

グラム陽性細菌に対する銅イオン溶液抗菌力感受性試験および
Cu²⁺ によるペプチドグリカン細胞壁の溶菌・破壊作用に対する考察

理学博士 石田 恒雄¹

Susceptibility of Cu²⁺ in Cu(NO₃)₂·3H₂O solution against *Staphylococcus aureus* and the antibacterial activities of Cu²⁺ with the peptidoglycan cell wall of *S.aureus*

Dr. Sci. T. Ishida

Abstract

The MIC/MBC/Viable cell counting of Cu²⁺ in Cu(NO₃)₂·3H₂O solution were measured against *Staphylococcus aureus* and the antibacterial activities of Cu²⁺ with the *S.aureus* peptidoglycan cell wall were considered. The MIC and the MBC values obtained were 625 ppm and 1250 ppm, respectively. The killing curve in viable cell counting is greatly decreased with the MBC concentration region. Cu ion induced breaking of the *S.aureus* peptidoglycan cell wall was considered that the antibacterial actions of Cu²⁺ in the peptidoglycan cell wall had been occurred by the damages of synthetic enzymes and the activities of autolysins, accompanying the copper complex formations

アブストラクト

黄色ブドウ球菌に対する硝酸銅溶液の Cu²⁺の抗菌感受性試験を実施した結果、静菌作用 MIC 値=625ppm、殺菌作用 MBC 値=1250ppm が得られた。銅イオン濃度と生菌数の関係の殺菌曲線から、Cu²⁺ 溶液濃度増加に伴う生菌数の減少が観測され、Cu²⁺ 溶液は十分な殺菌作用効果を示す。Cu²⁺ によるペプチドグリカン細胞壁の破壊は、合成酵素と分解酵素のバランス喪失による強固なペプチドグリカン網目構造の溶菌要因の結果である。黄色ブドウ球菌表層のペプチドグリカン細胞壁における Cu²⁺ 溶液の抗菌反応は、銅イオン誘導による銅錯体を形成しつつ、2種のトランスグリコシラーゼ(TG)・トランスペプチダーゼ(TP)合成酵素の阻害と4種の自己溶菌酵素の活性化により、ペプチドグリカン細胞壁破壊の溶菌・殺菌を起こすものと推察した。

キーワード;黄色ブドウ球菌、銅イオン溶液、最小発育阻止濃度(MIC)、最小殺菌濃度(MBC)、生菌数単位(CFU)、ペプチドグリカン細胞壁、トランスグリコシラーゼ(TG)、トランスペプチダーゼ(TP)、自己溶菌酵素

¹ 日本大学薬学部上席研究員

1. 緒言

近年、金属イオンと金属錯体が、微生物細菌やウイルスに対する抗菌、抗ウイルスなどの抗微生物対策に有効的に発揮されている¹⁾。特に、白金や銅などの金属錯体が制癌²⁾、プリオン病・アルツハイマー病³⁾・ウイルス感染症などの疫病や重金属蓄積・ウイルソン病⁴⁾・筋萎縮性側索硬化症⁵⁾・パーキンソン病⁶⁾などの難病に対して効果的になることが予想される⁷⁾。銅イオンと銅錯体についての研究も盛んに行われてきており、抗菌を初め、細菌感染防止⁸⁾、防汚⁹⁾など画期的に進んでいる。しかし、いずれにしても、細菌やウイルスに対する金属イオンと金属錯体の抗菌・抗ウイルス挙動の抗菌・殺菌作用過程の解明までには至っていないのが現状である。

本研究の目的は、グラム陽性菌に対する銅イオン溶液による抗菌・殺菌過程の解明の一環として、黄色ブドウ球菌への銅イオン溶液による抗菌感受性試験を行い、細菌細胞壁ペプチドグリカン層で起こる抗菌・殺菌反応を明らかにすることにある。前報ではグラム陰性菌に対する銅イオンと活性酸素種の抗菌作用機構を考察した¹⁰⁾。今回の実験では、グラム陽性菌の代表として黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)に対する銅イオンの最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)、最小殺菌濃度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)、および生菌数(Account of bacterial cell, cfu/mL)の測定を行い、その測定結果と考察、および銅イオン溶液による黄色ブドウ球菌ペプチドグリカン(PGN)細胞壁の溶菌・殺菌・破壊挙動について銅錯体形成¹¹⁾、合成酵素阻害、自己溶菌酵素活性化から考察を試みた。

2. 供試材と実験方法

(1)供試材

銅イオン抗菌剤：和光純薬・特級試薬で硝酸銅(II)三水和物 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ の 10 種 Cu^{2+} 濃度各溶液の準備、試薬硝酸銅の選択は、溶液では銅イオンと硝酸イオン全解離および銅イオンの MIC、MBC 測定に硝酸イオンの影響が殆どないことからなされた。

微生物：黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (NBRC12732)

使用した培地は全て日水製薬製である。

(2)実験方法

初めに検体の銅イオン濃度を 10,000 ppm になるように、ハートブレインインフュージョン培地で調整する。次に 2 倍段階希釈法で 9 段階希釈した合計 10 段階の希釈液を用意した。その後、それぞれの希釈液 1 mL に対して最終濃度が 5×10^5 cfu/mL になるように調整した菌液を 1 mL ずつ接種した培養液を用い、以下に記す MIC 測定、MBC 測定、生菌数測定に供した。

① MIC 測定；上記により調整した培養液 35°C で 20 時間培養し、発育の有無を肉眼で判

別した。

- ② MBC 測定 ; MIC 測定直後の培養液 0.1mL を SCDLP 寒天培地 20mL により希釈し、35°C で 24 時間培養し、シャーレで生育したコロニーの有無で判別した。
- ③ 生菌数 : まず MIC 測定直後の培養液を、SCDLP ブイヨン培地により 10 倍段階希釈法で 7 段階希釈した。次に標準寒天培地により 35°C で 24 時間培養し、シャーレで生育したコロニーを拡大鏡付きコロニーカウンターで計数した (生菌数は標準寒天培地に形成されたコロニー数、生菌数単位 ; Colony Forming Unit, cfu/mL で表す)。

3. 実験結果および考察

3.1 抗菌力測定結果

表 1 に黄色ブドウ球菌に対する銅イオンの抗菌力測定試験結果を示す。

表 1 黄色ブドウ球菌に対する銅イオン溶液の MIC(ppm), MBC(ppm), 生菌数(cfu/mL) の試験結果

検体液	銅イオン濃度 (ppm)									
	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	9.8
硝酸銅溶液										
MIC(+) 陽性 (-) 陰性	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MBC (同上)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
生菌数 (cfu/mL)	<10	<10	<10	1.1 X 10 ²	3.1 X 10 ⁸	4.0X 10 ⁸	4.5X 10 ⁸	5.1X 10 ⁸	5.5X 10 ⁸	5.3 X 10 ⁸

(-) ; No visible bacterial growth, (+) ; Bacterial growth(visible turbidity)

MIC 値は 625 ppm、MBC 値は 1250 ppm、MBC/MIC=2 が得られた。MIC と MBC の値の差が小さいほど良好な抗菌剤であり^{1 2)}、MBC/MIC の比の値が静菌的と殺菌的とで異なり、一例として、静菌的な場合は 32 以上、殺菌的な場合 2~4 以内とされる^{1 3), 1 4)}。従って、従来から得られている銅イオンの静菌作用でなく、本実験の場合、銅イオンは殺菌作用として働くものと判断される。他方、従来から研究されている黄色ブドウ球菌に対しての銅イオンの MIC 値 78.1~250 ppm、MBC 値 500 ppm^{1 5)} が得られている。本実験の硝酸銅イオン溶液による MIC、MBC 測定結果とは合致せず、単純な比較はできないが、本実験で得られた結果は、従来の研究より比較的高い Cu²⁺ 濃度が得られている。この要因については今の所不明である。

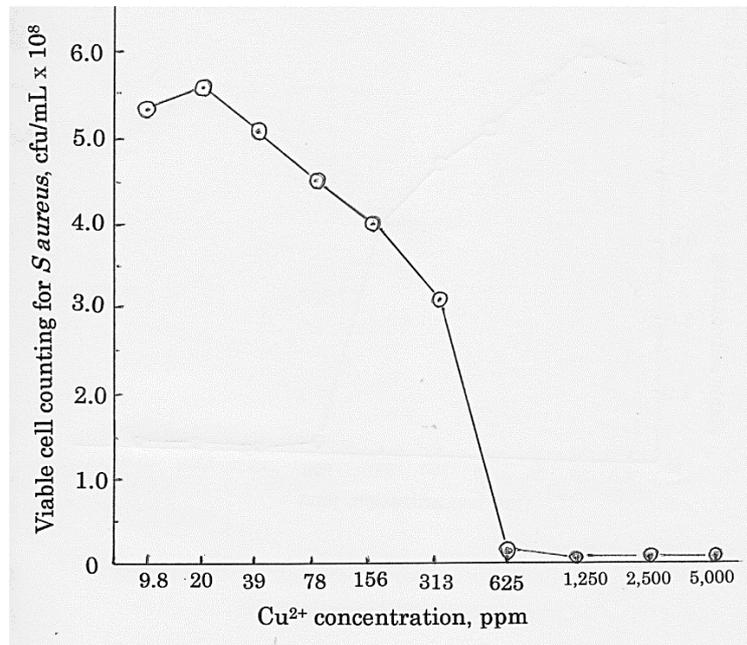


図1 黄色ブドウ球菌に対する Cu²⁺ 濃度と生菌数との関係

銅イオン濃度に対する黄色ブドウ球菌の生菌数を図1に示す。Cu²⁺濃度(ppm)の増加と共に生菌数は減少する。銅イオン濃度に対する黄色ブドウ球菌の殺菌能は、銅イオン濃度の増加と共に、9.8~20 ppmでは減少が見られず、39 ppm以上から減少している。特にMBC付近のCu²⁺濃度では急激な減少が見られる。この減少は殺菌作用が急激に起こる領域であり、Cu²⁺による細菌表層のペプチドグリカン細胞壁の溶菌、破壊へと導く。

3.2 測定結果の考察

(1)生菌数の濃度依存性,殺菌曲線と殺菌速度との対応,銅イオンによる静菌作用と殺菌作用

図1のCu²⁺濃度に対する生菌数の減少曲線、即ち殺菌曲線は、24時間培養され、特に菌の増殖期間に強い殺菌効果を経た結果得られたものである。殺菌効果から死滅速度D値、殺菌速度、殺菌時間が推定され¹⁶⁾、殺菌曲線の勾配は、概ね殺菌速度の濃度依存性に対応すると考えられる。それ故、銅イオン濃度増加と共に、低濃度ではMIC値までは殺菌量は少ないが、特にMBC値付近の濃度においては急激に殺菌量と殺菌速度は増加する。MIC値は静菌作用効果の範囲、MBC値は殺菌作用効果の範囲を示すものと考えられる。MBC以上の殺菌的薬物は細菌を死滅させることができるので細菌の生存数は極端に少なくなるが、殺菌効果は強力になる。一方、人体に対しての適応は、この条件では銅の許容量から考えて過剰摂取となり安全性が保たれるかどうか疑問が残る。本測定の結果から、黄色ブドウ球菌に対しては、銅硝酸水溶液による殺菌作用効果が十分発現されていることが理解される。

(2)銅イオンによるペプチドグリカン細胞壁の破壊

縦糸方向には、NAG(GlcNAc)と NAM(MurNAc)との二糖グリカンの繰り返しを基本とし、一方、横糸方向には、NAMに4つのアミノ酸からなるテトラペプチドが結合した構造を持ち、隣り合ったペプチド鎖のD-アラニンとL-リジンの間は5分子のグリシンで架橋されている。このグリシンによる架橋構造は黄色ブドウ球菌に特異的である。

ペプチドグリカン合成過程は、細胞質で細胞壁前駆体の合成で始まり、細胞質膜で脂質キャリアに結合した新規細胞壁サブユニットの合成、細胞壁でペプチドグリカンへの新規細胞壁ユニットの結合によって、伸びゆくペプチドグリカン鎖に新たな細胞壁ユニットが組み込まれる²⁰⁾。ペプチドグリカン重合体は、2糖の繰り返し骨格をなすサブユニットが(NAG)と(NAM)で構成されている。この骨格鎖はペプチド(PEP)によって架橋されている。ペプチドグリカンの生合成は、次の5段階によって行われる²¹⁾。

細胞質・細胞膜において、

- ① サブユニットの活性化 (NAM と NAG の活性化ペプチドグリカン前駆体 UDP(Uridine diphosphate)-MurNAc-pentapeptide と UDP-GlcNAc の合成)。
- ② 架橋ペプチドの合成。ペプチドは UDP-NAM にアミノ酸が連続的に付加され、末端に2個のアラニン残基がジペプチドとして加えられている。
- ③ NAM-PEP 複合体は UDP から膜に結合したバクトプレノールリン酸 (BPP) に転送される。

細胞壁において、

- ④ 既存のペプチドグリカンへの繰り返し単位の添加 (重合反応) である。この重合反応はトランスグリコシラーゼ (TG) 酵素によって触媒される²²⁾。
- ⑤ ペプチドグリカン骨格へのペプチドの架橋を行う (架橋反応)。この架橋反応を触媒とする酵素をトランスペプチダーゼ (TP) という²²⁾。黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンは、5残基の Gly オリゴペプチドによって間接的に架橋され、ペントペプチドの3番目の位置に存在する L-Lys に予め(Gly)₅ が結合し、(Gly)₅ の末端アミノ基と D-Ala の間に架橋が形成される。

4.2 黄色ブドウ球菌特有の自己溶菌酵素 (autolysin)

ペプチドグリカンの切断に関与する酵素として、黄色ブドウ球菌では、4種類の自己溶菌酵素、N-アセチルムラミダーゼ、N-アセチルグルコサミダーゼ、N-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼ、およびエンドペプチダーゼが存在する²³⁾。また、さらにリゾスタフィン酵素がペントグリシン(Gly)₅の分解酵素として働く²⁴⁾。ペプチドグリカン合成酵素、TGとTPの2酵素、黄色ブドウ球菌の4種類の自己溶菌酵素、およびリゾチームとリゾスタフィン酵素の各作用部位を図3にそれぞれ示す。

は溶菌・殺菌にも大きな役割を果たすものである。

細胞分裂時におけるペプチドグリカン細胞壁の形成の観点から考えると、ペプチドグリカン形成における細胞分裂時の分裂部位に隔壁ペプチドグリカンが形成され、細胞質が分割される。その後、隔壁が分解酵素により分割され、娘細胞を分離する。細胞分裂部位では、隔壁合成酵素と隔壁分割酵素のバランスによる厳密な制御がなされている。銅イオンが隔壁合成酵素を阻害して、隔壁分割酵素による隔壁の分解が進み、溶菌を引き起こすことが考えられる²⁵⁾。隔壁合成酵素は通常は不活性であり、細胞分裂時のみ活性化するが、黄色ブドウ球菌のように細胞分裂時に隔壁が形成され、後ほど隔壁分割が独立して起こるとされている²⁵⁾。その場合の隔壁分割酵素とその制御機構についてのメカニズムはまだ明らかになっていない。自己溶菌酵素の活性化に隔壁分割酵素の活性化を付加することによる溶菌が起こることも考えられるが、今時点ではその詳細は分からない。

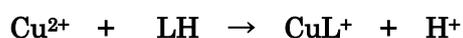
4.3 ペプチドグリカン細胞壁における合成酵素と分解酵素とのバランス喪失による溶菌要因

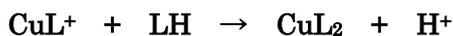
ペプチドグリカンの合成には合成酵素が働く。ペプチドグリカンは静的なものでなく、菌の増殖と共に常に代謝回転を受け、細胞分裂をして増殖する。このため、このペプチドグリカンを切断する酵素を必要としている。その酵素は一義的にはリゾチーム、補酵素としてリゾスタフィンがある。一方、ペプチドグリカン形成にはペプチドグリカン細胞壁合成酵素も必要だが、分解酵素も重要な役割を果たしている。銅イオンは補酵素による生合成を活発にすることが明らかにされている²⁶⁾。このことは銅イオンの誘発による自己溶菌酵素の活性化に寄与すると考えられる。それらの合成酵素と分解酵素の活性は通常厳密に制御されている²⁵⁾が、この合成と分解のバランスが失われると、ペプチドグリカンは欠損し、溶菌することとなる。即ち、銅イオンによって細胞壁合成酵素が阻害され、一方で細菌自身が保有する自己溶菌酵素の阻害剤の役目を持つリポタイコ酸(LTA)が細胞外に遊離されると共に、銅イオンによって自己溶菌酵素が活性化され溶菌・殺菌が起こり、ペプチドグリカン層の破壊に繋がるものと考えられる²⁷⁾。

4.4 銅イオンの細胞壁ペプチドグリカン層への侵入、攻撃部位、銅錯体形成

(1)縦方向への銅イオンの侵入と糖鎖間銅錯体形成による重合反応の阻止

—NAG-NAM-NAG-NAM—連結における糖鎖結合の NAM-NAG 結合部位に Cu^{2+} イオンが侵入して、 Cu^{2+} が TG 酵素と結合し、TG 酵素によるグリカン 2 糖鎖の結合、末端である N-アセチル酸 MurNAc との間でのグリコシド結合の重合反応を阻止する。また、リゾチーム酵素併用による NAM-NAG 結合の切断の促進で、切断後の部位に糖鎖間銅錯体の形成が推察される²⁸⁾。その糖鎖間銅錯体は $\text{CuL}_2 = \text{Cu}(\text{O}_2\text{N}_2)$ と考えられ、次の反応式で進行する。

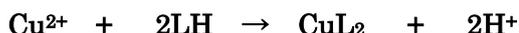




Lは有機リガンドを表す。

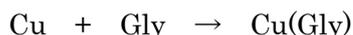
(2)横方向への銅イオンの侵入とペプチド銅錯体形成による架橋反応の阻止

銅イオンのペプチドグリカン層への侵入で、合成酵素の不活化、分解酵素の活性化が起こることが推察される。グリカン部分とペプチド部分とを結ぶ MurNAc→ L-Ala-結合部分の架橋反応を銅イオンが侵入して阻害する。その際は、次の反応式により、ペプチド銅錯体 3N-Cu-O、Cu(Gly-L-Ala)H₂O が形成されると考えられる。



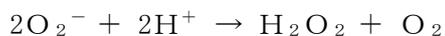
(3)リゾスタフィンによるペントグリシン分子の開裂、銅-グリシン錯体の形成

ペントグリシン架橋分子への銅イオンの侵入で、図 3 に示すように、リゾスタフィン酵素の活性化による(Gly)₅ 中の Gly-Gly 結合の切断と開裂によって、銅イオンとグリシンの錯体 **Cu(Gly)_x** ²⁹⁾ が形成されると考えられる。



4.5 細胞壁における活性酸素(ROS) O₂⁻, H₂O₂ の産生

黄色ブドウ球菌の認識におけるタンパク質リン酸化酵素から構成される情報経路の活性化を介して活性酸素(ROS)の産生が導かれる³⁰⁾。また、金属イオン依存性の活性酸素の産生はキレート化合物生成に依存する³¹⁾。それ故、細胞壁では銅イオンは銅錯体または銅キレート錯体を形成して活性酸素を生成する。さらに、タイコ酸とリポタイコサンとの銅イオンの結合で、O₂⁻、OH⁻ を生成する³²⁾。そのうち、O₂については、NADPH + H⁺ が、縦糸方向の糖鎖間 NAG-NAM 間で反応して、O₂ → O₂⁻ により、スーパーオキシドアニオン O₂⁻ が生成される。さらに、次のように過酸化水素 H₂O₂ を生成する。



5. 結論

黄色ブドウ球菌に対する硝酸銅溶液の Cu²⁺の抗菌感受性試験の結果、静菌作用 MIC 値 =625 ppm、殺菌作用 MBC 値=1250 ppm が得られ、Cu²⁺ 溶液濃度増加に伴う生菌数の減少が観測され、Cu²⁺ 溶液は十分な殺菌作用効果を示す。Cu²⁺ によるペプチドグリカン細胞壁の破壊は、合成酵素と分解酵素のバランス喪失による溶菌要因の結果である。黄色ブドウ球菌表層のペプチドグリカン細胞壁における抗菌反応は、銅イオン誘導による糖鎖間銅錯体とペプチド銅錯体を形成しつつ、2種の TG・TP 合成酵素の阻害と4種の自己溶菌酵素の活性化により、ペプチドグリカン細胞壁の溶菌・殺菌による細胞壁破壊を起こすものと推察した。

謝辞：MIC・MBC などの抗菌力測定試験は埼玉県産業技術総合研究センター への依頼試験として実施され、細井永次研究員の指導の下で行われた。

引用・参考文献

- 1) Marcela Rizzotto(2012):Chapter 5 Metal Complexes as Antibacterial Agents,A Search for Antibacterial Agents,book edited by Varaprasad Bobbarala,ISBN.Publisher:In Tech,Chapters published September, pp.73-88.
- 2)中井美早紀 (2011)：抗がん薬としての高機能性金属錯体の開発とその生理評価、関西大学理工会誌、理工学と技術、Vol.18, p71-74.
- 3)京都大学大学院 病態機能分析学分野 (2014)：微量金属元素の生体作用解明および生理活性金属錯化合物の創製、研究紹介。
- 4)林久男、鈴木理恵、涌澤伸哉(2004)：ウイルソン病とその薬物治療、YAKUGAKU ZASSHI、Vol.124、711-724.
- 5)西田雄三 (2007)：二量体 SOD 酵素の構造変化と筋萎縮性側索硬化発症、TCI メール、No.135、1-8.
- 6)望月秀樹 (2010)：パーキンソン病の治療と病態、臨床神経学、50 巻 9 号 623-627.
- 7)Marcela Rizzotto: Metal Complexes as Antimicrobial Agents, A Search for Antibacterial Agents, Chapter 5:73-88, 2010
- 8)J.O Gorman,and H.Humphreys(2012): Application of Copper to prevent and control infection,Journal of Hospital Infection,xxx,1-7.
- 9)E.Pahontu,F.Julea,T.Rosu,et al(2015);Antibacterial,antifungal and in vitro antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones, J.Cell.Mol.Med. Vol.19, pp.865-878.
- 10)石田恒雄(2014)：グラム陰性菌細胞に対する銅イオンと活性酸素種の抗菌作用機構、銅と銅合金、53,No1,272-278.
- 11)山内脩・鈴木晋一郎・櫻井武(2012)：生物無機化学、朝倉書店。
- 12)石田恒雄(2011)：抗菌剤の特性と抗菌メカニズム、マテリアルライフ学会誌、23, No1, 21-32.
- 13)新井進・岡本博樹・野口恵子他(2003)：Telithromycin の in vitro 殺菌作用、日本化学療法学会誌、Vol.51,S-1,77-82.
- 14)C.Mims, 中込治監訳(2004)；ミムス微生物学、西村書店、476-478.
- 15) 高玉博朗、木付貴司、松下富春、小久保正(2010)；人工関節用チタンへの生体活性と抗菌性付与、中部大学生命健康科学研究所紀要、Vol.7, 61-66.
- 16) 細井永次・鳴嶋善聡(2010)：抗菌剤の簡易評価法の開発、埼玉県産業技術総合センター研究報告、8, p.1-5.

- 17)力石紀子・野宮健司・高木由貴他(2011)：広い抗菌活性スペクトルを示す錯体の合成、
バクテリアの電顕観察、神奈川大学総合理学研究所 **22**；29-35.
- 18)K.Jung,H.C.Koo,K.Kim,S.Shin,S.H.Kim,and Y.H..Park (2008); Antibacterial activity
and mechanism of action of the Silber ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia
coli*, Appl Environ Microbial, Apr., **74(7)**, 2171-2178.
- 19)土肥義胤、山本容正、宇賀昭二(2008)：スタンダード微生物学、第2版、文光堂、p.30-
31.
- 20) Cedric.MIMS, 中込治 監訳(2012):ミムス微生物学、西村書店、456.
- 21)Richard A.Harvey,Cynthia Nau Cornelissen,Bruce D.Fisher 松本哲哉・館田一博 監
訳(2014): イラストレイテッド微生物学、Microbiology、Third Edition、原書3版、丸善、
61-64.
- 22)柳原保武、多村憲編集 (2006)：微生物学 病原微生物の基礎、改訂第5版、南江堂、31-
32.
- 23)西野武志(2014)：総説、薬剤耐性菌の耐性機構に関する研究、日本化学療法学会雑誌、
Vol.62,No.2,March,177-191.
- 24)嶋谷雅博(1979)：黄色ブドウ球菌の自己融解のリポタイコ酸による調節と殺菌、大阪大学
学位論文、昭和54年3月。
- 25)上原剛(2010)：細菌の形態形成における細胞壁造形機構、生化学、**第85巻**第5号,349-
353.
- 26)岡島・中井・谷澤(2011):ビルトイン型補酵素の構造、機能と生合成、生化学、**83(8)**, 691-
703.
- 27)平田隆則(1970)：黄色ブドウ球菌細胞壁溶解機序ならびに溶解因子の精製に関する研究、
大阪大学歯学研究科、学位論文、昭和45年3月。
- 28)福留秀雄(1971)：酵素反応の機構、生物物理、**Vol.11**, No.4, 12-26.
- 29)石田恒雄(2015):微生物細菌細胞に対する銅イオンと銅錯体の抗菌作用、マテリアルライ
フ学会誌、**Vol.27**, 23-31.
- 30)白土明子(2012)：黄色ブドウ球菌の細胞壁成分による自然免疫の誘導と制御、生化学、
第84巻、第9号、737-752.
- 31) Welch KD,Davis TZ,Aust SD(2002):Iron autoxidation and free radical
generation:effects of buffers,ligands and chelators. Arch Biochem Biophys
397:360-369.
- 32)池田玲子、他10名著(2000)：薬科微生物学、第4版、丸善、21-23, 40-43.