

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659801

研究課題名(和文)細菌の鉄獲得機構阻害による静菌効果と臨床応用に向けた試み

研究課題名(英文)Bacteriostatic effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin against clinically identified bacteria

研究代表者

森崎 浩(MORISAKI, HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60182226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)の細菌鉄獲得阻害機能(静菌効果)に着目し、臨床的に問題となる感染症起因菌に対するNGALの静菌効果を検討するため臨床検体より高頻度に単離されるグラム陰性菌の同定調査を行い、大腸菌(E.coli)、肺炎桿菌、エンテロバクター・クロアカエの上位3菌種を同定した。細菌のTuf遺伝子を標的としたreal-time PCR法では、NGAL15 $\mu$ gの添加でE.coliの3時間後の増殖が抑制される傾向を認め、高濃度NGALがE.coliに対して増殖能を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously focused on bacteriostatic effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), known as a biomarker of acute kidney injury, and investigated the interaction between this protein and intestinal microflora. The present study demonstrated that bacteriostatic effects of NGAL against bacteria, which is frequently found in clinical situations. As a result, gram-negative bacteria such as Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Enterobacter cloacae was investigated to examine the bacteriostatic effects of NGAL in vitro. To detect bacterial growth, real-time PCR by using bacteria specific primer was performed. Although 1 mcg NGAL did not prevent the growth of these bacteria in vitro, 15 mcg NGAL tended to inhibit the growth of Escherichia coli, but it did not reach statistically significance. In conclusion, the present study demonstrated that high concentration NGAL might be able to inhibit the growth of Escherichia coli.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：感染症 NGAL 静菌効果

## 1. 研究開始当初の背景

近年、従来の抗菌薬に抵抗性を示す耐性菌の発生・伝播が問題となっている。世界保健機構はこれら耐性菌による細菌感染症を“re-emerging disease”と位置付けた。特に臨床で使用される抗生物質の約70%を占めるラクタム系抗生物質の中で広域スペクトルを持つカルバペネム耐性菌などが問題となる(Clin Ter. 2011;162:e93)。我が国においても多剤耐性緑膿菌(multiple drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*)や多剤耐性アシネトバクター・バウマニ菌(multiple drug-resistant *Acinetobacter baumannii*)及び多剤耐性クレブシエラ肺炎桿菌(multiple drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*)などの多剤耐性グラム陰性菌(multiple drug-resistant Gram negative bacilli)の発生が多数報告され、細菌の薬剤耐性化は進んでいる。これら細菌種は、最も広域スペクトルを持つカルバペネム製剤に対して耐性を示すため、肺炎、敗血症などの致死性の疾患の起因菌となった場合、有効な治療法が存在せず治療が難渋することが懸念されている。一方、neutrophil gelatinase associated lipocalin(NGAL)はほぼ全ての哺乳類が持つ25kDaの糖蛋白で、主に炎症状態で分泌が亢進する。近年の研究でNGALの自然免疫的役割として、細菌が外部の鉄を取り込むために分泌するsiderophoreと高い親和性を持つことが報告され、結果として、細菌の鉄の取り込みを阻害し増殖を抑制することが明らかとなっている(Nature 2004;432:917)。中でも多くのグラム陰性菌が分泌するenterobactin(Ent)と特に高い親和性を示す(Mol cell 2002;10:1033)。事実、Floらは、Entを生産する*Escherichia coli*の増殖をNGALが抑制することを*in vitro*で確認し、さらに*Escherichia coli*腹腔内投与モデルを用いて、NGALが細菌増殖抑制を介して個体の生存時

間を延長させることを示した(Nature 2004;432:917)。また、*Klebsiella*を起因菌とする肺炎において、肺胞上皮細胞よりNGALの発現が亢進することから、NGALは個体の感染防御に重要な役割を果たしていると考えられる(J Immunol 2009;182:4947)。一方、NGALの発現・分泌は炎症反応初期に亢進するものの、感染成立後、長時間経過した場合その発現・分泌は著しく低下することから、感染症後期においては、NGALの静菌作用は減衰しているものと考えられている。(Nature 2004;432:917)。

## 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ本研究では、感染症に対するNGALの静菌効果を検討するために、臨床で感染症起因菌として高頻度で単離される*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Acinetobacter*属等の菌種に対するNGALの静菌作用を探索する。また、近年その拡大が懸念されている耐性菌に対するNGALの効果を検討することを目的とした。同時に*in vivo*の系でNGALの静菌効果を検討し、創薬としての臨床応用への可能性を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床上高頻度で単離される優位菌種の同定

