

氏名(本籍)	細江智夫	(千葉県)
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙第148号	
学位授与年月日	平成17年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	<i>Cladosporium</i> 属菌および未同定土壌分離真菌が産生する 抗 <i>Aspergillus fumigatus</i> 物質	
論文審査委員	主査	教授 河合賢一
	副査	教授 本多利雄
	副査	助教授 南雲清二

論文内容の要旨

深在性真菌症は、別名内臓真菌症ともいわれるように身体内部の臓器や組織が真菌で侵される感染症のことである。従来、日本国内で使用されている深在性真菌症の治療薬は細胞膜障害作用を有するアムホテリシン B、核酸合成阻害薬であるフルシトシン、細胞膜エルゴステロール合成阻害活性を有するアゾール系抗真菌剤ミコナゾール、フルコナゾールおよびイトラコナゾールの5薬剤であったが、2002年に1,3- β -D-グルカン合成酵素阻害という新しい作用機序のキャンディン系抗真菌薬ミカファンギンが承認され、深在性真菌症に対する新しい治療が期待されている。しかしながら、近年の医療技術の発達に伴い免疫力が低下した患者の増加や薬剤耐性菌の出現等といった現状からも、これまでの薬剤だけでは不十分であり、深在性真菌症の治療には新規抗真菌薬の開発がなお必要である。特に最近の深在性真菌症の傾向として、主に *Aspergillus fumigatus* var. *fumigatus* (以下、*A. fumigatus*) を原因菌としたアスペルギルス症の増加が認められている。現在、深在性真菌症の治療薬として最も汎用されているフルコナゾールは *Aspergillus* 属に対する抗真菌活性は弱いため、抗 *A. fumigatus* 作用を示す薬剤は医療現場において要求の高い薬剤と考えられる。

そこで、著者は抗 *A. fumigatus* 作用を有する新規化合物を求めて、菌株保有機関(千葉大学真菌医学研究センター等)の保存菌株や新規分離菌株について抗菌スクリーニングを行った。その結果、抗 *A. fumigatus* 活性を有する化合物として、*Cladosporium* sp. IFM 49189 から新規 pentanorlanostane 誘導体 cladosporide A(26)・D(29)を、また未同定真菌 IFM52672 から新規 nonadrinde である

dihydroepiheveadride (32) およびその関連化合物を単離し、それらの構造決定を行なった。さらに各化合物の構造の一部を化学変換することで、化学構造と抗真菌活性との関連を示す知見が得られた。

1997年に南米土壌から分離した *Cladosporium* sp. IFM 49189 株を米培地 1500 g (米 150 g を 10 本の 1L 用 Roux flask に分注) で 21 日間、25 °C で培養した後、CH₂Cl₂-EtOH (1 : 1) で抽出・濃縮を行ない抽出物 24 g を得た。抽出物は、精製水で懸濁した後、CHCl₃ で液液分配を行なうと抗真菌活性は有機層のみに存在したので、それを濃縮し抽出エキス 14.5 g を得た。次に、抽出エキス 14.5 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃, CHCl₃-EtOH (50 : 1), CHCl₃-EtOH (5 : 1), CHCl₃-EtOH (1 : 1) および acetone で順次溶出した。CHCl₃ および CHCl₃-EtOH (50 : 1) 分画の主成分は、ergosterol (22) であった。抗真菌活性は CHCl₃-EtOH (50 : 1) 分画に認められた。そこで、本分画を溶離液 CH₂Cl₂-acetone (20 : 1) で、シリカゲル LPLC によって分離を行なったところ、抗真菌活性は ergosterol peroxide (23) を主成分とした分画に認められた。この分画を濃縮乾固した後、MeOH を添加して溶解し遠心分離を行い、沈殿物として ergosterol peroxide (23) と脂肪酸を除去した。上清液は溶離液 90% MeOH を用いて ODS 逆相 LPLC で繰返し精製した後、HPLC (CHCl₃ : MeOH = 200:1) で精製することで、lanosterol (24) の側鎖の炭素 5 個が欠損した pentanorlanostane 誘導体である 23, 24, 25, 26, 27-pentanorlanost-8-ene-3 β , 22-diol (25) 3 mg とともに新規化合物である cladosporide A (26) 13 mg、cladosporide B (27) 2 mg、cladosporide C (28) 2.5 mg および cladosporide D (29) 1 mg を得た (Fig. 4)。

Cladosporide A (26) の化学構造は、NMR を中心とした各種スペクトルの検討と cladosporide A-MeOH 溶媒和物の X 線結晶解析の結果 (Fig. 8) から、4 β -アルデヒドを持つ pentanorlanostane 誘導体であると決定した。Cladosporide B (27)、C (28) および D (29) の化学構造は、cladosporide A と各種機器データを詳細に比較検討することにより決定した。

次にこれらの pentanorlanostane 誘導体について、Chart 4 に示したように合成した cladosporide A の酸化体 (30) および還元体 (31) も含めて、抗真菌活性試験を行なった。その結果、cladosporide A (26)、cladosporide B (27)、cladosporide A の酸化体 (30) および還元体 (31) は、本実験で試験菌として使用した糸状菌や酵母の中で、*A. fumigatus* に対して特異的に抗真菌活性を示し、化合物 25、cladosporide C (28) および cladosporide D (29) には抗真菌活性は認められなかった。また、これらの化合物の *A. fumigatus* に対する抗真菌活性の発現には、3 位

