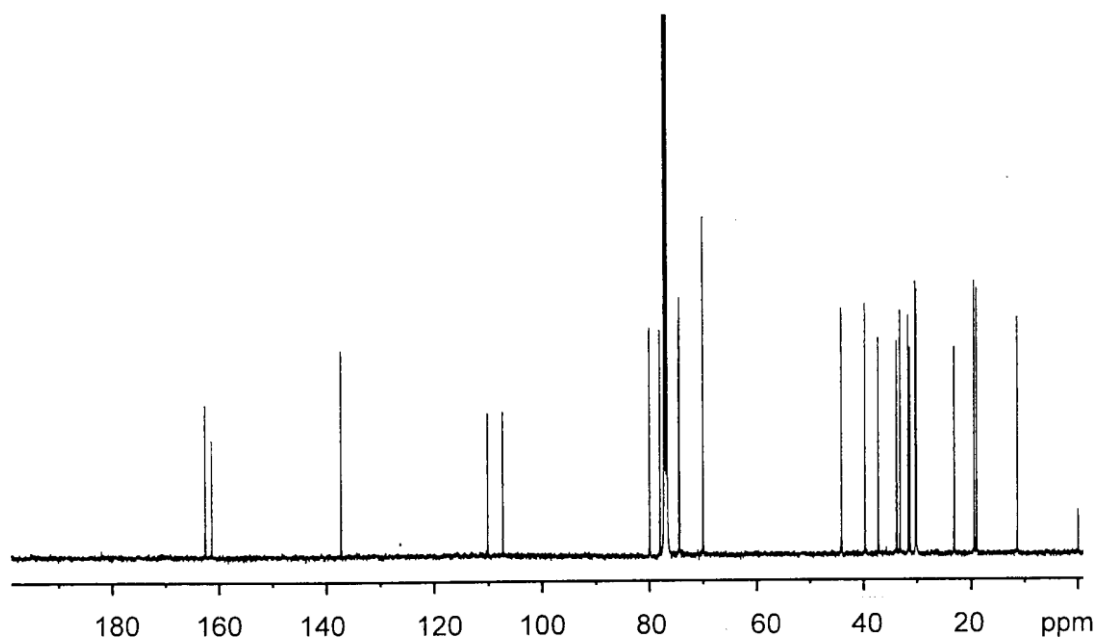


図 15 AS2077715 の ^{13}C NMR スペクトル

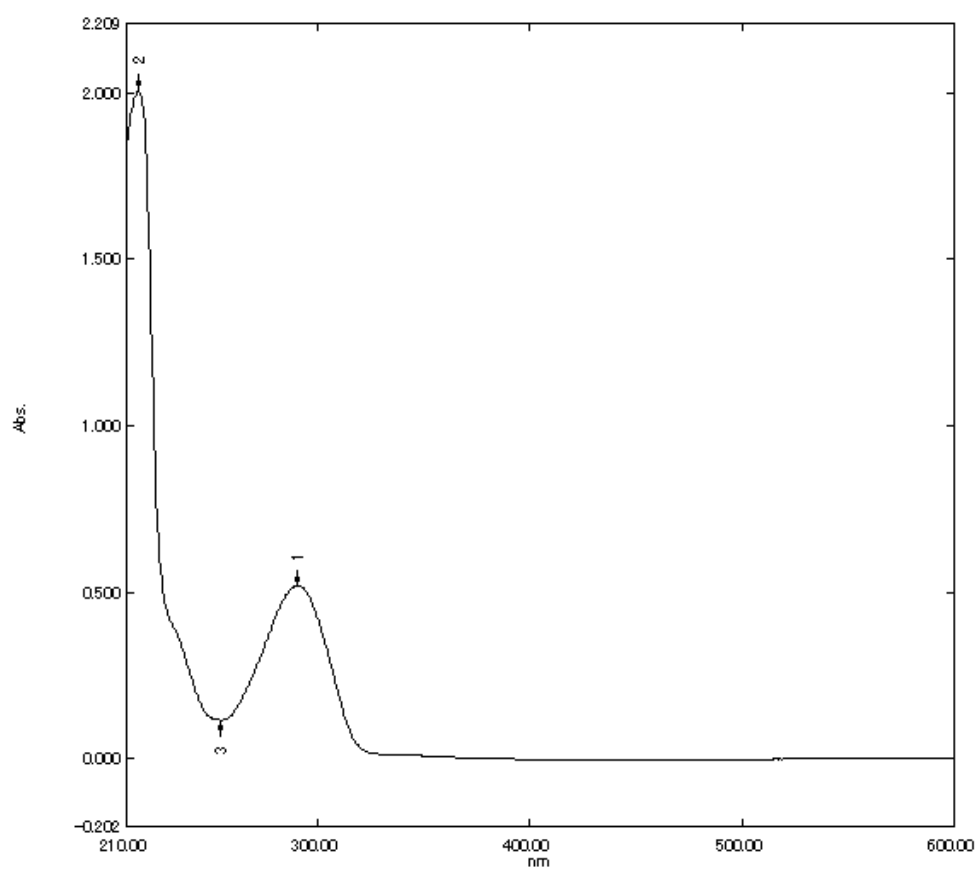


図 16 AS2077715 の UV スペクトル

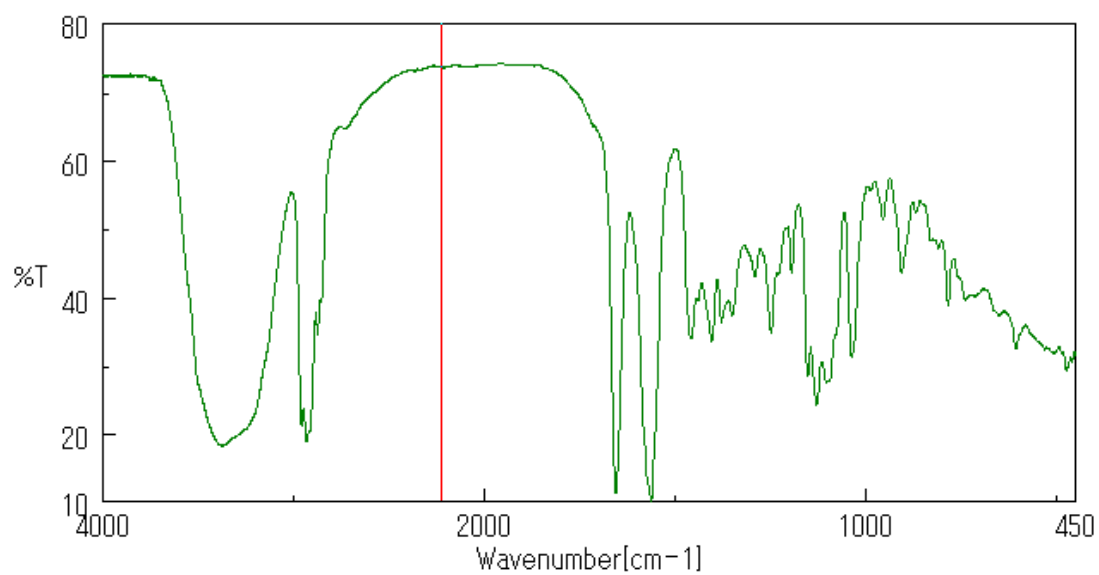


図 17 AS2077715 の赤外線吸収スペクトル

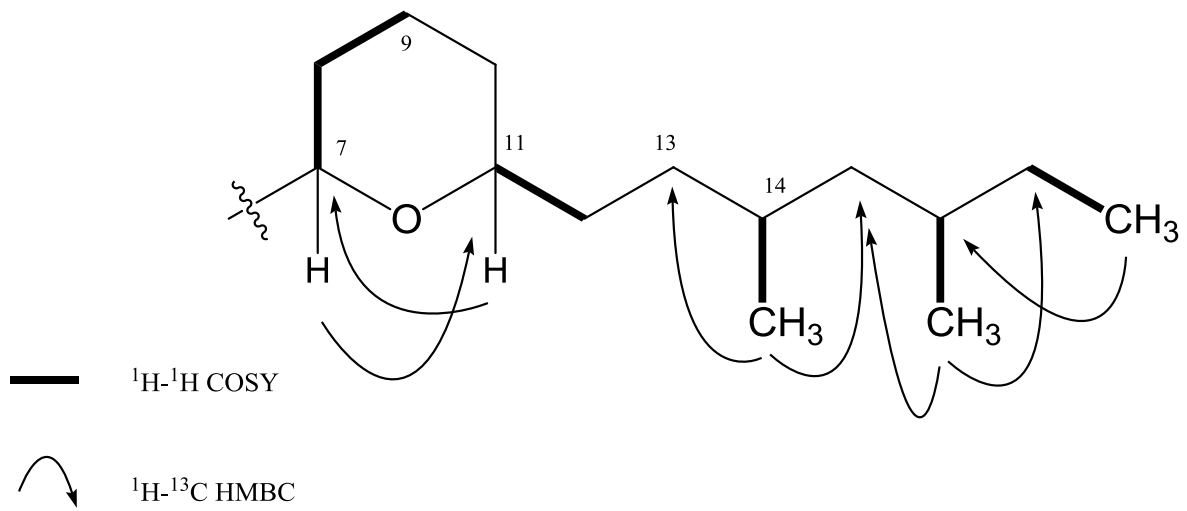


図 18 AS2077715 の側鎖部分の構造解析

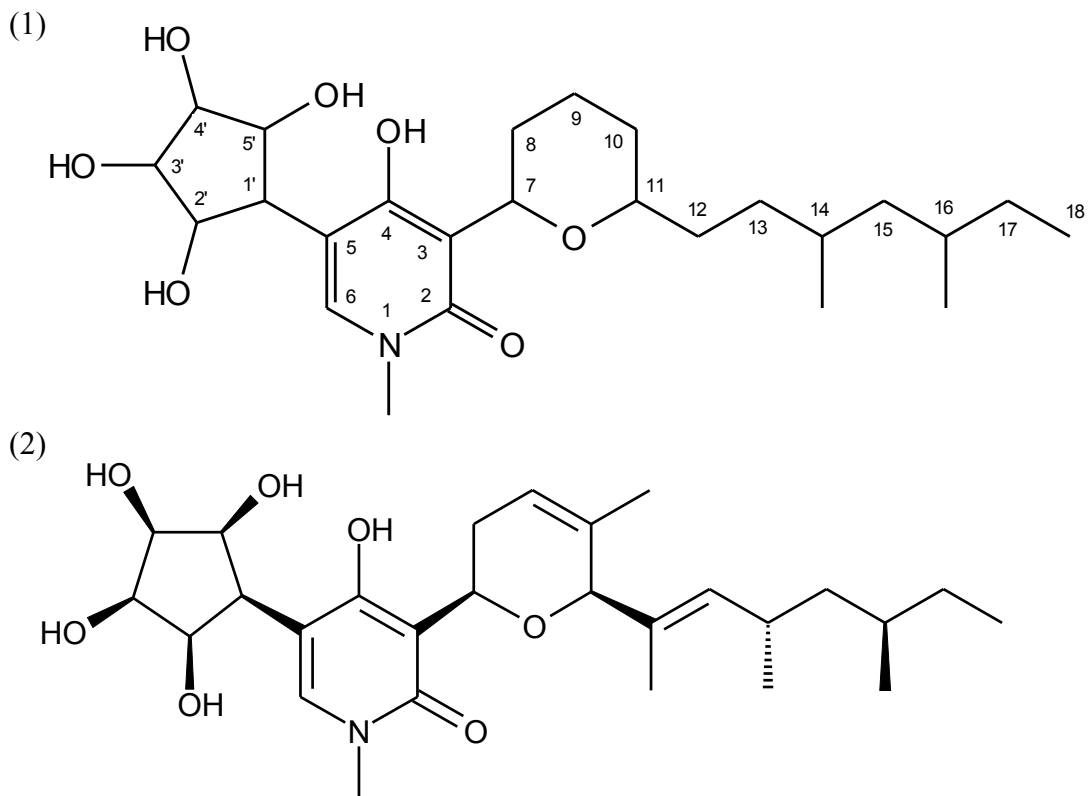


図 19 AS2077715 (1)と funiculosin (2)の構造

表 10 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR data of AS2077715 in CDCl_3

<i>Position</i>	<i>AS2077715</i>	
	δ_{C} (m)	δ_{H} (m, J)
2	161.4 (s)	
3	110.1 (s)	
4	162.5 (s)	
5	107.2 (s)	
6	137.2 (d)	7.87 (s)
7	78.1 (d)	4.94 (dd, 11 & 2)
8	30.2 (t)	2.04 (m), 1.45 (m)
9	23.1 (t)	1.88 (m), 1.70 (m)
10	31.4 (t)	1.70 (m), 1.30 (m)
11	80.0 (d)	3.51 (m)
12	33.9 (t)	1.54 (m), 1.52 (m)
13	33.2 (t)	1.37 (m), 1.12 (m)
14	30.1 (d)	1.45 (m)
15	44.1 (t)	1.06 (m), 1.05 (m)
16	31.7 (d)	1.38 (m)
17	30.4 (t)	1.26 (m), 1.13 (m)
18	11.4 (q)	0.86 (3H, t, 7.5)
1'	39.7 (d)	2.88 (m)
2', 5'	74.4 (d)	4.40 (2H, m)
	74.4 (d)	
3', 4'	70.0 (d)	4.10 (2H, m)
	70.0 (d)	
N-CH ₃	37.2 (q)	3.49 (3H, s)
14-CH ₃	19.4 (q)	0.83 (3H, d, 6.5)
16-CH ₃	19.0 (q)	0.80 (3H, d, 6.5)
4-OH		10.09 (s)
2'-OH		3.40 (d, 5)
5'-OH		3.39 (d, 5)
3'-OH		3.53 (d, 5)
4'-OH		3.50 (d, 5)

第5章 AS2077715 の生物学的性質

本章では、AS2077715 の生物活性について研究を行った。AS2077715 の *in vitro* における抗真菌活性、ミトコンドリアシトクローム *bc₁* 複合体阻害活性、*in vivo* の動物モデルにおける *Trichophyton mentagrophytes* に対する生菌数減少効果について述べる。

5.1 実験方法

5.1.1 *In vitro* 抗真菌活性測定法

Funiculosin は当研究所にて調製し、テルビナフィン は東京化成工業株式会社から購入した。

使用菌株は、アステラス製薬（株）culture collection 保存菌株を使用して、以下に示す方法で抗真菌活性を測定した。

微量液体培地希釈法：96-well 平板 microtiter plate（住友ベークライト社）を使用した。薬剤は予め microtiter plate 上で所定の培地にて 2 倍希釈系列を作製しておいた（50 μ l/well）。菌液は、ポテトデキストロース寒天培地斜面培養物に滅菌生理食塩水を加え胞子を懸濁し、その懸濁液を、ガーゼを詰めたロートに通液後、菌体濃度を計測し、5 \times 10⁷ 個/mL に調整することにより作製した。それぞれの菌株の菌液を 50 μ l ずつ薬剤希釈済みの各 well に接種した（最終菌量/最終液量/well：1 \times 10⁴ 個/100 μ l/well）。*Candida* 属、*Aspergillus* 属を試験菌として用いる場合には、この microtiter plate を 37 °C で 22 時間静置培養し、*Cryptococcus* 属の場合は、30 °C で 48 時間静置培養した。培養終了後、顕微鏡にて試験菌の増殖および形態変化を観察し、最少生育阻止濃度（minimum inhibitory concentration [MIC]）値を求めた。

5.1.2 *In vitro* 抗細菌活性測定法

アステラス製薬（株） culture collection 保存菌株を使用した。*Staphylococcus aureus* ATCC29213 (JCM2874)、*Bacteroides fragilis* ATCC25285、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741 は薬剤感受性のコントロールとして用いた。

