岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

抗真菌薬剤 miconazole の活性増強物質に関する化学的研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2008-02-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 福田, 隆志
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/3124

氏　　名（本国籍）	福　田　隆　志　（長野県）
学　位　の　種　類	博士（農学）
学　位　記　番　号	農博乙第 107 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学　位　論　文　題　目	抗真菌薬剤 miconazole の活性増強物質に関する化学的研究
審　査　委　員　会	主査　信州大学　教　授　　廣　田　　満
	副査　静岡大学　教　授　　渡　邉　修　治
	副査　岐阜大学　教　授　　木　曽　　真
	副査　信州大学　助教授　　真　壁　秀　文

論　文　の　内　容　の　要　旨

近年，臓器移植，悪性腫瘍や AIDS など免疫機能が低下した患者での *Candida albicans* や *Aspergillus fumigatus* による深在性真菌症が問題となっている。ところが現在医療に用いられている抗真菌剤の種類は少なく，それに対する耐性菌の存在も問題となっている。このような状況の下，福田論文は，現在汎用されているエルゴステロール生合成阻害剤の一つである アゾール系抗真菌剤である miconazole の抗真菌活性を増強するような新しい化合物の取得を天然物に求めたものである。福田論文は七つの章より構成される。

第Ⅰ章　“緒論”では，現在用いられている抗真菌剤の現状，特に深在性真菌症に対する薬剤の作用機構，耐性菌の問題について述べている。さらにアゾール系抗真菌剤である miconazole に着目し，この抗真菌活性を増強する化合物を探索する意義について詳説している。

第Ⅱ章　“抗真菌薬剤 miconazole の活性増強物質の探索”では，抗真菌剤の miconazole を用い，この抗真菌剤の作用を増強する化合物を探索するためのスクリーニング法について述べている。検定菌として野生株 *Candida albicans* (KF-1) を用い，通常の寒天培地と，菌の生育には影響しない濃度の miconazole (0.06 μM) を加えた寒天培地に評価サンプルをしみ込ませたペーパーディスクを置き，培養後 miconazole を加えた寒天培地のみに阻止円を示すサンプルを miconazole 抗真菌活性の増強作用があると判断している。開発したスクリーニング法を用いて，真菌および放線菌の培養液，合計 13,856 サンプルを調べ，9 菌株に活性を認めた。そのうち未知の活性物質を含む 3 菌株を選択し，以後の研究対象とした。

第Ⅲ章　“新規活性物質の単離および構造決定”では，選択した 3 株について大量培養を行い，溶媒抽出，各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を繰り返し行うことで活性物質の単離を行っている。真菌 *Beauveria* sp. FKI-1366 株の培養液 4 L から beauvericin D (15.9 mg)，E (28.9 mg) および F (6.9 mg)を，真菌 *Penicillium* sp. FKI-1938 株の培養液 5 L からは citridone A (6.4 mg)，B+B' (59.2 mg エピマーとして存在)，および C (11.7 mg)を，さらに放線菌 *Streptomyces* sp. K03-0132 株の培養液 1 L からは phenatic acid A (4.0 mg)および B (4.0 mg)をそれぞれ単離した。得られた化合物の構造は各種機器分析データを解析することで決定した。

第Ⅳ章　“新規活性物質の抗真菌活性増強作用”では，スクリーニングに用いたペーパ

ーディスク法を用い評価を行い，新規化合物が *C. albicans* KF-1 に対し 50 μg/ 8 mm disk の濃度で阻止円を示さず，miconazole 添加培地では 12 ~ 23 mm の阻止円を示すことを明らかにした。活性の強い beauvericin 類および citridone 類については微量液体希釈法で miconazole の IC_{50} 値を比較し，beauvericin 類(1 μg/ml) 存在下では最大 6.1 倍，citridone 類(25 μg/ml)存在下では最大 4.1 倍の miconazole 抗真菌活性増強作用を示すことを明らにした。さらに fluconazole 耐性 *C. albicans* KF-378 に対しても beauvericin 類(1 μg/ml) は miconazole 抗真菌活性を最大で 5.2 倍増強することを明らかにした。

第Ⅴ章 "Miconazole 抗真菌活性増強作用機構の解析 その 1 (蛍光物質 Rhodamine 6G chloride を用いた作用機構の解析)" では，beauvericin E について *C. albicans* KF-1 に対する miconazole の活性増強作用機構を蛍光物質 Rhodamine 6G chloride (Rh6G) を用いて調べた。Beauvericin E (1 ~ 50 μg/ml) 存在下では Rh6G の菌体内への取り込み量は無添加の場合と差が認められなかった。しかし Rh6G の菌体外への排出は beauvericin E (1 μg/ml) 存在下で無添加の場合の 75% に，50 μg/ml 存在下では 43% と濃度依存的に抑制された。このことから beauvericin E は miconazole の菌体外への排出を抑制することで，菌体内の薬剤濃度を上昇させ，その抗真菌活性を増強していることが示唆された。

第Ⅵ章 "Miconazole 抗真菌活性増強作用機構の解析 その 2 (PDR5 欠損株 *Saccharomyces cerevisiae* Δpdr5::leu2(a)を用いた作用機構の解析)" では，*S. cerevisae* の野生株と薬剤排出ポンプである PDR5 を欠損した変異株を用い beauvericin E の miconazole の抗真菌活性増強作用について調べ，野生株では増強活性が認められるのに対し，変異株では増強活性がほとんど認められないことから，beauvericin E の増強活性は薬剤排出ポンプの阻害が主なものであると結論した。

第Ⅶ章 総括 では，本研究の総括をおこない，既存のアゾール系抗真菌薬剤の活性を増強する化合物の探索を行い，将来の薬剤モデルとして，beauvericin 類が有望であると結論した。

