

総 説

微生物資源からの新規抗生物質のスクリーニング

— 簡易的な *in vivo* 様評価系：カイコ感染症モデルを利用して —

内田 龍児

Drug Screening for New Antibiotics of Microbial Origin in an *in vivo*-Mimic Infection Assay Using Silkworm Larvae

Ryuji UCHIDA

Department of Natural Product Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku Medical and Pharmaceutical University.

(Received November 20, 2017)

In the process of new antibiotic developments, many drug candidates from *in vitro* assay systems often have no therapeutic effects in *in vivo* animal models using mammal. To overcome this problem, we established an *in vivo*-mimic infection assay using silkworm larvae as a host animal, and started to apply this assay to the primary screening for new antibiotics of microbial origin. Comparing with an *in vitro* assay using paper disk method, the hit rate of candidate culture broths showing a therapeutic effect in silkworm infection assay markedly decreased, but isolated compounds have included some clinical drugs and their related compounds. Furthermore, we discovered new anti-MRSA antibiotics, designated nosokomyocins A to D, from the culture broth of *Streptomyces cyslabdanicas* K04-0144, and demonstrated that nosokomyocin A also showed a good therapeutic effect in an *in vivo* mouse infection assay as well as silkworm infection assay. Thus, we predicted that candidate compounds discovered by silkworm infection assay would have higher potential as antibiotic leads.

Key words — silkworm infection assay, antibiotic, microbial origin, therapeutic effect, *in vivo*-mimic

1. はじめに

1928年にフレミング博士によって糸状菌 *Penicillium notatum* の培養液中から世界初の抗生物質ペニシリンが発見されてから、 β -ラクタム薬、アミノ配糖体系薬、マクロライド系薬、テトラサイクリン系薬、ニューキノロン系薬、グリコペプチド系薬など、人類は様々なタイプの抗生物質を創出し、感染症から多くの人の命を救ってきた。しかし、抗生物質の乱用により生じたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) などの薬剤耐性菌の出現、過去に見られなかったエボラ出血熱や鳥インフルエンザなどの新興感染症、一度は封じ込まれたと考えられていた結核を代表とする再興感染症、さらに渡航者が知らずに本国へ持ち帰るマラリアやデング熱などの輸入感染症など、いまだ感染症は脅威である。しかし、感染症は世界で上位の死因となっているにもかかわらず、大手製薬企業による感染症治療薬の開発は年々減少傾向に

ある。このことは現在臨床で使用中の抗生物質が、耐性菌の出現などにより効果を示さなくなった場合、対応できる抗生物質の枯渇を意味している。¹⁾ したがって、この問題を解決するためには新しい抗生物質の開発が必要であり、社会の重要な要請でもある。

これまでの抗生物質のスクリーニングでは、ペーパーディスク法や微量液体希釈法などのバイオアッセイや、核酸、タンパク質、細胞膜や細胞壁などの微生物の生育に必須な生合成経路を標的とした *in vitro* 評価系が用いられてきた。このような *in vitro* 評価系は、多検体を短時間で評価できることから、スクリーニングの必要条件を備えた有効な手段の一つである。しかし、多く微生物が従属栄養性であり、栄養豊富で好氣的な *in vitro* での生育条件が、宿主への感染あるいは宿主内の増殖に必要な栄養、温度、pHなどの生育条件と大きく異なる場合がある。また、微生物の中には、培地中と宿主内とで増殖に必要な遺伝子の発現が異なるものも存在する。²⁾ さらに、*in vitro* 評価系で優れた活性と選択性を示すとしてスクリーニングを通過

した化合物が、動物モデルを用いた *in vivo* 評価系において、その体内動態の悪さや毒性の影響により、薬剤開発の対象から外れるケースも少なくない。したがって、このような *in vitro* 評価系と *in vivo* 評価系で生じる効果の差（ギャップ）をいかに小さくするかがスクリーニングにおける課題として挙げられる。

これらのギャップを埋める一つの手段として、線虫、昆虫、魚類など哺乳動物以外の代替生物を利用した簡易的な *in vivo* 様の感染評価系の報告がある。^{3,5)} ハードルは高いが、*in vivo* 評価系をスクリーニング時に導入できれば、生体内で治療効果を示す可能性の高い化合物の選択率が格段に上がることが予想される。そこで、著者らは関水・浜本らが構築した、カイコを哺乳動物の代替生物として用いた感染評価系（以下、カイコ評価系と略す）を、^{5,9)} 抗生物質のリードの開拓のためにスクリーニング初期段階で利用することにした。本稿では、まず、微生物資源からのスクリーニングを通して明らかになったカイコ評価系の有効性について考察し、次いで、本評価系の導入により発見につながった新規抗 MRSA 物質ノソコマイシン類について、さらに結核症対策を目的とした抗酸菌感染評価系の構築について概説する。

2. 感染症モデル生物としてのカイコの可能性

カイコ (Fig. 1) は哺乳動物とはかけ離れた無脊椎動物、しかも昆虫である。そのため、哺乳動物の代わりに利用することに違和感を感じるかもしれない。そこでまず、カイコに抗生物質の治療効果や吸収・代謝などが哺乳動物と共通する部分があり、感染症のモデル生物としての可能性を示した関水・浜本らの実験結果を紹介する。^{6,7)} 5 齢虫のカイコに黄色ブドウ球菌を接種し感染させると実

際に死に至る。そこで、このカイコ感染評価系を用いて、現在臨床で使用されている様々なタイプの抗生物質の治療効果をマウスのそれと比較した。その結果、各抗生物質の 50% 有効濃度 (ED₅₀ 値) は、両者間でほとんど差がないことが明らかになり (Table 1)、カイコが抗生物質の *in vivo* での評価において哺乳動物の代わりに利用できる可能性が初めて示された。

また、カイコをスクリーニングに用いた場合に考えられる利点として、①哺乳動物の利用により生じる倫理的問題が解消できる、②個体がマウスと比べて小さく (約 2 g) のため少量で多数のサンプルを評価できる、③経口、血中や腸管など投与方法の使い分けができる、④ほとんど動かないのでハンドリングが容易である、⑤自然免疫のみのため日和見感染的な症状を観察できる、⑥サンプルの体内動態 (安定性) や毒性も同時に評価できるなどが挙げられる。さらに日本には養蚕業の長い歴史があり、カイコの飼育方法や遺伝系統が確立されていることから、安定した蚕種卵の入手も可能である。そこで著者らはまず、抗菌薬と比較して薬剤の絶対数が少ない真菌 (*Candida*



Fig. 1. Silkworm larva (*Bonbix mori*; 5th-instar larva).

Table 1. MIC and ED₅₀ values of various antibiotics in clinical use against *Staphylococcus aureus*.

Antibiotic		ED ₅₀		MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Type	Name	Silkworm ($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{larva}$)	Mic ($\mu\text{g}/\text{g}$)	
Oxacephem	Flomoxef	0.2	0.3	0.4
Tetracycline	Minocycline	4.0	1.0	0.4
Glycopeptide	Teichoplanine	0.3	0.1	0.5
	Vancomycin	0.3	1.0	1.0
Oxazolidine	Linezolid	9.0	4.0	4.0

(Ref. 5 and 6)

albicans) と、院内感染の起因菌として社会的な問題であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に焦点を当て、カイコ評価系を利用した感染症治療薬の探索に着手した。

3. *Candida albicans* および MRSA のカイコ評価系の構築

関水・浜本らの方法を参考に、まず病原真菌 *C. albicans* の感染評価系の構築を行った。⁵⁶⁾ 臨床分離株 *C. albicans* TIMM1768 株を試験菌とし、これをサブロー培地で 27 °C で 24 時間液体培養した菌液を、 $1 \times 10^6 \sim 10^8$ cells/ml の範囲で 6 段階の菌数に調製した。これらの菌液 (50 μ L) を哺乳類の血管に相当するカイコの背脈管に接種し (Fig. 2), 27 °C のインキュベーター中で 1 週間経過を観察した。その結果、コントロールとしてサブロー培地のみを接種したカイコは全て生存したのに対し (Fig. 3A), 菌液を接種したカイコは菌数依存的かつ経時的に黒化して死んだ (Fig. 3B および 4)。なお、オートクレーブ処理した菌液を接種したカイコは生存することから、*C. albicans* の感染による死であることが裏付けられた。これらの結果をもとに、スクリーニングでは試験サンプルが示す毒性も同時に評価するため、菌液接種後約 3 日後に全てのカイコが感染死する菌数 1×10^6 cells/ml を設定した (Fig. 4)。つまり、この設定時間より早く死ぬカイコは、試験サンプルの毒性が原因である可能性と推察できる。

次に構築したカイコ評価系で、臨床薬のアゾール系抗真菌薬ミコナゾールとフルコナゾールの治療効果を確認し、同時に、*in vitro* の抗真菌活性と

してペーパーディスク法を用い、両者の活性を比較した。¹⁰⁾ 一般にミコナゾールとフルコナゾールの抗真菌活性は、*in vitro* と *in vivo* で効果が逆転することが知られている。ペーパーディスク法ではミコナゾールとフルコナゾールの阻止円径の差はほとんどなかったが、ミコナゾールの方が鮮明な阻止円を示していた (Fig. 5A)。一方、カイコ評価系では、最終投与量 0.005~50 μ g/カイコのミコナゾールとフルコナゾールを投与すると、それぞれ 5 μ g/カイコ、および 0.5 μ g/カイコの濃度で全てのカイコが生存した (Fig. 5C)。つまり、フルコナゾールはミコナゾールの 1/10 の濃度で同程度の治療効果を示したことになり、*in vitro* と *in vivo* の効果の逆転をカイコ評価系で再現した。また、フルコナゾール耐性株 *C. albicans* KF 378 株に対しても同様の試験を行った結果、フルコナゾールはペーパーディスク法で全く阻止円を示さず、ミコ