ミューラーヒントンブロス培地 (MHB ; Difco) は通性嫌気性細菌の前培養に用いた。0.4% KNO₃ を含む MHB 培地は *Pseudomonas aeruginosa* を前培養するのに用いた。薬剤を含むミューラーヒントン寒天培地 (MHA ; Difco) を感受性試験に用いた。5% 脱繊維血を含む MHA 培地は *Streptococcus pyogenes* の前培養に用いた。GAM ブロスと変法 GAM 寒天培地 (ニッスイ) は偏性嫌気性細菌のそれぞれ、前培養と感受性試験に用いた。通性嫌気性細菌、好気性菌、偏性嫌気性細菌に対する最少生育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会が推奨する寒天平板希釈法にて測定した[66] [67]。細菌類は、18~24 時間培養後、マクファーランド比濁法 0.5 番 (1.5×10^8 CFU/mL) の濁度になるようにゼラチンを含む生理食塩水バッファー (BSG) 溶液で希釈し[68]、それから、 10^6 CFU/mL となるように希釈した。調製した菌液を、薬剤を含む寒天培地にマイクロプレーター (佐久間製作所) にてスポットした (接種した細菌量は 10^4 CFU/スポット)。スポットした寒天培地を 37 °C で 18~24 時間培養し (偏性嫌気性細菌の場合は、80% N₂、10% H₂、10% CO₂ の環境下)、細菌の生育を目視にて判定した。

5.1.3 シトクローム *bcl* 複合体阻害活性測定法

Antimycin A はシグマアルドリッチから購入した。シトクローム *bcl* 複合体阻害活性は、*T. mentagrophytes* FP2103 やラット肝臓、培養細胞から調整したミトコンドリア画分を用いたユビキノール - シトクローム *c* 還元アッセイにて測定した。ミトコンドリア画分は Mitochondria Isolation Kit (BioChain Institute, Inc.) を用いて、プロトコールに従い調整した。簡潔に記すと、細かく切り刻んだラッ

ト肝臓 (0.96g) を PBS で洗浄後、10 mL の mitochondria isolation buffer に懸濁し、ポリトロンを用いてホモジナイズした (20,000 rpm 20 秒を 3 回)。ホモジネートを 4°C で 600 g にて 10 分間遠心し、得られた上清を 4°C で 12,000 g にて 15 分間遠心した。ペレットを mitochondria storage buffer に懸濁し、ミトコンドリア画分とした。*T. mentagrophytes* と培養細胞のミトコンドリア画分は、おおよそ 2×10^7 細胞をソニケーションし、上記と同様の方法にて調整した。ミトコンドリア画分をアッセイバッファー (250 mM ショ糖、0.2 mM EDTA、1 mM アジ化ナトリウム、0.01% Tween-20、50 mM リン酸カリウムバッファー [pH7.0]) にて希釈し、シアン化カリウムとシトクローム *c* をそれぞれ終濃度 1 mM と 30 mM になるように添加した。反応は decyl-ubiquinol [69] を終濃度 50 mM となるように添加することで開始し、分光光度計にて 539 nm -550 nm の値を測定することでシトクローム *c* の還元をモニターした。

5.1.4 細胞毒性測定法

Jurkat 細胞 (ヒト T リンパ球細胞株) と EL-4 (マウス T リンパ腫細胞株) の培養には RPMI 1640 培地 (Gibco) を用いた。ヒト表皮角化細胞とヒト皮膚線維芽細胞とこれらの細胞の培養培地は Cell Applications, Inc. から購入した。薬剤は予め 96-well 平板 microtiter plate (住友ベークライト社) 上で所定の培地にて 2 倍希釈系列を作製しておいた (50 μ l/well)。それぞれの細胞懸濁液を 50 μ l ずつ薬剤希釈済みの各 well に接種し (最終菌量/最終液量/well : 1×10^4 細胞/100 μ l/well)、37°C で 3 日間静置培養した。生存率を CellTiter-Blue Cell Viability Assay 試薬を用いて測定した。

5.1.5 ATP 産生阻害活性測定法

ポテトデキストロース寒天培地上で 30 °C で 7 日間培養した *T. mentagrophytes*

FP2103 斜面培養物に滅菌生理食塩水を加え胞子を懸濁後、その懸濁液を、ガーゼを詰めたロートに通液し、胞子懸濁液を得た。MSD 培地にて 37°C、24 時間培養した胞子液に、被験薬剤を添加後、37 °C で 30 分培養し、BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega) を用いて細胞内 ATP 量を測定した。

5.1.6 抗白癩菌時間-殺菌曲線試験

ilicicolin H と mysothiazol は当研究室にて調製した。

10 µl の DMSO に溶解した試験薬剤を 1.5 mL エッペンチューブに入れ、そこに MSD 培地に懸濁した *T. mentagrophytes* FP2103 の胞子液 (1×10^5 個/mL) を 990 µl 添加した。このチューブを 30 °C、もしくは 4 °C で 48 時間静置培養した。生育期の菌に対する殺菌性試験では、30 °C で 18 時間プレインキュベーションした胞子懸濁液を試験薬剤入りのチューブに添加した。培養開始後、いくつかのタイムポイントで CFU アッセイを行った。簡潔に記すと、チューブから 50 µl を抜き取り、10 cm シャーレに移した後、20 mL の 40 °C に保温しておいた溶解サブローデキストロース寒天培地を注いだ。30 °C で 48 時間培養し、出現したコロニー数をカウントした。培養 0 時間目の CFU は、薬剤を含まないチューブの CFU を採用した。

5.1.7 マウス急性毒性試験

全ての動物実験はアステラス製薬 (株) の動物実験委員会に承認された方法で行った。薬剤は、10% polyoxyethylated (60 mol) hydrogenated castor oil (NIKKOL HCO60、日本ケミカルズ株式会社) 生理食塩水に溶解し、ICR マウス (5 週令、雄) に投与した。1 投与量につき 4 匹の投与を行い、投与直後から 4 日目まで観察を行った。

5.1.8 モルモット白癬菌感染モデル

全ての動物実験はアステラス製薬（株）の動物実験委員会に承認された方法で行った。接種菌株は、臨床分離株、*Trichophyton mentagrophytes* FP2103 株（アステラス製薬（株） culture collection 保存菌株）を使用した。接種菌液は以下のように調整した。MSD 寒天培地に継代後 7 日目の FP2103 株を滅菌生理食塩水にて集菌し、遠心操作にて一度洗浄した。この菌液を、ガーゼを詰めたロートで濾過し、各モデルで使用する濃度になるように生理食塩水にて希釈し接種孢子懸濁液とした。モルモットは雄性 Hartley 系、4 週令を日本エスエルシー（株）から購入し使用した。

- 体白癬モデル

感染日前日にモルモットの背部の毛を剃り、除毛剤で毛を除去しておき、感染日に背部の 5 箇所乱指刀で傷をつけ、そこに孢子懸濁液（ 2×10^7 孢子/mL）を 50 μ l 塗りつけた。薬剤は、10% HCO60—生理食塩水に溶解し、各投与量に対して一群モルモット 5 匹を使用した。感染 3 日後から 10 日間投与を行い、投与終了翌日に感染部位の病変をスコア化した。また、感染部位の皮膚片（約 1.5cm 角）を摘出し、皮膚内生菌数を測定した。病変スコアの指標を以下に示す。正常皮膚と同じ状態を「スコア 1」、表皮剥離／痂皮形成が観察される状態を「スコア 2」、感染拡大や強い紅斑が観察される状態を「スコア 3」、出血性膿瘍の状態を「スコア 4」、広範な出血性膿瘍の状態を「スコア 5」として、各スコアの中間の状態は各スコアの平均値とし（たとえば、スコア 2 とスコア 3 の中間状態はスコア 2.5）、1 から 5 までの 9 段階評価を行った。回収した皮膚はハサミで小さく刻んだ後、10mL の生理食塩水に懸濁し、ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。このホモジネート液 50 μ l および希釈したホモジネート液 50 μ l を各々 10 cm ディッシュに移し、オートクレーブ滅菌後 40 °C に保温しておいた 500 μ g/mL シクロヘキシミド含有サブロー寒天培地をディッシュに

加え、懸濁した。ディッシュを 30 °C で 3 日間培養した後、生育したコロニーを計測し、足毎の生存菌数 (CFU, colony forming units) を計算した。

- 足白癬モデル

モルモットの後足の足裏を 70%エタノールで消毒した後、菌液 200 μ l を含ませた脱脂綿を足裏に接着させ、絆創膏にて固定した。3 日後、足裏からガーゼを剥がし、同じ方法で再度、感染させた。さらに 3 日後、足裏からガーゼを剥がした。薬剤は、10% HCO60-生理食塩水に溶解し、各投与量に対して一群モルモット 6 匹を使用し、一匹当たり 1.0mL を経口投与した。投与スケジュールは、用量設定試験では、感染後 7 日目以降 10 日間連続して行い、計 10 回投与した。治療効果比較試験では、感染後 11 日目以降 14 日間連続して行い、計 14 回投与した。溶剤のみを投与した群を薬剤非投与群とした。病変スコアの判定は、体白癬モデルと同じ指標を用いて評価を行った。投与終了翌日に後足の足首から下の皮膚すべてを回収し皮膚内生菌数を測定した。治療効果比較試験では、感染後 11 日目 (投与 0 回)、18 日目 (投与 7 回)、21 日目 (投与 10 回) にも各投与群につき 5 匹ずつのモルモットの足皮膚内生菌数を測定した。

回収した皮膚はハサミで小さく刻んだ後、10mL の生理食塩水に懸濁し、ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。このホモジネート液 50 μ l および希釈したホモジネート液 50 μ l を各々 10 cm ディッシュに移し、オートクレーブ滅菌後 40 °C に保温しておいた 500 μ g/mL シクロヘキシミド含有サブロー寒天培地をディッシュに加え、懸濁した。ディッシュを 30 °C で 3 日間培養した後、生育したコロニーを計測し、足毎の生存菌数 (CFU, colony forming units) を計算した。

5.1.8 薬物動態試験

モルモットは雄性 Hartley 系、5 週令を日本エスエルシー (株) から購入し使

用した。AS2077715 とテルビナフィン を 10% HCO-60 生理食塩水に溶解し、各薬剤に対してモルモット 4 匹を使用し、10 mg/kg を経口投与した。血液サンプルは投与後、30 分、1, 2, 4, 8, 24 時間に麻酔下で採取した。血漿サンプル中の薬剤濃度は、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS) にて測定した。HPLC は Agilent 1100 システムを、MS/MS は Sciex API-2000 システムを用いた。分析カラムは Waters 社の Atlantis (5 μ m, 50 \times 2.0 mm i.d.)を用い、流量は 0.2 mL/min とした。移動相は、A = 0.01%ギ酸、B = アセトニトリルとし、テルビナフィン分析には A : B = 55 : 45 (v/v)、AS2077715 分析には A : B = 45 : 55 (v/v) を用いた。分析サンプルは、血漿サンプルから以下に示す方法にて調整した。50 μ L の血漿サンプルを 1.5 mL チューブに入れ、これに 50 μ L の 50%アセトニトリルを加え、お互いの内部標準として 10 μ L の 0.5 μ g/mL テルビナフィン、もしくは、10 μ g/mL の AS2077715 を添加した。ボルテックスミキサーにてチューブを攪拌後、14,000 rpm で 5 分間遠心した。50 μ L の上清を 100 μ L のそれぞれの移動相と混合し、この混合液 20 μ L を分析カラムに注入し分析した。薬物動態パラメーターはノンコンパートメントモデルを用いて計算した。

ラットは SD ラットを用いた。経口投与用の溶剤として注射用水/プロピレングリコール (PG) 溶剤を、静脈投与用の溶剤として注射用水/PG+30%(w/v) 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD)を用いた。

5.2 実験結果

5.2.1 AS2077715 の *in vitro* 抗真菌活性

AS2077715 の *in vitro* 抗真菌活性を微量液体培地希釈法にて測定し、funiculosin の抗真菌スペクトラム、テルビナフィンの抗白癬菌活性と比較した (表 11)。AS2077715 は funiculosin と同じ抗真菌スペクトラムを示した。すなわち、*Trichophyton* 属に対しては強い抗菌力を示したが、*Cryptococcus neoformans* 以外の他の被験菌に対しては 2.5 µg/mL の濃度で無効であった。AS2077715 の *Trichophyton* 属に対する MIC は 0.08 µg/mL と強いものであったが、テルビナフィンの MIC より 8 倍弱かった。

5.2.2 AS2077715 の *In vitro* 抗細菌活性

AS2077715 と funiculosin の *in vitro* 抗細菌活性を寒天平板希釈法にて測定した。コントロール薬剤として抗細菌薬のオフロキサシン (OFLX) とクリンダマイシン (CLDM) を用いた。AS2077715 と funiculosin はグラム陽性球菌やグラム陰性細菌に対して、12.5 µg/mL の濃度で生育抑制を示さなかった (表 12)。偏性嫌気性細菌においては、ヒトの腸内細菌叢を構成する *Peptostreptococcus* spp.、*Streptococcus intermedius*、*Bifidobacterium* spp.、*Lactobacillus* spp.、*Eubacterium lentum*、*Bacteroides* spp. に対して 12.5 µg/mL の濃度で生育抑制を示さなかったが、*Prevotella* 属の *P. intermedia* と *P. melaninogenica* に対しては、AS2077715 は 0.10~0.20 µg/mL の MIC で抗細菌活性を示した (表 13)。Funiculosin はこれらの菌に対して、AS2077715 より少し弱く、0.78~3.13 µg/mL の MIC で抗細菌活性を示した。

表 11 AS2077715、funiculosin、テルビナフィンの抗真菌活性

Strain	MIC (μg/mL)		
	AS2077715	funiculosin	terbinafine
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FP2103	0.08	0.08	0.01
<i>T. rubrum</i> FP596	0.08	0.08	N.D.
<i>Aspergillus fumigatus</i> FP1305	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>Rizopus oryzae</i> FP1988	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>Pseudallescheria boydii</i> FP1987	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>Fusarium solani</i> FP1930	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>Candida albicans</i> FP633	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>C. krusei</i> FP1979	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>C. glabrata</i> FP1944	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>C. tropicalis</i> FP1589	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>C. guilliermondii</i> FP2086	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>C. parapsilosis</i> FP1980	> 2.5	> 2.5	N.D.
<i>Cryptococcus neoformans</i> FP1739	1.3	2.5	N.D.

*N.D.; 未実施

表 12 AS2077715 と funiculosin の通性嫌気性細菌と好気性細菌に対する抗菌活性

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a		
	AS2077715	Funiculosin	OFLX
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P JC-1	>12.5	>12.5	0.39
<i>S. epidermidis</i> IID866	>12.5	>12.5	0.39
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	>12.5	12.5	0.78
<i>Enterococcus faecalis</i> IID682	>12.5	>12.5	1.56
<i>E. faecium</i> CAY09-1	>12.5	>12.5	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	>12.5	>12.5	3.13
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	>12.5	>12.5	0.10
<i>Micrococcus smegmatis</i> ATCC607	>12.5	>12.5	0.78
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	>12.5	>12.5	0.013
<i>Citrobacter freundii</i> CAY17-1	>12.5	>12.5	0.20
<i>Salmonella enteritidis</i> 1891	>12.5	>12.5	0.05
<i>Shigella sonnei</i> II 37148	>12.5	>12.5	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	>12.5	>12.5	0.025
<i>Enterobacter cloacae</i> 963	>12.5	>12.5	0.20
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	>12.5	>12.5	0.20
<i>Hafnia alvei</i> NCTC9540	>12.5	>12.5	0.10
<i>Serratia marcescens</i> IID620	>12.5	>12.5	0.10
<i>Morganella morganii</i> IID602	>12.5	>12.5	0.20
<i>Providencia rettgeri</i> IFO3850	>12.5	>12.5	0.10
<i>P. stuartii</i> A-2	>12.5	>12.5	0.10
<i>P. alcalifaciens</i> NIH118	>12.5	>12.5	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490	>12.5	>12.5	0.20
<i>P. putida</i> IAM1002	>12.5	>12.5	3.13
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 276	>12.5	>12.5	3.13
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IAM12087	>12.5	>12.5	0.20

^a MICs were determined by the agar dilution method. Inoculum size: 10^4 CFU/spot.

