

報道関係各位

2019年 5月 29日

国立大学法人 東京医科歯科大学

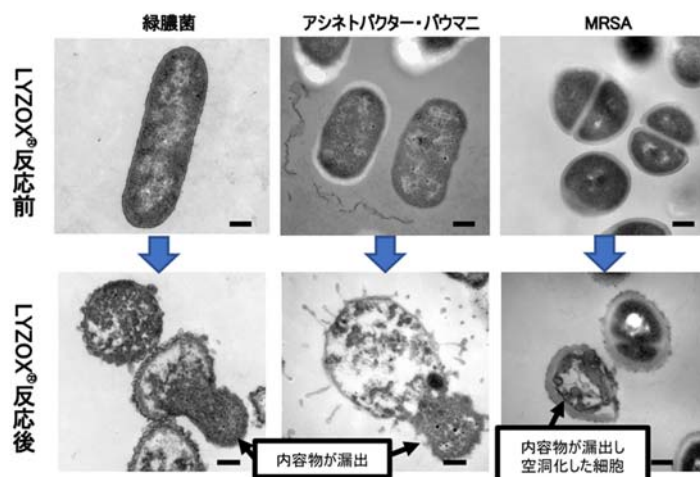
「薬剤耐性化で問題の緑膿菌、アシネトバクター、MRSAに対する新たな抗菌素材を発見」 — 耐性菌による感染症の予防・治療と医療費削減への貢献に期待 —

【ポイント】

- 耐性菌が増加していることが昨今大きな問題になっており、2050年には年間1000万人が耐性菌による感染症で亡くなると推計されています。
- 本研究により、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）と薬剤耐性化が問題となる緑膿菌、アシネトバクターに対するリゾチーム・キトサンオリゴ糖複合体（LYZOX® [リゾックス]）の抗菌効果が明らかになりました。
- 新規の抗生剤開発が停滞している昨今、新たな治療薬としての応用が期待されます。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・統合呼吸器病学分野の齋藤弘明大学院生、宮崎泰成教授の研究グループは、九州大学病院耳鼻咽喉・頭頸部外科の村上大輔講師と和興フィルタテクノロジー株式会社との共同研究で、鶏卵白由来のリゾチーム というタンパクとカニ甲羅由来のキトサンオリゴ糖をメイラード反応^{*1}を介して生成した、リゾチーム・キトサンオリゴ糖複合体（LYZOX® [リゾックス]）が、MRSA や耐性菌で問題となる緑膿菌、アシネトバクターに有効であることを明らかにしました。この研究成果は、国際科学誌 PLOS ONE に、2019年5月28日午後2時（米国東部時間）にオンライン版で発表されました。

図1. 透過型電子顕微鏡による LYZOX 反応前後の形態変化の観察(37°C、2 時間反応)



LYZOX®に反応後、細菌細胞膜の損傷と細胞内容物の漏出を認める

【研究の背景】

抗生剤の不適切な使用が細菌の耐性化を導き、緑膿菌、アシネトバクター・パウマニ、MRSAを含む薬剤耐性菌が院内感染や易感染者において問題の一つとなっています。対策を立てない限り、2050年には薬剤耐性菌による死亡者数は世界で1000万人にも及ぶと推計されており、不適切な抗生剤使用を防ぐと同時に、新たな抗生剤の開発が強く望まれています。

【研究成果の概要】

リゾチームは鶏卵白から得られる安全性の高いタンパクですが、熱に弱く、抗菌作用も限定的です。一方、キトサンは主に甲殻類の殻から得られる多糖類で、様々な細菌に抗菌作用を持ちますが、酸の溶液でないとよく溶けません。触媒などの薬品が不要なメイラード反応はタンパクと糖類を結合させて複合体を作り、複合体の乳化作用、熱安定性、溶解性、抗菌作用を高めることが確認されています。

