

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 大隅恵介

爪に白癬菌（水虫菌）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。多くは足白癬（水虫）を治療せずに放置したために、白癬菌が足の皮膚から爪の中に移行することにより発症する。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おり、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。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90%を占める。

足の爪白癬では人目にさらされるわけではないため、外観的な問題だけで抗真菌内服薬による高額な治療を行う必要はないとの議論もあるが、身体的な障害や患者の QOL 低下の観点から、できるだけ積極的に治療をすべきと考えられている。

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、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内服薬は、グリセオフルビン、アリルアミン系化合物のテルビナフィン、アゾール系化合物のイトラコナゾールの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。

テルビナフィンやイトラコナゾール治療による爪白癬症の治癒率は60~80%にまで達するが、治療数年後の再発率は20%以上と高いことが報告されている。再発の原因の一つとして、これら薬剤が爪に感染している白癬菌を完全に殺菌できていないことが示唆されている。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。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、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。そこで筆者は、新規抗白癬菌物質を探索することを目的として本研究を行った。

本論文では、微生物代謝産物からの抗白癬菌物質のスクリーニングにおいて新規抗白癬抗生物質 AS2077715 を見だし、その生産菌の同定、培養、単離精製、構造解析、生物活性について研究を行った。結果を以下に要約する。

第1章 抗白癬菌抗生物質のスクリーニング

微生物代謝産物から抗白癬菌抗生物質を探索する目的で、白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* FP2103 株の培養条件の検討を行い、糸状菌感受性試験の標準法で用いられる培地よりも生育が良好な培地を設定した。最適化した培養条件を用いた抗白癬菌アッセイと細胞傷害性試験を評価系として、カビ、放線菌、バクテリアの培養物約 8 万 5 千検体をスクリーニングした結果、カビ No.339855 株の培養抽出物中に新規の抗白癬菌抗生物質 AS2077715 を見いだした。

第2章 AS2077715 生産菌の菌学的性質

AS2077715 の生産菌株である 339855 株は、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。分生子形成の形態的特徴や、リボゾーム DNA Large subunit 領域の塩基配列の系統樹解析の結果から、本菌はカプノディウム属 (*Capnodium*) の分岐群に属することが判明し、本菌を *Capnodium* sp. No. 339855 と同定した。

第3章 AS2077715 の培養生産および単離精製

AS2077715 の培養生産を目的に、寒天培養から液体培養への切り替えと培地組成の検討を行い、高い生産量を示す生産用の培地条件を設定した。ジャーファーメンターを用いて培養を行い、その培養液 60L から活性物質をアセトンで抽出し、カラム精製、結晶化により、AS2077715 の白色粉末 17.6g を単離した。

第4章 AS2077715 の物理化学的性質および構造解析

精密質量分析により AS2077715 の分子式を $C_{25}H_{41}NO_7$ と推定し、NMR 解析により AS2077715 の構造を決定した (図 1)。AS2077715 は既知天然物である funiculosin (図 1) と類似の構造を持つ新規天然物であることが判明した。

第5章 AS2077715 の生物学的性質

AS2077715 は白癬菌 *Trichophyton* 属に対し、MIC 値 $0.08 \mu\text{g/ml}$ と、強い抗菌活性を示した。他の病原真菌に対しては、*Cryptococcus neoformans* 以外、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ の濃度で無効であった。この抗真菌スペクトラムは funiculosin と同じであった。AS2077715 は *T. mentagrophytes* のミトコンドリア電子伝達系のシトクローム *bcl* 複合体によるシトクローム *c* 還元反応を 1.4 nM の IC_{50} 値で阻害し、その結果として、*T. mentagrophytes* の ATP 産生を阻害した。*T. mentagrophytes* に対する阻害活性は funiculosin と同等であった。一方で、哺乳類のシトクローム *bcl* 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 *bcl* 阻害活性より 500 倍以上弱かった。この結果は、AS2077715 が *T. mentagrophytes* シトクローム *bcl* 複合体の選択的阻害剤であることが示している。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。さらに、マウス急性毒性試験の結果では、AS2077715 の LD_{50} は funiculosin より 40~100 倍高かった。これらの結果は、AS2077715 が安全性の高い爪白癬剤になりうる可能性を示している。