表 13 AS2077715 と funiculosin の偏性嫌気性細菌に対する抗菌活性

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a			
	AS2077715	Funiculosin	OFLX	CLDM
<i>Peptostreptococcus productus</i> CAYA 12-2	>12.5	>12.5	6.25	0.10
<i>P. asaccharolyticus</i> 4280-2	>12.5	>12.5	6.25	0.025
<i>P. magnus</i> BI-29328	>12.5	>12.5	0.78	0.78
<i>P. micros</i> GAI5540	>12.5	>12.5	0.78	≤ 0.006
<i>Streptococcus intermedius</i> BI-741629	>12.5	>12.5	3.13	0.10
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CAYA 20-1	>12.5	>12.5	3.13	0.025
<i>B. bifidum</i> JCM1209	>12.5	>12.5	12.5	0.025
<i>Lactobacillus. casei</i> subsp. <i>casei</i> JCM1134	>12.5	>12.5	3.13	1.56
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	>12.5	>12.5	6.25	0.025
<i>Propionibacterium acnes</i> JCM6425	>12.5	>12.5	0.78	0.10
<i>P. granulosum</i> GAI 7414	>12.5	>12.5	0.78	0.10
<i>Eubacterium lentum</i> GAI 7413	>12.5	>12.5	1.56	0.20
<i>Clostridium perfringens</i> CAYA 39-1	>12.5	>12.5	0.78	0.20
<i>C. difficile</i> 3941	>12.5	>12.5	100	1.56
<i>C. ramosum</i> GAI 5514	>12.5	>12.5	0.78	0.10
<i>Veillonella parvula</i> BI-10790	>12.5	>12.5	0.78	0.05
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>12.5	>12.5	6.25	0.20
<i>B. distasonis</i> CL99-3	>12.5	>12.5	1.56	0.20
<i>B. ovatus</i> BI-5630	>12.5	>12.5	25	3.13
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>12.5	>12.5	6.25	0.20
<i>B. vulgatus</i> IFO 14291	>12.5	>12.5	25	>100
<i>Propionibacterium gingivalis</i> ATCC33277	12.5	6.25	0.78	≤ 0.006
<i>Prevotella corporis</i> GAI 4859	>12.5	>12.5	3.13	0.013
<i>P. intermedia</i> BI-5500	0.20	3.13	1.56	≤ 0.006
<i>P. melaninogenica</i> GAI 5590	0.10	0.78	6.25	≤ 0.006
<i>Fusobacterium nucleatum</i> U-5	>12.5	>12.5	3.13	0.05
<i>F. varium</i> ATCC8501	>12.5	>12.5	12.5	1.56

^a MICs were determined by the agar dilution method. Inoculum size: 10^4 CFU/spot.

5.2.3 AS2077715 のシトクローム *bc1* 複合体阻害活性と細胞毒性

Funiculosin は、*T. mentagrophytes* のシトクローム *bc1* 複合体によるユビキノール-シトクローム *c* 還元反応を阻害し、その IC₅₀ 値は 1.7 nM であった (図 20b)。AS2077715 も *T. mentagrophytes* のシトクローム *bc1* 複合体を 1.4 nM の IC₅₀ 値で阻害し、Funiculosin と同等の阻害活性を有していた (図 20a)。ラットのシトクローム *bc1* 複合体に対する阻害活性を測定したところ、funiculosin は 9.2 nM の IC₅₀ 値で阻害活性を示したのに対し、AS2077715 の IC₅₀ 値は 1200 nM であり、funiculosin より 860 倍弱い阻害活性を示した (図 20)。ラット以外の哺乳類のシトクローム *bc1* 複合体阻害活性を調べるために、マウス細胞として EL-4 を、ヒト細胞として Jarkat を用いた。また、白癬菌の感染部位の細胞として、ヒト皮膚角化細胞とヒト皮膚繊維芽細胞を用いた。AS2077715、funiculosin と antimycin A のマウスとヒト細胞のシトクローム *bc1* 複合体阻害活性と細胞毒性を測定した結果を表 14 に示す。非選択的シトクローム *bc1* 複合体阻害剤である antimycin A は、マウスとヒト細胞のシトクローム *bc1* 複合体を 0.12~0.37 ng/mL の IC₅₀ 値で阻害した。これは、*T. mentagrophytes* シトクローム *bc1* 複合体に対する IC₅₀ 値 (0.4 ng/mL) と同等の濃度であった。Funiculosin のマウスシトクローム *bc1* 複合体に対する IC₅₀ 値は、*T. mentagrophytes* に対する IC₅₀ 値と同等であったが、ヒトのシトクローム *bc1* 複合体に対する IC₅₀ 値は 19~180 nM であり、*T. mentagrophytes* に対する阻害活性より 10 倍以上弱かった。一方、AS2077715 のマウスとヒトのシトクローム *bc1* 複合体に対する IC₅₀ 値は 6000~20000 nM であり、*T. mentagrophytes* に対する阻害活性より 500 倍以上弱かった。このように、AS2077715 のシトクローム *bc1* 複合体阻害活性は、*T. mentagrophytes* に対して高い選択性を示した。

これら阻害剤の *T. mentagrophytes* や各種哺乳細胞に対する生育抑制活性はシトクローム *bc1* 阻害活性とよく相関し (表 14)、AS2077715 のマウスやヒト細

胞に対する生育抑制活性は *T. mentagrophytes* に対する生育阻害活性より 70 倍以上弱かった。

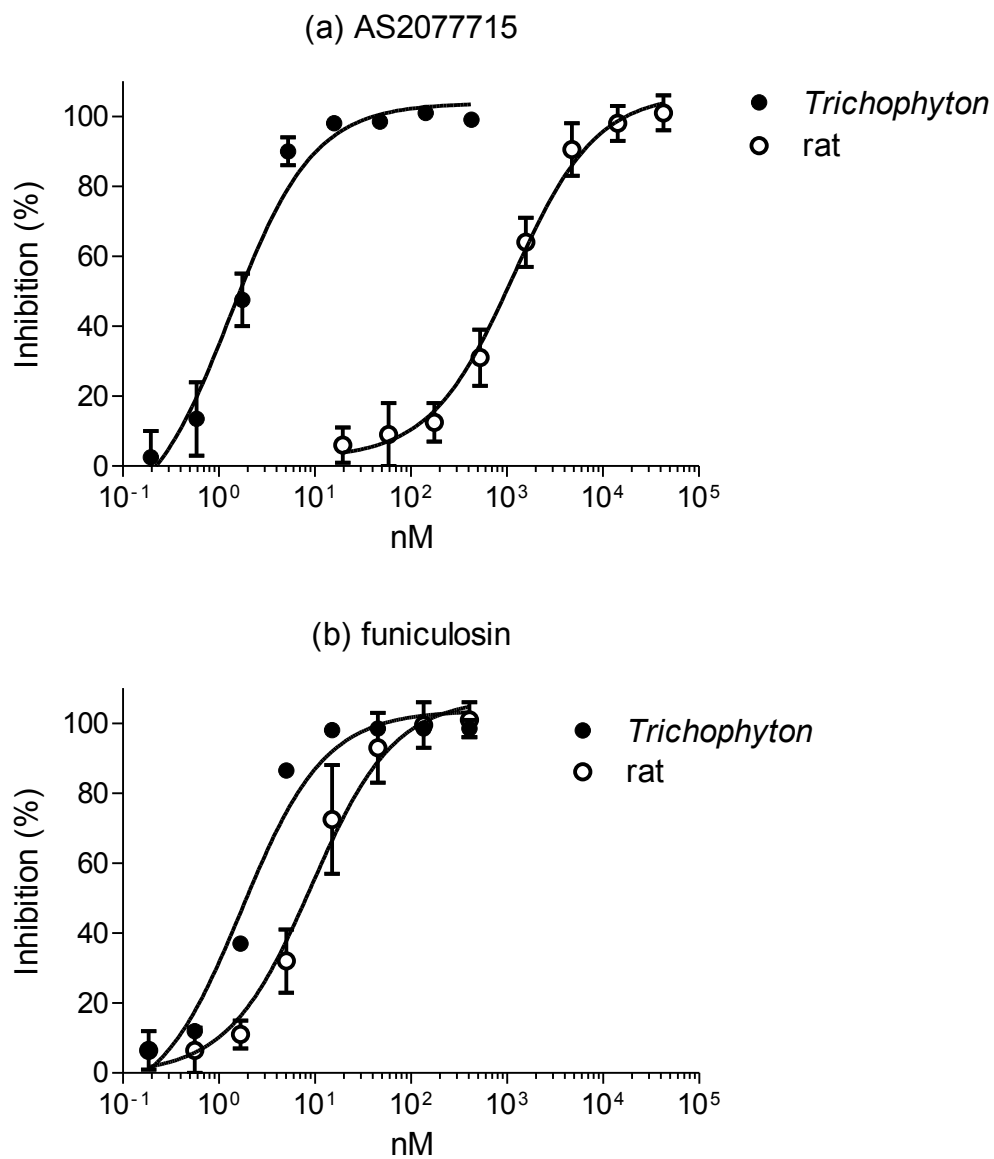


図 20 AS2077715 と funiculosin の白癬菌とラットのシトクローム *bc1* に対する阻害活性

表 14 AS2077715、funiculosin、antimycin A の白癬菌と哺乳細胞のシトクローム *bcl* 阻害活性と抗白癬菌活性と細胞増殖抑制活性

Cell type	IC ₅₀ (ng/mL)		
	(Cytotoxicity : Complex III inhibition)		
	AS2077715	Funiculosin	Antimycin A
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	80 : 0.9	70 : 1.5	1300 : 0.4
EL4 (mouse)	6200 : 480	35 : 1.9	5.4 : 0.28
Jurkat (Human)	20000 : 860	1400 : 180	1.6 : 0.12
Human epidermal keratinocytes	6000 : 500	120* : 19	0.8* : 0.30
Human dermal fibroblasts	11000 : 690	490* : 41	6.3* : 0.37

*; IC₃₀ (ng/mL).

5.2.4 AS2077715 の *T. mentagrophytes* に対する ATP 産生阻害活性

前項の結果から、AS2077715 は *T. mentagrophytes* のシトクローム *bc1* 複合体に対する強い阻害活性を有することが判明した。ミトコンドリア電子伝達系の阻害によりミトコンドリア膜間のプロトン勾配が消失し、酸化的リン酸化による ATP 合成が停止することが知られている。そこで、AS2077715 と funiculosin、antimycin A の *T. mentagrophytes* に対する ATP 産生阻害活性を調べた。薬剤添加 30 分後の *T. mentagrophytes* 細胞内 ATP 量を測定したところ、AS2077715 は 0.33 $\mu\text{g/mL}$ の IC_{50} 値で ATP 量を 95% 減少させた (図 21)。funiculosin と antimycin A の IC_{50} 値はそれぞれ 0.28 $\mu\text{g/mL}$ 、0.62 $\mu\text{g/mL}$ であり、減少効果は AS2077715 と同等であった。

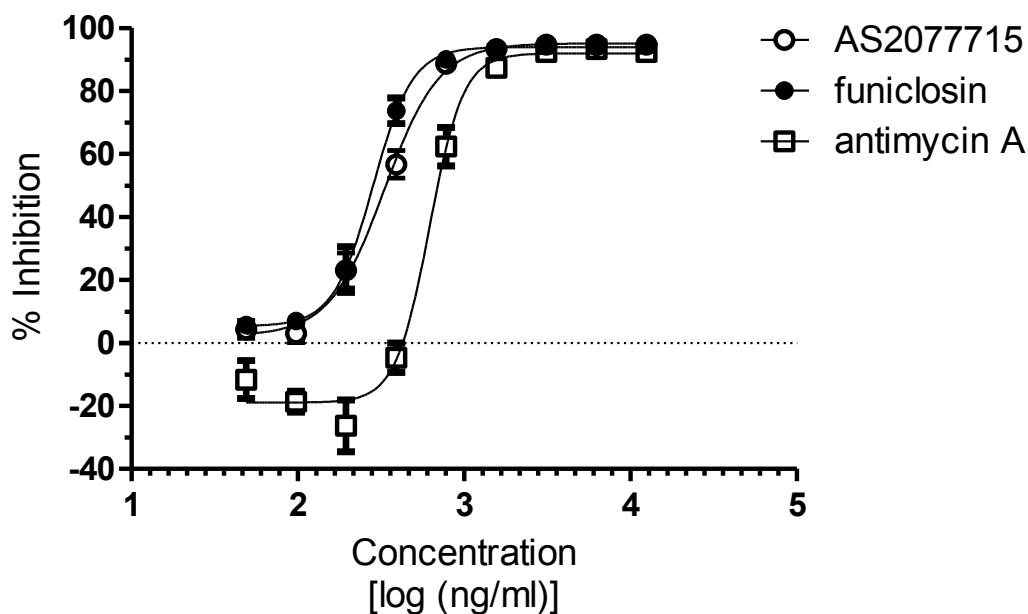


図 21 AS2077715、funiculosin、antimycin A の白癬菌 ATP 産生阻害活性

5.2.5 AS2077715 の抗白癬菌時間－殺菌曲線試験

AS2077715 の *T. mentagrophytes* に対する殺菌作用をテルビナフィンと比較した結果を図 22 に示す。胞子に薬剤を添加した後に培養を開始した場合、テルビナフィンは薬剤添加 22 時間以上の培養時間で薬剤未添加群と比較して生菌数を減少させた (図 22-1a)。一方で、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の AS2077715 は培養開始 2 時間以内に生菌数を減少させた。次に、生育中の菌に薬剤添加した場合の殺菌作用を調べるために、18 時間培養した胞子に薬剤を添加した。テルビナフィンは薬剤添加後 8 から 24 時間の間に生菌数を減少させたが、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の AS2077715 は添加後 4 時間以内に生菌数を減少させた (図 22-1b)。このように、AS2077715 はテルビナフィンより短時間で真菌効果を発揮した。胞子が菌糸を発芽するまでには、培養開始からおおよそ 10 時間以上かかるため、AS2077715 が数時間以内に殺菌性を発揮した結果は、この化合物が、生育していない休眠菌に対する殺菌効果を有する可能性があると考えられた。そこで、胞子に薬剤を添加後、4 $^{\circ}\text{C}$ で培養する条件での殺菌曲線試験を行った。テルビナフィンは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でも培養 48 時間後の生菌数に影響を示さなかったのに対し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の AS2077715 は 2 時間以内に生菌数を減少させた (図 22-2c)。この結果から、AS2077715 は休眠している胞子に対する殺菌効果を有することが示された。次に、AS2077715 が示した短時間殺菌性の特徴がこの化合物特有の性質であるのか、もしくはシトクローム *bcl* 複合体阻害剤特有の性質であるのかを調べる目的でその他のシトクローム *bcl* 複合体阻害剤の殺菌曲線試験を行った。試験した全てのシトクローム *bcl* 複合体阻害剤は薬剤添加後 8 時間以内の培養で生菌数を減少させた (図 22-2d)。この結果から、AS2077715 の *T. mentagrophytes* に対する短時間殺菌性効果は、シトクローム *bcl* 複合体阻害に由来することが示唆された。