Fig. 2. Inoculation method (intravenous injection). Sample or bacterial/fungal suspension was injected into hemolymph of silkworm larva. (Ref. 10)



A: No infection



B: Infection

Fig. 3. Infection experiment using silkworm larva. (A) No infection larvae. (B) Infected larvae with *Candida albicans*. A suspension of the *C. albicans* TIMM1778 strain (1×10^6 cells/ml) was injected into the silkworm hemolymph. Infected silkworms were incubated at 27 °C for 3 days. (Ref. 10)

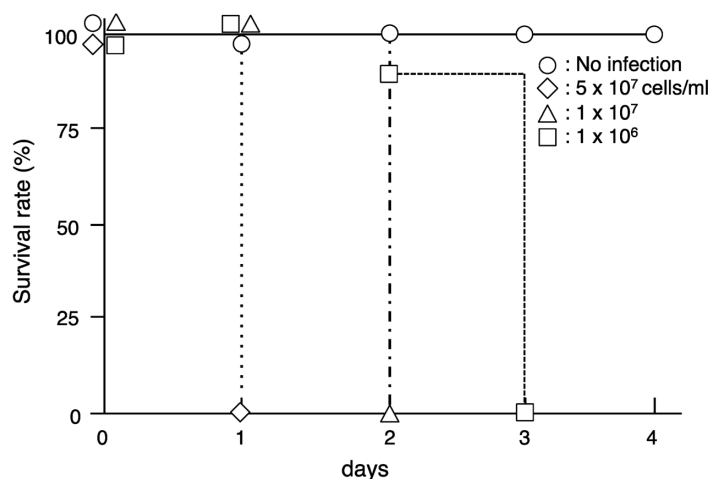


Fig. 4. Silkworm killing ability of *Candida albicans*. A suspension of the *C. albicans* TIMM1768 strain was diluted to the indicated cell number and injected into the silkworm hemolymph. Infected silkworms were incubated at 27 °C. The number of surviving silkworms was counted 3 days after the injection. ◇: 5×10^7 , △: 1×10^7 , □: 1×10^6 , and ○: 0 cells/ml. Experiments were performed three times and reproducible data were observed. (Ref. 10)

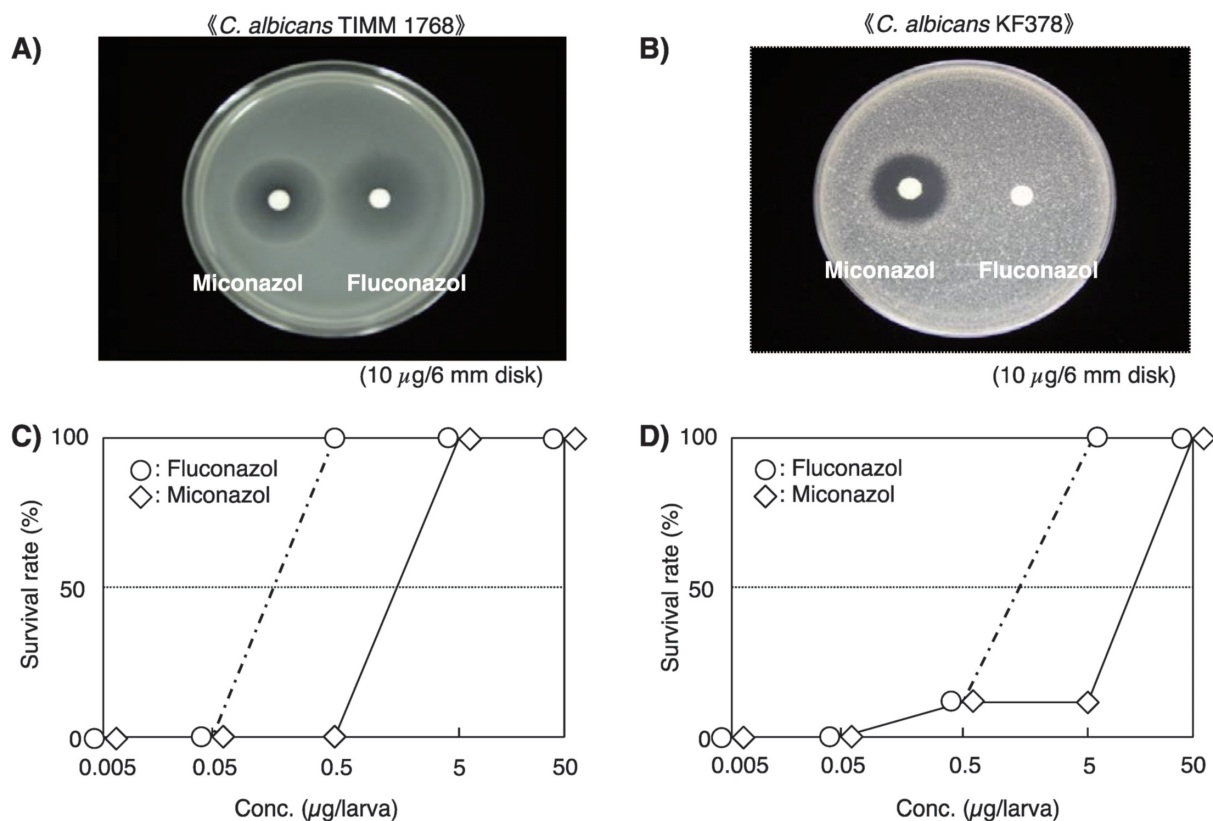


Fig. 5. Antifungal activities of miconazol and fluconazole against *C. albicans* TIMM1768 (fluconazole-sensitive strain) and KF378 (fluconazole resistant-strain). Inhibitory activities in the paper disk method against TIMM1768 strain (A) and KF378 strain (B). Therapeutic effects of Miconazol (◇) and fluconazole (○) in the silkworm infection assay with TIMM1768 strain (C) and KF378 strain (D). (Ref. 10)

ナゾールでは阻止円径の縮小が確認された (Fig. 5B). 一方, カイコ評価系では, ミコナゾールおよびフルコナゾールはそれぞれ 50 μg/カイコおよび 5 μg/カイコの投与量で治療効果を示し, 感受性株と比較し薬剤感受性が 10 倍低下したものの, 同様

に *in vitro* と *in vivo* の効果の逆転が認められた (Fig. 5D). これらの結果から, カイコ評価系を実際のスクリーニングに応用した場合, ペーパーディスク法などの *in vitro* 評価系では活性を示さないが, 生体内で何らかの代謝を受けることで活性を発

現するプロドラッグ様の化合物が選択される可能性も期待できる。

MRSA を試験菌としたカイコ評価系についても同様に構築した。敗血症患者より分離された MRSA K-24 株 (2.5×10^8 CFU/カイコ/50 μ l) をカイコに接種した場合に 90%以上のカイコが3日目に黒化して感染死する条件下で、バンコマイシンを最終投与量 (1~50 μ g/カイコ) で投与した結果、濃度依存的に治療効果を示すことを確認し、スクリーニングに用いた。

4. 微生物資源からの抗 *C. albicans* および抗 MRSA 化合物のスクリーニング

4-1. 微生物資源からのスクリーニング

微生物が生産する化合物は、多種多様な構造と興味深い生物活性を示すことから、古くから医薬品の探索源としてスクリーニングに利用されてきた。著者らは、この微生物資源のうち真菌と放線菌の培養液を、構築した *C. albicans* および MRSA の各カイコ評価系に供しスクリーニングを実施した。カイコ評価系とペーパーディスク法の各評価方法の選択率を比較した結果を Table 2 に示した。^{10,11)} *C. albicans* および MRSA の各スクリーニング系で、それぞれ 19,433 および 5,340 の培養液サンプルを評価した結果、ペーパーディスク法では *C. albicans* に対して 654 サンプル (全体の 3.5%)、MRSA では 327 サンプル (6.1%) がそれぞれ活性を示した。しかし、

カイコ評価系ではその選択率はペーパーディスク法と比べ激減し、*C. albicans* ではわずか 29 サンプル (0.14%)、MRSA においても 21 サンプル (0.40%) のみが治療効果を示した。したがって、ペーパーディスク法で選択されたサンプルの9割以上が治療効果を示さなかったことになり、ペーパーディスク法で選択されたサンプルの中には、生体内で活性を示さない偽活性のものが多く含まれていたと推察される。また、抗 *C. albicans* 化合物のスクリーニングでは、ペーパーディスク法で活性が認められた約半数のサンプルは、カイコ評価系では毒性が強く候補としては不適であると判断された。このように、治療効果を示さない偽活性サンプルをスクリーニングの初期にのぞけたことは、カイコ評価系が効率良く候補サンプルを選別できる有効な手段であることを示している。

4-2. 微生物資源から単離した治療効果を示す化合物

カイコ評価系で選択された培養液の中からは、実際に治療効果を示す化合物が単離された。まず、*C. albicans* に対するスクリーニングから単離された化合物を Fig. 6 に示す。^{10,11)} スクリーニングに着手して早々、ポリエン系抗真菌薬アムホテリシン B やリポペプチド系抗真菌薬ミカファンギンの前駆化合物であるエキノキャンディン関連化合物が単離された。また、マウスを用いた感染実験で治療効果が報告されているペプチド化合物 SCH643432

Table 2. Screening results of anti-*C. albicans* (A) and anti-MRSA (B) antibiotic on silkworm infection method and paper disk method.