本研究では、臨床上、高頻度で単離される細菌種に対するNGALの静菌効果を探索することを主目的とする。したがって、動物由来では無く、人環境由来の菌種を本実験に用いるため、慶應義塾大学中央検査部の協力の下、臨床上高頻度に単離される細菌種の同定を行う。

### (2) 一般細菌及び耐性菌に対するNGALの静菌作用の検討

各一般細菌及び耐性菌に対するNGALの静

菌作用を探求するため、(1)で同定した高頻度単離菌種に対して、*in vitro*の系で個別に NGAL 添加試験を行う。具体的には、細菌種ごとに、リコンビナント NGAL を数段階の濃度(0、5、10、20、40、80  $\mu\text{M}$ )で添加し液体培地で数時間培養する。その後、それぞれの細菌の可変領域を標的とした細菌特異的プライマーを作成し、real-time PCR 法を用いて増殖率を定量的に解析し、NGAL の細菌増殖抑制効果を検討する。また、NGAL と他の静菌剤(アミノグリコシド等)の併剤使用の効果を探求するため、上記 NGAL 添加試験に静菌剤を加え、同条件で増殖能を評価する。

(3) *In vivo* 腹膜炎惹起敗血症モデルにおける NGAL 静菌作用の探求

*in vivo*での NGAL 静菌作用を探求するため、(1)で同定した細菌種を用いて腹膜炎惹起敗血症モデルを作成した後、個体に対する NGAL の静菌作用及び生存時間解析を行う。具体的には、同定した菌種を健常マウスの腹腔内に投与する。菌投与量は個体の生存時間が 48 時間の時点で 50%程度になるよう調整する。その後、マウスを NGAL 非投与群及び NGAL 投与群の 2 郡に分け、前者には生理食塩水、後者にはリコンビナント NGAL を投与する。腹膜炎惹起後 24 時間の時点で過剰麻酔によりマウスを安楽死させる。次に、両群の腹水及び血液を採取し両検体における細菌増殖率を、real-time PCR 法を用いて評価する。上記実験において NGAL の *in vivo*での静菌作用を確認した後、次の段階として生存時間解析を行う。具体的には、上記の方法にて腹膜炎惹起敗血症モデルを作成、NGAL 投与の有無で 2 郡に分けた後、心拍数モニタリングを行いこれを指標として生存時間解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、臨床上で問題となる感染症起因菌に対する NGAL の静菌効果を検討するた

めに、感染症起因菌種として高頻度で単離される菌種を標的として研究を行った。初年度に当たる平成 24 年度は、医学部倫理委員会承認を得た上で慶應義塾大学病院中央検査部門の協力のもと、臨床で高頻度に単離されるグラム陰性菌の同定調査を行った。結果、高頻度単離菌種は *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Enterobacter cloacae*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Klebsiella oxytoca*、*Enterobacter aerogenes*、*Citrobacter freundii complex*、*Serratia marcescens*、*Proteus mirabilis* の順であった。

平成 25 年度では、同定した細菌種の内、上位 3 菌種である *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae* を標的細菌とし、菌種間の保存性が高いとされるタンパク質伸長因子 Tuf 遺伝子を用いた real-time PCR 法で、NGAL 添加 3 時間後の増殖を定量的に解析した。NGAL 1  $\mu\text{g}$  の添加では *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae* の 3 菌種で対照群(生理食塩水)と比較し、同等程度に増殖し有意な増殖抑制を示さなかった。*Escherichia coli*においては標本数が少なく統計学的有意差を得られなかったものの、15  $\mu\text{g}$  NGAL の添加培養で増殖が抑制される傾向にあった。以上の結果より、本研究では高濃度 NGAL は臨床的に高頻度に単離される *Escherichia coli* に対して増殖能を抑制する可能性が示唆された。

本研究の結果から、臨床上高頻度に単離される細菌種、特に *Escherichia coli* に対して NGAL(15  $\mu\text{g}$ )の添加は、同菌の増殖を抑制する可能性が示唆された。本実験では時間的制約から、今回検討した 3 菌種以外の細菌種及び耐性菌、腹膜炎惹起モデルでの検討を行えなかったものの、多くのグラム陰性菌は enterobactin を利用することにより、鉄を取

り込んだ上で増強する。従って、これら細菌種に対しても NGAL がその静菌効果を発揮する可能性は高く、今後、更なる検討が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

なし

〔学会発表〕(計0件)

なし

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

森崎 浩(Morishaki Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60182226

(2)研究分担者

山田 高成(Yamada Takashige)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20348767