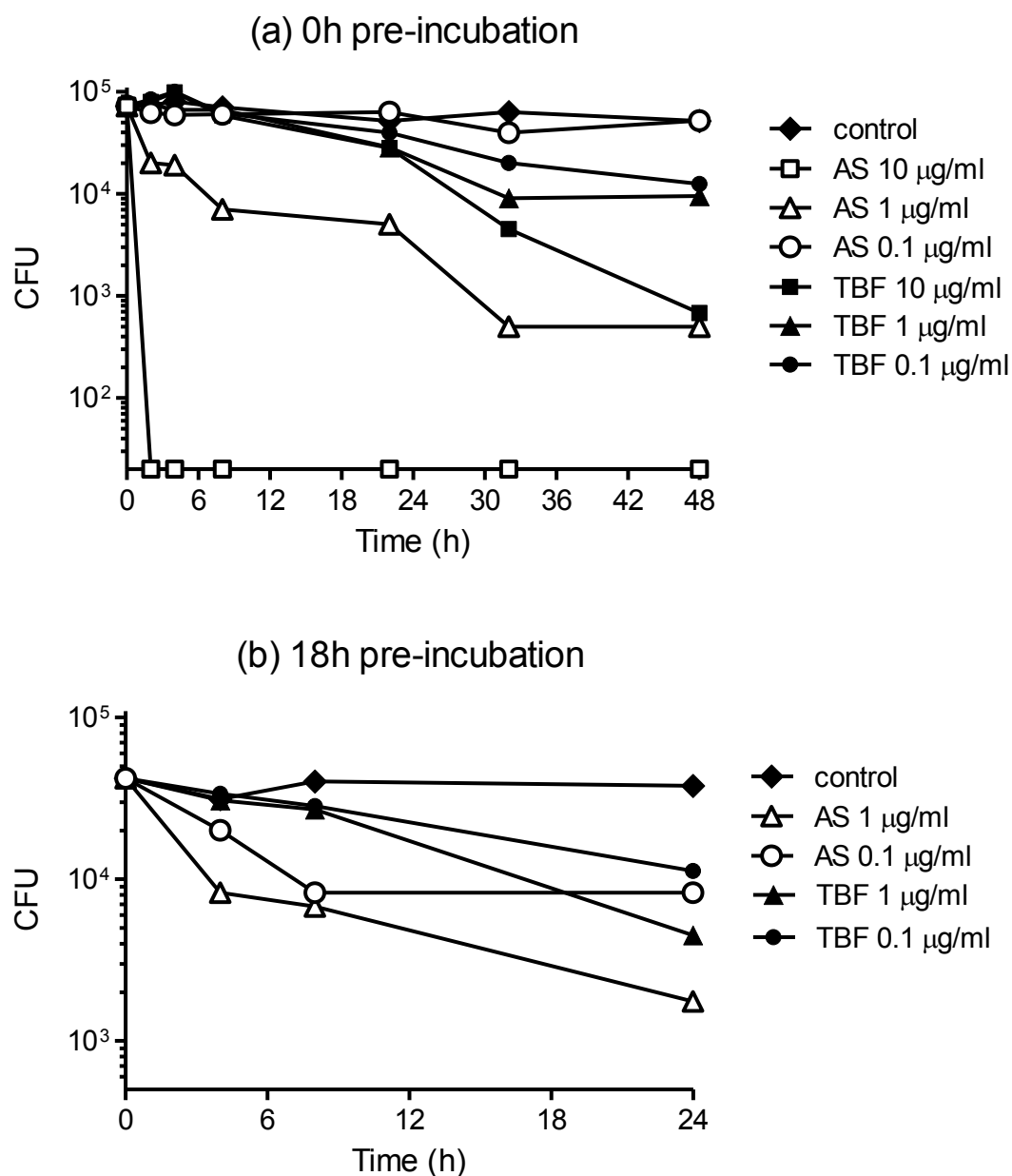


図 22-1 AS2077715(AS)とテルビナフィン(TBF)の白癬菌に対する作用時間一殺菌曲線

- a) 薬剤を *T. mentagrophytes* 孢子懸濁培地に添加後、30 °C で培養
 b) 薬剤を 18 時間培養した *T. mentagrophytes* 孢子懸濁培地に添加後、30 °C で培養

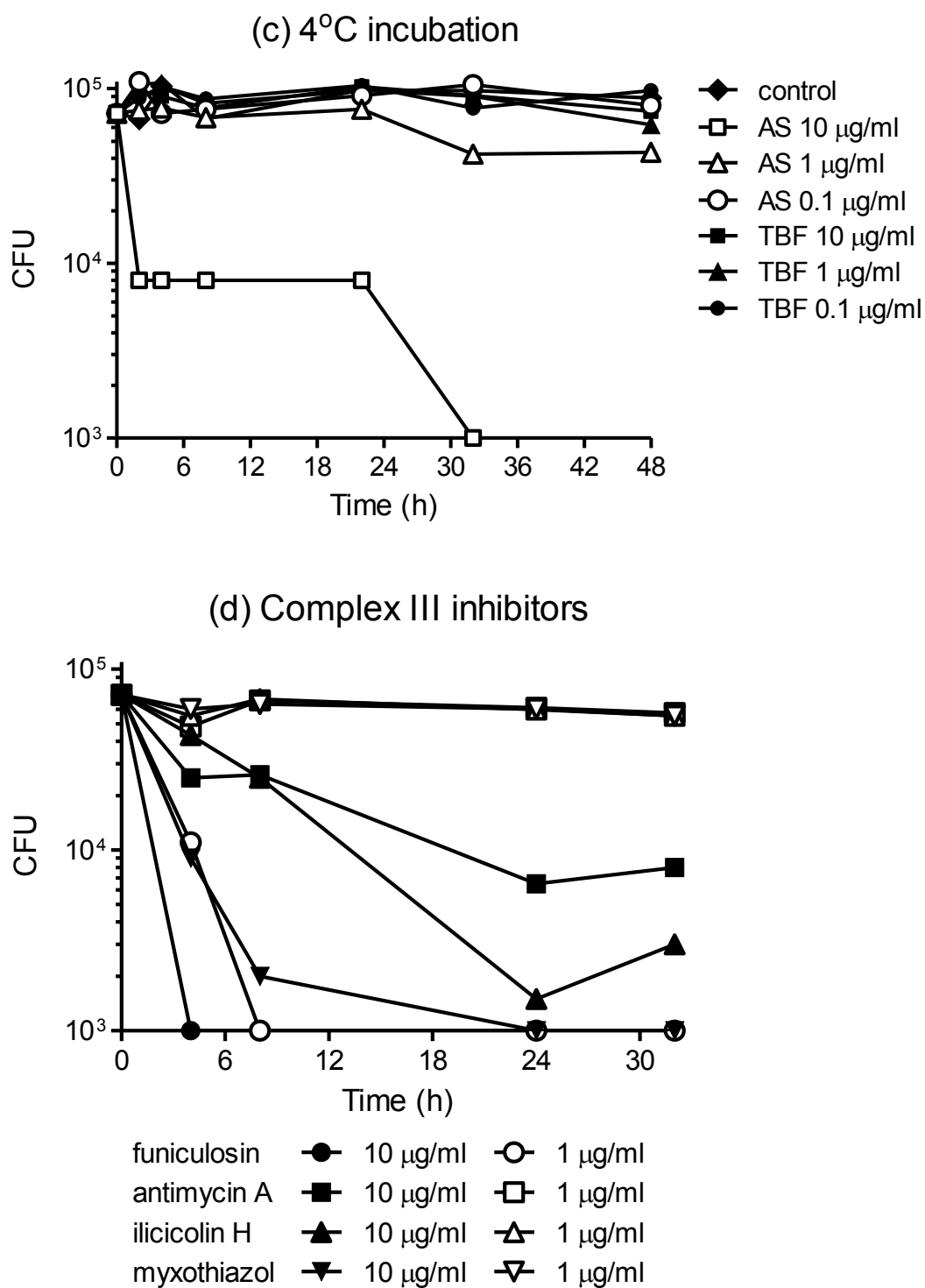


図 22-2 白癬菌に対する作用時間—殺菌曲線

c) 薬剤を *T. mentagrophytes* 孢子懸濁培地に添加後、4 °C で培養

d) 薬剤を *T. mentagrophytes* 孢子懸濁培地に添加後、30 °C で培養

AS, AS207715; TBF, テルビナフィン

5.2.6 AS2077715 のマウス急性毒性

5 週令の ICR マウスに AS2077715 を 100 mg/kg となるように尾静脈投与し、4 日間観察したところ、4 匹中 2 匹死亡した。funiculosin を 2.5 mg/kg となるように尾静脈投与したところ、全例死亡し、1 mg/kg 投与群では全例生存した。以上の結果から、AS2077715 と funiculosin のマウス LD₅₀ はそれぞれ、100 mg/kg、1~2.5 mg/kg であり、AS2077715 の急性毒性の濃度は funiculosin より 40~100 倍高かった。

5.2.7 AS2077715 のモルモット白癬菌感染モデルにおける評価

AS2077715 の *in vivo* 抗白癬菌活性を調べるために、*Trichophyton mentagrophytes* 感染モルモットモデルを用いて検討を行った。

白癬菌はマウスやラットの皮膚には感染しないが、モルモットの皮膚には免疫抑制剤等を用いなくても感染可能である。モルモットに白癬菌を感染させると、ヒトとは異なり炎症反応が引き起こされるため、永続的な感染は持続しないが、抗白癬菌剤を評価するスタンダードなモデルとして用いられている。

まず、体白癬モデルにて AS2077715 の評価を行った。モルモット背部の皮膚の 5 か所に白癬菌の孢子懸濁液を接種し、接種 3 日後から 1 日 1 回の投与を 10 日間行った。この体白癬モデルの感染部位の病変推移としては、感染 4, 5 日目ぐらいから感染部位に表皮剥離や痂皮形成の症状が現れ (スコア 2)、感染 9, 10 日目には赤くただれた症状 (スコア 4) を示す。投与終了翌日の病変スコアを図 23 に示す。投与終了翌日 (感染 13 日目) の溶剤投与群の病変は、すべての感染部位で赤くただれた出血性膿瘍の状態を呈しており、病変スコアの平均は 4 を超えていた。溶剤投与群と比較して、テルビナフィンの経口投与群は、有意 ($p < 0.01$) に病変スコアを改善させ、その効果は用量依存的であった。また、AS2077715 も溶剤投与群と比較して、有意 ($p < 0.01$) に病変スコアを改善させ、

用量依存的であった。12.5 mg/kg 投与群ではテルビナフィンより病変スコアの改善効果が高かった。投与終了翌日の皮膚内生菌数の結果を図 24 に示す。皮膚内生菌数の結果は病変スコアの結果と良く相関していた。投与終了翌日（感染 13 日目）の溶剤投与群の皮膚内生菌数は、皮膚片あたり 10^7 cfu 以上であったのに対し、テルビナフィンの経口投与群は、有意 ($p < 0.01$) に皮膚内生菌数を減少させ、その効果は用量依存的であった。また、AS2077715 も溶剤投与群と比較して、有意 ($p < 0.01$) に皮膚内生菌数を改善させ、用量依存的であった。12.5 mg/kg 投与群ではテルビナフィンより皮膚内生菌数減少効果が高く、約 2 オーダーの効果の差があった。今回試験した投与用量では無作用用量が設定されていないため推定ではあるが、ED₅₀ を計算したところ、テルビナフィンは 29 mg/kg、AS2077715 は 8.2 mg/kg であり、AS2077715 の方が低用量で効果を発揮することが判明した。また、今回の試験で AS2077715 は経口投与で有効性を発揮することが示されたため、以降の試験は経口投与で行うこととした。

次に、足白癬モデルにて AS2077715 の評価を行った。体白癬モデルでは感染効率を上げるために、感染部位の皮膚に傷をつけたが、これにより激しい炎症を伴う病態であった。足白癬モデルでは、皮膚を傷つけることなく、孢子懸濁液を染み込ませたガーゼを後足の足裏に数日間密着させることで自然感染させる系であり、よりヒトの足白癬に近い症状や病態推移を示す。この動物モデルを用いて、テルビナフィンと AS2077715 の比較評価を行った。

まず、感染開始後 7 日目から 10 日間連日投与する投薬スケジュールにて評価を行った。感染 11 日後から 16 日までの病変スコアの推移を図 25 に示す。溶剤投与群では、感染 11 日目前後から感染による病態が観察され始め、その後、15、16 日目で激しい痂皮形成や赤くはれた病態が見られ、病変スコアの平均値が 4 近くまで上昇した。溶剤投与群と比較してテルビナフィンは、20 mg/kg の投与群で感染後 12 日目（5 回投与後）から有意に病態スコアの改善を示した（図 25

(b)。5 mg/kg と 10 mg/kg 投与群では、感染後 13 日目（6 回投与後）から有意に病態スコアの改善を示したが、感染 16 日目（9 回投与後）の病態スコアは、改善傾向であったが、有意ではなかった。AS2077715 は、20 mg/kg 投与群では感染後 12 日目（5 回投与後）から、10 mg/kg 投与群では感染後 13 日目（5 回投与後）から、溶剤投与群と比較して有意に病態スコアを改善させた（図 25 (a)）。一方で、5 mg/kg と 2.5 mg/kg 投与群は病態スコアの改善を示さなかった。

投与終了翌日（感染後 17 日目）の足皮膚内生菌数の値を図 26 に示す。皮膚内生菌数の結果は、病変スコアの結果と良く相関していた。テルビナフィン、20 mg/kg 投与群において、溶剤投与群と比較して有意 ($p < 0.001$) に足皮膚内生菌数を減少させた。5 mg/kg と 10 mg/kg 投与群においては、生菌数減少傾向であったが、10 mg/kg 投与群の減少効果は有意ではなかった。AS2077715 は、10 mg/kg と 20 mg/kg 投与群において、溶剤投与群と比較して有意 ($p < 0.001$) な生菌数減少効果を示した。2.5 mg/kg と 5 mg/kg 投与群においては生菌数減少効果を示さなかった。20 mg/kg 投与群の生菌数減少効果を比較すると AS2077715 はテルビナフィンより生菌数を 10 分の 1 程度減少させているが、データのばらつきが大きいいため、有意ではなかった。

次に、投与量 20 mg/kg/day における AS2077715 とテルビナフィンの治療効果比較試験を行った。前の試験では、感染症状が観察される前から、つまり感染後 7 日目から投与を開始したため、治療効果というよりも予防効果の評価結果と考えられる。今回の試験では、感染症状が観察され始めた後、つまり感染後 11 日目から投与を開始することとした。これにより、感染が成立した足白癬における治療効果を評価することが可能となり、よりヒトにおける治療法に近いモデルであると考えられる。実際の投与スケジュールとしては、感染開始 11 日目から投与を開始し、投与を 7 日間、10 日間、14 日間行い、投与終了翌日に足皮膚内生菌数を計測することにより、治療期間における菌減少効果を調べた。

まず、感染 11 日目（投与開始日）から感染 25 日目（投与終了日）までの病態スコアの推移を図 27 に示す。感染 11 日目には、ほぼすべての個体で痂皮形成や表皮のめくれが観察され、病態スコアとしては 2 前後であった。感染 18 日目（7 回投与後）の薬剤投与群の病態スコアは、溶剤投与群と同程度であり差は見られなかった。感染 7 日目から投薬を行った前回の試験では、6 回投与後から有意に病態スコアの改善が見られたので、治療開始を遅くした今回のモデルは薬剤が効果を発揮しにくいモデルといえる。感染 21 日目以降で薬剤投与群は溶剤投与群と比較して病態スコアを優位に改善させた。テルビナフィンと AS2077715 の病態スコアは同じ推移を示し、病態の差は見られなかった。

計測した足皮膚内生菌数の値を図 28 に示す。図 29 は同じデータを経時的に示したグラフである。病態スコアでは差が見られなかったが、AS2077715 の 20 mg/kg 投与群は、溶剤投与群と比較して、7 日間以上の投与で足皮膚内生菌数を有意 ($p < 0.001$) に減少させた。一方で、テルビナフィン 20 mg/kg 投与群は、生菌数減少効果を示すのに 10 日間以上の投与が必要であった。しかしながら、14 日間投与後の生菌数減少効果は AS2077715 とテルビナフィンで同等であった。