(A) Anti- <i>C. albicans</i>			
Culture brot			
Type	Number	Silkworm method	Paper disk method
Actinomyces	7,116	4	290
Fungus	12,317	25	364
Total	19,433	29	654
Selectivity	(100%)	(0.14%)	(3.3%)

(B) Anti-MRSA			
Culture brot			
Type	Number	Silkworm method	Paper disk method
Actinomyces	2,940	15	184
Fungus	2,400	6	143
Total	5,340	21	327
Selectivity	(100%)	(0.4%)	(6.1%)

(Ref. 10 and 11)

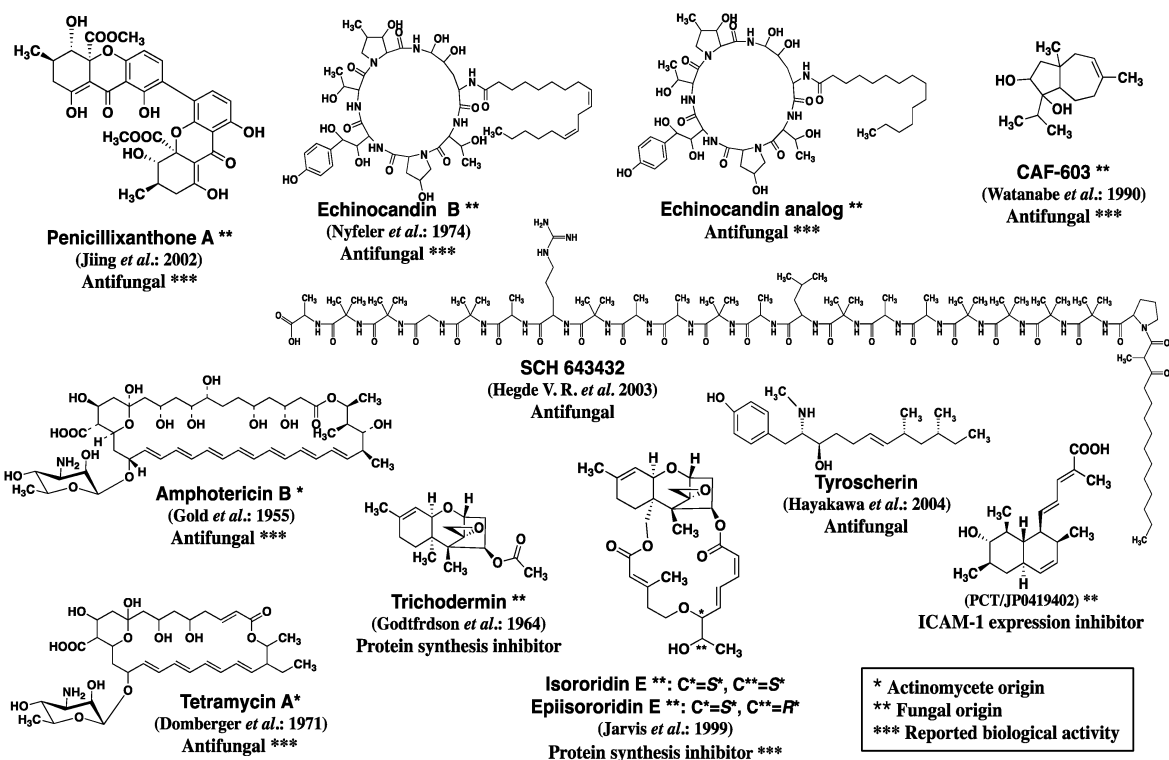


Fig. 6. Antifungal compounds obtained from a silkworm infection screen. (Ref. 10, 11)

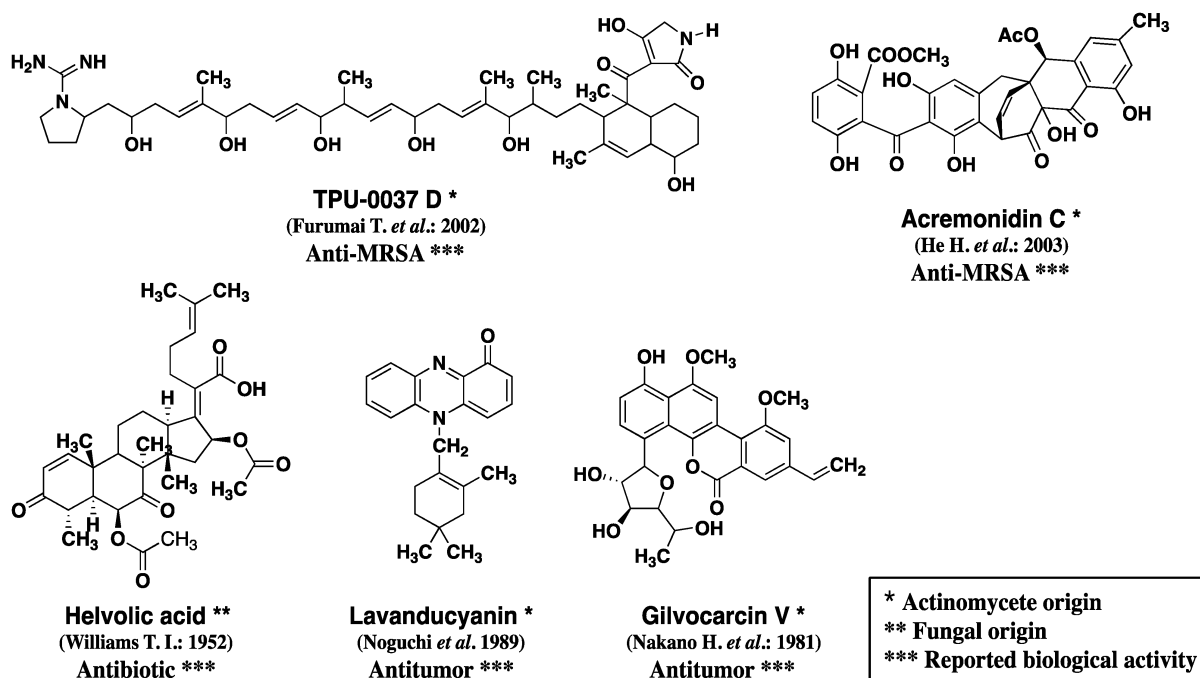


Fig. 7. Anti-MRSA compounds obtained from a silkworm infection screen. (Ref. 10)

も単離された。残念ながら新規化合物の発見には至っていないが、臨床薬として応用されている化合物が取得できたことに対し、一定の手応えを感じることができた。

一方、MRSA に対するスクリーニングでは

(Fig. 7), 黄色ブドウ球菌に強い抗菌活性を示す臨床薬フシジン酸の類縁化合物ヘルボール酸が単離された。¹⁰⁾ また、*in vitro* 評価系で抗 MRSA 活性を示す化合物として報告された TPU-0037 類やアクレモニジン C は、カイコ評価系で治療効果を示す

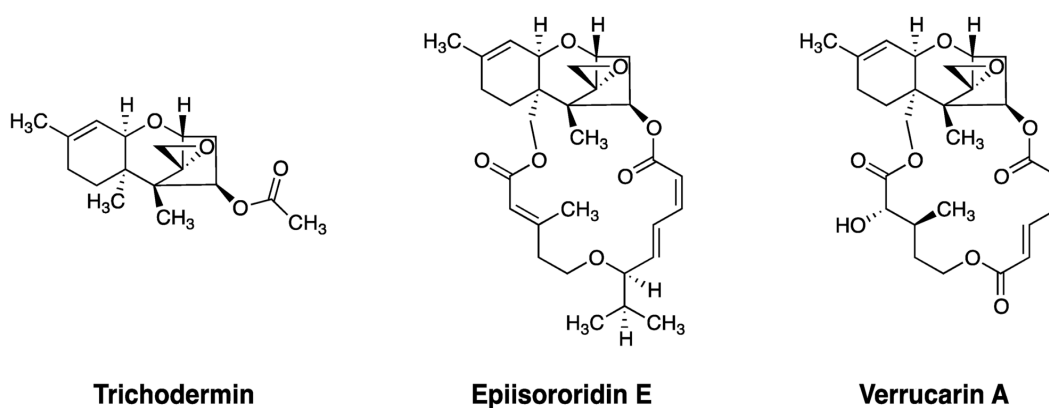


Fig. 8. Structures of trichodermin, epiisororidin E, and verrucarin A. (Ref. 13)

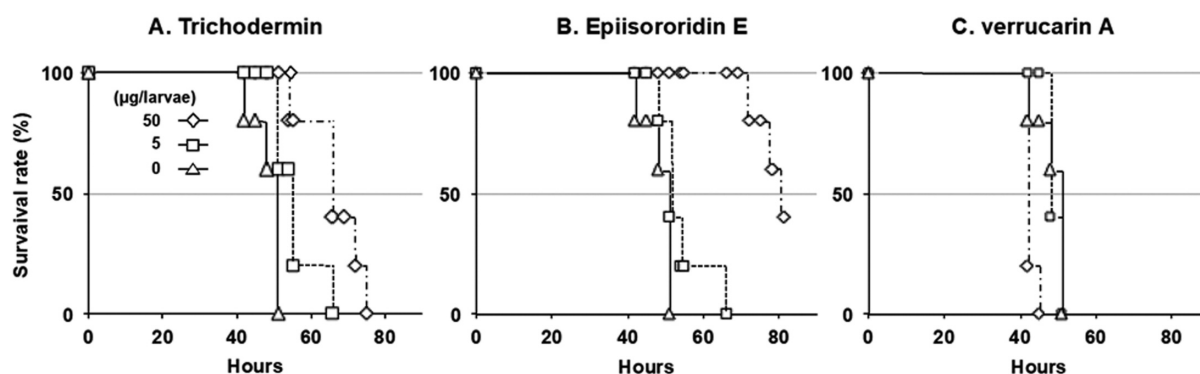


Fig. 9. Therapeutic effects of trichodermin, epiisororidin E, and verrucarin A in the silkworm infection assay with *C. albicans*. (A) trichodermin, (B) epiisororidin E, and (C) verrucarin A. ◇: 50, □: 5, and △: 0 µg/larva. (Ref. 13)

Table 3. *In vitro* antifungal activity of trichodermin, epiisororidin E, verrucarin A, and miconazol.

