

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 26 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790129

研究課題名(和文)同種移植血管の抗菌機序とその保存方法に関する研究

研究課題名(英文)Antimicrobial effect of allograft and development of its preservation

研究代表者

中南 秀将(Nakaminami, Hidemasa)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20548515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、感染性心内膜炎患者の外科的治療で使用されている同種生体弁(allograft)の抗菌活性機序が、tryptophan代謝物質であることを明らかにした。また、凍結保存したallograftは、非凍結allograftと同等かそれ以上の抗菌活性を有することを明らかにした。さらに、試験管内の実験において、摘出組織の細菌汚染をより効果的に予防できる新たな抗菌薬カクテルの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I demonstrated that the mechanism of antimicrobial activity in allograft, which has been used in surgical therapy for the patients with infectious endocarditis, is the tryptophan metabolites. Additionally, I demonstrated that the cryopreserved allograft has the same or more antimicrobial activity than the fresh allograft. Furthermore, development of the brand new antimicrobial cocktail, which was able to prevent the bacterial contamination of allograft more effective than traditional one, was carried out in vitro experiment successfully.

研究分野：病原微生物学

キーワード：Allograft 感染性心内膜炎 抗菌薬カクテル

1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は、心臓弁や心内膜に細菌や真菌が附着・増殖し、弁破壊や塞栓症により全身性の合併症をきたす重篤な疾患である。主な原因菌としては、*Staphylococcus* 属などのグラム陽性球菌が大部分を占める。特に、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は、感染性心内膜炎の原因菌として増加傾向にある。*S. aureus* は、種々の毒素を産生することにより、感染性心内膜炎を重症化しやすい。感染性心内膜炎の主な治療法として、外科的な弁置換術が行われている。しかし、人工弁移植後の患者は、院内感染で問題となっている methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) による感染性心内膜炎に罹患しやすく、重症化する特徴がある。

置換弁には、機械弁や異種生体弁、心停止下のドナーから摘出された組織 (allograft) の同種生体弁が用いられる。機械弁は感染症の発症率が高く、人工弁置換後の心内膜炎は極めて予後不良である。一方、allograft は感染症発症率が低く、感染症に対して抵抗性が強い。さらに、allograft の繊維芽細胞を生存させたまま液体窒素に保存する凍結保存法が確立されて以降は、その耐久性が飛躍的に向上し、利用価値が高まった。研究協力者の齋藤らは、非凍結保存 allograft が MRSA の増殖抑制効果を有することを明らかにしている。しかし、凍結保存された allograft による MRSA の増殖抑制効果は明らかとなっていない。

当研究室では、これまでに、allograft が抗菌活性を示す理由の一つが kynurenine (Kyn) 経路代謝物質であることを見出した。Kyn 経路は生体防御機構の一つであり、IFN- γ の産生に伴い誘導された indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) により tryptophan (Trp) を Kyn へと代謝する経路である。IDO は Trp の代謝分解を介した T 細胞の増殖抑制、および Trp 代謝物質の作用により、免疫寛容を誘導する重要な因子である。また、Trp 代謝物質は細菌感染を軽減させる作用が知られているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

心臓弁や血管などの組織移植は、臓器移植法の適応がないため、本邦では組織提供者が少ない。そのため、提供された allograft は非常に貴重であり、安定に保存することが重要である。しかし、ドナーから摘出した allograft は細菌汚染されていることが少なくない。細菌汚染された allograft は廃棄するしかないため、遺体から摘出した組織は、4種の抗菌薬を含有する細胞培養液を使用して、4℃で24~48時間浸漬される。その後、摘出組織はプログラムフリーザーで凍結後、液体窒素タンクに保存される。しかし、現行の抗菌薬カクテル (cefmetazole, vancomycin, lincomycin, polymixin B) では、雑菌の検出を完全に抑えられていないのが現状であ

る。また、この抗菌薬カクテルの組成は40年以上変わっておらず、微生物学および薬学的な観点から評価すると、その有効性は極めて低いと考えられる。

2. 研究の目的

感染性心内膜炎患者の外科的治療で使用されている同種生体弁 allograft は、それ自身が抗菌活性を有することが知られている。しかし、その抗菌活性機序は明らかとなっておらず、凍結保存された allograft が抗菌活性を保持しているかは不明である。また、凍結保存する前の allograft は、4種の抗菌薬混合溶液 (抗菌薬カクテル) によって洗浄・殺菌されているが、雑菌の検出を完全に抑えられていないのが現状である。そこで、本研究では、凍結 allograft の抗菌活性の有無を明らかにし、allograft の抗菌活性機序を明らかにする。さらに、摘出組織の細菌汚染をより効果的に予防できる新たな抗菌薬カクテルを開発する

3. 研究の方法

(1) Allograft 抽出液の調整

Allograft は、研究協力施設 (東京大学医学部附属病院・心臓外科) より提供を受けた。非凍結または凍結したラットの胸部大動脈を別のラットの腹部大動脈に移植し、1週間後に摘出する群と2週間後に摘出する群に分けた。さらに、それぞれの群を凍結群、非凍結群に分けた。Negative control として、移植していないラットの胸部大動脈を使用した。

(2) 抗菌活性の測定

対象菌株として、MRSA の代表的な菌株である N315 株を使用した。各種 allograft 抽出液と菌液を混合培養し、一定時間経過毎に反応液を採取し、抗菌活性を測定した。

(3) Trp 代謝物質の抗菌活性の測定

MRSA に対する Trp 代謝物質の抗菌活性は、最小発育阻止濃度 (MIC) から判定した。Trp 代謝物質として L-kynurenine、3-hydroxy-DL-kynurenine、anthranilic acid、3-hydroxyanthranilic acid、quinolinic acid、および γ -picolinic acid を使用した。