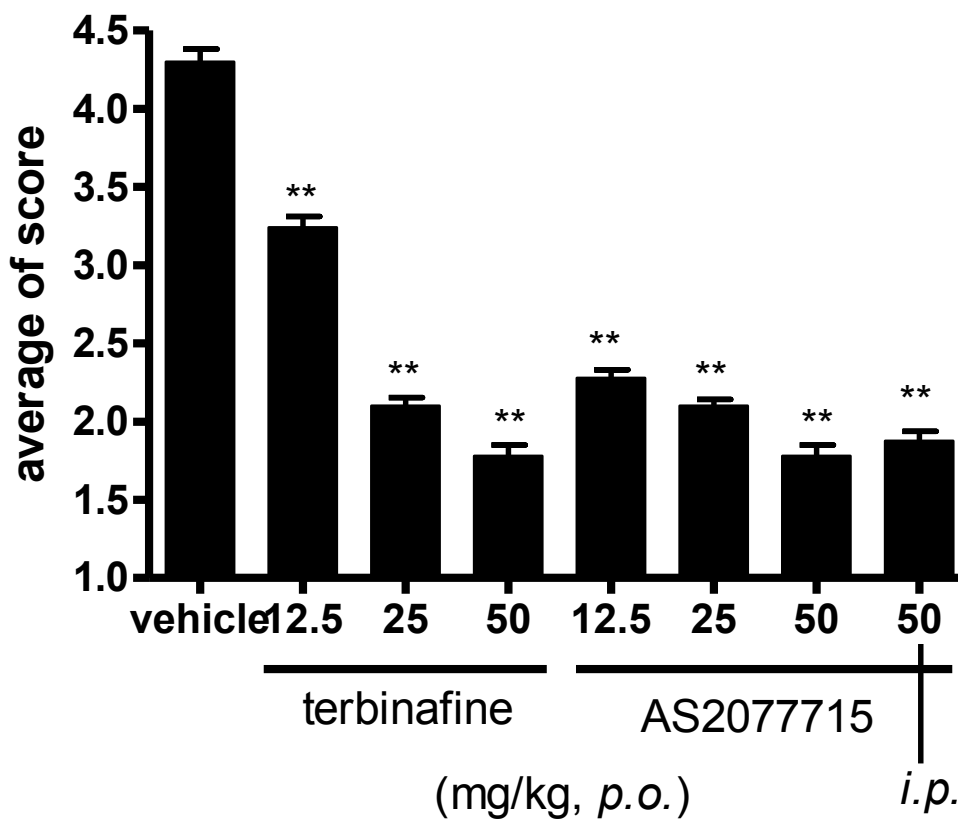
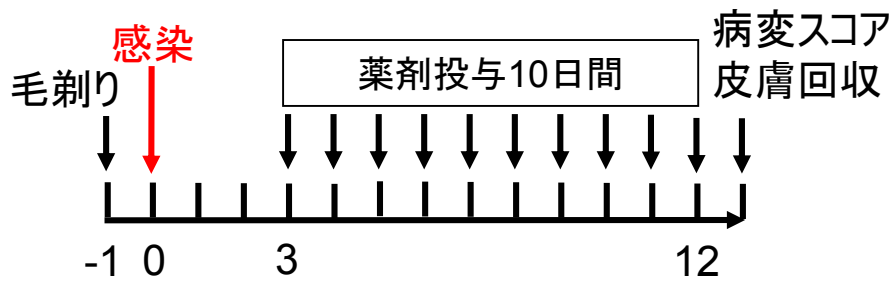


図 23 AS2077715 とテルビナフィンのモルモット体白癬における治療効果 (病変スコア)

Dunnett's Multiple Comparison Test ** : $P < 0.01$

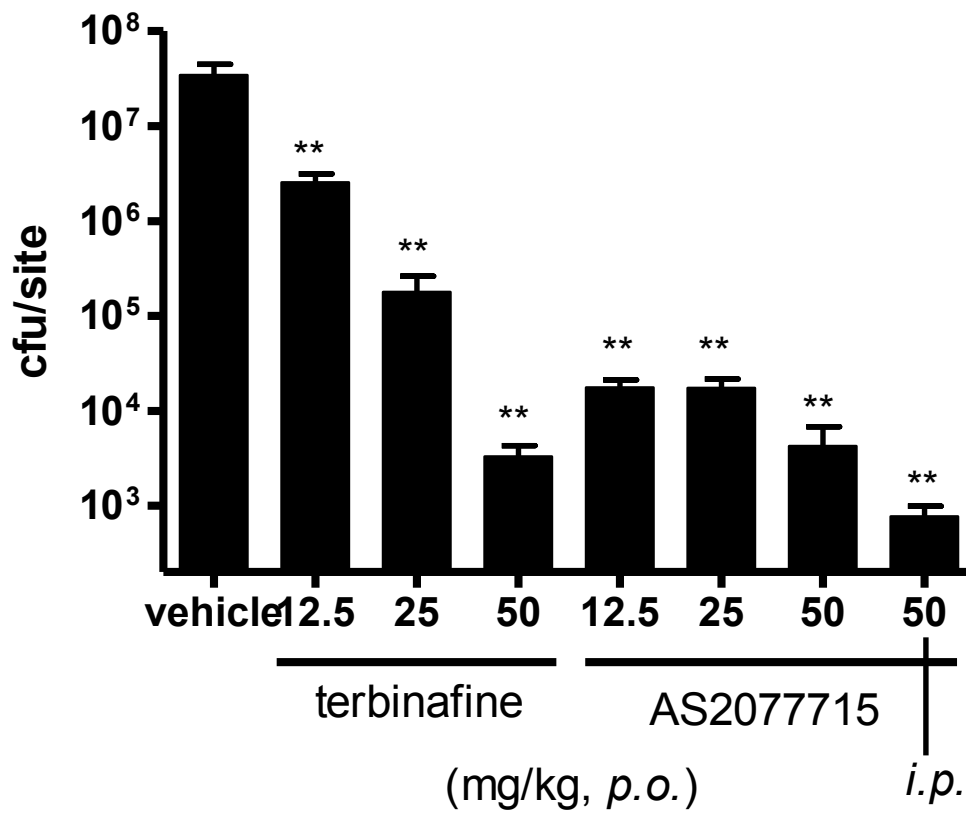
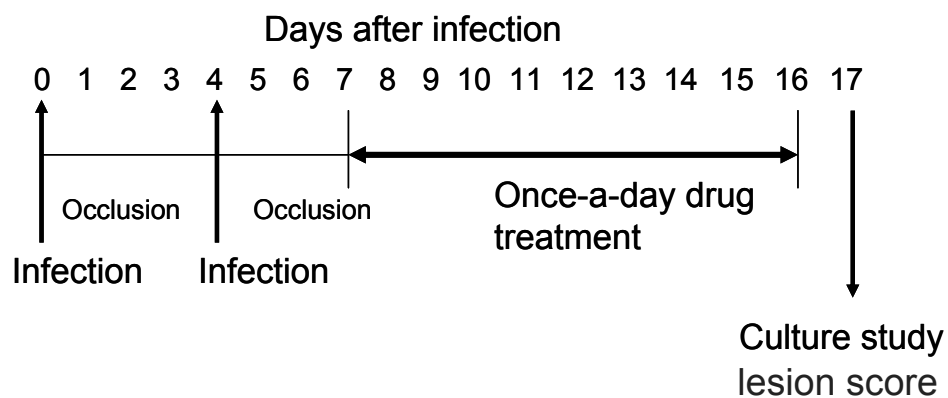


図 24 AS2077715 とテルビナフィンのモルモット体白癬における治療効果 (皮膚内生菌数)

Dunnett's Multiple Comparison Test ** : P<0.01

Treatment schedule



(a) AS2077715

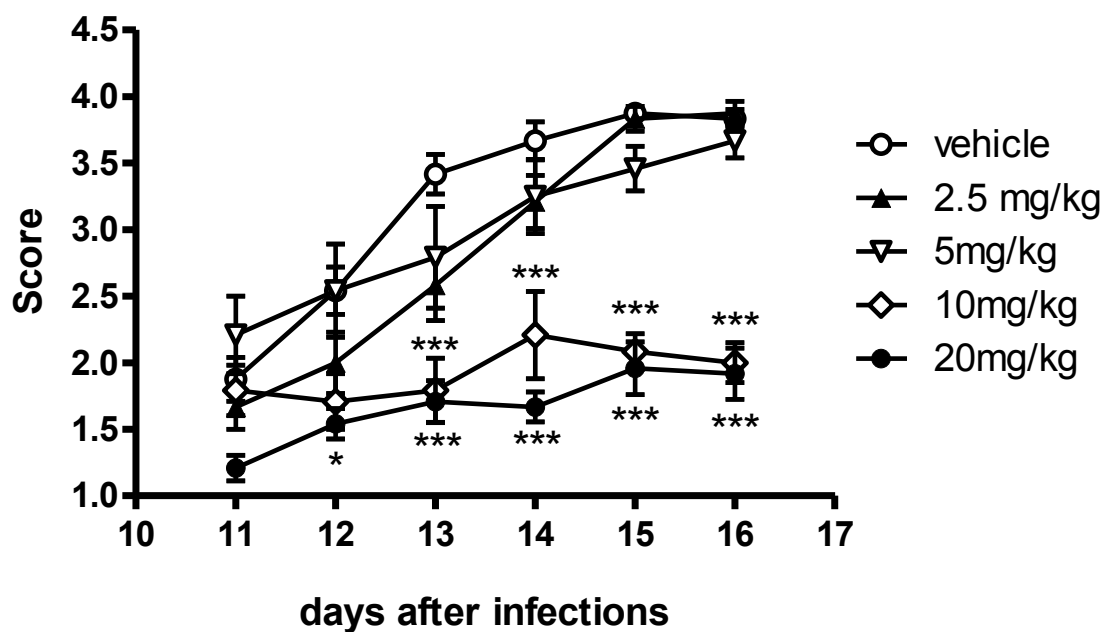


図 25 (a) AS2077715 のモルモット足白癬モデルにおける病変スコア
(感染開始後、7日目からの投与)

***, $P < 0.001$ versus the vehicle-treated group; *, $P < 0.05$ versus the vehicle-treated group

(b) テルビナフィン

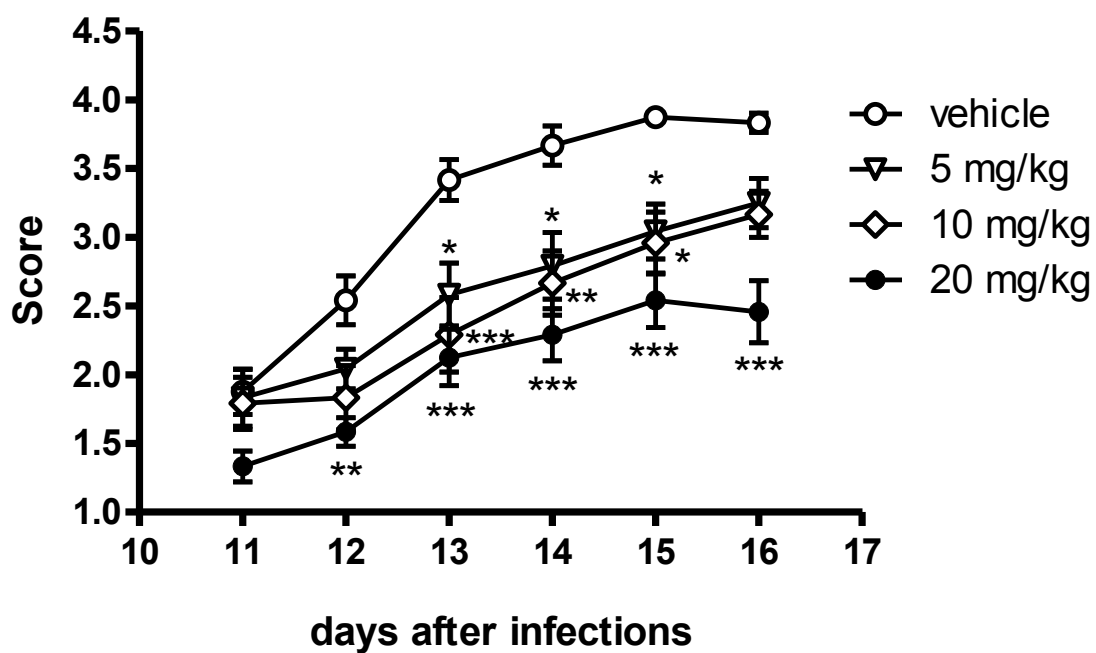


図 25 (b) テルビナフィンのモルモット足白癬モデルにおける病変スコア
(感染開始後、7日目からの投与)

***, $P < 0.001$ versus the vehicle-treated group; **, $P < 0.01$ versus the vehicle-treated group; *, $P < 0.05$ versus the vehicle-treated group

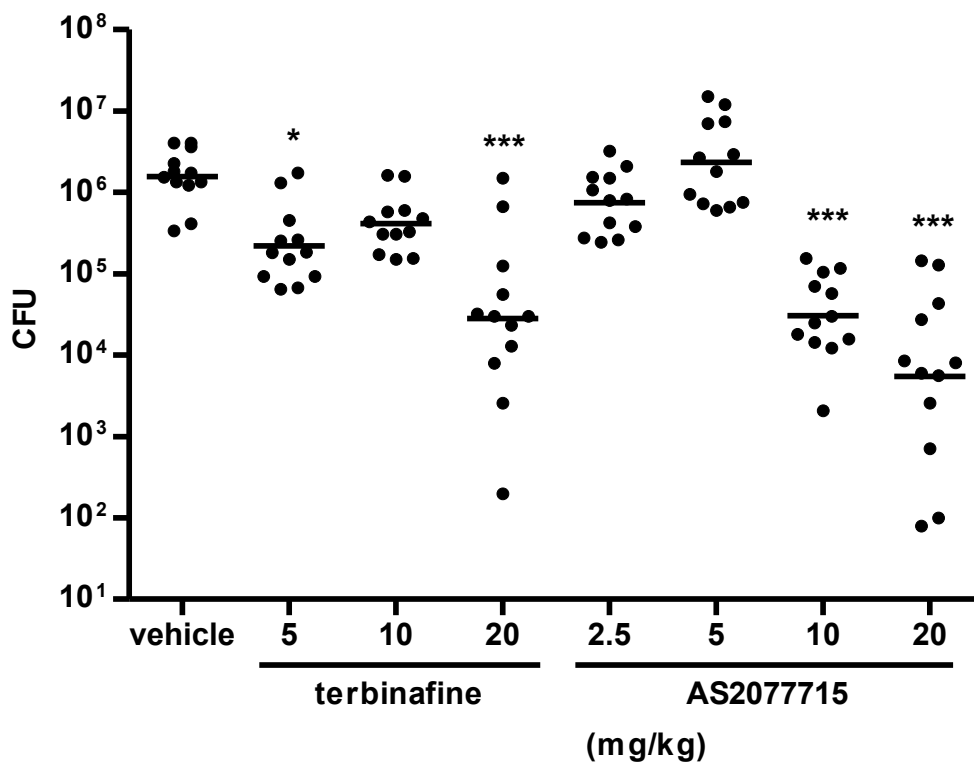


図 26 AS2077715 とテルビナフィンのモルモット足白癬モデルにおける菌減少効果（感染開始後、7日目からの投与）

***, $P < 0.001$ versus the vehicle-treated group; *, $P < 0.05$ versus the vehicle-treated group

Treatment schedule

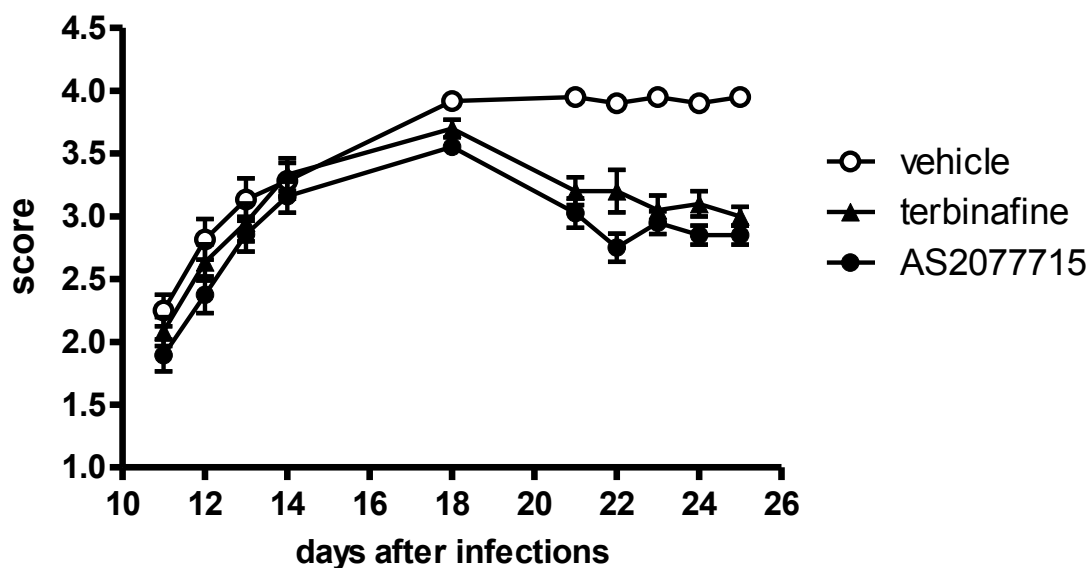
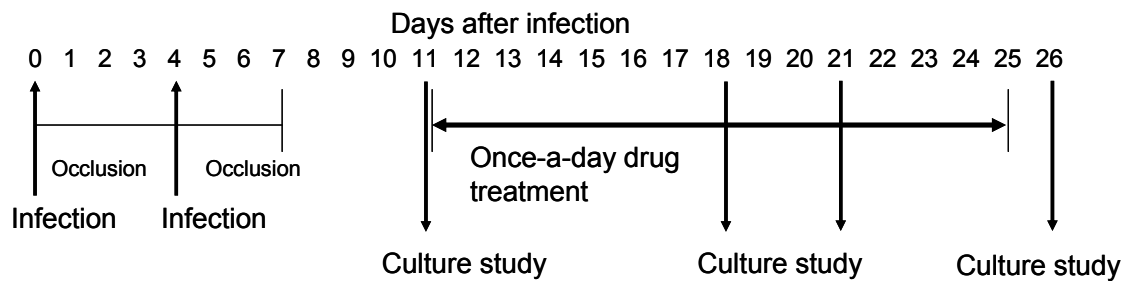