に β -OH 基もしくはカルボニル基を有することと 4β -メチル基に酸素官能基を有することが必要であり、また抗真菌活性の強さについては、3-keto 体より 3β -OH、 4β -CH₂OH よりも 4β -CHO、8-ene より 7,9(11)-diene のほうが強い抗真菌活性を示すという結論を得た (Table 8 および Chart 5)。今回得られた cladosporide 類のように側鎖が酸化的に開裂したラノステロール誘導体の真菌からの分離例はほとんどなく、cladosporide A (26) - D (29) は 4β -メチル基がアルデヒドに酸化された pentanorlanostane 誘導体の初めての例である。

一方、2000年に南米土壌から分離した未同定真菌 IFM 52672株を米培地 500 g (米 100 g ずつ 1L 用 Roux flask に分注) で 25 °C、28 日間培養した後、CHCl₃-MeOH (1:1) の混合溶媒で抽出し、粗抽出物 18 g を得た。粗抽出物をそれぞれ約 350mL の n-ヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、アセトンおよびメタノールの順に固液抽出を行った。各抽出液について *A. fumigatus* に対する抗真菌活性を調べた結果、活性は主に n-ヘキサンおよびベンゼン抽出液に認められた。そこで、両抽出液を合わせ、濃縮した後、*A. fumigatus* に対する抗菌活性を指標にして、シリカゲルクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、無色針状晶 (mp 157-8°C) として新規化合物 32 を 315 mg (ジエチルエーテルより再結晶)、32 の前分画から化合物 33 12 mg (アセトンより再結晶) を得た。化合物 32 および 33 はベンゼン、塩化メチレン、アセトン、メタノールなどの有機溶媒には易溶性であるが、水には不溶性であった (Fig. 14)。

化合物 32 は、CI-MS および HREI-MS から分子式を C₁₈H₂₂O₆ と決定した。化合物 32 は、IR スペクトルで、1770 cm⁻¹ および 1840 cm⁻¹ に無水カルボン酸に特徴的な吸収が認められ、さらに 3450 cm⁻¹ に OH 基による吸収が認められたことから、マレイン酸無水物構造およびその一つのカルボニルが還元された構造の存在が示唆された。さらに ¹H-¹H COSY および HMBC 等の各種二次元スペクトルの解析から、32 はエチル基とプロピル基を側鎖に有する九員環を基本骨格とする新規 nonadride であると推定した。化合物 33 は、CI-MS および HREI-MS から分子式 C₁₈H₂₂O₅ と決定した。化合物 33 は、¹H-, ¹³C-NMR スペクトル、¹H-¹H COSY および HMBC 等の二次元スペクトルの解析とそれらの 32 との比較から、32 の 12-dehydroxy 誘導体であると推定した。化合物 33 の X線結晶解析の結果もこれを支持した (Fig. 17)。さらに化合物 32 を NaBH₄ で還元後、PCC 酸化を行ったところ、得られた生成物は CD スペクトルを含めた各種機器データが 33 と完全に一致したことから、33 の絶対配置を含めた立体化学は 32 と同一であることが明らかとなった。

化合物 32 を PCC で処理した酸化体 34 は、各種機器データの詳細な検討から *Helminthosporium heveae* PETCH (*Bipolaris heveae* CBS 241.93) から既に単離され、平面構造のみが決定している heveadride (35) の 8 位あるいは 9 位の立体化学が異なるエピマー体であると推定した。そこで、35 について、9 位のエピマー化反応を行なったところ、天然品 34 と同じ(-)の符号をもつ 34 が生成した (Fig. 18)。この結果から、34 は 35 の 9-エピマー体であると決定し、epiheveadride と命名した。したがって今回分離した活性本体である 32 は 34 のジヒドロ体であることから、本化合物を dihydroepiheveadride と命名した。

次に heveadride (35) の 4-bromoaniline 誘導体 (36c) について、X 線結晶解析を行なった結果、化合物 36c の絶対構造は 8 位が *R* 配置、9 位が *S* 配置であることが確認された。したがって、heveadride (35) の絶対構造は 8 位が *R* 配置、9 位が *S* 配置と決定した。さらに heveadride (35) の 9 位が *S* 配置であることから、9-エピマー体である epiheveadride (34) は 32 および 33 も含めて 9 位が *R* 配置であり、これらの絶対構造は Fig. 14 の通りに決定した。また、それぞれの化合物の化学的な関連性については、Chart 11 にまとめた。

