

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791318

研究課題名(和文) カブトムシから単離・改変された抗菌ペプチドによる人工血管感染制御

研究課題名(英文) Protective effect of antimicrobial peptides based on the beetle defensins on Artificial blood vessel infection

研究代表者

名知 祥 (NACHI SHO)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30452155

研究成果の概要(和文)：

臨床的な敗血症・腹膜炎モデルである盲腸穿刺腹膜炎(CLP)マウスモデルを作成し、抗菌ペプチドを投与する事で治療効果を検討した。そのまま閉創する群(control群)と抗菌ペプチドを腹腔内投与してから閉創する群(peptide群)を作成したところ、Peptide群は有意に生存日数が延び、IL-6、TNF- $\alpha$ 、血中エンドトキシン値も低値であった。以上から抗菌ペプチドは、CLPモデルへの投与で有意に生存日数を延ばすだけでなく、炎症反応も抑え治療効果があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

The Cecal ligation and puncture (CLP) model is a clinical septicemic and infection model. We gave antimicrobial peptide and examined effect of treatment on CLP model. Control group was CLP control group. Peptide group was injected intraperitoneally with antimicrobial peptides before closing the abdomen. In the peptide group, the survival days were significantly prolonged as compared with control group. IL-6 and TNF- $\alpha$  and endotoxin levels were low level in the peptide group than the control group. Thus, not only we significantly prolonged the survival days by the administration to CLP model, but also the antimicrobial peptide controlled inflammatory reaction, and there was thought to be effect of treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：外科学、救急医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：外科、感染制御、抗菌ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

人工血管感染は人工血管を使用する全手

術の0.9～5%を占める比較的希な合併症であるが、その予後は非常に不良である。人工血

管感染に対する治療は感染人工血管除去、非解剖学的バイパスが原則で、抗生剤投与、洗浄などの追加治療が行われるが、感染の起炎菌も多種にわたり難治性である。

一方、昆虫の持つ生体防御機構の一つであるディフェンシンと呼ばれる抗菌性蛋白質を利用する研究が進められているが、中でもカブトムシから単離・改変された抗菌ペプチドは広い抗菌スペクトルを持ち、細胞毒性も持たない事が報告されている。作用機序から耐性菌を生じる事も無く、現在使用されている各種抗生剤に変わる感染症の治療手段として臨床応用が期待されている。

難治性である人工血管感染に対する新たな治療法として、このカブトムシから単離・改変された抗菌ペプチドを利用する事に着目した。

## 2. 研究の目的

難治性である人工血管感染防御に対し新たな治療法を開発することである。具体的にはカブトムシ (学名: *Allomirina dihotoma*) およびタイワンカブトムシ (学名: *Oryctes rhinoceros*) から単離・改変された抗菌ペプチドを用いて人工血管感染制御に有用であることの検証を行う。

## 3. 研究の方法

カブトムシから単離・改変された抗菌ペプチドが人工血管感染制御に有用であることを検証するために、以下のステップでの研究を予定した。

(1) 腹膜炎マウスに対する抗菌ペプチドの治療効果

(2) 腹膜炎マウスでの人工血管感染予防効果の検討

(3) 家兎で人工血管移植モデルを作製し、予防効果を検討

(1) 腹膜炎マウスに対する抗菌ペプチドの治療効果

当初の研究計画ではすでに研究報告のある MRSA 腹膜炎マウスモデルを作製する予定であった。しかし、実際の臨床では MRSA 腹膜炎自体の発症も珍しく、発症した患者に対して人工血管置換を行う病態が考えにくい

事から、より臨床的にも可能性の高いモデルとして、敗血症・腹膜炎モデルである盲腸穿刺腹膜炎 (CLP) マウスモデルを作製し抗菌ペプチド (Peptide A (RLYLIRIGRR-NH<sub>2</sub>)、Peptide B (RLRLRIGRR-NH<sub>2</sub>)) を投与する事で治療効果を検討する事とした。

実験方法: マウス (C57BL/6Jjcl) を用いて CLP モデルを作製した。

①エーテル麻酔下に腹部正中切開する。

②回盲弁直下の盲腸を結紮し、針 (18G) で盲腸末端を 2 カ所穿刺する。

③それぞれの穿刺部から腸内容物を一滴圧出し、盲腸を腹腔内へ戻す。

④閉腹する前に Control 群と抗菌ペプチド投与群を作製する。

Control 群: CLP 作成のみ (Group 1)