審 査 結 果 の 要 旨

近年，臓器移植，悪性腫瘍や AIDS など免疫機能が低下した患者での *Candida albicans* や *Aspergillus fumigatus* による深在性真菌症が問題となっている。福田論文は，現在抗真菌剤として汎用されているエルゴステロール生合成阻害剤の一つである miconazole の抗真菌活性を賦活化するような新しい化合物の取得を天然物に求めたものである。その内容は以下に要約できる。

1. 検定菌として野生株 *Candida albicans* (KF-1) を用い，抗真菌剤 miconazole と共存することによってのみ阻止円を示す微生物代謝物を検索した。

2. 1 万以上のサンプルをスクリーニングし，その中から強い活性を示す菌として 3 株を選択している。この 3 株については大量培養を行い，溶媒抽出，各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を繰り返し行うことで 9 種の新規活性物質の単離に成功した。

3. 機器分析ならびに化学反応，X 線構造解析などの分析手法を駆使することにより，これら新規化合物の構造を明らかにしている。

4. これら新規化合物の miconazole 活性増強作用を測定している。液体希釈法で miconazole の IC_{50} 値を比較し、beauvericin 類 (1 μg/ml) 存在下では最大 6.1 倍、citridone 類 (25μg/ml) 存在下では最大 4.1 倍の miconazole 抗真菌活性増強作用を示すことを見だした。

5. さらに beauvericin E を用い，*C. albicans* KF-1 に対する miconazole 活性増強の作用機構について考察をおこなっている。Beauvericin E (1 ~ 50 μg/ml) 存在下での蛍光物質 Rhodamine 6G chloride (Rh6G)の取り込み量，排出量を調べ，Rh6G の菌体内への取り込み量は無添加の場合と差が認められないが，Rh6G の菌体外への排出を濃度依存的に抑制することを見いだした。

以上のように本論文は既存のアゾール系抗真菌剤 miconazole の活性を増強する化合物の探索を行い，微生物培養液より計 9 成分の新規活性物質を見いだし，その作用機構についても考察をおこなったものである。その構造解析は適確であり，作用機構についても十分な考察を行なっている。今後これらの化合物のなかから，薬のモデルが生まれることが期待できる。

以上について，審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1) 論文題目：New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366　I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties

発表雑誌：THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS (日本抗生物質学術協議会誌), **57** (2), 110 ~ 116, (2004).

年号：2004 年.

著者：FUKUDA, Takashi, ARAI, Masayoshi, YAMAGUCHI, Yuichi, MASUMA, Rokurou, TOMODA, Hiroshi, OMURA, Satoshi.

2) 論文題目：New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366　II. Structure elucidation.

発表雑誌：THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS（日本抗生物質学術協議会誌）, **57** (2), 117 ~ 124, (2004)

年号：2004 年

著者：FUKUDA, Takashi, ARAI, Masayoshi, TOMODA, Hiroshi, OMURA, Satoshi,

3) 論文題目：Phenatic acids A and B, new potentiators of antifungal miconazole activity produced by *Streptomyces* sp. K03-0132.,

発表雑誌：THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS（日本抗生物質学術協議会誌）, **58** (4), 252 ~ 259, (2005).

年号：2005 年.

著者：FUKUDA, Takashi,　MATSUMOTO, Atsuko, TAKAHASHI, Yoko, TOMODA, Hiroshi, OMURA, Satoshi.

4) 論文題目：Citridones, new potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Penicillium* sp. FKI-1938　I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties

発表雑誌：THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS (日本抗生物質学術協議会誌), **58** (5), 309 ~ 314, (2005).

年号：2005.年

著者：FUKUDA, Takashi, YAMAGUCHI, Yuichi, MASUMA, Rokurou, TOMODA, Hiroshi, OMURA, Satoshi.

5) 論文題目：Citridones, new potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Penicillium* sp. FKI-1938 II. Structure elucidation

発表雑誌：THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS（日本抗生物質学術協議会誌）, **58** (5), 315 ~ 321, (2005).

年号：2005 年.

著者：FUKUDA, Takashi, TOMODA, Hiroshi, OMURA, Satoshi

既発表学術論文

1) 論文題目：Ornatipolide, a novel phenolic metabolite from the basidiomycete, *Boletus ornatipes*.,

発表雑誌：Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry（日本農芸化学会誌）, **62** (7), 1432 ~ 1434, (1998).

年号：1998 年.

著者：SHIBATA, Hisao, FUKUDA, Takashi, WADA, Tomonari, MORITA, Yasufumi, HASHIMOTO, Toshihiro, ASAKAWA, Yoshinori,

2) 論文題目：Takanawaenes, novel antifungal antibiotics produced by *Streptomyces* sp. K99-5278 I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties

発表雑誌：THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS（日本抗生物質学術協議会誌）, **56** (5), 448 ~ 453, (2003).

年号：2003 年

著者：KIM, Yongpil, TOMODA, Hiroshi, IIZIMA, Kousuke, FUKUDA, Takashi, MATSUMOTO, Atsuko, TAKAHASHI, Yoko, OMURA, Satoshi,

3). 論文題目：Takanawaenes, novel antifungal antibiotics produced by *Streptomyces* sp. K99-5278 II. Structure elucidation

発表雑誌：THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS（日本抗生物質学術協議会誌）, **56** (5), 454 ~ 458, (2003).

年号：2003 年

著者：FUKUDA, Takashi, KIM, Yongpil, IIZIMA, Kousuke, TOMODA, Hiroshi, OMURA, Satoshi