	Trichodermin	Epiisororidin E	Verrucarin A	Miconazol
Yeast-like fungus				
<i>Candida albicans</i> ATCC90029	0.125	1.0	0.125	0.0039
<i>C. glabrata</i> ATCC90030	2.0	16	4.0	0.0078
<i>C. parapsilosis</i> ATCC90018	0.5	4.0	0.125	0.031
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC90113	2.0	4.0	2.0	0.125
Filamentous fungus				
<i>Aspergillus fumigatus</i> NBRC33022	>32	>32	>32	1.0
<i>A. flavus</i> NBRC6343	>32	>32	>32	2.0
<i>A. niger</i> NBRC1 05649	4.0	>32	32	2.0
<i>A. terreus</i> NBRC7078	>32	>32	>32	1.0
Zygomycetes				
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC4705	>32	>32	>32	0.5
<i>R. microsporus</i> IFM46417	>32	>32	>32	2.0
<i>Rhizomucor pusillus</i> NBRC9744	8.0	16	4.0	1.0
<i>Absidia corymbifera</i> IFM 5335	8.0	>32	8.0	4.0

ことから, *in vivo*での治療効果が期待できる化合物である。

これらカイコ評価系で単離した化合物の中で特に注目したのが, 抗 *C. albicans*のスクリーニングで得られたトリコデルミンやエピイソロリジンなどのトリコテセン類である。トリコテセン類は真菌が生産するマイコトキシンの一種であるが,¹²⁾トリコデルミンやエピイソロリジン (Fig. 8)はカイコにほとんど毒性を示すことなく, 治療効果を示すことが明らかになった。¹³⁾トリコデルミン, エピイソロリジンおよびベルカリン A のカイコ評価系における治療効果を Fig. 9に, 微量液体希釈法による測定した抗真菌スペクトルを Table 3に示す。微量液体希釈法ではトリコデルミンの方がエピイソロリジンより低濃度で MIC 値を示すのに対し, カイコ評価系ではエピイソロリジンの方が高い治療効果を示し, ミコナゾールとフルコナゾールと同様に効果の逆転が認められた。一方, 微量液体希釈法でエピイソロリジンより低い MIC 値を示した類縁化合物ベルカリン A は, カイコ評価系では全く治療効果を示さず, 50 μg /カイコの投与で毒性を示す結果となった。したがって, 構造的な特徴からマイコトキシンとひとまとめにされていた化合物であっても, 治療効果を指標としたカイコ評価系は, これまでとは違った知見が得られるのも特色の一つである。

このように, カイコ評価系を利用したスクリーニングから得られた化合物の中には, 実際に臨床薬として使用されている化合物あるいはその類縁

化合物が含まれ, 今後選択される化合物の中からの抗生物質のリードの期待が高まった。さらに, 既知化合物であったとしてもカイコ評価系で治療効果を示す化合物は, 哺乳動物を用いた *in vivo*での再評価に値する可能性が示唆された。また, ペーパーディスク法では抗菌活性を示さず, カイコ評価系で治療効果を示す培養液サンプルも選択されており, 化合物の単離が期待される。

5. カイコ評価系で発見した新規抗 MRSA 化合物 ノソコマイシン類

5-1. ノソコマイシン類の発見

カイコ評価系を利用した抗 MRSA 化合物のスクリーニングにおいて選択された放線菌 *Streptomyces cyslabdanicas* K04-0144 株の培養液からは, ノソコマイシン A~D (nosokomycins A~D, Fig. 10)と命名した新規化合物 4 成分を見いだした。¹⁴⁻¹⁷⁾ノソコマイシン類は, 生産菌 K04-0144 株が沖縄県石垣島の野底 (nosoko) ダムの土壌より分離されたことと, 院内感染 (nosocomial infection) にちなんで命名した。その構造は, セスタテルペンからなるリポド部分と 4~5 個の糖から構成される糖鎖部分が 3-ホスホグリセリン酸を介して結合していることから, ホスホグリコリポド系の抗生物質に属する。このクラスの代表的な化合物としてモエノマイシン (moenomycin) 類が存在する。¹⁸⁾モエノマイシン類は, グラム陽性菌に対して強力な抗菌活性を有し, これまでに約 20 種が報告されており, 動物飼料中に成長促進抗生物

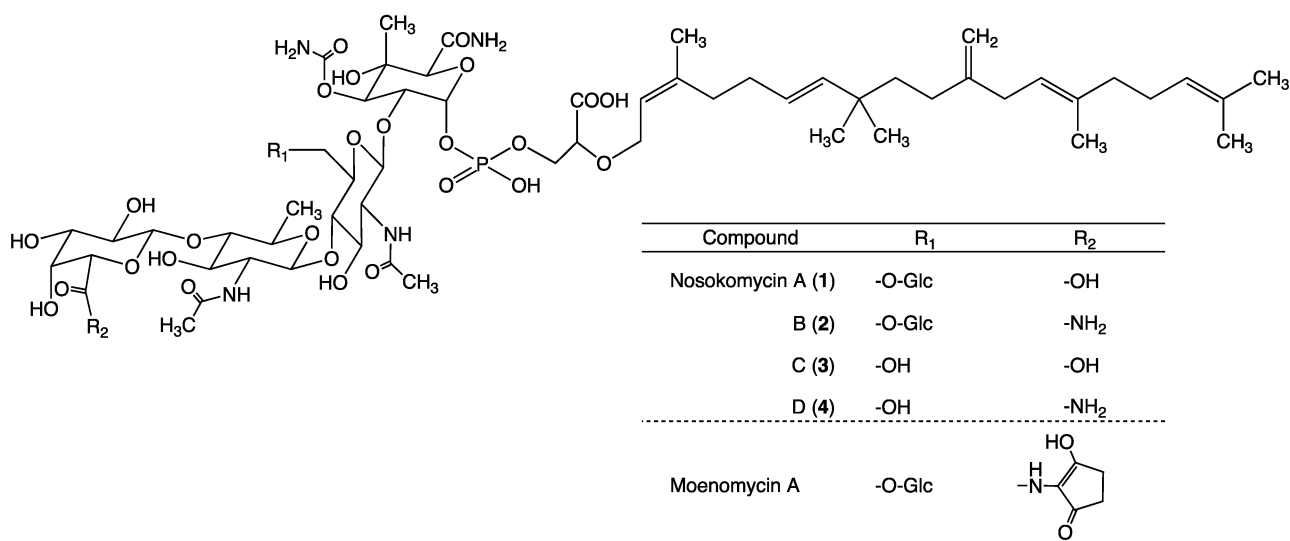


Fig. 10. Structures of nosokomycins A to D. (Ref. 14-17)

質として使用されている化合物群である。構造的にはノソコマイシン類の R2 位にシクロペンタノン環を持つが、これまでに完全な NMR の帰属が行われた報告は少なく、本研究で明らかにしたノソコマイシン類の物理化学的データは、他の類縁化合物の構造解析において参考になると考えられる。また、モエノマイシン A は既に全合成研究が行われており、その中間体としてノソコマイシン B が報告されている。¹⁹⁾ さらに、モエノマイシン A の生合成遺伝子やその酵素の解析から、生合成中間体としてノソコマイシン類の存在が示唆されていたが、^{20,21)} 本研究では実際に最終代謝産物として単離した。しかし、K04-0144 株にモエノマイシン類の生産は確認できなかったことから、本生産菌ではシクロペンタノン環を生合成する遺伝子の欠損あるいは機能していない可能性が示唆された。

5-2. ノソコマイシン類の抗菌スペクトル

寒天平板希釈法により測定した、MRSA やバン

コマイシン耐性腸球菌 (VRE) を含むノソコマイシン類の抗菌スペクトルを Table 4 に示す。¹⁶⁾ ノソコマイシン類は、グラム陰性菌にはほとんど抗菌活性を示さないが、八連球菌 (*Micrococcus luteus*) を除くグラム陽性球菌に対し強力な抗菌活性を示すことが明らかになった。中でもメチシリン、イミペネム、シプロフロキサシンおよびトブラマイシンに対して耐性を獲得した多剤耐性 MRSA (N315 IR94 HR 株) や VRE (NTCT12201 VanA 株) の生育も阻害し、その最小発育阻止濃度 (MIC 値) は MRSA 治療薬であるバンコマイシンやリネゾリドより低い値を示したことは興味深い。特に B 成分は、調べた全てのグラム陽性菌に対して 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値を示し、次いで D 成分、A および C 成分はほぼ同等の抗菌活性を示した。

次に、ノソコマイシン類の抗 MRSA 活性をより詳細に調べるために、臨床分離株 54 株を用いて寒天平板希釈法によるポピュレーション解析を行っ

Table 4. MIC values of nosokomycins against various pathogenic bacteria including MRSA.

