

半世紀前の筆者は新しい抗生物質を探索する研究者でした。抗生物質と言っても抗菌性抗生物質ではありません。抗ウイルス、抗ガン、免疫抑制などの活性を示す新しい抗生物質

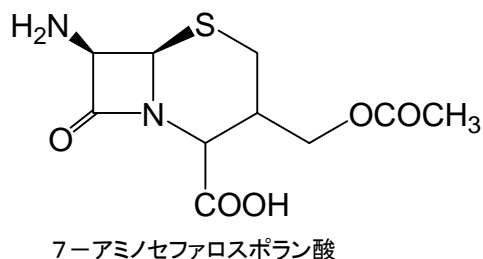
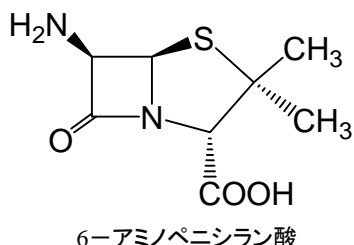


図1. β ラクタム系抗生物質の基本骨格

です。抗生物質と言えば抗菌性抗生物質を思い浮かべますが、その頃でも、新しい系統の抗菌性抗生物質に巡り会うチャンスはほとんどなくなっていたからです。当時、ペニシリンおよびセファロスポリンなどの β ラクタム系抗生物質とニューキノロン系合成抗菌剤の両系統は発展途上にありましたが、これら二系統は効力と安全性の両面で圧倒的に優れていたからです。すでに実用化されていたテトラサイクリン系、マクロライド系およびアミノ配糖体系の抗生物質は、脇役として隅に押しやられてしまいました。1950年代、一世を風靡したクロラムフェニコールに至っては、まったく使われなくなりました。

抗生物質捜しの活路は、新しい酵素阻害剤、抗ガン性あるいは免疫抑制性抗生物質の発見にあり、この面ではスタチン系化合物、マイトマイシン、アドリアマイシン、シクロスポリンA、タクロリムス、ミコフェノール酸等が発見され医療に貢献しています。特に、わが国で発見された HMG-CoA 還元酵素の阻害剤、スタチン系のコンパクチンは、血清総コレステロールを低下させる作用があり、リード化合物として医療に与えたインパクトは絶大でした。微生物代謝産物のなかに新しい生理活性を持ったリード化合物を求める研究は、地味で労力の割に報われない仕事です。研究の3K（汚い、きつい、厳しい）と言ったところでしょうか、米国や西欧ではほとんど放棄されています。それでも細々と研究は続いており、日本の貢献が大きい分野です。人間の頭脳のはたらきには限界があります。X線回折法によりタンパク質の活性部位にフィットする化学構造を割り出したところで、コンピューターが考えた化合物を有機化学の技法で合成できるとは限りません。さらに、合成できても、期待どおりの活性を示す保証もありません。やはりランダムスクリーニングで天然有機化合物のなかから生理活性物質を探索するほうが、特異性と活性の両面で優れたリード化合物が発見できるチャンスが多いからだろうと思います。

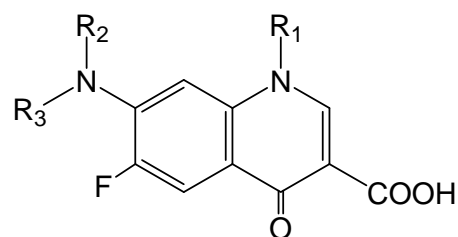


図2. ニューキノロン系抗菌剤の基本骨格

抗生物質の研究者だった当時、どう考えても解けない謎がありました。それは各種の病原菌に対し *in vitro* で圧倒的な抗菌活性を示す抗生物質が、なぜ医療現場の感染症に対し期待するほどの効果がないのだろうかと言うことです。医療現場で使われる抗生物質は、緑膿菌とか霊菌等の特殊な例外はありますが、ほとんどの病原菌の生育を $0.1\sim 0.01\ \mu\text{g/ml}$ 以下で阻止します。患者に投与した際における抗生物質の血中濃度は、*in vitro* における最少阻止濃度をはるかに越えていますから、感染症で亡くなる方は大幅に減少するはずですが、しかし、今もって医療現場ではそうになっていないのです。この謎が解け始めたのはごく最近になってでした。免疫能が低下した人々に侵入して感染症を起こす日和見病原菌は、生体内でもバイオフィームに包まれて生き長らえており、免疫的に排除できないばかりか抗生物質はほとんど効果がなくなることがわかったからです。それではバイオフィームとは何でしょうか。