本研究では、メイラード反応により得たリゾチーム・キトサンオリゴ糖複合体(LYZOX[®])がMRSAや薬剤耐性で問題となる緑膿菌、アシネトバクターに有効であるかを調べました。それぞれの細菌において、生理食塩水に溶かしたLYZOX[®]はその構成成分(リゾチームとキトサンオリゴ糖)やLGC(リゾチーム・ガラクトマンナン複合体)より強い抗菌作用を示し、液体培地に溶かしたLYZOX[®]はその構成成分やLGCより細菌の増殖を有意に抑えました(図2、3)。メイラード反応により抗菌作用が高められたこととリゾチームのメイラード反応のパートナーはガラクトマンナンよりキトサンオリゴ糖の方が良いことがわかりました。抗菌作用の機序を調べるために、細胞膜完全性試験、NPNアッセイ^{*2}、ONPGアッセイ^{*3}を行

い、共焦点レーザー走査型顕微鏡を施行しました。これらの結果は、LYZOX[®]はグラム陰性菌(緑膿菌、アシネトバクター)では細胞外膜^{*4}と細胞内膜^{*4}を障害し、グラム陽性菌(MRSA)では原形質膜^{*4}を障害することで抗菌作用を示すことを示唆し、共焦点レーザー走査型顕微鏡でも障害された細菌の細胞膜が確認されました(図4)。細胞膜がどのように障害されているかを

図2. 殺菌試験

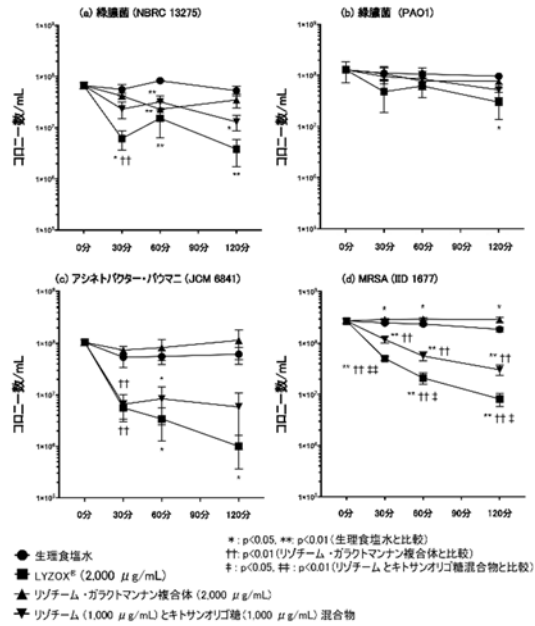


図3. 増殖抑制試験

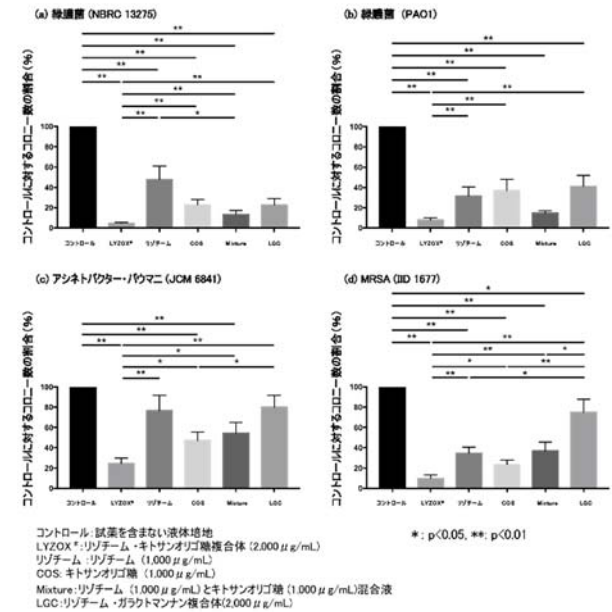
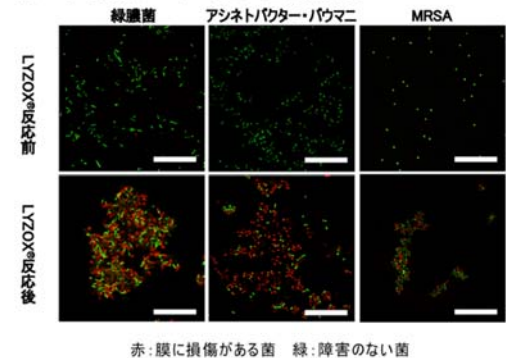