化合物 32・35 および 32 のメチル化体 38 (Chart 12) について、抗真菌活性試験を行なった。各化合物は水に不溶性であったため、NCCLS 法を適用することが出来なかったため、抗真菌活性試験はペーパーディスク法で行ない、その結果を Table 12 にまとめた。Dihydroepiheveadride (32) は、深在性真菌症の原因菌である *A. fumigatus*, *Penicillium marneffeii* や皮膚糸状菌である *Trichophyton rubrum* および *Trichophyton mentagrophytes* のような病原性真菌を含むさまざまな糸状菌に対して、濃度 5 µg/disc で抗真菌作用を示した。化合物 32 の抗酵母作用は濃度 5 µg/disc で *Trichosporon asahii* および *Trichosporon asteroides* の 2 菌株に認められたが、それ以外の *C. albicans* や *Cry. neoformans* のような病原性酵母には認められなかった。一方、32 は濃度 100 µg/disc で数種の *Candida* 属 (*C. albicans*, *C. krusei*) および *Cry. neoformans* の発育を阻害した。しかしながら、32 はいくつかの *Candida* 属 (*C. glabrata* および *C. tropicalis*) および黒色糸状菌 (*Fonsecaea pedrosoi* および *Phialophora verrucosa*) には発育阻害活性を示さなかった。化合物 34 および 35 の濃度 5 µg/disc での糸状菌に対する抗菌スペクトルは、32 と似ているが、その活性は全体的に弱かった。また、酵母に対して化合物 32 および 34 は、5 µg/disc では抗酵母作用が認められなかったが、100 µg/disc で互いに同様の抗菌スペクトルを示し、34 の抗真菌活性は 32 に対して相対的に弱かった。一方、35 は *Cry. neoformans* のみに抗酵母作用が認められた。

グラム陽性菌 *Bacillus subtilis* およびグラム陰性菌 *Escherichia coli* に対する抗菌性は、いずれの化合物にも認められなかった。

これらの結果から、nonadrinide 構造における抗真菌活性は 8 位および 9 位の側鎖の立体化学の違いよりも 12 位のカルボニル基の還元によるヘミアセタール構造のほうが強く関与していると考えられた。次に 32 の 12 位の水酸基をメチル化した 38 の抗真菌活性は 32 と比べて著しく低下した。このことから、強い抗真菌性の発現には水酸基が遊離の状態である必要が考えられた。

Nonadrinide 類は、1965 年に担子菌 *Byssosclamyces fulva* から (+)-byssosclamic acid が単離・構造決定されたのが最初の例である。以降、十数種の nonadrinide 類が自然界から分離されているが、dihydroepihevadrinide (32) のように部分的に還元された nonadrinide については *Penicillium rubrum* から nonadrinide としての主成分 rubratoxin B とともに分離された rubratoxin A の 1 例のみであり、dihydroepihevadrinide (32) は 2 番目の例である。

Nonadrinide 類の生理活性については、マイコトキシン、ファイトトキシン等の報告があるが、各活性の作用機序についての報告はない。また、最近になって ras farnesyl transferase および squalene synthase に対して顕著な阻害活性を示す CP-263,917 および CP-263,114 が単離された。この報告は、nonadrinide 類の生理活性作用が医薬品開発のリード化合物になりうる可能性を示しており、今回得られた dihydroepihevadrinide (32) についても詳細な作用機序の解明により新規深在性真菌症治療薬の開発に寄与できると考える。