1. バイオフィームとは

自然界に棲息する微生物は、人工的な培地で生育させた場合のように浮遊した状態 (*planktonic cells*) で生活しているわけではありません。ほとんどの場合、粘質多糖のバイオフィームで細胞を覆い何かの表面に付着して、粘質物の内部で数種の微生物と共同生活を営んでいます。表面とは何かというご質問があるでしょう。われわれの身体で言えば歯、口腔、鼻腔、気道、尿路、腸管などの粘膜、器物では台所の流し台、水道管さらには自然界では川のなかの石塊等々、表面であれば何でもよいのです。図3にコンタクトレンズの表面に生じた緑膿菌バイオフィームの電子顕微鏡写真を示します。菌体が糸状の粘質多糖にくるまれているのが観察できます。ところで、これら表面には一つの共通点があります。どれをとっても微生物が付着しているという事実です。自然界では付着した微生物は単独で存在しているのではなく、特徴ある構造の中で、他の微生物と生活共同体「バイオフィーム」を形成しています。われわれの周りは種々の表面であふれていますから、そこには様々なバイオフィームが見られます。このバイオフィームは、人間に有益に働くかと思えば、逆に、慢性感染症を引き起こしたり、食品汚染の原因ともなります。バイオフィームは、その普遍性ならびに重要性から近年関心が高まり、その科学的解明が急速に進んできました。このような普遍的な存在であるバイオフィームを正しく理解するには、次の二つの側面から微生物観を修正する必要があります。

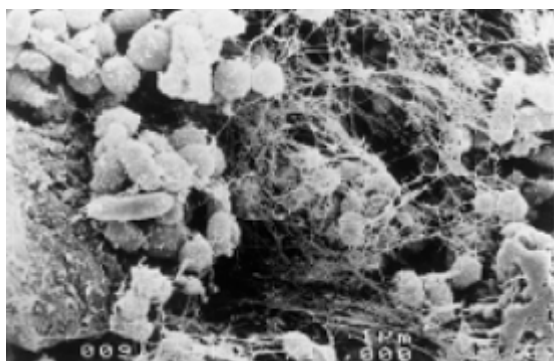


図3. コンタクトレンズ表面に生じたバイオフィーム

を営んでいます。表面とは何かというご質問があるでしょう。われわれの身体で言えば歯、口腔、鼻腔、気道、尿路、腸管などの粘膜、器物では台所の流し台、水道管さらには自然界では川のなかの石塊等々、表面であれば何でもよいのです。図3にコンタクトレンズの表面に生じた緑膿菌バイオフィームの電子顕微鏡写真を示します。菌体が糸状の粘質多糖にくるまれているのが観察できます。ところで、これら表面には一つの共通点があります。どれをとっても

微生物が付着しているという事実です。自然界では付着した微生物は単独で存在しているのではなく、特徴ある構造の中で、他の微生物と生活共同体「バイオフィーム」を形成しています。われわれの周りは種々の表面であふれていますから、そこには様々なバイオフィームが見られます。このバイオフィームは、人間に有益に働くかと思えば、逆に、慢性感染症を引き起こしたり、食品汚染の原因ともなります。バイオフィームは、その普遍性ならびに重要性から近年関心が高まり、その科学的解明が急速に進んできました。このような普遍的な存在であるバイオフィームを正しく理解するには、次の二つの側面から微生物観を修正する必要があります。

- 1) 微生物はバイオフィームに付着して生活している。
- 2) これら微生物は単独ではなく複数の種が共同体を形成している。

二つの事実を、われわれは先ずしっかりと認識し、そして、これら事実に基づいて、微生物に関してわれわれが知っていることを謙虚に振り返る必要があります。われわれはフラスコ中で微生物を液体培養し、その諸特性を知ることはできます。しかし、これら諸特性が付着状態にある微生物のものと同じであると確信できるのでしょうか？あるいは、ある微生物が自分と同じ種に属する仲間と一緒にいる場合と、その微生物とは別種の微生物と共同生活を営む場合の挙動は、はたして同じでしょうか？バイオフィームは、これまでの微生物学に根元的な問いかけを発している様に思えます。極論すれば、純粋培養された浮遊状態の微生物に関してわれわれが蓄えてきた知見は、付着し共同体を形成しているバイオフィーム中の微生物には通用しないかも知れないのです。