図 27 20 mg/kg/day 投与時の AS2077715 とテルビナフィンのモルモット足白癬モデルにおける病態スコア推移 (感染開始後、11 日目からの投与)

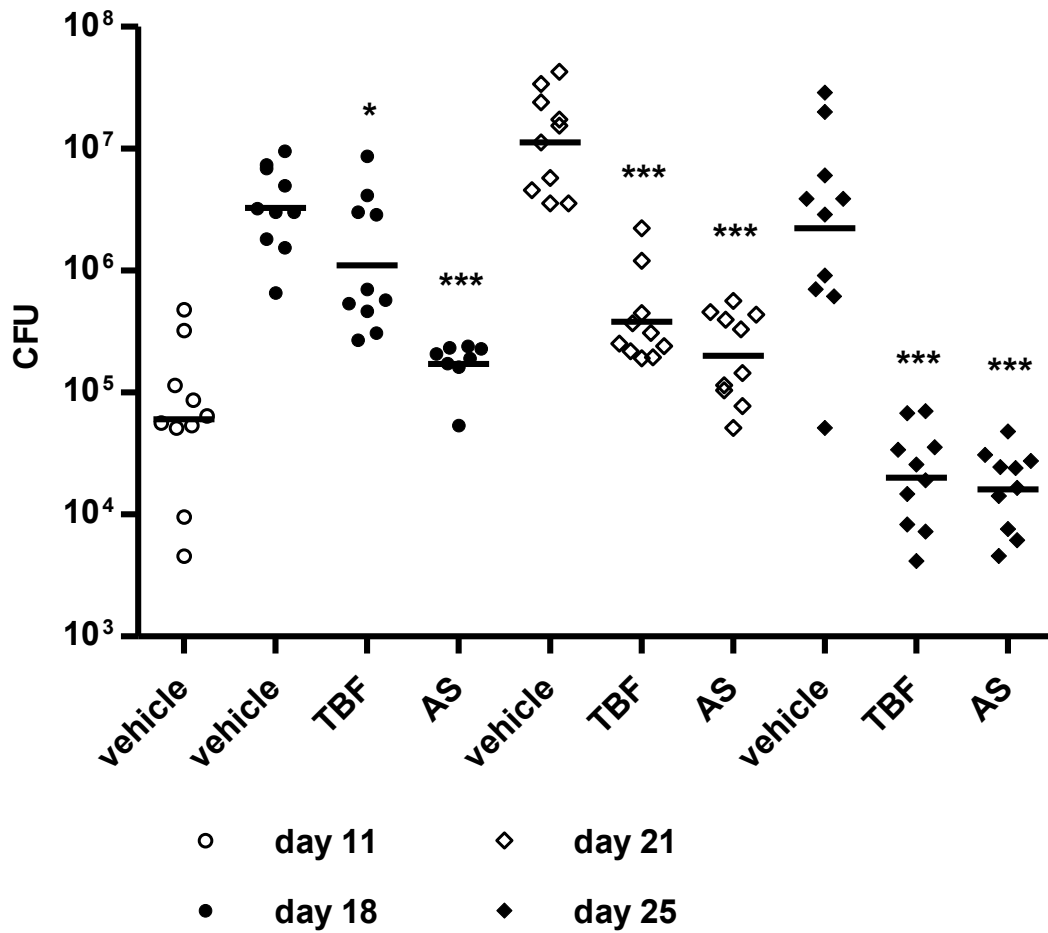


図 28 20 mg/kg/day 投与時の AS2077715(AS)とテルビナフィン(TBF)のモルモット足白癬モデルにおける菌減少効果
(感染開始後、11 日目からの投与)

***, $P < 0.001$ versus the vehicle-treated group; *, $P < 0.05$ versus the vehicle-treated group

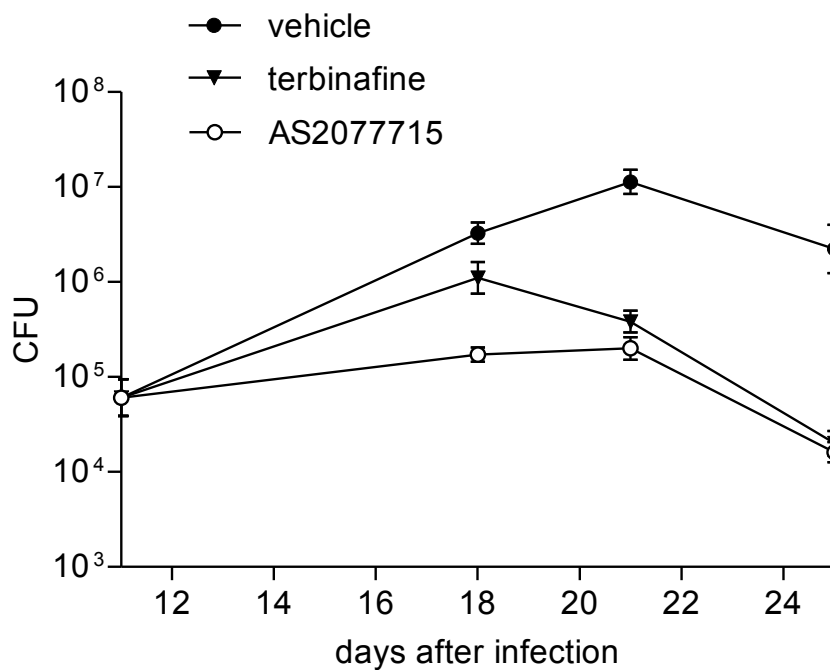


図 29 20 mg/kg/day 投与時の AS2077715 とテルビナフィンのモルモット足白癬モデルにおける菌減少効果（感染開始後、11 日目からの投与）
 図 24 のデータを感染後日数における CFU の変化の形式で表したもの

5.2.8 AS207715 の薬物動態 (PK)

AS207715 とテルビナフィンをモルモットに経口単回投与 (10 mg/kg) したときの血中濃度の推移を図 30 に示す。また、その結果から計算した PK パラメーターと薬力学 (PD) パラメーターを表 15 に示す。AS207715 の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) はテルビナフィンの約 2.7 倍高い値であったが、MIC がテルビナフィンより 8 倍高いため、AUC/MIC 値はテルビナフィンより 3 倍低い値であった。MIC より血中濃度が高く推移した時間 (T>MIC) は、AS207715 が約 4 時間、テルビナフィンが約 6 時間であった。

AS207715 をラットに静脈単回投与 (1 mg/kg)、経口単回投与 (3 mg/kg) したときの血中濃度の推移を図 31 に示す。また、その結果から計算した PK パラメーターを表 16 に示す。AS207715 の経口投与時の生物学的利用能 (バイオアベイラビリティ (F)) は 38.5%と算出された。

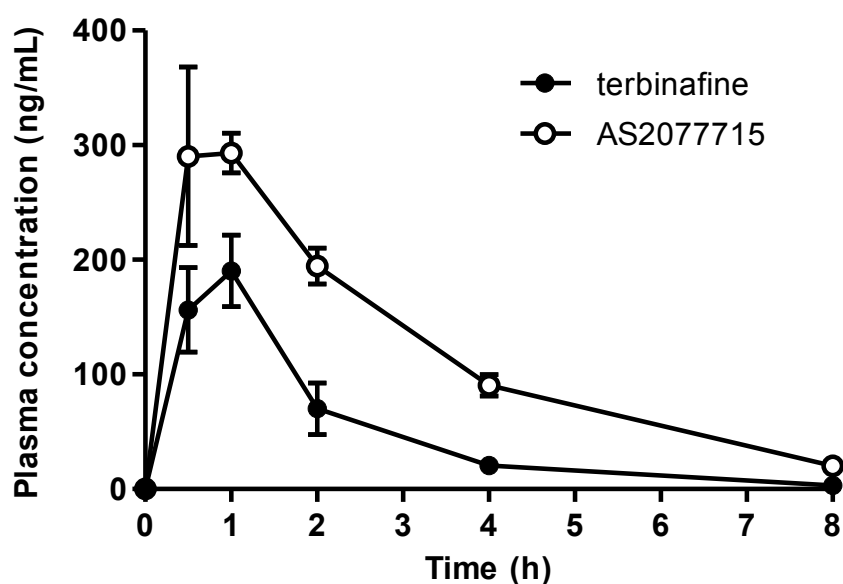


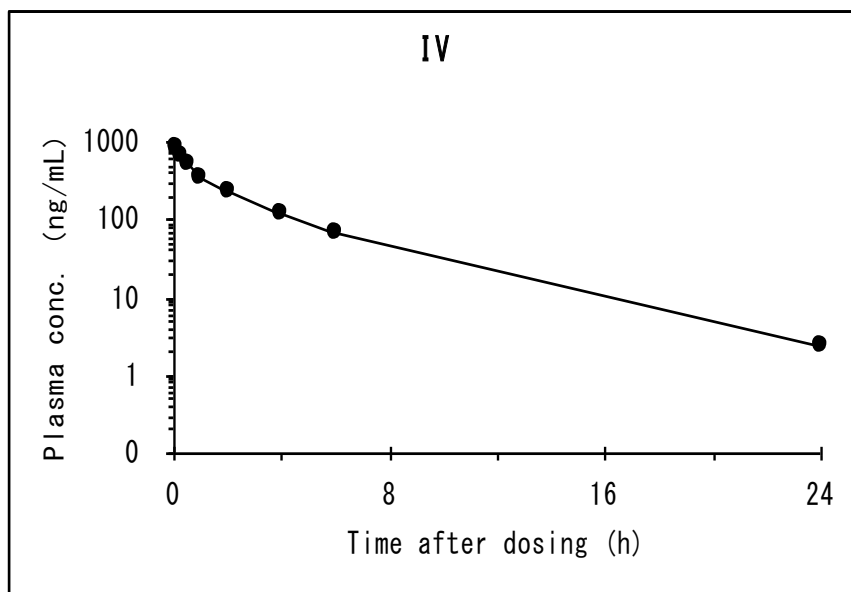
図 30 AS207715 とテルビナフィンをモルモットに経口単回投与（10 mg/kg）時の血中濃度の推移

表 15 AS207715 とテルビナフィンをモルモットに経口単回投与（10 mg/kg）時の PK と PD パラメーター（mean ± SD）

Test substrates	C_{max} (ng mL ⁻¹)	T_{max} (h)	AUC_{0-24h} (ng·hr mL ⁻¹)	MIC (ng mL ⁻¹)	T>MIC (h)	AUC/MIC (ng·hr mL ⁻¹)
AS207715	338 ± 95	0.8 ± 0.3	1141 ± 32	80	around 4	14
terbinafine	194 ± 53	0.8 ± 0.3	423 ± 13	10	around 6	42

C_{max} , maximum concentration; T_{max} , time to C_{max} ; AUC, area under the concentration–time curve from zero up to 24 h; MIC, minimal inhibitory concentration for *T. mentagrophytes* FP2103; T>MIC, time above MIC.

a) 1mg/kg (静脈投与)



b) 3 mg/kg (経口投与)

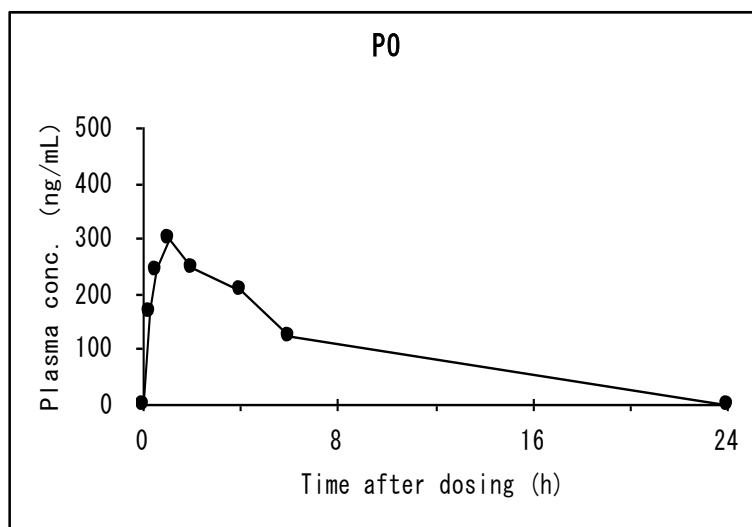


図 31 ラットにおける AS207715 単回投与時の血中濃度の推移

表 16 ラットにおける AS2077715 の PK パラメーター

a) 静脈投与

Dose (mg/kg)	AUC (ng·hr/mL)	C0 (ng/mL)	t1/2, β (hr)	Vdss (L/kg)	CLt (mL/min/kg)
1	2063	976	3.6	1.66	8.1

AUC, area under the curve; C0, initial serum concentration; t1/2, β , half-life at terminal phase; Vdss, volume of distribution at steady state; and CLt, total body clearance

b) 経口投与

Dose (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC (ng·hr/mL)	F (%)
3	310	1.3	2382	38.5

Cmax, maximal plasma concentration; Tmax, time to Cmax; AUC, area under the curve; and F, bioavailability.