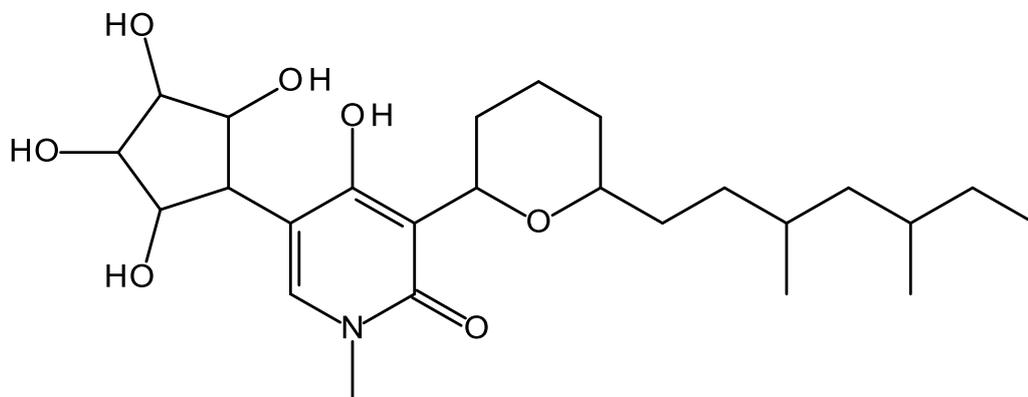
AS2077715 は、*T. mentagrophytes* に対してテルビナフィンより短時間で殺菌性を発揮し、さらに休眠胞子に対しても殺菌性を発揮したことから、優れた殺菌性を有することが明らかとなった。他のシトクローム *bcl* 阻害剤も AS2077715 と同様に短時間で殺菌性を示したことから、優れた殺菌作用はシトクローム *bcl* 阻害剤に共通の作用であることが示唆された。この結果は、シトクローム *bcl* 阻害が抗白癬菌剤の有望なターゲットになりうる可能性を示している。

AS2077715 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。50 mg/kg 投与群における菌減少効果はテルビナフィンと同等であったが、25 mg/kg 以下の投与量ではテルビナフィンより菌減少効果に優れていた。経口投与経路における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。

AS2077715 は、モルモット足白癬モデルにおいて 10 mg/kg/day の経口投与で足皮膚内の生菌数を著しく減少させる治療効果を示した。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 AS2077715 の優れた殺菌性が *in vivo* 薬効に反映された結果と推察される。

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。

(1)



(2)

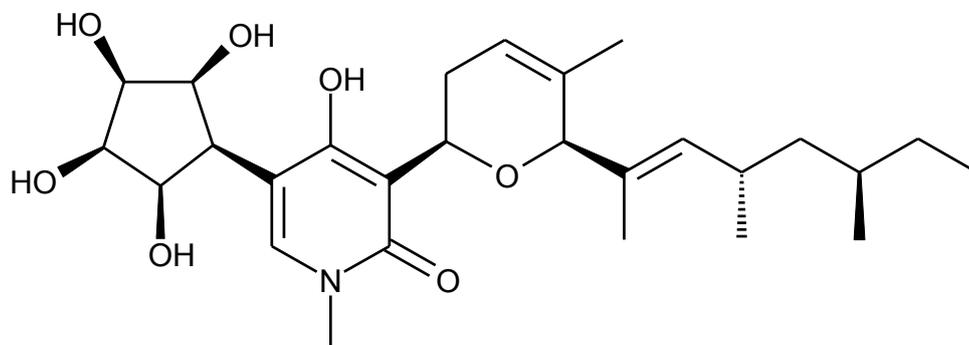


図1 AS2077715 (1)と funiculosin (2) の構造式