微生物の宝庫とされる土壌を例にとってみましょう。新規抗生物質の探索者達は、決まって土壌の微生物を分離し、それらが生産する代謝産物のなかに新規抗生物質を求めてきました。微生物による二次代謝産物の多様性は目を見はるばかりで、合成抗菌剤の独壇場と思われているキノロン系の抗菌物質さえ生産するほどなのです(1)。分離培地をいろいろに変え、極寒の南極、土壌の温度が

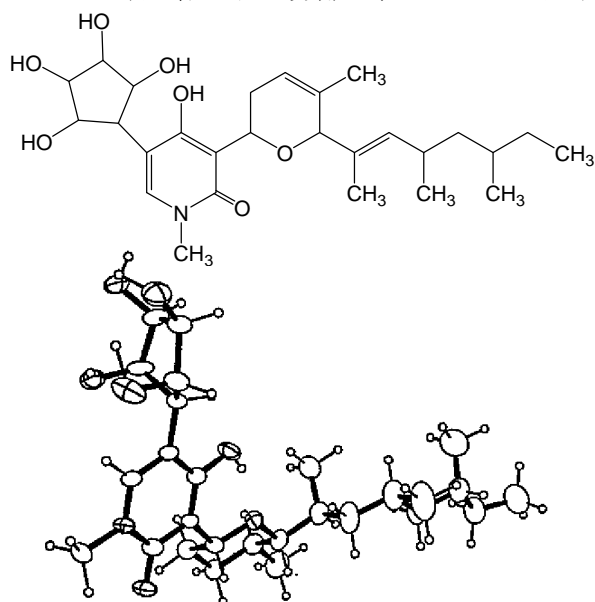


図4. フニコロシンのX線回折像

上はフニコロシンの化学構造。下の図はクロシンが微細な針状結晶でX線回折に不適當だったので、測定に適した結晶を得るため還元した。

100℃にも達する温泉地、極端な酸性とアルカリ性土壌、高圧の深海に至るまで、できるだけ多種の土壌を採取し、微生物の単離をこころみられてきました。しかし、今日では土壌のDNA分析から人工培地に分離できた微生物は1%にも満たなかったことがわかっています。苦心して分離した微生物が抗生物質の産生能を持っていても、三つに一つは人工培地上で継代できずに死滅するのです。したがって、混合したままで培養した方が、微生物が持っている潜在力を十分に活用できるかもしれないのです。筆者の乏しい経験でも培地に土壌を直接投入する混合培養の方が、

土壌微生物を単離してから培養するより、抗菌物質の出現頻度ははるかに高く、多様性に富んでいました。

バイオフィームはステンレスパイプさえ腐食させ、産業に甚大な被害を与えます。水道水には微生物の栄養になる有機物は、ほとんど含まれていません。しかし、われわれが水道水は極端に栄養が乏しいと勝手に思い込んでいるだけで、自然界の多様な微生物のなかには水道水の含まれるミネラルを栄養源として増殖し、管壁にバイオフィームをつくる微

生物がいるのです。いったん、バイオフィームが形成されると、他種の微生物も次々に粘着して相互に栄養物を分け合って共生するようになり、最終的には金属パイプさえ腐食させるほどの有機酸をつくるようになります。いわば、バイオフィームは、微生物の自然状態における生活様式で、彼らにとって住み心地がよいアパートのようなものです。医療分野でもバイオフィームはペースメーカー、腎透析器、血管内カテーテル、副鼻腔、気道、尿路、歯溝、舌面に形成され、難治性感染症の原因(2)になります。