Microorganism strain	Nosokomycin				Vancomycin	Arbekacin	Linezolid
	A	B	C	D			
Gram positive bacteria							
<i>S. aureus</i> FDA209P	1.0	≤ 0.25	2.0	1.0	1.0	≤ 0.25	1.0
MRSA N315 IR94	0.06	≤ 0.25	0.125	≤ 0.25	0.50	0.50	1.0
MRSA N315 IR94 HR-1	0.125	≤ 0.25	0.125	≤ 0.25	0.50	1.0	2.0
MRSAK24	0.125	0.125	0.125	0.125	NT	NT	NT
<i>S. aureus</i> ISP447	0.25	≤ 0.25	0.50	≤ 0.25	1.0	≤ 0.25	2.0
<i>S. aureus</i> 8325 (pEP2104)	0.06	≤ 0.25	0.06	0.50	2.0	≤ 0.25	2.0
<i>S. epidermidis</i> IF012648	4.0	≤ 0.25	8.0	1.0		≤ 0.25	2.0
<i>M. luteus</i> ATCC9341	>16	>128	>16	>128	1.0	≤ 0.25	2.0
<i>E. faecalis</i> ATCC21212	1.0	≤ 0.25	2.0	0.50	4.0	>32	2.0
<i>E. faecalis</i> NTCT12201 (VanA)	1.0	≤ 0.25	2.0	0.50	>32	>32	2.0
Gram negative bacteria							
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	>16	8.0	>16	8.0	>32	>32	>32
<i>C. freundii</i> ATCC8090	>16	64	>16	64	>32	0.50	>32
<i>K. pneumoniae</i> NCTN9632	>16	8.0	>16	8.0	>32	≤ 0.25	>32
<i>P. mirabilis</i> IF03849	>16	8.0	16	8.0	>32	2.0	>32
<i>P. vulgaris</i> OX-19	>16	8.0	4.0	4.0	>32	2.0	8.0
<i>M. morgani</i> IID Kono	>16	32	>16	32	>32	0.50	>32
<i>S. marcescens</i> IF012648	>16	32	>16	32	>32	1.0	>32
<i>E. cloacae</i> IF013535	>16	32	>16	32	>32	0.50	>32
<i>E. aerogenes</i> NCTC1 0006	>16	32	>16	32	>32	≤ 0.25	>32
<i>P. aeruginosa</i> 46001	>16	32	>16	32	>32	1.0	>32
<i>P. aeruginosa</i> E-2	>16	32	>16	32	>32	4.0	>32
<i>A. calcoaceticus</i> IF02552	16	8.0	8.0	8.0	>32	≤ 0.25	>32

NT: Not tested. (Ref. 16)

た (Fig. 11).¹⁶⁾ その結果, 抗菌スペクトルの結果と同様にノソコマイシン B の効果が最も高く, 終濃度 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 54 株全ての MRSA の生育を阻止し, 臨床薬のバンコマイシン, アルベカシン, リネゾリドより強い活性を示した. またノソコマ

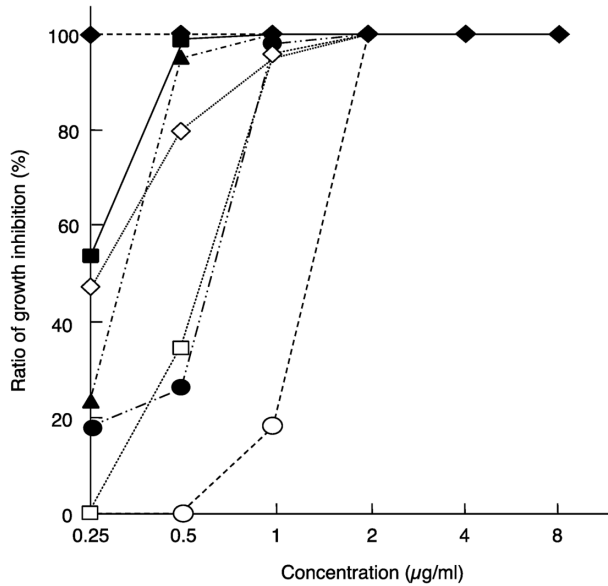


Fig. 11. Antibacterial activity of nosokomycins against 54 clinical isolated MRSA strains. (Ref. 16)

イシン A, C および D については, それぞれ 0.5, 2.0 および 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で全ての MRSA の生育を阻止し, バンコマイシン (2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で全ての生育を阻止) と同等かそれ以上の抗 MRSA 活性を示すことが明らかになった. データ数は少ないが, これらの結果より構造活性相関を考察した場合, ノソコマイシン類の R1 位には水酸基よりグルコース, また R2 位には水酸基よりアミノ基が存在した場合に, より強い活性を示すことが示唆された.

モエノマイシン A は, 細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンの生合成過程で, 最後から 2 番目のステップに関与するペプチドグリカングリコシルトランスフェラーゼ (PGT) に直接作用し, 重合反応を阻害することが報告されている. また, モエノマイシン A と PGT の共結晶構造から, モエノマイシン A が PGT の活性部位に結合することも報告されている.²²⁾ したがって, ノソコマイシン類も同様に, PGT に作用することで細胞壁の生合成を阻害することが作用機序として考えられる.

5-3. ノソコマイシン類の *in vivo* 評価系での治療効果

前述したように, ノソコマイシン類は *in vitro* 評

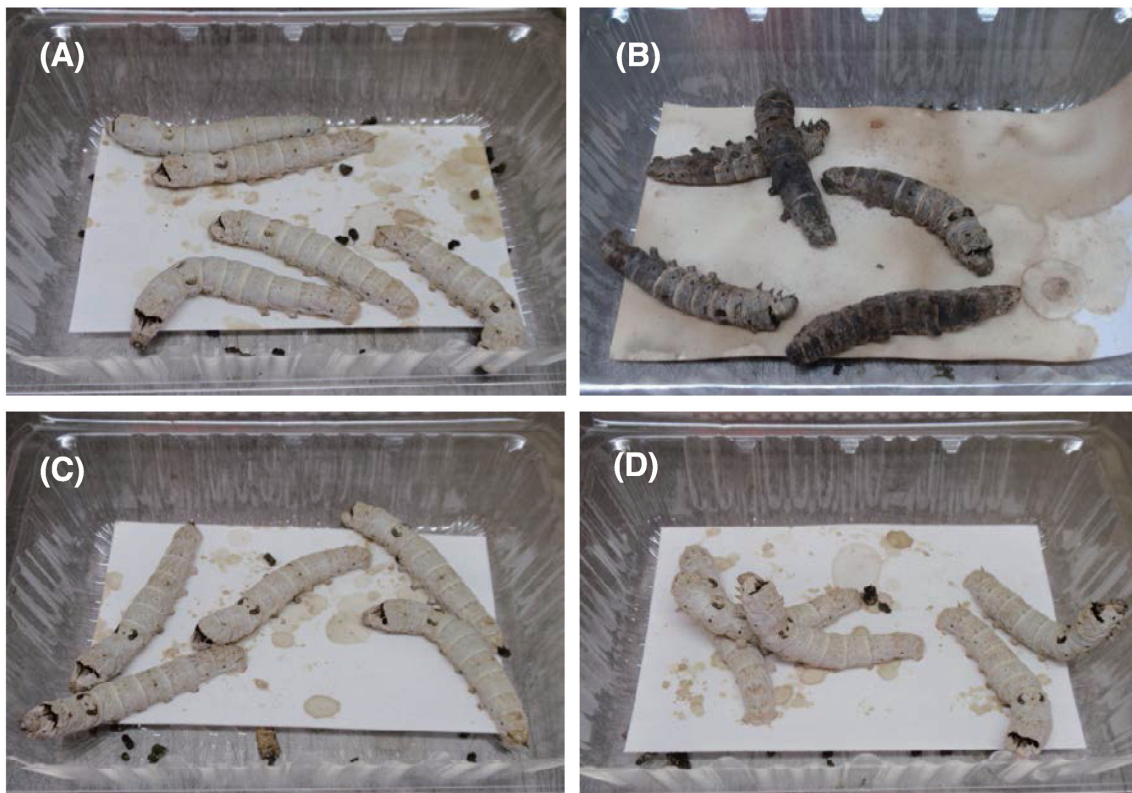


Fig. 12. *In vivo* efficacy of nosokomycin A in silkworm infected with MRSA. (A) Nosokomycin A (25 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{larvae}$). (B) MRSA suspension. (C) MRSA suspension + nosokomycin A (25 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{larvae}$). (D) MRSA suspension + vancomycin (25 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{larvae}$). (Ref. 16)

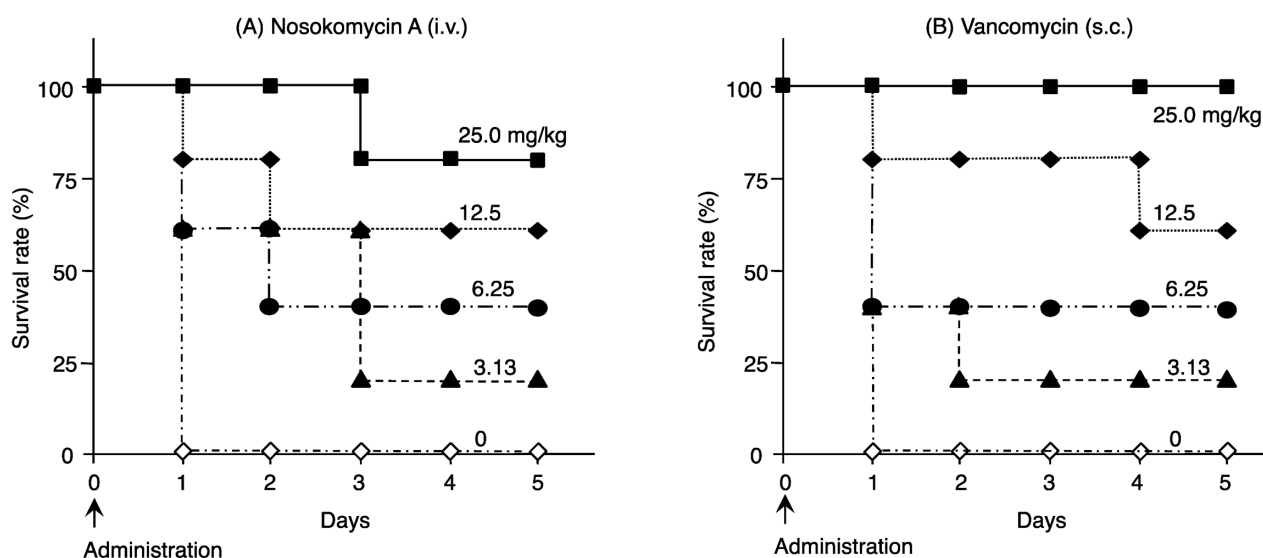


Fig. 13. Therapeutic effects of nosokomyacin A and vancomycin in mice infected with MRSA. (A) Intravenous administration of nosokomyacin A. (B) Subcutaneous administration of vancomycin. Drugs were administrated once on day 0. (Ref. 16)