5.3 考察

AS2077715 は *in vitro* において、*Trichophyton* 属と *Cryptococcus neoformans* に対して抗菌力を示し、特に *Trichophyton* 属に対して強い抗菌力を示した(表 11)。これら以外の病原真菌に対しては 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で抗真菌活性を示さなかった。AS2077715 と funiculosin の抗真菌活性(スペクトラムと MIC)は、ほぼ同様であったことから、両化合物の側鎖部分の構造差異は抗真菌活性に影響しないことが示された。

AS2077715 と funiculosin は通性嫌気性細菌と好気性細菌に対して、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で生育抑制を示さなかった(表 12)。偏性嫌気性細菌においては、*Prevotella* 属の *P. intermedia*、*P. melaninogenica* に対しては、AS2077715 は 0.10 ~ 0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC で抗細菌活性を示し、Funiculosin はこれらの菌に対して、AS2077715 より少し弱く、0.78 ~ 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC で抗細菌活性を示した(表 13)。この抗細菌活性の差は両化合物の側鎖部分の構造に由来すると考えられる。

ミトコンドリアシトクローム *bc1* 複合体阻害活性を有する funiculosin との構造類似性から、AS2077715 もこの酵素に対する阻害活性を有することが想定されたため、ミトコンドリア画分を用いたシトクローム *c* 還元反応系にて阻害活性を評価したところ、想定通り AS2077715 は funiculosin と同等の IC_{50} 値で *T. mentagrophytes* のシトクローム *bc1* 複合体によるシトクローム *c* 還元反応を阻害した(図 20)。さらに、ミトコンドリア電子伝達系が阻害された結果として *T. mentagrophytes* の ATP 産生が阻害されたことを確認した(図 21)。一方で、哺乳類のシトクローム *bc1* 複合体に対する阻害活性は funiculosin より 14 ~ 250 倍弱く、*Trichophyton* のシトクローム *bc1* 阻害活性より 500 倍以上弱かった(表 14)。この結果は、AS2077715 が *T. mentagrophytes* シトクローム *bc1* 複合体の選択的阻害剤であることを示している。それゆえ、AS2077715 の哺乳類細胞に対する毒性は、funiculosin よりも弱く、*Trichophyton* 属に対する MIC よりも 70 倍

以上弱かった。この抗白癬菌活性と細胞毒性との広い幅により、感染宿主に投与する際の宿主シトクローム *bcl* 阻害による副作用発現用量や最大認容用量が高くなることが期待され、実際、マウス急性毒性試験の結果では、AS2077715 の LD₅₀ は funiculosin より 40~100 倍高かった。スクリーニング系において、細胞毒性活性より 8 倍以上強い抗 *Trichophyton mentagrophytes* 活性を示す微生物培養サンプルを選択したことが、細胞毒性との広い幅を示す、この抗白癬菌物質の発見に繋がったと考えられる。白癬菌以外の真菌のシトクローム *bcl* 複合体に対する阻害活性は評価していないが、funiculosin は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のシトクローム *bcl* に対する阻害活性を有することが知られているため[70]、AS2077715 も同様に他の真菌のシトクローム *bcl* に対する阻害活性を有することが推測される。

Funiculosin はシトクローム *bcl* 複合体を構成するシトクローム *b* のユビキノン還元サイト (Qn サイト) に結合することが知られており[49]、構造類似性から AS2077715 も Qn サイトに結合すると推測される。Qn サイトに結合することが知られている ilicicolin H は、酵母とウシ心臓のシトクローム *bcl* 複合体をそれぞれ 3-5 nM と 200-250 nM の IC₅₀ 値で阻害し、酵母シトクローム *bcl* 複合体に選択性を示す[51]。AS2077715 や ilicicolin H のような真菌選択的シトクローム *bcl* 複合体阻害剤が存在することは、真菌と哺乳類の Qn サイトに構造上の違いがあることを示唆している。表 17 に各種真菌と哺乳類間のシトクローム *b* アミノ酸配列の相同性を示す。ヒトとマウスのアミノ酸配列の相同性は 78% であるが、*T. mentagrophytes* とヒトの相同性は 54% であり、この相同性の差が哺乳類と白癬菌の Qn サイトの構造上の違いに繋がっていると考えられる。

AS2077715 の哺乳類 Qn サイトへの結合を妨げているシトクローム *b* のアミノ酸を同定するためには、*T. mentagrophytes* シトクローム *b* のアミノ酸を哺乳類型に置換することにより耐性を獲得するアミノ酸を網羅的にスクリーニングす

る手法が有効である。また、AS2077715 に対する耐性菌を取得し、シトクローム *b* の変異点を解析する手法も有効である。すでに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の funiculosin 耐性菌のシトクローム *b* アミノ酸変異点が複数報告されており、これらアミノ酸配列も有用な情報である[71-73]。

ニワトリのシトクローム *bc1* 複合体と antimycin の共結晶構造解析データを基に、*T. mentagrophytes* のシトクローム *b* アミノ酸配列を当てはめて *T. mentagrophytes* のシトクローム *bc1* 複合体をモデリングし、AS2077715 とのドッキング解析を行った結果を図 32 に示す。AS2077715 との結合に関わっていると推測されたシトクローム *b* のアミノ酸配列のうち、17 番目のイソロイシンがヒトではフェニルアラニンとなっている。このドッキング解析では、フェニルアラニンに置換しても、結合性の違いは見られず、残念ながら、この化合物の選択性を説明することはできなかった。種選択性の構造学的理解には、シトクローム *bc1* 複合体と AS2077715 の共結晶構造の解析が必要である。

AS2077715 のような真菌選択的シトクローム *bc1* 複合体阻害剤が存在することは、真菌感染症治療薬として使用するに十分な選択性を有する、シトクローム *bc1* 複合体を標的とした新規阻害剤をデザインすることが可能であることを示唆している。

AS2077715 は生育している *T. mentagrophytes* に対して殺菌性を示すのみならず、休眠している胞子に対しても薬剤添加後数時間で殺菌性を示した(図 22a-c)。さらに、殺菌性を発揮するまでの時間はテルビナフィンより短かった(図 22b)。一方で、テルビナフィンは休眠している胞子に対しては、今回試験した濃度では殺菌性を示さなかった(図 22c)。全てのアゾールやテルビナフィン、アモロルフィンの作用機序はエルゴステロール合成阻害である。エルゴステロールは新しい細胞膜が形成されるときに合成されるため、エルゴステロール合成阻害剤は、生育中の菌に対してのみ、その生育阻害活性を発揮する。しかしながら、

白癬菌が感染した爪の爪下部位には通常、エルゴステロール合成阻害剤が殺菌性を示すことができない孢子や生育を休止した菌が存在する。通常、抗真菌剤の MIC は、生育状態の菌に対する生育阻害活性を測定するが、感染した爪白癬菌の排除には、孢子や休眠菌に対する効果も重要であると考えられる。

他のシトクローム *bcl* 阻害剤も AS2077715 と同様に *T. mentagrophytes* に対して短時間で殺菌性を示したことから (図 22d)、この作用は AS2077715 特有の作用ではなく、シトクローム *bcl* 阻害剤に共通の作用であることが示された。この結果は、シトクローム *bcl* 阻害が抗白癬菌剤の有望なターゲットになりうる可能性を示している。

AS2077715 の *T. mentagrophytes* に対する ATP 産生阻害作用を確認し、その効果は細胞内 ATP 量を 95%減少させるものであった (図 21)。培地にグルコースを添加した場合でも ATP 減少効果は 95%であった (データ略) ことから、白癬菌は解糖系による ATP 供給が機能していないことが示唆された。この現象は白癬菌が角質層、毛、爪を構成するケラチン嗜好性の菌であり、グルコース要求性を示さないことから説明される。つまり、白癬菌はほぼすべての ATP 産生を呼吸鎖に依存していることから、呼吸鎖阻害剤は白癬菌のほぼすべてのエネルギー供給を阻害することにより、菌の生育を止めていると考えられる。しかしながら、単なるエネルギー供給阻害のみで、短時間殺菌作用や休眠菌への殺菌作用まで示すとは考えにくく、他の機序の存在が推察される。シトクローム *bcl* 阻害により発生した活性酸素 (ROS) が菌の生育を阻害するとの報告があり [74]、今回示された殺菌性の作用機序の一つである可能性がある。活性酸素を除去する薬剤 (スカベンジャー) の添加が AS2077715 の殺菌作用に及ぼす影響を試験する必要がある。

モルモット体白癬モデルの結果から、AS2077715 は *in vivo* で抗白癬菌活性を示すことが明らかとなった (図 23、24)。最大投与量である 50 mg/kg 投与群の

菌減少効果はテルビナフィンと同等であったが、12.5 mg/kg と 25 mg/kg 投与群ではテルビナフィンより生菌数を減少させた。この結果は、AS2077715の方が最少有効用量が低いことを示している。*in vitro* における抗 *T. mentagrophytes* 活性はテルビナフィンの方が 8 倍強いことから (表 11)、この *in vivo* モデルの結果は意外であった。足白癬モデルの結果と合わせて、後に考察する。

この体白癬モデルにおいて経口投与での有効性を示したことから、AS2077715 は経口吸収性を有していることが明らかとなった。物理化学的性質 (表 9) から、極性が低い物質であることが明らかとなっており、経口吸収性を有することが期待されたが、期待通り経口吸収性を有していた。実際、ラットを用いた薬物動態試験から算出したバイオアベイラビリティは 38.5%(表 16) であり、経口薬として十分な経口吸収性を有していた。

今回の足白癬モデルでは、テルビナフィン治療は 10 mg/kg の投与量では菌の減少効果を示さなかった (図 26)。一方、AS2077715 は 10 mg/kg 以上の投与量で菌の減少効果を示した。以上の結果から、テルビナフィンより AS2077715 の方が、最少有効用量が低いことが示された。また、AS2077715 の方が菌減少効果を示すまでの投与期間が短かった (図 28、29)。モルモットに 10 mg/kg 経口投与した時の AUC は AS2077715 の方がテルビナフィンより 2.7 倍高いが (表 15)、*T. mentagrophytes* FP2103 に対する MIC は AS2077715 の方が 8 倍弱い (表 11) ため、MIC より高い血中濃度で推移した時間 (T>MIC) や AUC に対する MIC の割合 (AUC/MIC) 等の薬力学 (PD) パラメーターはテルビナフィンのほうが優れていた。この結果は、AS2077715 の方が *in vivo* 薬効効果に優れている結果と矛盾している。つまり、血中における T>MIC や AUC/MIC の値は薬効を反映できていないことを示しており、その他のパラメーターの存在が示唆される。おそらく、AS2077715 の *in vitro* における早い殺菌作用が、優れた *in vivo* 薬効に貢献していると考えられる。もしくは、AS2077715 の方が皮膚への移行

性や、皮膚に感染している環境下における MIC に優れている可能性も考えられる。病変スコアの推移 (図 25) を比較すると、AS2077715 は 5 mg/kg と 10 mg/kg 投与量の間にはっきりとした有効用量の境目が見られるのに対し、テルビナフィン投与量は投与用量が上がるに従い、徐々にスコアが改善されている。この結果は、*in vivo* における抗真菌作用様式が異なることを示している。今後、AS2077715 の皮膚における薬物動態 (PK) データや、ケラチンや皮膚で培養した菌に対する MIC や殺菌性データを取得し、テルビナフィンと比較する必要がある。

足白癬モデルにおいて、AS2077715 はテルビナフィンより短い投与期間で生菌数減少効果を示したが、14 日間投与後の CFU 減少効果はテルビナフィンと同等であった (図 28)。この足白癬モデルは炎症を伴う急性モデルであり、症状として痂皮形成 (かさぶた) が認められる。痂皮は足から物理的に隔離されているため経口投与による全身投与では、薬剤が浸透できない可能性があり、この治療期間における治療効果の限界があるのではないかと考えている。つまり、両薬剤ともに 14 日間の投与期間では、このモデルにおける CFU の下限値まで生菌数を減少させたため、薬効の差が見えなくなった可能性がある。

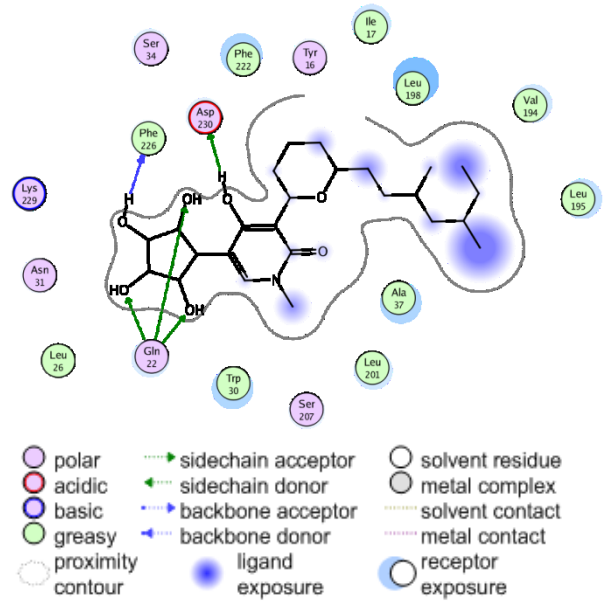
以上の検討から、AS2077715 が *T. mentagrophytes* 感染モデルにおいて優れた治療効果を発揮することを確認した。これらの結果は AS2077715 が *T. mentagrophytes* 感染症治療薬のよいリード化合物であることを示している。この化合物の爪白癬症治療薬への適応可能性を調べるためには、爪感染モデルにおける薬効を評価することが必要である。

表 17 シトクローム *b* アミノ酸配列の相同性

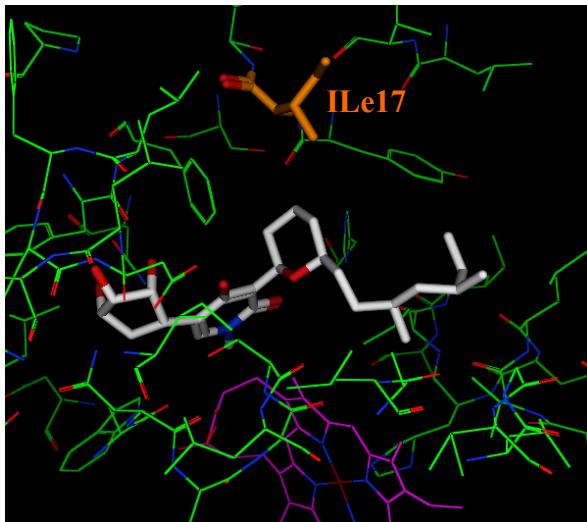
%	<i>A. fumigatus</i>	<i>N. crassa</i>	human	mouse
<i>T. mentagrophytes</i>	79	76	54	53
<i>Aspergillus fumigatus</i>		72	53	56
<i>Neurospora crassa</i>			53	54
human				78

GenBank Accession No.: *T. mentagrophytes* (ACR19586), *A. fumigatus* (AFE02870),
N. crassa (AGG16002), human (ACN37843), mouse (AAB48656)

(1)



(2)



<i>T. mentagrophytes</i>	Ile17
↓	
human	Phe
mouse	Phe
<i>S. cerevisiae</i>	Ile

図 32 Docking study of AS2077715

- (1) stigmatellin-antimycin-Chicken Cytochrome *bc1* 複合体(PDB code : 3BCC)をテンプレートとして、プログラム MOE を用い白癬菌 cytochrome *b* をモデリングし、antimycin が結合する Qn サイトにプログラム GOLD を用い AS2077715 のドッキングを行った結果
- (2) 結合に関わっているアミノ酸の中で *T. mentagrophytes* とヒトの違いは 17 番目のアミノ酸のみ

総括

筆者は、有効性と安全性を兼ね備えた表在性真菌症治療薬を開発することを目的として、微生物代謝産物から抗白癬菌抗生物質の探索研究を行った。

微生物代謝産物からの抗真菌抗生物質の探索は 60 年以上の長い歴史を持つため、新規物質を取得することは困難に思えた。そこで、感度と選択性に焦点を絞り、スクリーニング系を構築した。すなわち、培地検討により、既存の培地より成分濃度を 1/10 にした培地を用いた白癬菌培養条件を設定し、細胞障害活性をカウンター系として、選択的に抗 *Trichophyton mentagrophytes* 活性を示すサンプルを選択した。その結果、カビ、放線菌、バクテリアの培養物約 8 万 5 千検体の微生物代謝産物から、カプノディウム属 (*Capnodium*) の一菌株 (カビ No. 339855 株) の培養物中に新規のポリケチド化合物 AS2077715 を見出した。

AS2077715 を大量に取得し、その生物活性を *in vitro* および *in vivo* の両面で検討した。本物質の抗白癬菌活性は 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と強力であった。*Cryptococcus* 属を除いた他の真菌に対しては 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で抗真菌活性を示さなかった。ミトコンドリアシトクローム *bc1* 複合体の阻害剤である *funiculosin* との構造類似性から、AS2077715 はシトクローム *bc1* 複合体の阻害剤であることが推測されたため、白癬菌や哺乳類のミトコンドリア画分を用いてシトクローム *c* 還元反応系にて評価したところ、予想通り AS2077715 は *funiculosin* と同等の濃度で白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* のシトクローム *bc1* 複合体を阻害した。一方で、哺乳類のシトクローム *bc1* 複合体に対する阻害活性は *funiculosin* の阻害活性より 14~250 倍弱かった。この結果から、AS2077715 が *T. mentagrophytes* シトクローム *bc1* 複合体の選択的阻害剤であることが判明した。それゆえ、AS2077715 の哺乳類細胞に対する増殖抑制活性は、*funiculosin* よりも弱く、*T. mentagrophytes* に対する生育阻害活性より 70 倍以上弱かった。この弱い細胞毒性と関連して、マウスにおける急性毒性は 100 mg/kg と *funiculosin* より 40~100

倍弱かった。この結果から、ヒトに対する無毒性用量が高くなることが予想され、安全性の高い薬剤となりうる可能性が示された。細胞障害活性評価系をカウンタースクリーニング系に設定したことが、選択的抗白癬活性を示す本物質の発見に繋がったと考えられる。