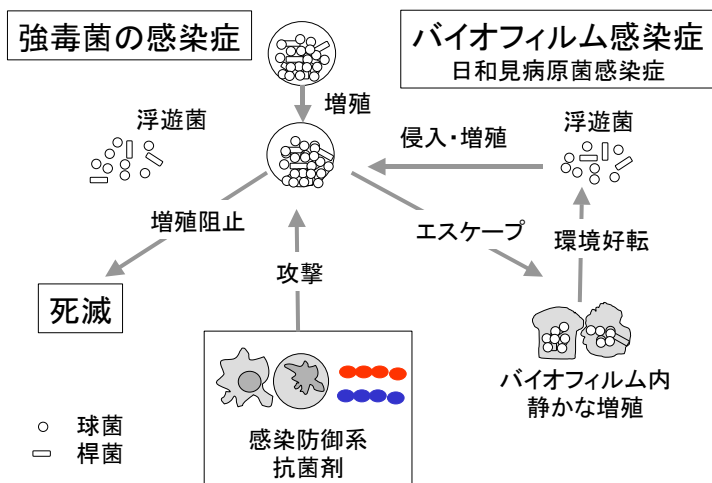


図5. 強毒菌の感染症とバイオフィーム感染症との違い

いるようなものですから健康にとって脅威です。図5に強毒菌の感染症とバイオフィーム感染症とを対比して示しました。炭ソ菌、肺炎球菌など強毒菌の感染症は、感染防御系と抗菌剤により治癒させることができます。治癒すると感染症の記憶は残りますから、パスツールが定義したように再感染しても免疫系により迅速に排除されるので「感染症は二度ない」のです。ところが、バイオフィーム感染症の方は、何度でも感染症を繰り返し、終末像は敗血症とか多臓器不全です。いったん、体内に日和見病原菌のバイオフィームが生ずると、手の施しようがないと思われるかもしれません。しかし、少なくとも二つの物質がバイオフィーム形成を阻害することがわかっています。そのうちの一つLFは、バイオフィーム形成を阻害する重要な因子であることがわかってきました。

2. 緑膿菌のバイオフィームとラクトフェリン

嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis(CF)) は、白人に多発する遺伝性疾患で、米国では出生児のうち白人で 1/3,300、黒人で 1/15,300、そしてアジア人-米国人の混血では 1/32,000 の割合で発症する難病です。患者の 50%は肺症状を呈し、通常は再発性または慢性の肺感染により慢性の咳をとまいません。患者の肺に感染する緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は、肺にバイオフィームをつくって定着します。Rogan 等(3)は緑膿菌が肺に感染している患者の喀痰は、LF を完全に断片化させるカテプシンを含むことを見いだしました。喀痰は LF を含んでいますが、緑膿菌が感染していない CF 患者の喀痰を *in vitro* でしらべると、緑膿菌が感染した CF 患者の喀痰より LF 濃度が高く (バイオフィームの合成阻害能が強い)、感染している患者でも、増悪期の喀痰は沈静期と比べカテプシン活性が高く、LF 含量が低いことを報告しました。これは LF が緑膿菌によるバイオフィーム合成を直接阻止してことを示した最初の発見です。

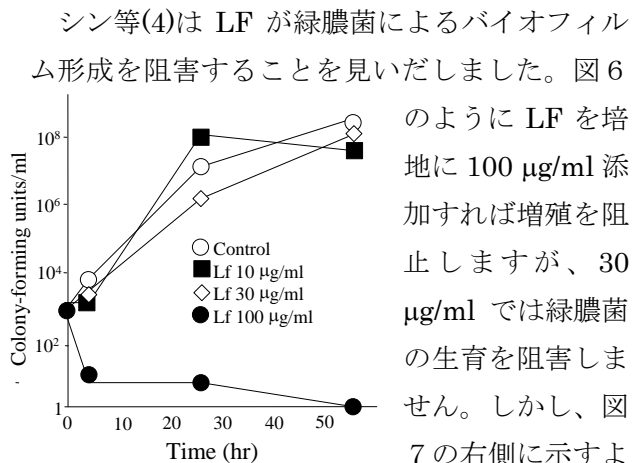


図6. LFによる緑膿菌の増殖阻害

のように LF を培地に 100 µg/ml 添加すれば増殖を阻止しますが、30 µg/ml では緑膿菌の生育を阻害しません。しかし、図7の右側に示すように緑膿菌は 20 µg/ml の LF 存在すると、個々の細胞はせわしなく動き回りガラス表面に薄い一層の膜をつくるだけで、対照のように時間の経過とともにキノコ型のバイオフィームを成長させません。つまり、LF は緑膿菌に対し殺菌的に作用することはないが、緑膿菌のバイオフィーム形成を阻害するのです。細菌、真菌および植物は、鉄が不足する環境では鉄キレーターを合成し、環境から鉄を集めようとしています。図8は鳥類における LF 相当蛋白であるコンアルブミンと殺菌物質の相乗的な殺菌効果を示します。左図の○に示すように緑膿菌感染症に汎用されるトブラマイシンは、培地