価系で強力な抗 MRSA 活性を示す化合物である。したがって、この活性がマウスを用いた *in vivo* 評価系でも認められるか否かを調べるために、まずカイコ評価系での治療効果を再確認した。ここでは完全な新規化合物である A 成分の結果について述べる。^{14,16)} ノソコマイシン A (25 $\mu\text{g}/\text{g}$ ・カイコ) を MRSA 未感染のカイコの背脈管から投与したところ全てのカイコが生存し、この濃度では毒性を示さないと判断した (Fig. 12A)。次に、MRSA を感染させたカイコが 72 時間までに全て感染死 (Fig. 12B) する条件下で、ノソコマイシン A (Fig. 12C) およびバンコマイシン (Fig. 12D) をそれぞれ 25 $\mu\text{g}/\text{g}$ ・カイコで投与した結果、全てのカイコの生存し良好な治療効果が確認できた。さらに、ICR マウス (♀, 4 週齢, 18~20 g) に MRSA 菌液 (1×10^9 CFU) を腹腔内に接種し、翌日に全て感染死する条件下で評価を行った。菌液を接種した 1 時間後に、ノソコマイシン A あるいはバンコマイシンを投与量 1.56~25 mg/kg で、それぞれ 5 匹のマウスに皮下注射あるいは静注投与し経過を観察した。その結果、ノソコマイシン A を皮下注射した場合には、治療効果を示さなかったが、静注では濃度依存的にマウスの生存が確認できた (Fig. 13)。^{16,17)} 一方で、バンコマイシンは皮下注射でも治療効果を示したことから、ノソコマイシン A は血中移行性に問題があることが示唆された。

以上のように、哺乳動物以外の生物を利用した

in vivo 評価系をスクリーニング初期に導入し、最終的に哺乳動物レベルでも治療効果を示す新規化合物ノソコマイシン類を発見することができた。このような実験例はノソコマイシン類が最初の報告である。

6. カイコ評価系を応用した抗結核薬のスクリーニング

結核は、単一の感染症としては HIV/エイズに次いで世界で 2 番目に死者が多い感染症で、特にアジアとアフリカの患者数が多い。日本では患者数が減少しているものの、先進国の中では罹患率がトップで「中蔓延国」として位置付けられている。しかし、その治療薬には限りがあり、さらに多剤耐性菌が広がりを見せていることから、抗菌薬と同様に新しいタイプの薬剤が必要な状況にある。しかし、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* はバイオセーフティーレベル 3 クラスの実験施設が必要になるため安易には扱えない。そこで著者らは、一般には病原性がほとんどないとされる同属の *M. smegmatis* を試験菌とした *in vitro* スクリーニングを実施している。評価の基準として、*M. smegmatis* のみ抗菌活性を示し、他のグラム陽性菌や陰性菌には全く抗菌活性を示さない培養液サンプルを選択し、その中から新規化合物としてラリアチン (lariatins) 類^{23,24)} やカルピナクタム (calpinactams)²⁵⁻²⁷⁾ を発見してきた経緯がある (Fig. 14)。これら化合物の

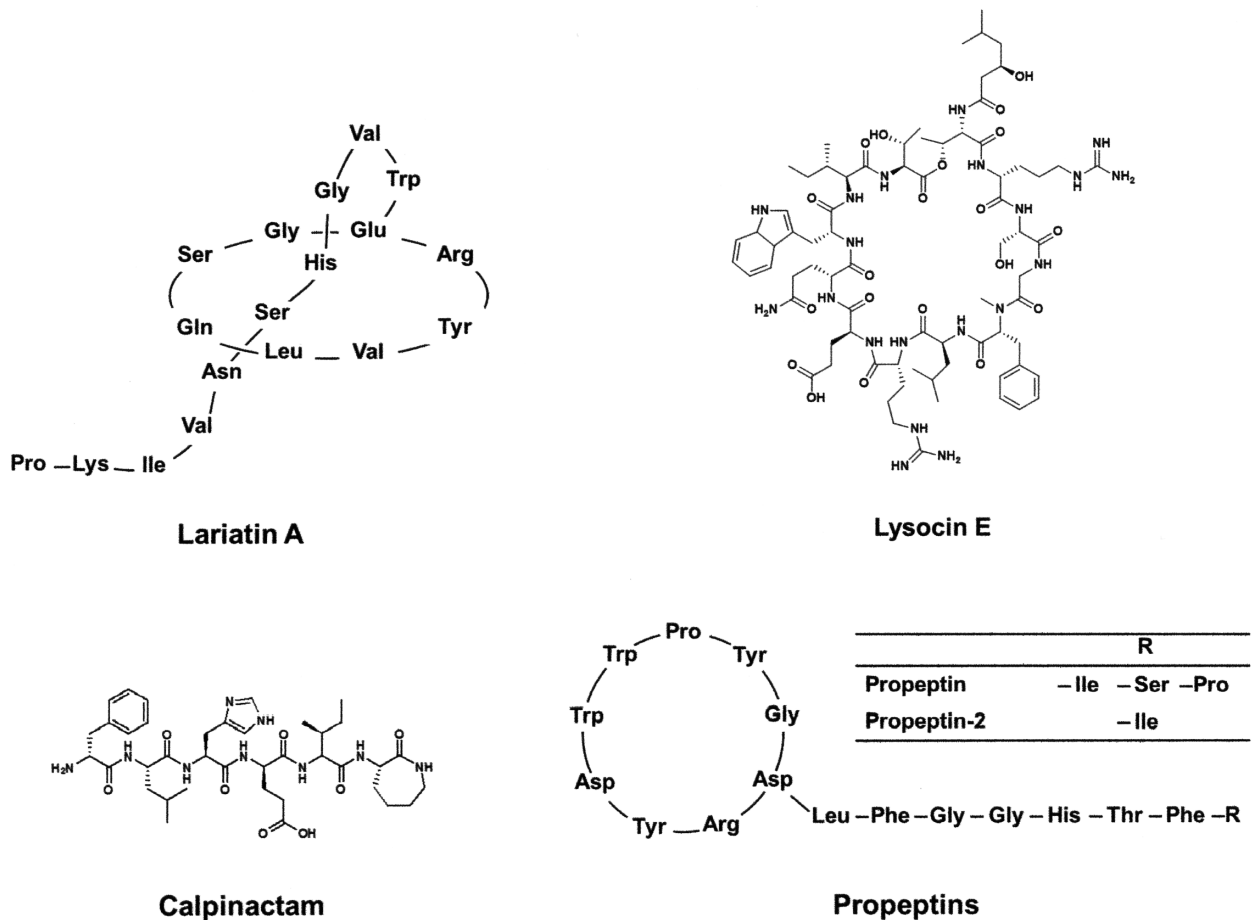


Fig. 14. Structures of microbial peptides. (Ref. 28)

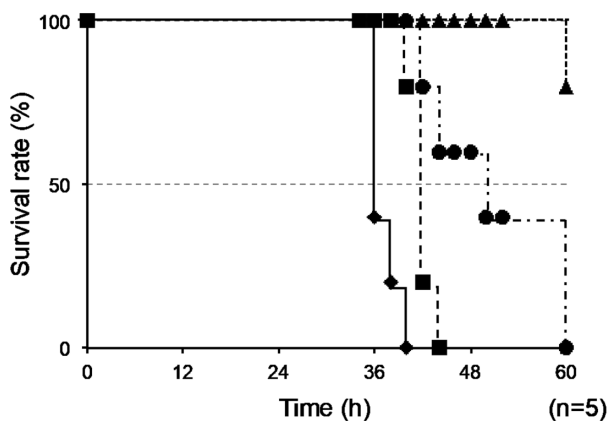


Fig. 15. Silkworm killing ability of *Mycobacterium smegmatis*. A suspension of the *M. smegmatis* M341 strain was diluted to the indicated cell number and injected into the silkworm hemolymph. Infected silkworms were incubated at 37°C. The number of surviving silkworms was counted 60 h after the injection. ◆: 2.5×10^7 , ■: 1.3×10^7 , ●: 0.6×10^7 , and ▲: 0 CFU/larva · g. Experiments were performed three times and reproducible data were observed. (Ref. 28)

治療効果にも興味を持たれたが、簡便かつ適切な評価系は存在しない。そこで、*M. smegmatis*をカイコ評価系に応用した。

まず、前述した方法と同様に *M. smegmatis*をカイコの背脈管に接種し 27°Cで経過を観察したが、感染死しなかった。そこで、カイコの飼育温度を *M. smegmatis*の生育温度の 37°Cに上げて再度感染実験を行った結果、菌数依存的に感染死させることに成功した (Fig. 15)。しかし、37°Cではカイコの体力の消耗も激しく、60時間を過ぎると未感染のカイコも死にはじめることから、最終的な菌数を 1.25×10^7 CFU/カイコ · g とし、観察時間を約 48時間と従来の方法より短めに設定することで対応することにした。²⁸⁾

構築した条件下で、まず臨床で用いられる抗結核薬の治療効果を調べた。薬剤未投与のカイコが約 48時間で全て感染死する条件下で、イソニアジド、エタンブロール、リファンピシン、ストレプトマイシンおよびカナマイシンはそれぞれ 25, 50, 5.0, 1.5 および 0.5 μg/カイコ · g の投与量で治療効