(4) Chequerboard titrations 法による Trp 代謝物質の相乗効果の測定

Trp 代謝物質同士の相加相乗効果について、fractional inhibitory concentration (FIC) index を算出し、判定した。

(5) Trp 代謝物質の細胞侵入性の研究²⁾

細胞侵入性は gentamicin protection assay を改良して測定した。

(6) 抗菌薬カクテルの開発

1) 使用した菌株

菌株は、摘出組織汚染で特に問題となる *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*、多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、*Bacillus subtilis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus aureus*、MRSA、*Enterococcus faecalis*、*Streptococcus pyogenes*、*Propionibacterium acnes* を使用した。

2) 使用した薬剤

-ラクタム系抗菌薬、カルバペネム系抗菌薬、グリコペプチド抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬、マクロライド系抗菌薬、リンコマイシン系抗菌薬、テトラサイクリン系抗菌薬、ニューキノロン抗菌薬、ポリペプチド系抗菌薬、サルファ剤を用いた。

3) 残存菌数の測定

試験菌株を各種抗菌薬を含有した液体培地に接種した。4 で 24 時間および 48 時間放置した後、寒天培地に塗布し、35、24 時間培養し、残存菌数を測定した。

4) 抗菌薬の組合せの検討

抗菌薬の各菌種に対する抗微生物活性を MIC、最小殺菌濃度 (MBC) から判定した。さらに、抗菌薬同士の相加相乗効果について、FIC index、fractional bactericidal concentration (FBC) index を算出し、判定した。

5) 抗菌薬カクテルの殺菌作用の測定

抗菌薬カクテルを含有した細胞培養溶液に菌液を接種し、4 で 24 時間浸漬した。浸漬後、寒天培地に塗布し、35、24 時間培養し、殺菌作用を測定した。

4. 研究成果

凍結保存された allograft の抗微生物活性を測定した結果、凍結 allograft は非凍結 allograft と同程度の MRSA 増殖抑制効果を示した ($P=0.99$)。さらに、移植 2 週間後においては、非凍結、凍結 allograft との間で MRSA 増殖抑制効果に大きな差は認められなかったが ($P=0.99$)、移植 1 週間後においては、凍結 allograft は非凍結 allograft よりも、MRSA 増殖抑制効果が高い傾向が認められた ($P=0.05$)。したがって、凍結 allograft は非凍結 allograft と同等かそれ以上の MRSA 増殖抑制効果を有することを明らかにした。

各種 Trp 代謝物質の抗微生物活性を微量液体希釈法により測定した結果、MRSA に対する MIC は、3-hydroxy-DL-kynurenine が 256 $\mu\text{g/ml}$ であり、その他の Trp 代謝物質は 1024 $\mu\text{g/ml}$ であった。したがって、Trp 代謝物質のうち、3-hydroxy-DL-kynurenine の抗 MRSA 活性が高いことが明らかとなった。

Chequerboard titrations 法により Trp 代謝物質の相乗効果を測定するために、MIC が最も低かった 3-hydroxy-DL-kynurenine とその他の Trp 代謝物質の 2 剤を組み合わせた MIC を測定し、FIC index を算出した。その結果、-picolinic acid は FIC index >0.5 であり相加効果が認められた。しかし、その他 L-kynurenine、anthranilic acid、3-hydroxyanthranilic acid および quinolinic acid については FIC index >1 であり、不関であった。

Trp 代謝物質の MRSA に対する細胞内侵入抑制効果について研究した。その結果、各種 Trp 代謝物質のうち、高濃度 (1000 $\mu\text{g/ml}$) の 3-hydroxy-DL-kynurenine ($P<0.0001$) および -picolinic acid ($P<0.0001$) において、MRSA の細胞侵入抑制効果が認められた。そこで、MRSA に対する MIC が最も低かった 3-hydroxy-DL-kynurenine と他の Trp 代謝物質との 2 剤をそれぞれ低濃度 (100 $\mu\text{g/ml}$) で組み合わせ、細胞侵入試験を行った。その結果、anthranilic acid ($P=0.012$)、3-hydroxyanthranilic acid ($P<0.0001$) および -picolinic acid ($P<0.0001$) との組み合わせにおいて、MRSA の細胞侵入抑制効果が認められた。

移植組織の細菌汚染を防ぐ新しい抗菌薬カクテルを開発するために、摘出組織汚染原因菌種に対する各種抗菌薬の 4 での殺菌作用を測定した。その結果、gentamicin、levofloxacin、sitafloxacin、lincomycin、minocycline、daptomycin が高い有効性を示した。特に、daptomycin は感染性心内膜炎の重要な起因菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に優れた殺菌活性を示した。そこで、daptomycin を中心とした抗菌薬 2 剤併用時の殺菌効果を測定した結果、gentamicin および sitafloxacin 併用時に高い殺菌作用が認められた。以上の結果から、実際の臨床応用を踏まえて、注射用の医薬品として市販されている daptomycin、gentamicin、levofloxacin を新規移植組織保存抗菌薬カクテル候補とした。各濃度を 200 $\mu\text{g/ml}$ として殺菌効果を測定した結果、 10^4 CFU/ml の *Enterococcus faecalis* を検出限界値以下に減少させることができた。さらに、他の菌種についても同様の結果が得られた。一方、*Enterococcus faecium* については、levofloxacin の濃度を 2,000 $\mu\text{g/ml}$ とすることによって、 10^2 CFU/ml の菌数を検出限界以下に減少させることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

中南秀将、田島美沙、笹津備規、野口雅久、移植後組織による MRSA の増殖および細胞内侵入抑制効果、第 24 回微生物シンポジウム、

2012年9月、大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中南 秀将 (NAKAMINAMI, Hidemasa)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20548515