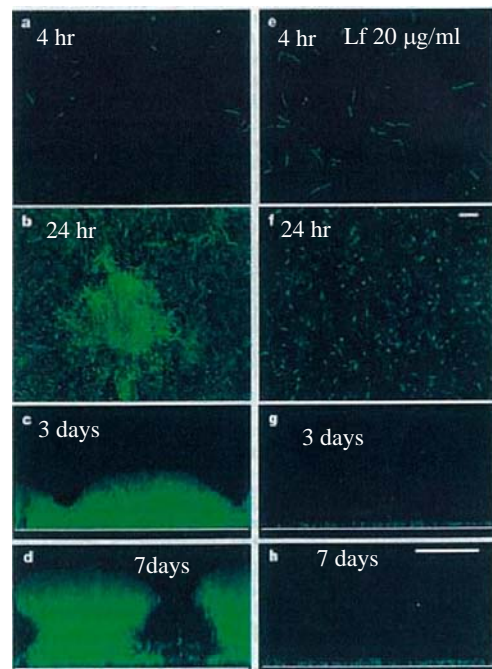
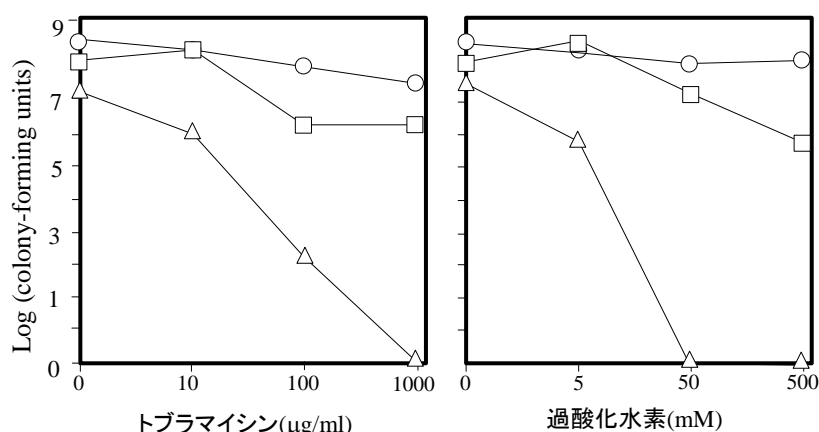


図7. LF 存在下における緑膿菌のバイオフィーム形成

顕微鏡下に緑膿菌懸濁液を循環させ、液下にバイオフィームが形成される様子を観察した。右は対照、左は LF を 20 µg/ml 含む懸濁液。右は 24 時間、3 日および 7 日と時間の経過とともに緑色のバイオフィームが形成されるが、LF 含有の懸濁液はバイオフィームが形成されない。

培地

に 1000 $\mu\text{g/ml}$ 添加されても生菌数はほとんど減少しません。この系にコンアルブミン 20 $\mu\text{g/ml}$ を添加しても、トブラマイシン濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で生菌数を 1/100 程度に減らすだけです。ところが、40 $\mu\text{g/ml}$ のコンアルブミンと共存すると、トブラマイシンが 100 $\mu\text{g/ml}$ で生菌数は 1/10⁵、1000 $\mu\text{g/ml}$ で 0 に減少させる強い殺菌効果を発揮するようになります。また、単独では殺菌効果がない過酸化水素も、コンアルブミンが共存すると緑膿菌に対し強い殺菌効果を発揮します。つまり、緑膿菌はバイオフィルムを合成して身にたとえば抗菌剤に対し強い抵抗性を発揮するが、鉄のキレート作用がある LF あるいはコンアルブミンが存在すると、バイオフィルムを合成できなくなるのです。緑膿菌も独自の鉄キレター



○ Conalbumin 20 $\mu\text{g/ml}$ Mean \pm SE, n=6
 △ Conalbumin 40 $\mu\text{g/ml}$

図 8. コンアルブミンとトブラマイシンおよび過酸化水素との相乗的な殺菌作用

コンアルブミンは卵白蛋白の 10% を占めるラクトフェリン・トランスフェリン群に属するタンパク質で、ラクトフェリンの相当する鳥類の生体防御蛋白と考えられている。

ある LF が微量環境からバイオフィルム形成に必要な鉄を奪うためであろうと思われます。緑膿菌は免疫能が低下した患者に感染する代表的な病原菌です。鉄イオンを強力にキレートすることによる LF のバイオフィルム合成阻害効果は、免疫能低下により引き起こされる日和見感染症の治療と予防に大きな効果を発揮することが期待されます。

終わりに

LF は驚くほど多岐にわたる作用を示します。筆者のように半世紀近く西洋医薬の研究開発に携わってきた者にとっても、これはにわかに信じ難いことです。それには二つの理由があるからではないかと思われます。一つはラクトフェリンが乳由来だと言うことです。乳は単に栄養を充足するだけでなく、生理活性があります。育児用調製粉乳の組成が年ごとに母乳に近づいているにもかかわらず、母乳保育児と調製粉乳保育児とのあいだには、罹病率と死亡率で大差があります。ヒトの新生児は他の哺乳動物と比べ非常に未熟な状態で生まれてきます。母乳のラクトフェリンはカゼインに次いで多量に含まれるタンパク質