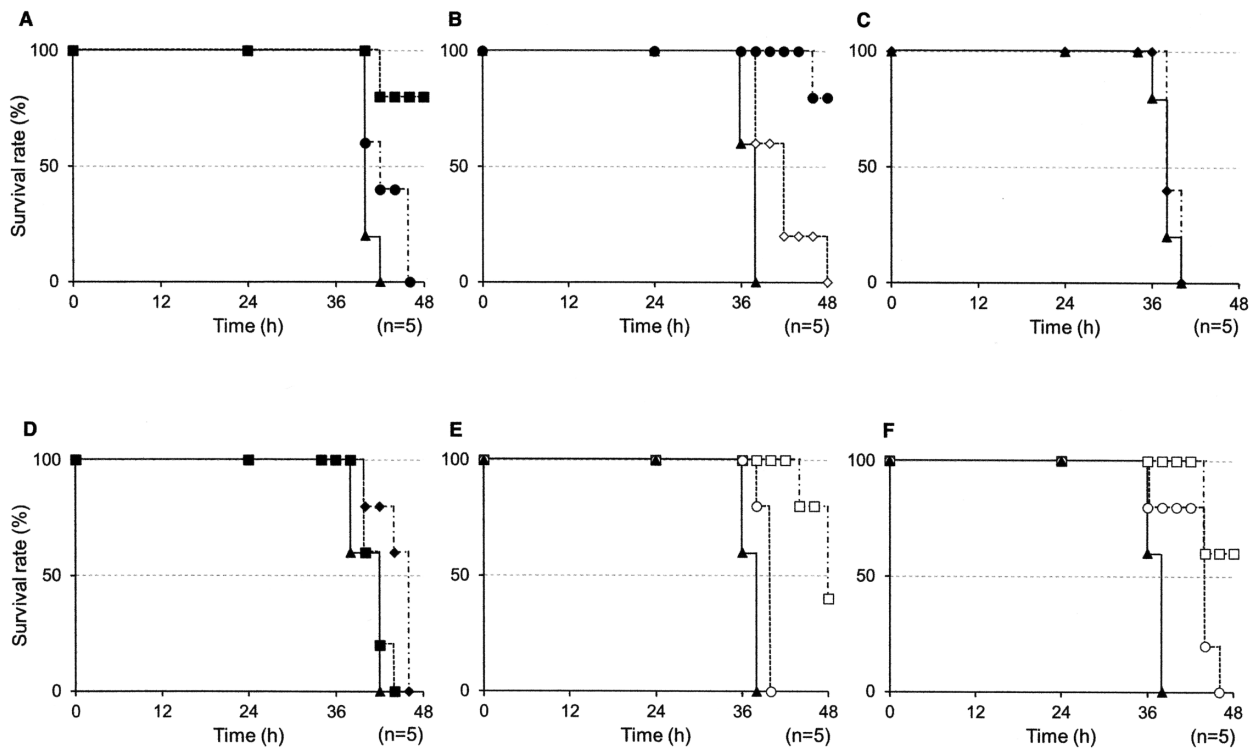


Fig. 16. Therapeutic effects of anti-tuberculosis (TB) drugs in the silkworm infection assay with *Mycobacterium smegmatis*. (a) Isoniazid (INH), (b) rifampicin (RFP), (c) pyrazinamide (PZA), (d) ethambutol (EB), (e) streptomycin (SM), and (f) kanamycin (KM). ◆: 50; ■: 25; ●: 13; ◇: 5; □: 1.5; ○: 0.5; and ▲: 0 $\mu\text{g}/\text{larva}\cdot\text{g}$. Experiments were performed three times and reproducible data were observed. (Ref. 28)

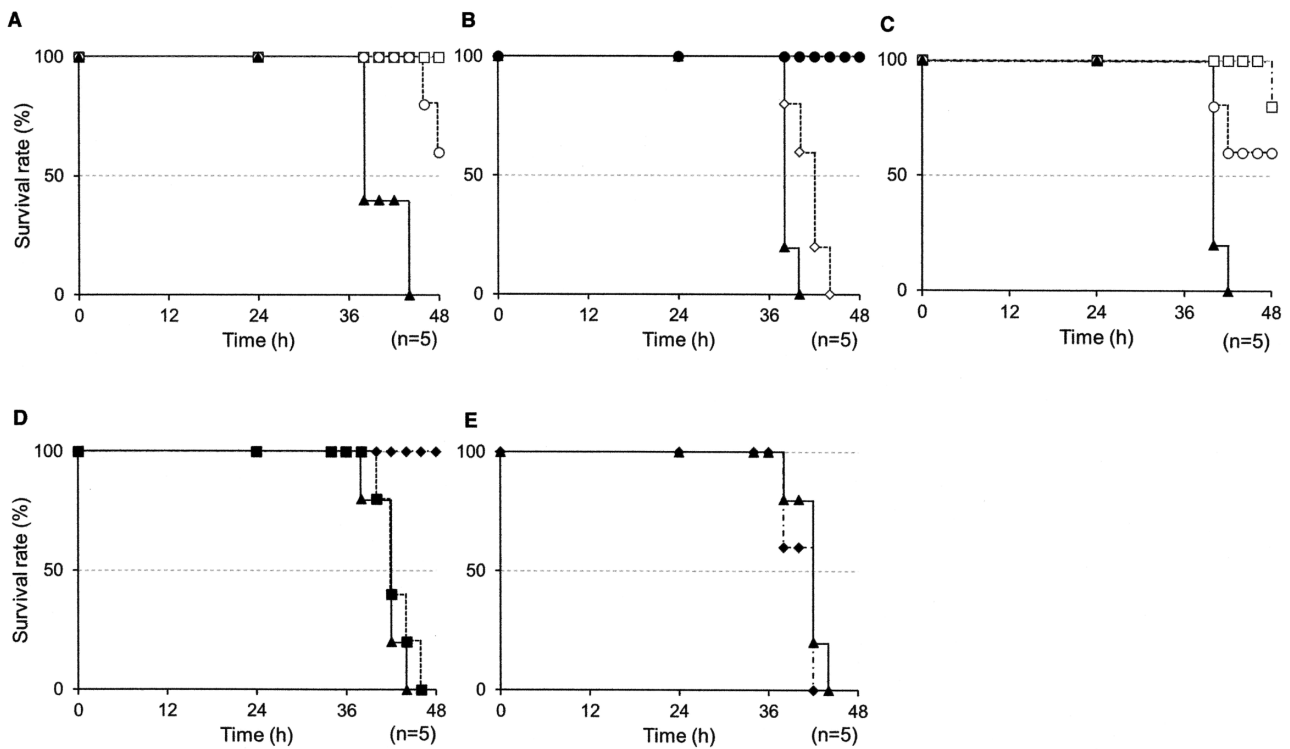


Fig. 17. Therapeutic effects of microbial peptides in the silkworm infection assay with *Mycobacterium smegmatis*. (a) Lariat A, (b) calpinactam, (c) lysocin E, (d) propeptin and (e) propeptin-2. ◆: 50; ■: 25; ●: 13; ◇: 5; □: 1.5; ○: 0.5; and ▲: 0 $\mu\text{g}/\text{larva}\cdot\text{g}$. Experiments were performed three times and reproducible data were observed. (Ref. 28)

Table 5. MIC and ED₅₀ values of anti-*Mycobacterium* agents against *Mycobacterium smegmatis*.

Compound	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	ED ₅₀ ($\mu\text{g larva}^{-1} \text{g}^{-1}$)	ED ₅₀ per MIC
Isoniazid	1.56	12.5	8.0
Rifampicin	1.56	5	3.2
Pyrazinamide	>100	>100	—
Ethambutol	0.78	50	64
Streptomycin	0.78	1.5	1.9
Kanamycin	3.13	0.5	0.1
Lariat A	0.10	0.5	5
Calpinactam	0.78	5	6.4
Lysocin E	3.13	0.5	0.16
Propeptin	100	50	0.5
Propeptin-2	>100	>200	—

(Ref. 28)

果を示した (Fig. 16). その一方で、ピラジナミドは $100 \mu\text{g}/\text{カイコ} \cdot \text{g}$ でも治療効果を示さなかった.²⁸⁾ これは *M. smegmatis* がピラジナミドを細胞内に取り込めないためである.²⁹⁾ 一部の臨床薬を除いて治療効果が確認できたことから、目的である微生物の培養液から単離された抗 *M. smegmatis* 活性を示す5種類のペプチド系化合物 (Fig. 14), ラリアチン A, カルピナクタム, ライソシン E (lysocin E),^{17,30,31)} プロペプチン (propeptin) およびプロペプチン-2 (プロペプチンの非活性体)^{32,33)} の治療効果を調べた. その結果, ラリアチン A およびライソシン E は優れた治療効果を示し, $0.5 \mu\text{g}/\text{カイコ} \cdot \text{g}$ の低投与量でもカナマイシンと同レベルの治療効果を示した. また, プロペプチンは弱い治療効果を示したが, 非活性体のプロペプチン-2は治療効果を示さなかった (Fig. 17). これらのデータから算出したカイコ評価系における50%有効濃度 (ED₅₀ 値) と微量液体希釈法によるMIC 値を Table 5 にまとめた. 関水・浜本らは, 薬剤のポテンシャルを示す指標として ED₅₀/MIC の値を参考にしており, 一般に臨床で用いられている抗生物質はその値が10以下であることを報告している.³⁴⁾ 臨床薬の場合, エタンブトールを除くイソニアジド, リファンピシン, ストレプトマイシンおよびカナマイシンが10以下の ED₅₀/MIC 値を示す. 一方, ペプチド化合物については, 治療効果を示したラリアチン A, カルピナクタム, ライソシン E およびプロペプチンが10以下の値を示し, 抗結核薬のリードとなり得る可能性が示唆された. 今後, 哺乳動物を用いた *M. tuberculosis*

による感染実験での治療効果に興味を持たれる. 現在, 構築したカイコ評価系を用いて, 新しい抗結核薬のスクリーニングも始めている.