Peptide A 群: Peptide A を 0.5mg/mice、閉腹前に腹腔内へ投与 (Group 2)

Peptide B 群: Peptide B を 0.5mg/mice、閉腹前に腹腔内へ投与 (Group 3)

⑤閉腹して通常飼育する。

生存日数を調べて抗菌ペプチドの効果を評価した。また、腹膜炎の状態を評価するために 4 時間後に採血を行い、炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ )、エンドトキシンを測定した。

## 4. 研究成果

(1) 腹膜炎マウスに対する抗菌ペプチドの治療効果に対する結果

①24 時間生存率の比較 (Table1)

Control 群 26 匹、Peptide A 群 26 匹、Peptide B 群 28 匹 の 24 時間後生存率を比較したところ、生存率は Control 群 23%、Peptide A 群 81%、Peptide B 群 64%であった。カイ 2 乗検定すると、Control 群に比し

Table 1  
Effect of antimicrobial peptides on survival rate in mice following the CLP procedure at 24 hours after.

Group	Injection of peptide	No. of lethal mice / total number	Survival rate (%)
1	-	6/26	23.1
2	A	21/26	80.8*
3	B	18/28	64.3*

A: RLYLIRIGRR-NH<sub>2</sub>; B: RLRLRIGRR-NH<sub>2</sub>

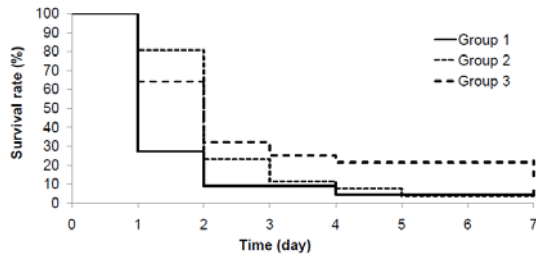
\* P<0.001, when compare to the CLP control group (group 1).

\* P<0.01, when compare to the CLP control group (group 1).

て Peptide A 群 ( $P<0.001$ )、Peptide B 群 ( $P<0.01$ ) ともに有意差があった。Peptide A 群と Peptide B 群には差が無かった。以上より、24 時間生存率において抗菌ペプチドは治療効果があると示唆された。

### ②生存日数 (Fig. 1)

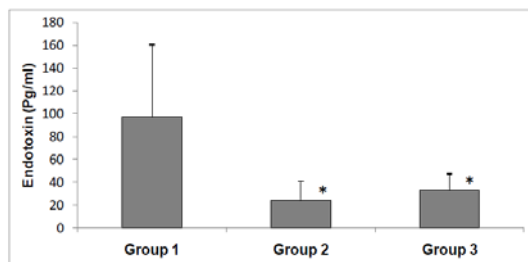
Fig. 1. Survival rate in mice following the CLP procedure over a period of 7 days.



7 日打ち切りで平均生存日数を見てみると、それぞれ Control 群 1.5 日、Peptide A 群 2.31 日、Peptide B 群 2.86 日であった。Log-rank 検定を行うと Control 群に比して、Peptide A 群と Peptide B 群は有意に生存日数が延びていた ( $P<0.01$ )。以上より、生存日数において抗菌ペプチドは治療効果があると示唆された。

### ③CLP モデルに対する感染制御評価

Fig. 2. Effect of antimicrobial peptide on endotoxin levels in mice 4 hours after CLP.



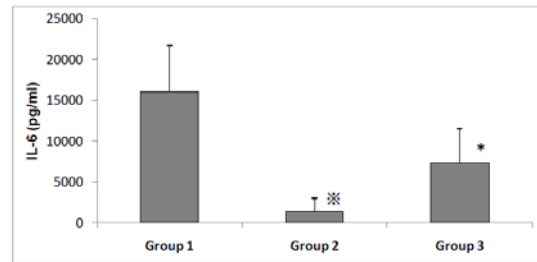
\*  $P<0.05$ , when compare to the CLP control group (group 1).