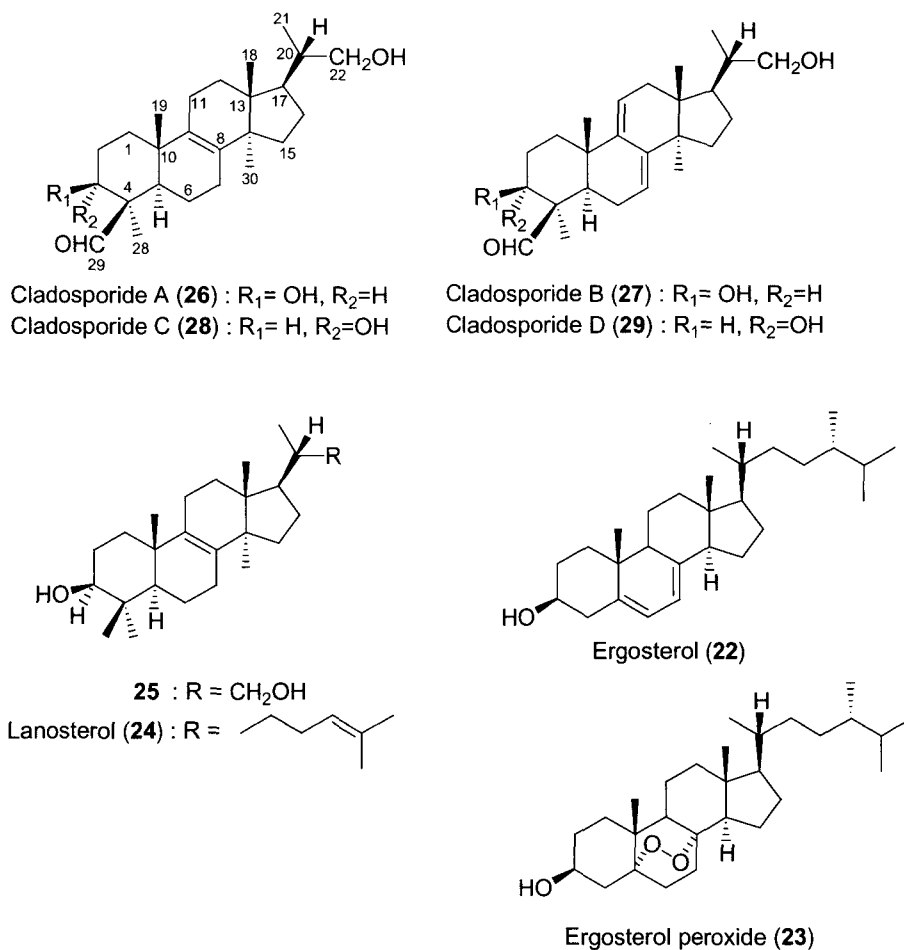


Fig. 4 Chemical Structures of Cladosporide A - D and Their Related Compounds

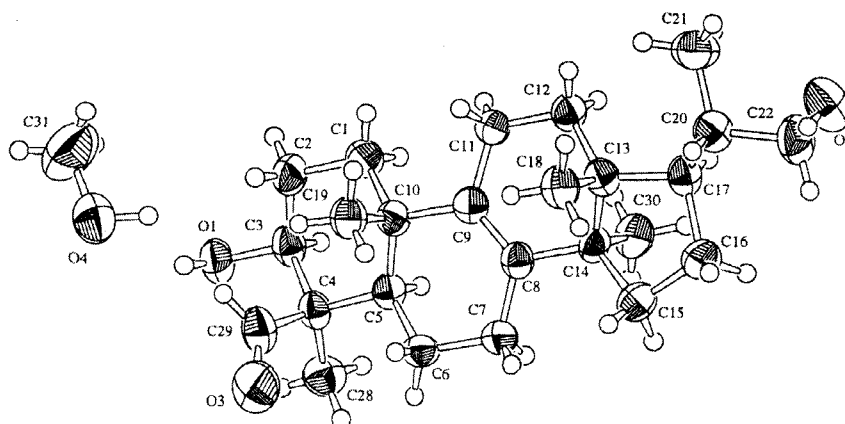


Fig. 8. Perspective View of the Crystal Structure of Cladosporide A (**26**)
 Methanol Solvate with Thermal Ellipsoids at 30 % Possibility

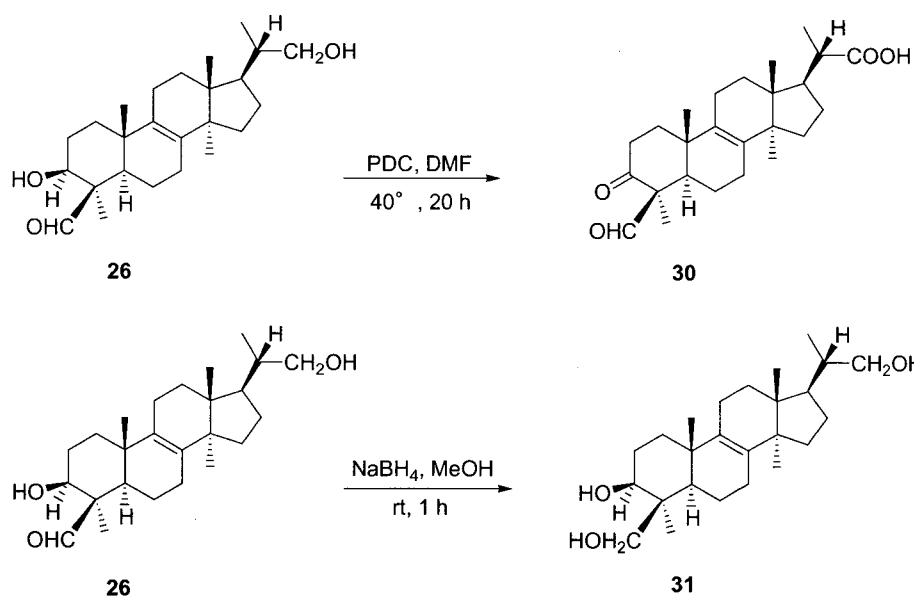


Chart 4.

Table 8. Antifungal Activity of Compounds 25-31

Compound ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	25	26	27	28	29	30	31
100	—	15	17	—	—	±	10
50	—	15	16	—	—	—	9
25	—	15	14	—	—	—	±
12.5	—	13	13	—	—	—	—
6	—	13	13	—	—	—	—
3	—	11	12	—	—	—	—
1.5	—	—	11	—	—	—	—

The diameter of inhibition circle was indicated on mm.

All of Compounds showed no activity for *A. niger*, *C. albicans* and *Cry. neoformans*.