おわりに

医薬品の開発において, 薬理・薬効や安全性などを調べる非臨床試験で多大な貢献をしている動物実験ではあるが, 動物保護や倫理面の観点から, 実験の規模の縮小あるいはそのものを見直す流れも起こっている. そこで本研究では, カイコ評価系での臨床薬の治療効果が, マウスのそれとよく一致するという実験事実に基づいて, *in vitro* スクリーニングで生じる問題の解消と治療効果を示す化合物をより早く見いだすことを目的に, これをスクリーニング初期に導入し新規抗生物質の探索を試みた. カイコ評価系は, 病原微生物とサンプルをカイコの背脈管に接種するという操作を含むため, 高度な技術を必要とし, スクリーニングという意味では手間と時間がかかる. しかし, 治療効果を指標とした評価系であることから, *in vitro* 評価系で発見される化合物よりも治療薬に近いものを, 高確率で発見できると考えている. 実際, 抗MRSAのスクリーニングにおいて, ペーパーディスク法では327ものサンプルが選択されており, これを一つずつ精製してはよほど運が良くなければノソコマイシン類の発見に至らなかったはずである. また, ライソシン類も, 黄色ブドウ球菌のカイコ評価系を利用したスクリーニングから発見された化合物である. ライソシン類は, 細菌の細胞膜に存在する電子伝達系補因子メナキノン

Table 6. Adaptive strains on silkworm infection method.

<ul style="list-style-type: none"> ■ Gram-positive bacteria <ul style="list-style-type: none"> <i>Staphylococcus aureus</i>: 27 °C MRSA: 27 °C ■ Gram-negative bacteria <ul style="list-style-type: none"> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: 27 °C ■ <i>Mycobacterium</i> spp. <ul style="list-style-type: none"> <i>M. smegmatis</i>: 37 °C 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Yeast <ul style="list-style-type: none"> <i>Candida albicans</i>: 27 °C <i>C. glabrata</i>: 27 °C <i>C. parapsilosis</i>: 27 °C <i>Cryptococcus neoformans</i>: 37 °C ■ Fungus <ul style="list-style-type: none"> <i>Aspergillus fumigatus</i>: 27 °C <i>A. niger</i>: 27 °C ■ Zygomycota <ul style="list-style-type: none"> <i>Rhizopus oryzae</i>: 27 °C
---	--

と相互作用し、細胞膜を破壊することで殺菌作用を示すという新しい作用機序を有することも明らかにされており、これまでの抗菌薬とは異なる標的分子の提唱にもつながっている¹⁷⁾。さらに、アステラス製薬の中村らは、*Aspergillus fumigatus* のカイコ評価系より新規抗真菌薬 ASP2397 類を見出しており^{35,36)} いずれも化合物もマウスモデルでの治療効果が確認されている。

様々な *in vitro* 評価系のスクリーニングから、数多くの抗生物質が報告されているが、*in vivo* での治療効果まで調べられた報告は極めて少ない。したがって、これらの化合物をカイコ評価系で再評価できれば、抗生物質のリードとしての価値を再発見できる可能性もある。著者らはこれまでに、今回取り上げた *C. albicans*, MRSA や *M. smegmatis* 以外にも Table 6 に示した病原微生物のカイコ評価系も構築し、新規抗生物質のスクリーニングを進めている。今後、カイコ評価系が新たな抗生物質の開拓のために広く利用されることを期待している。

謝辞 本研究は北里大学薬学部および北里生命科学研究所在籍時に行った研究成果であり、多くの先生方や学生さんにご協力をいただきました。特に、北里大学特別栄誉教授大村智博士および北里大学薬学部教授供田洋博士には多大なるご助言や激励をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。また、カイコ評価系を構築するにあたり直接ご指導をいただきました東京大学大学院薬学研究科教授関水久博士（現帝京大学医真菌研究センター教授）および浜本洋博士（現同准教授）に深く感謝いたします。さらに、北里生命科学研究科名誉教授高橋洋子博士、同前講師増間稔

郎博士、金容必博士（現いわき明星大学教授）、同准教授岩月正人博士、同講師松井英則博士、ならびに感染制御センター部長花木秀明博士に感謝いたします。

本研究は科学研究費補助金基盤研究 B (16H05095) および基盤研究 C (19590104, 22590013 および 25460130) の助成によってなされたものです。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Nathan C., *Nature*, **431**, 899–902 (2004).
- 2) Schnappinger D. Ehrt S. Voskuil M. I. Liu Y. Mangan J. A. Monahan I. M. Dolganov G. Efron B. Butcher P. D. Nathan C. Schoolnik G. K., *J. Exp. Med.*, **198**, 693–704 (2003).
- 3) Zon L. I. Peterson R. T., *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**, 35–44 (2005).
- 4) Kwok T. C. Y. Ricker N. Fraser R. Chan A. W. Burns A. Stanley E. F. McCourt P. Cutler S. R. Roy P. J., *Nature*, **441**, 91–95 (2006).
- 5) Kaito C. Akimitsu N. Watanabe H. Sekimizu K., *Microb. Pathog.*, **32**, 183–190 (2002).
- 6) Hamamoto H. Kurokawa K. Kaito C. Kamura K. Manitra R. I. Kusuhara H. Santa T. Sekimizu K., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 774–779 (2004).
- 7) Hamamoto H. Kamura K. Razanajatovo I. M. Murakami K. Santa T. Sekimizu K., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**, 38–42 (2005).

- 8) Hamamoto H. Tonoike A. Narushima K. Horie R. Sekimizu K., *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **149**, 334–339 (2009).
- 9) Fujiyuki T. Imamura K. Hamamoto H. Sekimizu K., *Drug Discov. Ther.*, **4**, 349–354 (2010).
- 10) 内田龍児, 浜本 洋, 関水久, 供田 洋, バイオサイエンスとインダストリー, **68**(5), 314–321 (2010).
- 11) 内田龍児, 供田 洋, 生化学, **86**(5), 595–601 (2014).
- 12) Bräse S. Encinas A. Keck J. Nising C. F., *Chem Rev.*, **109**, 3903–3990 (2009).
- 13) Uchida R. Namiguchi S. Ishijima H. Tomoda H., *Drug Discov Ther.*, **10**, 44–48 (2016).
- 14) Uchida R. Iwatsuki M. Kim Y. P. Ohte S. Ōmura S. Tomoda H., *J. Antibiot.*, **63**, 151–155 (2010).
- 15) Uchida R. Iwatsuki M. Kim Y. P. Ōmura S. Tomoda H., *J. Antibiot.*, **63**, 157–163 (2010).
- 16) Uchida R. Hanaki H. Matsui H. Hamamoto H. Sekimizu K. Iwatsuki M. Kim Y. P. Tomoda H., *Drug Discov Ther.*, **8**, 249–254 (2014).
- 17) Hamamoto H. Urai M. Ishii K. Yasukawa J. Paudel A. Murai M. Kaji T. Kuranaga T. Hamase K. Katsu T. Su J. Adachi T. Uchida R. Tomoda, H. Yamada M. Souma M. Kurihara H. Inoue M. Sekimizu K., *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 127–133 (2015).
- 18) Huber, G., In *Antibiotics*; Hahn, F. E., Ed.; Springer: Berlin, Vol. V/1, 135–153 (1979).
- 19) Marzan S. Happel M. Wagner U. Müller D. Welzel P., *Tetrahedron*, **50**, 5299–5308 (1994).
- 20) Ostash B. Walker S., *Nat Prod Rep.*, **27**, 1594–1617 (2010).
- 21) Ostash B. Doud E. H. Lin C. Ostash I. Perlstein D. L. Fuse S. Wolpert M. Kahne D. Walker S., *Biochemistry*, **48**, 8830–8841 (2009).
- 22) Lovering A. L. de Castro L. H. Lim D. Strynadka N. C., *Science*, **315**, 1402–1405 (2007).
- 23) Iwatsuki M. Tomoda H. Uchida R. Gouda H. Hirono S. Ōmura S., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7486–7491 (2006).
- 24) Iwatsuki M. Uchida R. Takakusagi Y. Matsumoto A. Jiang C. L. Takahashi Y. Arai M. Kobayashi S. Matsumoto M. Inokoshi J. Tomoda H. Ōmura S., *J. Antibiot.*, **60**, 357–363 (2007).
- 25) Koyama N. Kojima S. Fukuda T. Nagamitsu T. Yasuhara T. Ōmura S. Tomoda H., *Org Lett.*, **12**, 432–435 (2010).
- 26) Koyama N. Kojima S. Nonaka K. Masuma R. Matsumoto M. Ōmura S. Tomoda H., *J Antibiot.*, **63**, 183–186 (2010).
- 27) Nagai K. Koyama N. Sato N. Yanagisawa C. Tomoda H., *Bioorg Med Chem Lett.*, **22**, 7739–7741 (2012).
- 28) Yagi A. Uchida R. Hamamoto H. Sekimizu K. Kimura K. Tomoda H., *J. Antibiot.*, **70**, 685–690 (2017).
- 29) Boshoff H. Mizrahi V., *J Bacteriol.*, **182**, 5479–5485 (2000).
- 30) Murai M. Kaji T. Kuranaga T. Hamamoto H. Sekimizu K. Inoue M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**, 1556–1560 (2015).
- 31) Hamamoto H. Sekimizu K., *Drug. Discov. Ther.*, **10**, 24–29 (2016).
- 32) Kimura K. Kanou F. Takahashi H. Esumi Y. Uramoto M. Yoshihama M., *J. Antibiot.*, **50**, 373–378 (1997).
- 33) Esumi Y. Suzuki Y. Itoh Y. Uramoto M. Kimura K. Goto M. Yoshihama M. Ichikawa T., *J. Antibiot.*, **55**, 296–300 (2002).
- 34) 浜本 洋, 村上和久, 関水久, 化学療法の領域, **25**, 2134–2140 (2009).
- 35) Nakamura I. Kanasaki R. Yoshikawa K. Furukawa S. Fujie A. Hamamoto H. Sekimizu K., *J. Antibiot.*, **70**, 41–44 (2017).
- 36) Nakamura I. Yoshimura S. Masaki T. Takase S. Ohsumi K. Hashimoto M. Furukawa S. Fujie A., *J. Antibiot.*, **70**, 45–51 (2017).