CLP モデル作製後、4 時間後に採血しエンドトキシンを測定 (各群  $n=7$ , 3 匹分の採血を行った (Fig. 2)。各群の平均は Control 群 97pg/ml、Peptide A 群 24pg/ml、Peptide B 群 32.8pg/ml であり、Control 群に比して、Peptide A 群と Peptide B 群は有意にエンドトキシン量が少なかった ( $P<0.05$ )。

同様に CLP モデル作製 4 時間後に炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- $\alpha$ ) の測定も行った (各群  $n=8$ 、IVC より採血し遠心分離・冷凍

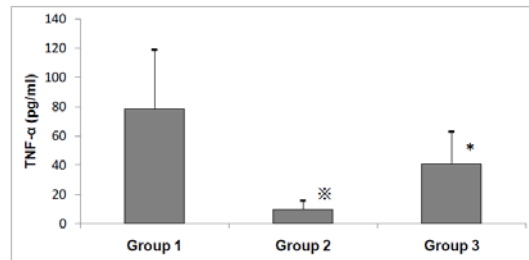
保存した血漿を提出) (Fig. 3、Fig. 4)。

Fig. 3 Effect of antimicrobial peptide on IL-6 production in mice 4 hours after CLP.



※  $P<0.001$ , when compare to the CLP control group (group 1).  
\*  $P<0.01$ , when compare to the CLP control group (group 1).

Fig. 4 Effect of antimicrobial peptide on TNF- $\alpha$  production in mice 4 hours after CLP.



※  $P<0.01$ , when compare to the CLP control group (group 1).  
\*  $P<0.05$ , when compare to the CLP control group (group 1).

IL-6 の平均は Control 群 16032.775pg/ml、Peptide A 群 1325.636pg/ml、Peptide B 群 7273.618pg/ml であり、Control 群に比して、Peptide A 群と Peptide B 群は有意に IL-6 が低値であった (A 群  $P<0.001$ 、B 群  $P<0.01$ )。また、Peptide A 群は Peptide B 群に比しても IL-6 が低値であった。

TNF- $\alpha$  の平均は Control 群 78.28pg/ml、Peptide A 群 9.305pg/ml、Peptide B 群 40.59375pg/ml であり、Control 群に比して、Peptide A 群と Peptide B 群は有意に TNF- $\alpha$  が低値であった (A 群  $P<0.01$ 、B 群  $P<0.05$ )。また、Peptide A 群は Peptide B 群に比しても TNF- $\alpha$  が低値であった。

24 時間後生存率、生存日数、エンドトキシン値、炎症性サイトカイン値は全て Control 群と比較して Peptide 投与群で有意に治療効果がある事が分かった。

Peptide 投与群同士で比較すると、24 時間後の生存率では有意差を認めなかったが、Peptide A 群 81%、Peptide B 群 64% と Peptide A 群の方が高かった。これは、Peptide A 群の方が炎症性サイトカインである IL-6、TNF- $\alpha$  を抑制している事が、24 時間以内の生

存率に影響したのではないかと考えられた。

Kaplan-Meier 生存曲線を見ると、7日後では Peptide B 群の方が Peptide A 群よりも有意差は無いものの生存率が高かった。マウスの腸内細菌群は大腸菌を中心としたグラム陰性桿菌が主体であり、Peptide B 群はグラム陰性桿菌への抗菌活性が強いと言われていた事が影響したと考えられた。

以上より、カプトムシから単離・改変された抗菌ペプチドはマウスの盲腸穿刺腹膜炎モデルに投与すると生存日数を有意に延長し、IL-6・TNF- $\alpha$ ・エンドトキシン値もコントロール群と比較すると低値で治療効果を認めた。

これまで MRSA や緑膿菌といった単独の菌を腹腔内投与した実験での抗菌ペプチドの効果報告はあったが、CLP モデルに対する今回の結果からより臨床的な腹膜炎モデルでも抗菌ペプチドの効果がある事が分かった。

抗菌ペプチドは従来の抗生剤とは違う、感染症治療に対する新たな治療手段として臨床応用が可能であると考えられ、当初の目的である人工血管感染に対する感染予防効果へ臨床応用も可能であると示唆された。

(2) 腹膜炎マウスでの人工血管感染予防効果の検討

(3) 家兎で人工血管移植モデルを作製し、予防効果を検討

研究期間内には成果は出なかったが、上記研究結果を基に現在も研究継続中である。

## 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2件)

① 名知 祥、盲腸穿刺腹膜炎モデルにおけるカプトムシから単離・改変された抗菌ペプチドの効果検討、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 14 日、海峡メッセ下関

② 名知 祥、カプトムシから単離・改変された抗菌ペプチドによる盲腸穿刺腹膜炎モデルにおける治療効果の検討、第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010 年 4 月 9 日、名古屋

屋国際会議場

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

名知 祥 (NACHI SHO)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30452155