を合成しますが、Greeberg 等(5)は鉄キレター生産能が変異した緑膿菌を分離し、鉄がバイオフィルム産生に必須であることを証明しました。

細菌がバイオフィルムを形成するには、増殖に必要とされる量を数倍上回る鉄が必要とされています。LF が細菌によるバイオフィルム形成を阻害するのは、強力な鉄キレターで

ですから、いろいろの生理活性を持っていても何ら不思議ではありません。

今一つの理由は、ラクトフェリンが鉄をはじめとし、銅などの遷移金属イオンを強くキレ

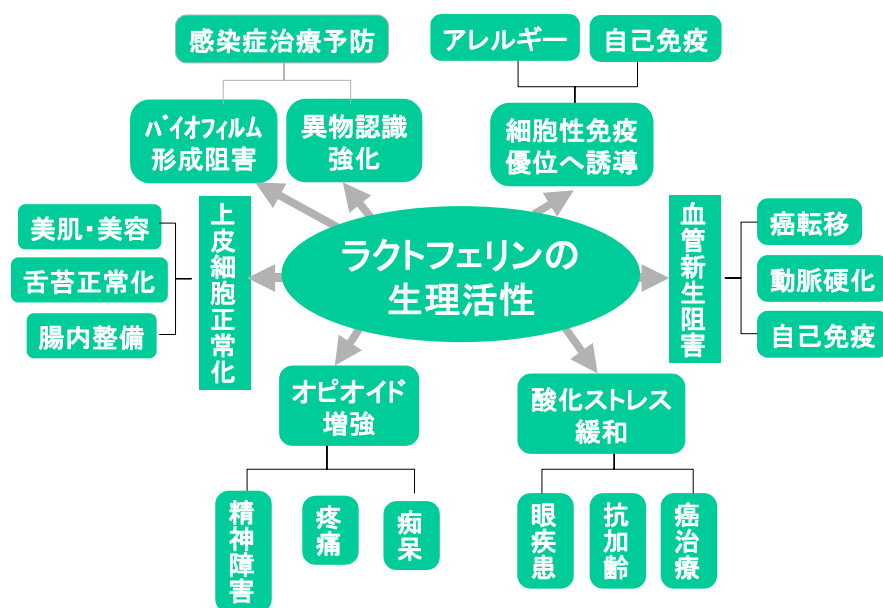


図9. ラクトフェリンの生理作用

ートするタンパク質だからです。鉄はヘモグロビン、ミエロパーオキシダーゼ、チトクロームCなどの構成要素であり生存に必須ですが、繰り返し説明したように、遊離の遷移金属イオンは、毒性が強いヒドロパーオキシドを連鎖反応で生成させる触媒です。ラクトフェリンが、過剰にヒドロパーオキシドが生

成しないよう身体を護るはたらきを持っているのも当然です。

最近、Banin 等はキレート剤 EDTA が緑膿菌のバイオフィーム合成を LF と同様に阻害することを報告しました (6)。EDTA によるバイオフィーム合成阻害は、鉄イオンの他にカルシウムとマグネシウムの両イオンにより解除されるようです。バイオフィームと慢性感染症に関する研究は、未だ始まったばかりです。筆者が 50 年前に抱いた疑問「抗生物質は各種の病原菌に対し *in vitro* で圧倒的な抗菌活性を示すが、なぜ現場の感染症に対し期待するほどの効果がないのだろうか」に対する回答も間もなく得られるだろうと期待しています。

引用文献

- (1) Ando K, Matsuura I, Nawata Y, Endo H, Sasaki H, Okytomi T, Saehi T, Tamura G. Funiculosin, a new antibiotic. II. Structure elucidation and antifungal activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1978; 31:533-8.
- (2) Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003;112:1300-7. Review.
- (3) Rogan MP, Taggart CC, Greene CM, Murphy PG, O'Neill SJ, McElvaney NG. Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis.

J Infect Dis. 2004;190:1245-53.

- (4) Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002 May 30;417(6888):552-5.
- (5) Banin E, Vasil ML, Greenberg EP. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11076-81.
- (6) Banin E, Brady KM, Greenberg EP.
Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:2064-9.