図4. 共焦点レーザー走査型顕微鏡



形態的に見るため電子顕微鏡検査を施行したところ、いずれの細菌においても、LYZOX[®]に反応させるとリゾチーム 単独による細菌の形態変化とキトサンオリゴ糖単独による形態変化の両方の特徴を併せ持っており、LYZOX[®]はリゾチーム とキトサンオリゴ糖の抗菌作用を併せ持ち、それらが相乗的に働くと推察されました(図1)。さらに、継代培養による耐性獲得試験を行ったところ、LYZOX[®]は 10 継代の時点ではいずれの細菌からも耐性獲得をされませんでした。LYZOX[®]の特性についても調べましたが、4 時間、80°Cで熱しても抗菌性を失わないことと、溶血毒性はないことを確認しました。

【研究成果の意義】

LYZOX[®]は MRSA と薬剤耐性化で問題となる緑膿菌、アシネトバクターに対して抗菌活性を認め、耐性獲得されづらいことから、これらの細菌のさらなる薬剤耐性を抑えつつ、感染症の予防や治療に応用できる可能性が見出されました。また、耐性菌に対する抗生剤は高額なものが多いですが、リゾチーム とキトサンオリゴ糖は天然素材より比較的安価に精製できるため、LYZOX[®]は感染症治療に関する医療費の削減にも貢献する可能性があります。

【用語の解説】

*1 メイラード反応

非触媒下、乾燥、加熱下で生じる、アミノ酸やタンパク質のアミノ基と糖の還元末端カルボニル基との共有結合反応。

*2 NPN アッセイ

1-N-フェニルナフチルアミン(NPN)は細胞膜内部のようなリン脂質環境では強く蛍光を発するが、水性環境では弱く蛍光を発する。この特性を生かし、グラム陰性菌(緑膿菌、アシネトバクターなど)の細胞外膜の障害やグラム陽性菌(MRSA など)原形質膜の障害の有無を評価することができる。

*3 ONPG アッセイ

o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(ONPG)は細菌内部に存在するβ-ガラクトシダーゼで分解され、黄色く発色する。この特性から細胞膜損傷によるβ-ガラクトシダーゼの漏出が確認でき、グラム陰性菌(緑膿菌、アシネトバクターなど)の細胞内膜の障害やグラム陽性菌(MRSA など)の原形質膜の障害の有無を評価することができる。

*4 細胞内膜、細胞外膜、原形質膜

細菌はグラム染色という染色方法で、グラム陰性菌とグラム陽性菌の2種類に大別できる。グラム陰性菌の細胞壁は主に細胞外膜と細胞内膜、それらの間にある薄いペプチドグリカンという成分で構成されている。グラム陽性菌の細胞壁は主に原形質膜とその外側にある厚いペプチドグリカンで構成されている。グラム陽性菌の原形質膜はグラム陰性菌の細胞内膜に相当する。

【論文情報】

掲載誌:PLOS ONE

論文タイトル: Antibacterial activity of lysozyme-chitosan oligosaccharide conjugates (LYZOX) against *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0217504>

【研究者プロフィール】

宮崎 泰成 (ミヤザキ ヤスナリ) Miyazaki Yasunari

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

統合呼吸器病学分野 教授

・研究領域:

呼吸器内科学



齋藤 弘明 (サイトウ ヒロアキ) Saito Hiroaki

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

統合呼吸器病学分野 大学院生

・研究領域:

呼吸器内科学



【問い合わせ先】

<研究に関すること>

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

統合呼吸器病学分野 宮崎 泰成(ミヤザキ ヤスナリ)

TEL:03-5803-5950 FAX:03-5803-0260

E-mail: miyazaki.pilm@tmd.ac.jp

<報道に関すること>

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp