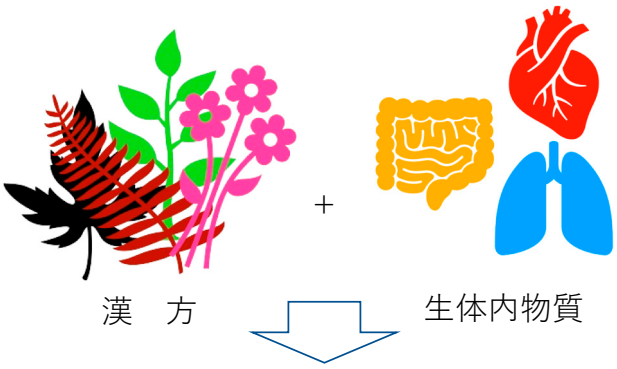
114　漢方薬における感染部位特異的抗菌活性の効能評価	佐藤　豊孝

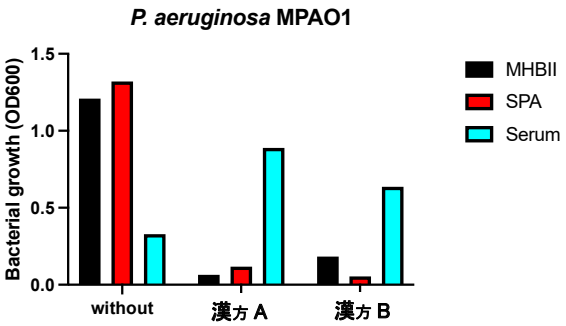
【目的】多剤耐性菌にも有効な抗菌薬開発や新たな薬剤耐性菌を生み出さない科学技術の創世が国際社会から求められている。本研究では、我々が有する感染部位特異的抗菌活性物質の検索・評価系を漢方薬に適用することにより、漢方薬の新たな効能（＝感染部位特異的抗菌活性効果）を評価することを目的し、感染症領域における東洋医学の位置付けを新たに提供することを最終目標とする。

【方法】本研究では、漢方薬の感染部位特異的抗菌活性を評価するために、市販および医療用の計 126 種の漢方薬を用いて各種病原性細菌（緑膿菌、肺炎桿菌、大腸菌）に対する 1. 各生体内物質（サーファクタントプロテイン、血清、尿）存在下における各細菌種の増殖抑制効果の評価、2. 各生体内物質存在下による各細菌種の増殖抑制効果の増強能の評価、3. 漢方存在下での増殖に必須となる細菌因子の網羅的推定を行った。

【結果】各菌種において菌の増殖が認められた漢方数は、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）では、無添加時で 34、サーファクタントプロテイン A（SPA）添加時で 33、血清（Serum）添加時では 0 であった。肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）では、無添加時、SPA、Serum のいずれの添加時でも本菌の増殖を抑制する漢方は認められなかった。大腸菌では、無添加時および Serum 添加時では本菌の増殖を抑制する漢方は認められなかったが、尿添加時に本菌の増殖を抑制する漢方が 1 種類認められた。各生体内物質存在下で菌の増殖抑制効果が増強された漢方は、*P. aeruginosa* において SPA 添加時に 11 種類、大腸菌において尿添加時に 1 種類認められた。*P. aeruginosa* において増殖能の抑制効果と SPA 添加時に増殖能抑制効果の増強が認めれたそれぞれ 1 種類の漢方（漢方 A および漢方 B）を用いて漢方存在下での増殖に必須となる細菌因子の網羅的推定を行った結果、それぞれ 3 および 19 の細菌因子を抽出した。うち 3 因子（*oxyR*、*pvdE* および *fpvA*）は、両漢方において共通して抽出された遺伝子であったため、これらの細菌因子が漢方 A および漢方 B 存在下での *P. aeruginosa* の増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。

細菌感染症における漢方薬の新たな効能の評価





細菌感染症における漢方薬の新たな効能

114. 漢方薬における感染部位特異的抗菌活性の効能評価

佐藤　豊孝

北海道大学 大学院獣医学研究院・獣医学部 衛生学分野 獣医衛生学教室

Key words：漢方薬，細菌感染症，薬剤耐性菌，生体内物質

緒　言

昨今の薬剤耐性菌（AMR）対策で問われているように、多剤耐性菌にも有効な抗菌薬開発や、薬剤耐性菌制御の観点から新たな薬剤耐性菌を生み出さない科学技術の創世が国際社会全体から求められている。薬剤耐性菌に有効な新規抗菌薬開発は必須とされるが、開発コストなどの問題からその開発は停滞している。特に、既存検索法・評価法の限界から『多剤耐性菌にも有効な新たな標的因子の同定』と本因子を阻害する『新系統の抗菌薬開発』は皆無に等しい。すなわち、これらの薬剤耐性菌を含めた細菌感染症問題の根本を克服するような画期的な新規抗菌薬の開発、といったブレークスルーは起きていない。

東洋医学の代表である漢方薬は生薬（しょうやく）とよばれる植物や動物、鉱物などを 2 種類以上組み合わされて作られたものであり、古来から中国や日本などにおいて全人的医療として治癒力の維持・向上や各種疾病の治療・症状緩和薬として使用されている。一部の漢方薬は主にウイルス感染症に対して有効との報告が存在し、細菌感染症においてもその有効性が散見されるが、細菌因子に着目するような漢方薬の抗菌効果に関する詳細な細菌学的検討は行われていない。

漢方薬の持つ西洋医学で使用する薬剤との異なる最大の特徴は、成分が全く異なり、漢方薬 1 処方の中には複数の成分が含まれることである。漢方薬の持つ本特徴は、我々がこれまで着目し行ってきた「従来の抗菌薬開発法にとらわれない、新たな細菌感染症治療薬」の開発研究に合致する魅力的な対象であり、1）従来の抗菌薬とは全く異なる成分による新たな標的阻害部位の可能性と、2）漢方薬 1 処方に含まれる複数の含有成分が複数の細菌因子を同時に阻害する可能性から、我々は『漢方薬が今後一層困難に直面するとされている耐性菌を含めた細菌感染症治療・予防薬としての切り札となる可能性を十分に秘めているのでは？』と考えた。

本研究では、我々が有する独自の検索・評価系を漢方薬に適用することにより、従来の解析法では見落とされてきた細菌感染症治療に対する漢方薬の新たな効能（＝感染部位特異的抗菌活性効果）を評価することを目的とする。その最終目標は、多剤耐性菌感染症を含めた細菌感染治療における東洋医学の新たな位置付けを提供することにある。

方　法

本研究では、漢方薬の感染部位特異的抗菌活性を評価するために、市販および医療用の計 126 種の漢方薬を用いた。各漢方薬原末 1 g を 10 mL の 1%DMSO 添加蒸留水にて溶解した。溶解後遠心（10,000 rpm、10 分間）し、遠心後の上清を 0.22 μm のフィルターにて濾過滅菌をした。本溶液を漢方原液とし、以下の 1～3 の方法にて評価を行った。

1. 各生体内物質（サーファクタントプロテイン A、血清、尿）存在下における各細菌種の増殖抑制効果の評価

最終濃度が 10%（vol/vol）となる漢方薬原液を添加したミューラーヒントン液体培地（MHBⅡ）を調整した（無添加時とする）。漢方添加 MHBⅡに 8%（vol/vol）ヒト血清、50 mg/L ヒトサーファクタントプロテイン A、および 87.5%（vol/vol）ヒト尿を添加した MHBⅡを調整した（これらを各生体内物質添加時とした）。調整した各培地を 100 μL/well にて 96 well plate に用意し、そこに各種病原性細菌（緑膿菌、肺炎桿菌、大腸菌）を 10^5cfu/mL となるように接種し、37℃で 20 時間培養した。培養後の培地の濁度（OD 600 nm）をプレートリーダーにて測定し菌の増殖能を評価した。

菌液未接種の各漢方薬存在下でのMHBⅡのOD600（Background）を測定した。得られたOD600の値から実測値を以下の式にて算出した。

[実測値（OD600）]=[各漢方薬存在下での培養後の培地濁度（OD600）]−[Background（OD600）]

同時に漢方薬非存在下における菌の増殖［NC（OD600）］を測定した。得られた値およびから菌の増殖能を以下の式にて算出した。

各漢方薬存在下での菌の増殖能=[実測値（OD600）]／[NC（OD600）]

各漢方薬存在下での菌の増殖能が＜0.5となるものをヒット漢方とした。

2. 各細菌種に対する生体内物質存在下での漢方薬の増殖抑制増強能の評価

各生体内物質添加時における菌の増殖抑制効果は、方法1同様に[実測値（OD600）]／[NC（OD600）]にて求めた。各体内物質存在下での漢方薬の増殖抑制増強能は以下の式で算出した。

各体内物質存在下での漢方薬の増殖抑制増強能

=[各生体内物質添加時における菌の増殖能]／[各漢方薬存在下での菌の増殖能]

各生体内物質添加時における菌の増殖能抑制増強能が＜0.5となるものをヒット漢方とした。

3. 漢方薬存在下での増殖に必須となる細菌因子の網羅的推定

トランスポゾンは細菌遺伝子にランダムに挿入されるため、各遺伝子が破壊された変異株を無作為に複数作製できる。緑膿菌トランスポゾン変異株ライブラリーを最終濃度が10%（vol/vol）となる漢方AまたはBを添加したMHBⅡに接種し、37℃で20時間培養した。培養後に菌体DNA抽出を行い本DNAを用いてTransposon-directed sequencing（TraDIS法）を行った。TraDIS法は、トランスポゾンが導入された遺伝子部位を標的に次世代シークエンス解析を行う技術である［1］。CLC genomic workbenchを用いてControl（無処理）DNAと漢方薬存在下で抽出したSample DNAをTraDIS解析で比較することにより、Sample DNAで有意に減少したトランスポゾン挿入遺伝子を検出した（本遺伝子は漢方薬存在下で減少した緑膿菌の遺伝子であり、漢方薬存在下での菌の増殖や生存に重要な因子と推定できる）。

結　果

1. 各生体内物質（サーファクタントプロテイン、血清、尿）存在下における各細菌種の増殖抑制効果の評価

各生体内物質と漢方薬の両存在下で菌の増殖抑制効果は、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）において最も多く認められた（図1）。各菌種において菌の増殖が認められた漢方薬数は、*P.aeruginosa*では、無添加時で34、サーファクタントプロテインA（SPA）添加時で、33、血清（Serum）添加時では0であった（表1）。肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）では、無添加時、SPA、Serumのいずれの添加時でも本菌の増殖を抑制する漢方は認められなかった。大腸菌では、無添加時およびSerum添加時では本菌の増殖を抑制する漢方薬は認められなかったが、尿（Urine）添加時に本菌の増殖を抑制する漢方薬が1種類認められた（表1）。一方で、*P. aeruginosa*や*K. pneumoniae*では血清存在下では漢方薬添加により、菌の増殖能が顕著に増加した（図1）。

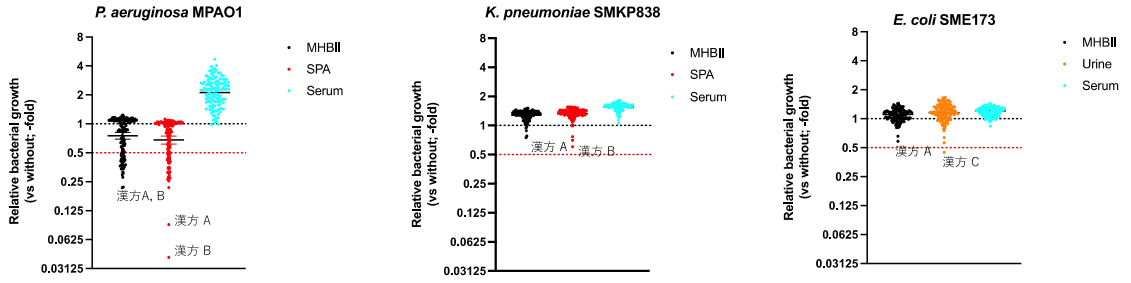


図1. 各生体内物質存在下における各細菌種の増殖抑制効果

MBⅡ：ミューラーヒントン培地Ⅱ、SPA：サーファクタントプロテインA、Serum：血清、Urine：尿

表 1. 各細菌種で増殖抑制が認められた漢方薬数の比較

菌種	増殖抑制が認められた漢方の数			
	無添加時	SPA添加時	Serum添加時	尿添加時
P. aeruginosa	34	33	0	ND
K. pneumoniae	0	0	0	ND
E. coli	0	ND	0	1

2. 各細菌種に対する生体内物質存在下での漢方薬の増殖抑制増強能の評価

各生体内物質存在下で菌の増殖抑制効果が増強された漢方薬は、*P. aeruginosa* および *E. coli* において認められた（図 2）。*P. aeruginosa* では SPA 添加時に計 11 種の漢方が、大腸菌においては尿添加時に 1 種の漢方が各生体内物質存在下において各細菌種の増殖抑制効果を増強した（表 2）。

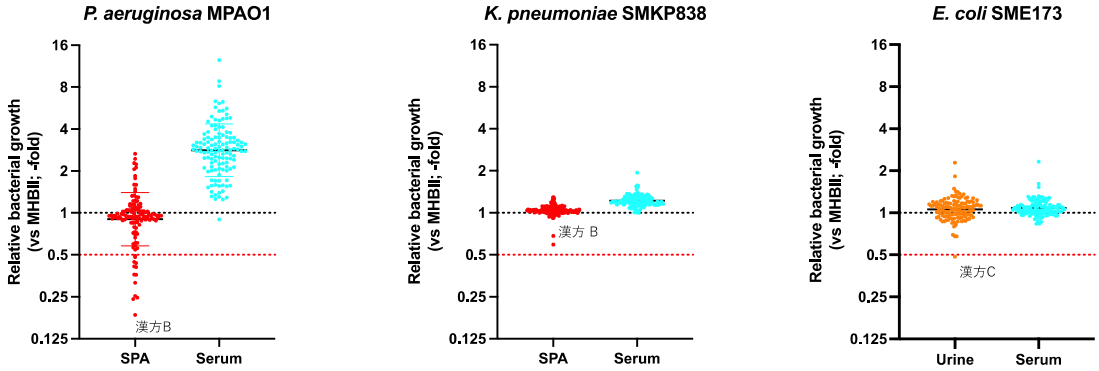


図 2. 各生体内物質存在下による各細菌種の増殖抑制増強能の評価

MBⅡ：ミューラーヒントン培地Ⅱ、SPA：サーファクタントプロテインA、Serum：血清、Urine：尿。

表 2. 各生体内物質添加時に増殖抑制効果の増強が認められた漢方薬の数

菌種	生体内物質添加時に増殖抑制効果が増強された漢方の数		
	SPA添加時	Serum添加時	尿添加時
P. aeruginosa	11	0	ND
K. pneumoniae	0	0	ND
E. coli	ND	0	1

3. 漢方薬存在下での増殖に必須となる細菌因子の網羅的推定

結果 1 および 2 より *P. aeruginosa* で良好な増殖抑制効果を示した漢方 A およびに着目し、TraDIS 解析を行った（図 3）。

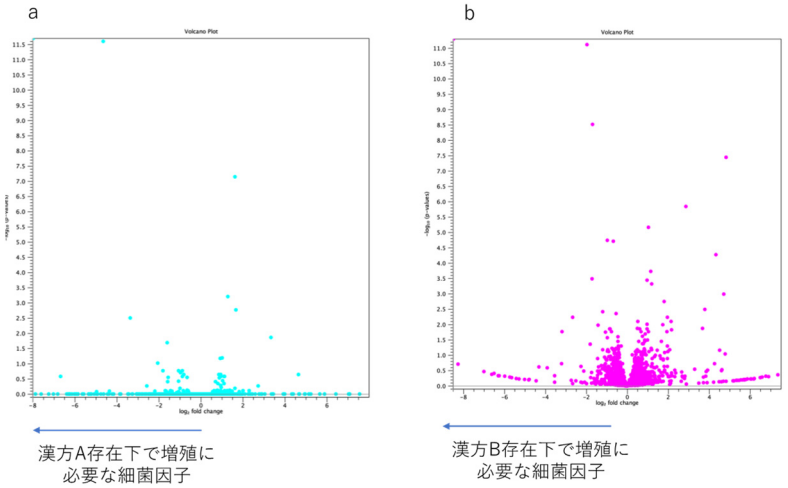


図 3. TraDIS 解析の結果

漢方非存在下に対して漢方薬 A（a）または漢方薬 B（b）存在下で減少した細菌因子（トランスポゾン挿入部位）を抽出した。

有意差検定の結果、漢方薬 A で 3 および漢方薬 B で 19 の各漢方存在下での生存や増殖に重要となる細菌因子を抽出した（FDRp<0.05）。アノテーションした結果、*oxyR*, *pvdE* および *fpvA* が両漢方薬において共通して抽出された遺伝子であった（表 3）。

表 3. TraDIS で明らかとなった漢方薬 A（a）および漢方薬 B（b）存在下での生存や増殖に重要となる細菌因子

a

Name	Region	PaCtl vs. PaNo74 - Max group mean	PaCtl vs. PaNo74 - Log2 fold change	PaCtl vs. PaNo74 - Fold change	PaCtl vs. PaNo74 - P-value	PaCtl vs. PaNo74 - FDR p-value	PaCtl vs. PaNo74 - Bonferroni
oxyR	6022628..6023560	132.7508	-4.64664	-25.0483	4.55E-16	2.54E-12	2.54E-12
pvdE	complement(2860260..2861909)	39.37036	-3.36806	-10.3249	2.8E-06	0.003131	0.015656
fpvA	complement(2857710..2860157)	61.11383	-1.60126	-3.03409	2.54E-05	0.020271	0.141895

b

Name	Region	PaCtl vs. PaNo84 - Max group mean	PaCtl vs. PaNo84 - Log2 fold change	PaCtl vs. PaNo84 - Fold change	PaCtl vs. PaNo84 - P-value	PaCtl vs. PaNo84 - FDR p-value	PaCtl vs. PaNo84 - Bonferroni
rfbC	5823703..5824248	20.86211	-3.1926	-9.14258	0.000112	0.017038	0.630405
MPAO1_RS22130	complement(4791712..4793247)	20.12624	-2.66069	-6.32335	1.97E-05	0.005829	0.110756
oxyR	6022628..6023560	132.7508	-1.97164	-3.92213	1.39E-15	7.8E-12	7.8E-12
MPAO1_RS25980	complement(5632498..5633634)	20.54167	-1.80373	-3.49121	0.000406	0.043927	1
pvdE	complement(2860260..2861909)	39.37036	-1.72052	-3.29555	5.8E-07	0.000326	0.003258
fpvA	complement(2857710..2860157)	61.11383	-1.70484	-3.25992	1.1E-12	3.09E-09	6.17E-09
MPAO1_RS02520	552262..552510	186.6642	-1.43431	-2.70253	4.48E-05	0.010482	0.251576
MPAO1_RS16010	3505626..3505868	343.0575	-1.20298	-2.30215	1.11E-05	0.003887	0.062198
MPAO1_RS06615	1411919..1412272	211.3779	-1.06494	-2.09209	0.000121	0.017947	0.681988
rseP	1426470..1427822	53.36089	-0.98311	-1.97673	0.000207	0.027076	1
MPAO1_RS24780	5365964..5367652	191.2628	-0.96672	-1.95439	1.97E-08	1.84E-05	0.000111
MPAO1_RS25150	complement(5444693..5445229)	267.3856	-0.87074	-1.8286	7.22E-05	0.013796	0.405721
pqqB	complement(3342446..3343360)	159.4006	-0.83486	-1.78369	7.36E-05	0.013796	0.413873
pvdT	complement(2870047..2872038)	104.3886	-0.7693	-1.70444	9.91E-05	0.017038	0.55714
MPAO1_RS07015	complement(1499185..1499940)	842.0313	-0.68915	-1.61234	2.44E-08	1.96E-05	0.000137
MPAO1_RS26700	5804286..5806538	281.34	-0.53718	-1.45114	1.36E-05	0.00451	0.076665
MPAO1_RS05590	1194528..1196426	339.7596	-0.46162	-1.37708	0.000185	0.025148	1
MPAO1_RS23130	complement(5004314..5008144)	207.1869	-0.46021	-1.37574	0.000188	0.025148	1
nirS	complement(577910..579616)	218.0307	-0.4497	-1.36575	0.000298	0.035566	1

考　察

以上から、本研究によって漢方薬の各種病原性細菌に対する増殖抑制効果を明らかにした。特に、*P. aeruginosa* においては SPA 存在下でも良好な増殖抑制効果を示す漢方薬が複数認められたことから、SPA が存在する肺胞内では漢方薬の抗菌効果を期待できると考えられた。一方で、*P. aeruginosa* において血清存在下では漢方薬との供培養において菌の増殖を促進させることを示唆する結果が得られた。本促進効果は、*K. pneumoinae* の血清存在下においても複数の漢方薬で認められたことから、*P. aeruginosa* および *K. pneumoinae* による血流感染症における漢方薬の影響をより詳細に検討していく必要があると考えられた。

菌の増殖抑制効果が認められた漢方薬のうち、漢方薬Aは*P. aeruginosa*において良好な増殖抑制効果を示し、本効果は*P. aeruginosa*と比較すると弱いものの*K. pneumoinae*や*E. coli*においても同様な効果が認められた。また、漢方薬Bは特に*P. aeruginosa*においてSPA存在下で菌の増殖抑制効果を増強する効果が認められたことから、漢方薬Bは*P. aeruginosa*による呼吸器感染症に対して有効な治療効果を示すことが示唆された。

TraDIS解析の結果、漢方A薬および漢方薬B共に*P. aeruginosa*の複数の細菌因子を標的にしていることが明らかになり、特に3因子（OxyR、PvdEおよびFpvA）は、漢方薬Aおよび漢方薬B存在下での生存や増殖に重要となる共通の細菌因子であることが明らかとなった。OxyRはOxidative stress regulatorであり、ピオペルジン介在性のFe^{3+}イオンの取り込みやH_2O_2存在下での生存に重要な役割を果たすことが知られている［2］。また、PvdEはピオペルジンであり［3］、FpvAはferripyoverdine receptorでありPvdEの生合成に関与する［4］。これらの細菌因子が肺胞などの特定の生体内環境下における漢方薬A および漢方薬B 存在下での増殖や生存に関連しているとの報告は存在せず、本研究によってこれらの細菌因子が漢方薬を用いた感染部位特異的治療法の確立に向けた有用な標的候補となることを明らかにした。

共同研究者・謝辞

本研究の実施にあたり漢方薬のご提供を下さりました株式会社ツムラに心より感謝御礼申し上げます。

文　献

1） Phan MD, Peters KM, Sarkar S, Lukowski SW, Allsopp LP, Moriel DG, Achard M, Totsika, Marshall VM, Upton M, Beatson SA, Schembri MA. The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic Escherichia coli clone. PLoS Genet. 2013;9(10):e1003834. Epub 2013 Oct 3. PMID: 24098145 DOI: 10.1371/journal.pgen.1003834.

2） Vinckx T, Matthijs S, Cornelis P. Loss of the oxidative stress regulator OxyR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 impairs growth under iron-limited conditions. FEMS Microbiol Lett. 2008 Nov;288(2):258-65. PMID: 19054085 DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01360.x.

3） Suzuki T, Okamoto S, Oka N, Hayashi N, Gotoh N, Shiraishi A. Role of pvdE Pyoverdine Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. Cornea. 2018 Nov;37 Suppl 1:S99-S105. PMID: 30252682 DOI: 10.1097/ICO.0000000000001728.

4） Shen J, Meldrum A, Poole K. FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol. 2002 Jun;184(12):3268-75. PMID: 12029043 DOI: 10.1128/JB.184.12.3268-3275.2002.