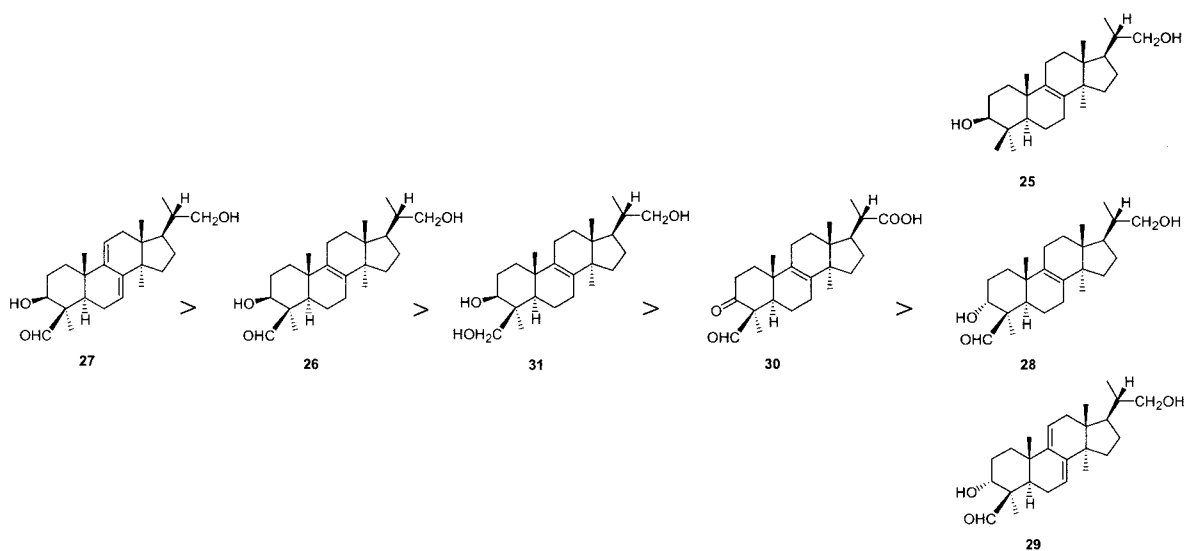


Chart 5.

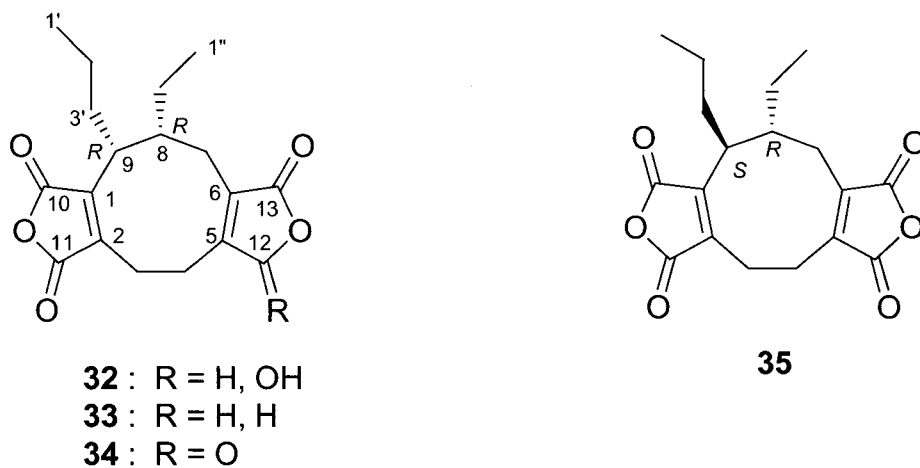


Fig. 14. Chemical Structures of Compounds 32 -35

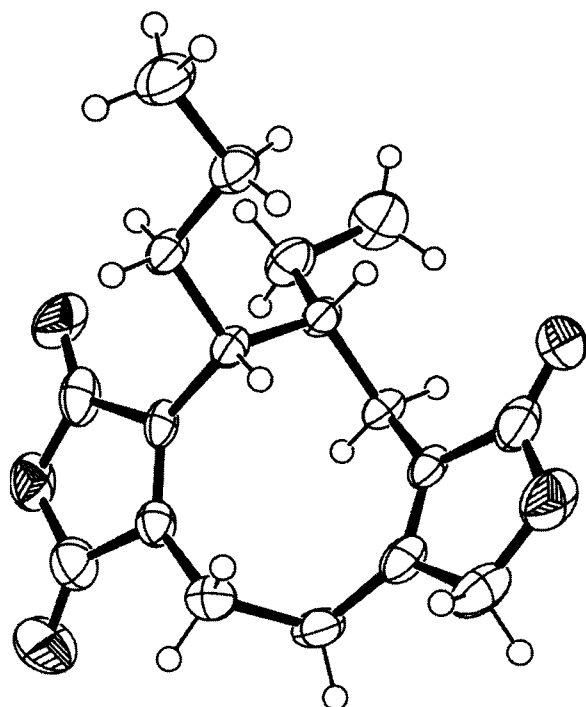


Fig. 17. Perspective View of the Crystal Structure of 32
with Thermal Ellipsoids at 50 % Possibility

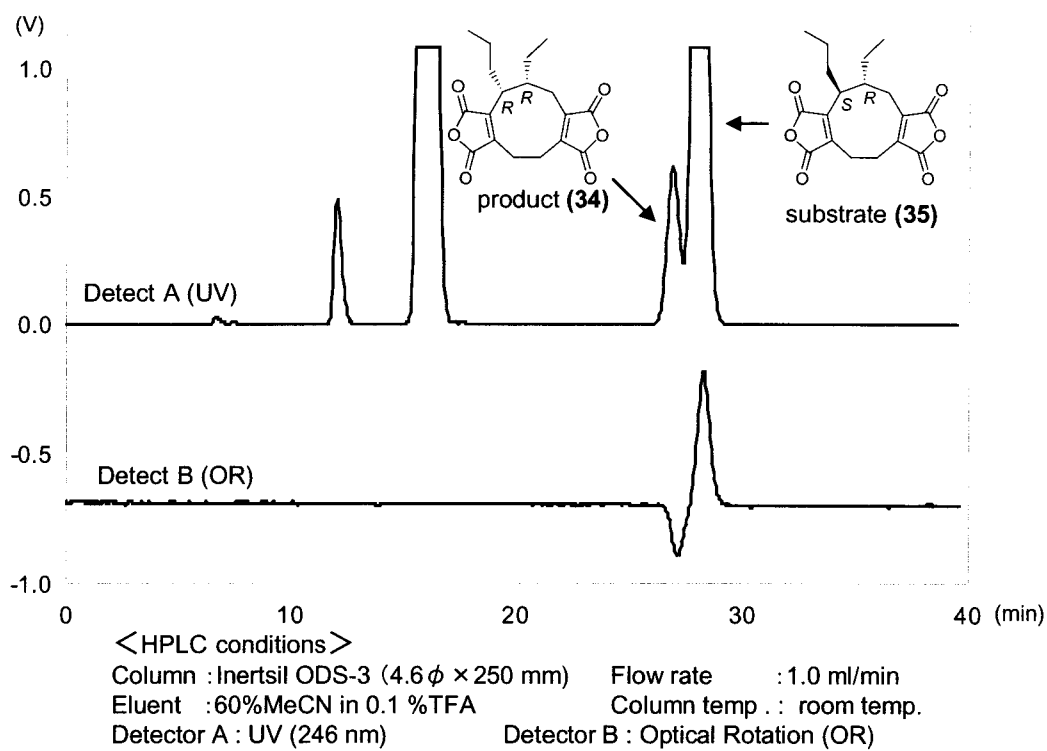


Fig. 18. HPLC Chromatogram for Epimerization of Heveadride (35)

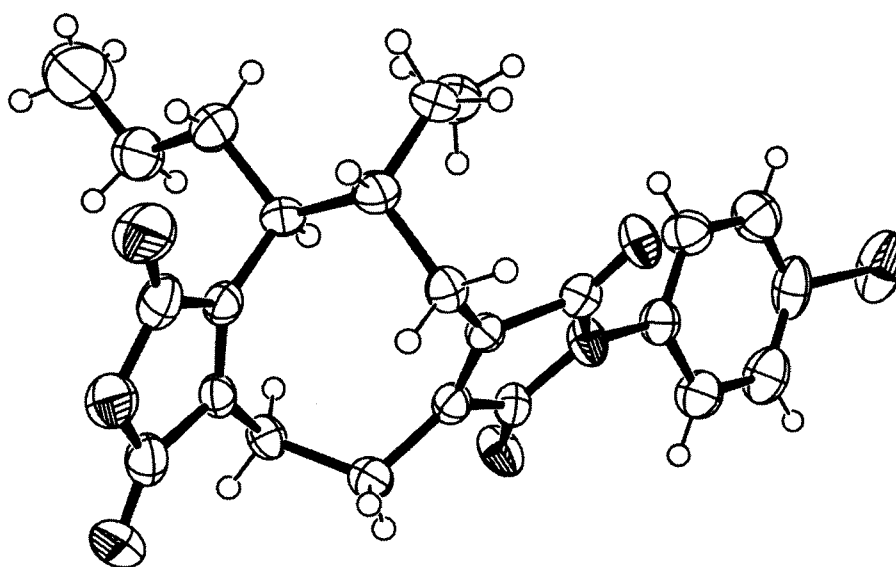


Fig. 19. Perspective View of the Crystal Structure of 36c
with Thermal Ellipsoids at 50 % Possibility

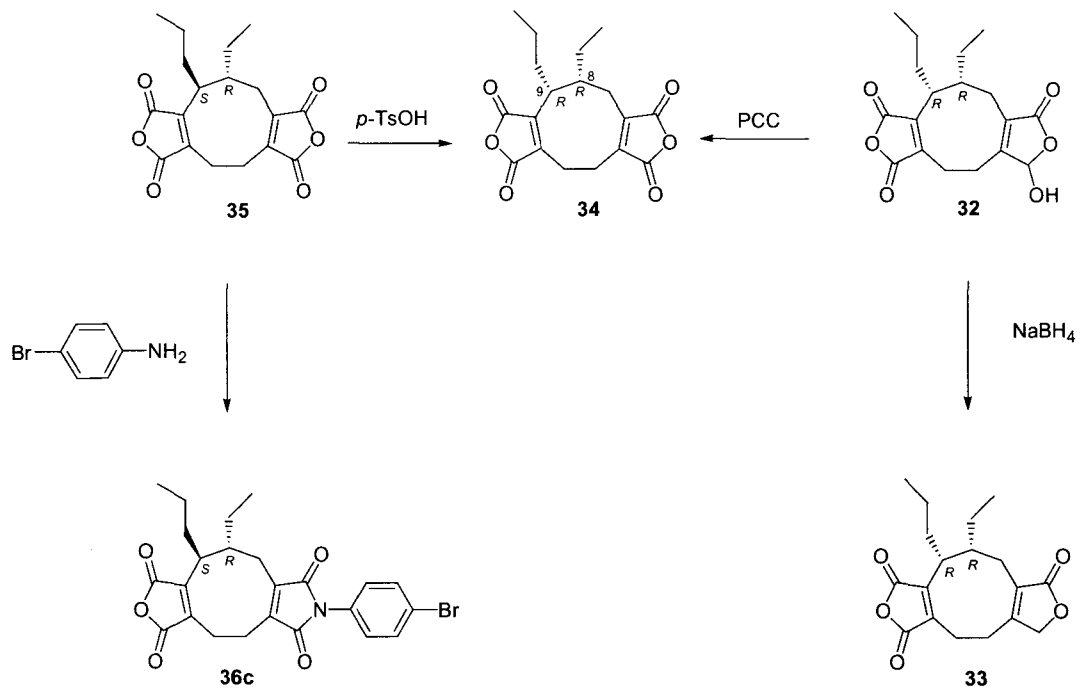


Chart 11.

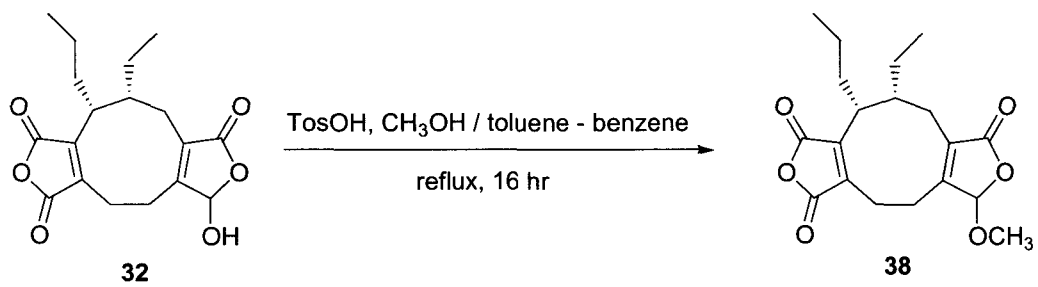


Chart 12.

Table 12. Antimicrobial Activities of Compounds 32-35 and 38

Microorganisms	Diameter of Inhibition Zone (mm)					
	32		34		35	
	5 μ g	100 μ g	5 μ g	100 μ g	5 μ g	100 μ g
<Filamentous fungi>						
<i>Arthroderma benhamiae</i> IFM 41160	20		10		9	
<i>Aspergillus flavus</i> IFM 41935	26		—		—	
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 41243	20		—		—	
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 41362	20		—		—	
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 47078	23		—		—	
<i>Aspergillus niger</i> IFM 41398	21		—		—	
<i>Cladophialophora carrionii</i> IFM 4808	—	26	—	—	—	—
<i>Emericella nidulans</i> IFM 46997	24		—		—	
<i>Epidermophyton floccosum</i> IFM 46637	13		9		8	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> IFM 4887		—		—		—
<i>Fusarium oxysporum</i> IFM 53787	10		—		—	
<i>Fusarium solani</i> IFM 52712	12		9		9	
<i>Microsporum canis</i> IFM 45108	25		10		9	
<i>Penicillium marneffeii</i> IFM 52703	21		—		—	
<i>Penicillium marneffeii</i> IFM 52697	11		—		—	
<i>Phialophora verrucosa</i> IFM 4928		—		—		—
<i>Scedosporium apiospermum</i> IFM 52028	17		11		11	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFM 40951	30		12		12	
<i>Trichophyton raubitschekii</i> IFM 45579	20		12		8	
<i>Trichophyton rubrum</i> IFM 45802	17		13		11	
<i>Trichophyton tonsurans</i> IFM 5275	28		12		9	
<i>Trichophyton verrucosum</i> IFM 46798	10		—		—	
<i>Trichophyton violaceum</i> IFM 46913	25		16		13	
<Yeasts>						
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	—	16	—	15	—	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	—	19	—	19	—	—
<i>Candida glabrata</i> IFM 40217	—	—	—	—	—	—
<i>Candida guilliermondii</i> IFM 46823	—	8	—	—	—	—
<i>Candida kefir</i> IFM 46921	—	12	—	8	—	—
<i>Candida krusei</i> IFM 46834	—	15	—	—	—	—
<i>Candida parapsilosis</i> IFM 46863	—	—	—	—	—	—
<i>Candida tropicalis</i> IFM 46816	—	—	—	—	—	—
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112	—	14	—	11	—	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFM 40210	—	20	—	—	—	—
<i>Pichia anomala</i> IFM 53788	—	—	—	—	—	—
<i>Trichosporon asahii</i> IFM 48429	15		10		—	
<i>Trichosporon asteroides</i> IFM 48608	10		—		—	
<Bacteria>						
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> B	—	—	—	—	—	—

Paper disc (i. d. 6 mm) was used.

The minus (-) means no inhibition.

Compounds 33 and 38 were shown no antimicrobial activities.

論文審査の結果の要旨

申請者は、深在性真菌症の中でも近年増加傾向にあるアスペルギルス症の主な原因菌である *Aspergillus fumigatus* に対して特異的に抗真菌作用を有する新規化合物を求めて、南米土壌を中心とした新規分離菌株について抗菌スクリーニングを行なった結果、*Cladosporium* 属菌 IFM 49189 株及び未同定真菌 IFM52672 株のエキスの抗 *A. fumigatus* 活性に着目し、その成分検索を行った。

南米土壌から分離した *Cladosporium* 属菌 IFM 49189 株を米培地で培養した後、 CH_2Cl_2 -EtOH (1:1) で抽出を行い、得られた残渣を水と CHCl_3 で液液分配を行って、抽出エキスを得た。本エキスについて抗真菌活性を指標にしながらカラムクロマトグラフィー等で分離・精製し、23,24,25,26,27-pentanorlanost-8-ene-3 β , 22-diol とともに同様の pentanorlanostane 骨格を有する新規化合物 cladosporide A、B、C 及び D を単離した。Cladosporide A の化学構造は、NMR を中心とした各種機器スペクトルの詳細な解析と cladosporide A-MeOH 溶媒和物の X 線結晶解析の結果から、4 β 位にアルデヒドを持つ pentanorlanostane 誘導体であると決定した。Cladosporide B、C 及び D の化学構造は、cladosporide A と各種機器データを詳細に比較検討することにより決定した。これらの cladosporide 類は 4 β -ホルミル基を有する化合物であり、cladosporide A と cladosporide C、cladosporide B と cladosporide D は互いに 3 位の水酸基の立体配置が異なる diastereomer である。これら及び cladosporide A から誘導した酸化体、還元体について抗真菌活性試験を行なった結果、試験菌として使用した糸状菌や酵母の中で、cladosporide A と cladosporide B のみが *A. fumigatus* に対して特異的に強い抗真菌活性を示した。その結果、これら pentanorlanostane 誘導体では 4 β -CHO 基及び 3- β -OH 基を有することが抗真菌活性の強さに強く関係しており、8-ene より 7,9(11)-diene のほうが若干強い抗真菌活性を示すことがわかった。

Cladosporide A は 4 β -メチル基がホルミル基に酸化された pentanorlanostane 誘導体の初めての例であり、*A. fumigatus* に対して特異的な抗真菌活性を示す Mer-NF8054A と同じステロイド様化合物であることは興味深い。

一方、未同定真菌 IFM 52672 株の米培養エキスについては、各種クロマトグラフィーを駆使して、分離・精製を繰り返した結果、新規 nonadride である抗真菌性物質 dihydroepiheveadride とその 12-dehydroxy 誘導体を単離した。これらの平面構造は IR、MS スペクトル及び ^1H - ^1H COSY、HMBC 等の各種二次元スペクトルの解析、また 12-dehydroxy 体の X 線結晶解析の結果から、エチル基とプロ

ピル基を側鎖に有する九員環を基本骨格とする新規 nonadride であると決定した。さらに dihydroepiheveadride の NaBH_4 還元後 PCC 酸化によって得られた生成物が CD スペクトルを含めて 12-dehydroxy 体と一致したことから、両者の立体化学は絶対配置を含めて同一であると決定した。

Dihydroepiheveadride を PCC 酸化で生成した epiheveadride は、既に *Helminthosporium heveae* から単離され、平面構造のみが決定している heveadride の 8 位あるいは 9 位の立体化学が異なる立体異性体であることがわかった。そこで、これら一連の nonadride の立体化学を決定するために、heveadride の 9 位の異性化反応を行なったところ、天然と同一の旋光性を有する epiheveadride が得られた。これまでに 2 つのアルキル側鎖を隣接炭素上に持つ nonadride は、前述の heveadride のほか、地衣類 *Cladonia polycarpoides* から homoheveadride が単離されているが、それらの側鎖の立体化学はいずれも未定のままであった。今回、heveadride の 4-bromoaniline 誘導体の X 線結晶解析の結果、dihydroepiheveadride、heveadride 等一連の nonadride 類の立体化学および絶対配置を明らかにすることができた。

Dihydroepiheveadride のように部分的に還元された nonadride の単離例は *Penicillium rubrum* から主成分 rubratoxin B とともに分離された rubratoxin A のみであり、dihydroepiheveadride は 2 番目の例である。Dihydroepiheveadride はアスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus* 属菌や *Trichophyton mentagrophytes* などの皮膚糸状菌を含む糸状真菌類に対して特異的に抗菌性を示すことが明らかとなり、その抗菌活性は静菌的であることが阻止円の観察から示唆された。また、抗真菌作用については、得られた関連化合物や化学変換で生成した化合物の抗真菌活性の比較から、dihydroepiheveadride のような nonadride 類の抗真菌活性の発現にはヘミアセタール構造が強く関与していることが示唆された。

以上の研究内容から、本論文は、学位論文として充分評価しうるものであり、博士（薬学）の学位を授与するに値するものであると認める。