AS2077715 は、*T. mentagrophytes* に対してテルビナフィンより短時間で殺菌性を発揮し、さらに休眠孢子に対しても殺菌性を発揮したことから、優れた殺菌性を有することが明らかとなった。他のシトクローム *bc1* 阻害剤も AS2077715 と同様に短時間で殺菌性を示したことから、優れた殺菌作用はシトクローム *bc1* 阻害剤に共通の作用であることが示唆された。この結果は、シトクローム *bc1* 阻害が抗白癬菌剤の有望なターゲットになりうる可能性を示している。

AS2077715 は、モルモット体白癬モデルにおいて、顕著な生菌数減少効果を示した。この結果から AS2077715 は *in vivo* で抗白癬菌活性を示すことが明らかとなった。菌減少効果はテルビナフィンと同等であったが、最少有効用量はテルビナフィンより低かった。このモデルにて、経口投与での有効性を示したことから、AS2077715 の経口薬として開発可能が示された。

モルモット足白癬モデルにおいて 10 mg/day の経口投与で足皮膚内の生菌数を著しく減少させる効果を示した。また、足白癬発症後の治療効果をテルビナフィンと比較したところ、AS2077715 の方が短い治療期間で生菌数減少効果を示した。薬力学パラメーター ($T > MIC$ 、 AUC/MIC) はテルビナフィンの方が優れていたことから、MIC 値よりも *in vitro* における AS2077715 の優れた殺菌性が *in vivo* 薬効に反映された結果と推察している。

以上の検討から、AS2077715 が *T. mentagrophytes* 感染モデルにおいて優れた治療効果を発揮することを確認した。これらの結果は AS2077715 が白癬菌感染症治療薬のよいリード化合物であることを示している。この化合物の爪白癬症

治療薬への適応可能性を調べるためには、爪感染モデルにおける薬効を評価することが必要である。

参考文献

1. 原田, 敬. (2011). 教育シリーズ Superficial mycosis 爪白癬. *Medical Mycology Journal* 52, 77-95.
2. 渡辺, 晋., 西本, 勝., 浅沼, 廣., 楠, 俊., 東, 禹., 古賀, 哲., and 原田, 昭. (2001). 本邦における足・爪白癬の疫学調査成績. *日本皮膚科学会雑誌* 111, 2101-2112.
3. Watanabe, S., Harada, T., Hiruma, M., Iozumi, K., Katoh, T., Mochizuki, T., and Naka, W. (2010). Epidemiological survey of foot diseases in Japan: results of 30,000 foot checks by dermatologists. *J Dermatol* 37, 397-406.
4. Roseeuw, D. (1999). Achilles foot screening project: preliminary results of patients screened by dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 12 *Suppl* 1, S6-9; discussion S17.
5. Roberts, D.T. (1992). Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey. *Br J Dermatol* 126 *Suppl* 39, 23-27.
6. Ghannoum, M.A., Hajjeh, R.A., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A.K., Summerbell, R., Sullivan, S., Daniel, R., Krusinski, P., Fleckman, P., et al. (2000). A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 43, 641-648.
7. Haneke, E. (1999). Achilles foot-screening project: background, objectives and design. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 12 *Suppl* 1, S2-5; discussion S17.
8. Heikkila, H., and Stubb, S. (1995). The prevalence of onychomycosis in Finland. *Br J Dermatol* 133, 699-703.
9. Noppakun, N. Achilles project in Asia, 6th Asian Dermatological Congress, Nov 11-13, 2001, Bangkok, Thailand.

10. Sei, Y. (2012). [2006 Epidemiological survey of dermatomycoses in Japan]. *Med Mycol J* 53, 185-192.
11. 徳久, 弓. (2006). 【爪真菌症診療マニュアル】 足白癬・爪白癬の疫学. *Derma.*, 1-5.
12. Rich, P. (2000). Onychomycosis and tinea pedis in patients with diabetes. *J Am Acad Dermatol* 43, S130-134.
13. Rich, P., and Hare, A. (1999). Onychomycosis in a special patient population: focus on the diabetic. *Int J Dermatol* 38 *Suppl* 2, 17-19.
14. Elewski, B.E. (1998). Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev* 11, 415-429.
15. 日本医真菌学会疫学調査委員会 (1993). 1991 年次皮膚真菌症疫学調査成績. *日本医真菌学会雑誌* 34, 493-502.
16. 笠井, 達., and 日本医真菌学会疫学調査委員会 (2000). 1996 年次皮膚真菌症疫学調査成績. *日本医真菌学会雑誌* 41, 187-196.
17. 西本, 勝., and 日本医真菌学会疫学調査委員会 (2006). 2002 年次皮膚真菌症疫学調査報告. *日本医真菌学会雑誌* 47, 103-111.
18. 清, 佳., and 日本医真菌学会疫学調査委員会 (2012). 2006 年次皮膚真菌症疫学調査報告. *Medical Mycology Journal* 53, 185-192.
19. Burke, W.A., and Jones, B.E. (1984). A simple stain for rapid office diagnosis of fungus infections of the skin. *Arch Dermatol* 120, 1519-1520.
20. 東, 禹. (2003). パーカーインク KOH 法に替わる方法 クロラゾール真菌染色液. *Visual Dermatology* 2, 506-507.
21. Liu, H.N., Lee, D.D., and Wong, C.K. (1993). KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium. *Dermatology* 187, 166-168.
22. Lubeck, D.P., Patrick, D.L., McNulty, P., Fifer, S.K., and Birnbaum, J. (1993).

- Quality of life of persons with onychomycosis. *Qual Life Res* 2, 341-348.
23. Schein, J.R., Gause, D., Stier, D.M., Lubeck, D.P., Bates, M.M., and Fisk, R. (1997). Onychomycosis. Baseline results of an observational study. *J Am Podiatr Med Assoc* 87, 512-519.
 24. Kaur, I.P., and Kakkar, S. (2010). Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv* 7, 1303-1327.
 25. Oxford, A.E., Raistrick, H., and Simonart, P. (1939). Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, $C(17)H(17)O(6)Cl$, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx. *Biochem J* 33, 240-248.
 26. Roobol, A., Gull, K., and Pogson, C.I. (1976). Inhibition by griseofulvin of microtubule assembly in vitro. *FEBS Lett* 67, 248-251.
 27. Sobue, S., Sekiguchi, K., and Nabeshima, T. (2004). Intracutaneous distributions of fluconazole, itraconazole, and griseofulvin in Guinea pigs and binding to human stratum corneum. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 216-223.
 28. 秋山, 祐. (1998). 【小児の薬】 抗真菌薬 Griseofulvin(GRF). *小児科診療* 61, 94.
 29. 幸野, 健. (2006). エビデンスに基づく足爪白癬治療ガイド. *日本医事新報*, 89.
 30. Ryder, N.S. (1989). The mechanism of action of terbinafine. *Clin Exp Dermatol* 14, 98-100.
 31. 西山, 弥., 浅黄, 友., 平谷, 民., and 他 (1991). 新規アリルアミン系抗真菌剤 Terbinafine の作用 *Trichophyton mentagrophytes* 形態に及ぼす影響の電子顕微鏡的解析. *日本医真菌学会雑誌* 32, 165-175.

32. Petranýi, G., Meingassner, J.G., and Mieth, H. (1987). Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 31, 1365-1368.
33. 平谷, 民., 浅黄, 友., and 山口, 英. (1991). アリルアミン系抗真菌剤 Terbinafine の in vitro 抗菌活性に関する研究. *日本医真菌学会雑誌* 32, 323-332.
34. 内田, 勝., and 山口, 英. (1991). Malassezia 属酵母に対する Terbinafine の in vitro 抗菌活性. *日本医真菌学会雑誌* 32, 343-346.
35. Stütz, A. (1989). Book Review: Sterol Biosynthesis Inhibitors. *Pharmaceutical and Agrochemical Aspects*. (Ellis Horwood Series in Biomedicine). Edited by D. Berg and M. Plempel. *Angewandte Chemie International Edition in English* 28, 449-470.
36. Wenig, J.A. (2004). The systemic treatment of onychomycosis. *Clin Podiatr Med Surg* 21, 579-589, vi.
37. (2013). イトリゾールカプセル 50 添付文書. ヤンセンファーマ株式会社 (第24版).
38. Cleary, J.D., Taylor, J.W., and Chapman, S.W. (1992). Itraconazole in antifungal therapy. *Ann Pharmacother* 26, 502-509.
39. Jain, S., and Sehgal, V.N. (2001). Itraconazole: an effective oral antifungal for onychomycosis. *Int J Dermatol* 40, 1-5.
40. Evans, E.G., and Sigurgeirsson, B. (1999). Double blind, randomised study of continuous terbinafine compared with intermittent itraconazole in treatment of toenail onychomycosis. The LION Study Group. *BMJ* 318, 1031-1035.
41. Jain, S., and Sehgal, V.N. (2003). Itraconazole versus terbinafine in the management of onychomycosis: an overview. *J Dermatolog Treat* 14, 30-42.

42. 渡辺, 晋., 望月, 隆., 五十棲, 健., 加藤, 卓., 清, 佳., 武藤, 正., 仲, 弥., 西本, 勝., 比留間, 政., and 松田, 哲. (2009). 日本皮膚科学会ガイドライン 皮膚真菌症診断・治療ガイドライン. 日本皮膚科学会雑誌 119, 289-300.
43. Singer, M.I., Shapiro, L.E., and Shear, N.H. (1997). Cytochrome P-450 3A: interactions with dermatologic therapies. *J Am Acad Dermatol* 37, 765-771.
44. Hay, R.J. (2001). The future of onychomycosis therapy may involve a combination of approaches. *Br J Dermatol* 145 Suppl 60, 3-8.
45. Piraccini, B.M., Sisti, A., and Tosti, A. (2010). Long-term follow-up of toenail onychomycosis caused by dermatophytes after successful treatment with systemic antifungal agents. *J Am Acad Dermatol* 62, 411-414.
46. Gupta, A.K., Cooper, E.A., and Paquet, M. (2013). Recurrences of dermatophyte toenail onychomycosis during long-term follow-up after successful treatments with mono- and combined therapy of terbinafine and itraconazole. *J Cutan Med Surg* 17, 201-206.
47. Seebacher, C. (2003). Action mechanisms of modern antifungal agents and resulting problems in the management of onychomycosis. *Mycoses* 46, 506-510.
48. Arrese, J.E., and Pierard, G.E. (2003). Treatment failures and relapses in onychomycosis: a stubborn clinical problem. *Dermatology* 207, 255-260.
49. Masuma, R., Shiomi, K., and Ōmura, S. (2009). Helminth Electron Transport Inhibitors Produced by Fungi. In *Physiology and Genetics*, Volume 15, T. Anke and D. Weber, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 247-271.
50. Ando, K., Suzuki, S., Saeki, T., Tamura, G., and Arima, K. (1969). Funiculosin, a new antibiotic. I. Isolation, biological and chemical properties (studies on

- antiviral and antitumor antibiotics. 8). *J Antibiot (Tokyo)* 22, 189-194.
51. Gutierrez-Cirlos, E.B., Merbitz-Zahradnik, T., and Trumpower, B.L. (2004). Inhibition of the yeast cytochrome bc1 complex by ilicicolin H, a novel inhibitor that acts at the Qn site of the bc1 complex. *J Biol Chem* 279, 8708-8714.
 52. Singh, S.B., Liu, W., Li, X., Chen, T., Shafiee, A., Dreikorn, S., Hornak, V., Meinz, M., and Onishi, J.C. (2013). Structure-activity relationship of cytochrome bc1 reductase inhibitor broad spectrum antifungal ilicicolin H. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 3018-3022.
 53. (2008). National Committee for Clinical Laboratory Standards : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard M38-A2. CLSI, Wayne, PA, USA.
 54. Chinworrungsee, M., Kittakoop, P., Isaka, M., Maithip, P., Supothina, S., and Thebtaranonth, Y. (2004). Isolation and structure elucidation of a novel antimalarial macrocyclic polylactone, menisporopsin A, from the fungus *Menisporopsis theobromae*. *J Nat Prod* 67, 689-692.
 55. Kawashima, K., Nakanishi, K., and Nishikawa, H. (1964). Structure of Tauranin and a Note on the "C16-Acids Obtained from Di- and Triterpenoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 12, 796-803.
 56. Sakamoto, K., Tsujii, E., Miyauchi, M., Nakanishi, T., Yamashita, M., Shigematsu, N., Tada, T., Izumi, S., and Okuhara, M. (1993). FR901459, a novel immunosuppressant isolated from *Stachybotrys chartarum* No. 19392. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 46, 1788-1798.

57. Dean, F.M., Robertson, A., Roberts, J.C., and Raper, K.B. (1953). Nidulin and ustilin; two chlorine-containing metabolic products of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 172, 344.
58. Abidi, S.L. (1988). High-performance liquid chromatographic separation of subcomponents of antimycin A. *J Chromatogr* 447, 65-79.
59. Chaudhary, P.M., Tupe, S.G., and Deshpande, M.V. (2013). Chitin synthase inhibitors as antifungal agents. *Mini Rev Med Chem* 13, 222-236.
60. Kornerup, A., Wanscher, J.H., and Pavey, D. (1987). *Methuen handbook of colour*, 3rd ed. / introduced and rev. by Don Pavey Edition, (Hastings House).
61. O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr Genet* 22, 213-220.
62. Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., and Kendrick, B. (2011). *The Genera of Hyphomycetes*, CBS Biodiversity Series 9. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center.
63. Takao, K. (1992). *Illustrated Genera of Plant Pathogenic Fungi in Japan*. Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai Publishing.
64. (2011). *Mycota Iryuda vol. 1*. Mycological volunteer group, Kanagawa Prefectural Museum of Natural History.
65. Nelson, B.D., Walter, P., and Ernster, L. (1977). Funiculosin: an antibiotic with antimycin-like inhibitory properties. *Biochim Biophys Acta* 460, 157-162.
66. Mitsuhashi, S. (1979). 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 27, 559-561.
67. Goto, S. (1981). 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29, 76-79.

68. Miller, J. (1991). Quality control of media, reagents, and strains. In: Balows A et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, 1203-1314.
69. von Jagow, G., and Link, T.A. (1986). Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc1 complex. *Methods Enzymol* 126, 253-271.
70. Rotsaert, F.A., Ding, M.G., and Trumpower, B.L. (2008). Differential efficacy of inhibition of mitochondrial and bacterial cytochrome bc1 complexes by center N inhibitors antimycin, ilicicolin H and funiculosin. *Biochim Biophys Acta* 1777, 211-219.
71. Brasseur, G., and Brivet-Chevillotte, P. (1994). Specificities of the two center N inhibitors of mitochondrial bc1 complex, antimycin and funiculosin: strong involvement of cytochrome b-asparagine-208 in funiculosin binding. *FEBS Lett* 354, 23-29.
72. di Rago, J.P., Perea, J., and Colson, A.M. (1990). Isolation and RNA sequence analysis of cytochrome b mutants resistant to funiculosin, a center i inhibitor of the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 263, 93-98.
73. Brasseur, G., and Brivet-Chevillotte, P. (1995). Characterization of mutations in the mitochondrial cytochrome b gene of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the quinone reductase site (QN). *Eur J Biochem* 230, 1118-1124.
74. Fujita, K., Tani, K., Usuki, Y., Tanaka, T., and Taniguchi, M. (2004). Growth inhibition dependent on reactive oxygen species generated by C9-UK-2A, a derivative of the antifungal antibiotic UK-2A, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antibiot (Tokyo)* 57, 511-517.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、懇切丁寧なご指導をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻微生物学研究室 北本勝ひこ教授に深く感謝致します。

本論文の研究を進めるにあたり、多大なご助言とご指導を賜りました元アステラス製薬株式会社 渡邊正人博士に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始ご協力いただきました元アステラス製薬株式会社 高瀬茂弘博士、アステラス製薬株式会社 村井英継博士、中村郁子研究員、山下みどり研究員、アステラスリサーチサービス株式会社 正木照久研究員に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行する機会を与えてくださり、終始御理解と御激励を賜りました元アステラス製薬株式会社 藤江昭彦博士に深く感謝致します。

2014年 6月 大隅 恵介