

学位論文題名

STUDIES ON MOLECULAR WEIGHT DEPENDENT  
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOSAN OLIGOMER

(キトサンオリゴ糖の分子量依存的抗細菌活性の研究)

学位論文内容の要旨

近年、病原性微生物により引き起こされる感染症が大きな社会問題となっている。それに伴い微生物の生育を抑制する抗菌性物質が注目されてきている。これまでは微生物による感染症対策として抗生物質による治療が頻繁に行われてきた。しかし、抗生物質の汎用は微生物による感染症対策として非常に有効であった反面、抗生物質に耐性を持つ微生物の出現を誘導する結果を引き起こした。このため、ここ数年の間に抗生物質の使用を控える動きが出始め、抗生物質に代わり天然物由来の抗菌性物質が注目され始めた。これらの抗菌性物質は抗生物質と比較して抗菌力は劣るものの、天然物由来ということで生分解性を示し、人体に対する毒性もほとんど見られないという利点があり、その応用が大いに期待されている。

これまで天然物由来の抗菌性物質としては発酵生産物であるアルコールや有機酸類、植物構成成分である香辛料やサポニン類、テルペン系化合物、タンニンなど、さらにアミノ酸系のアルカロイドやタンパク質などが知られている。これらの抗菌性物質と同様にキトサンにも抗菌性物質としての作用が認められており、天然物由来の抗菌性物質としてその応用が期待されている。

キトサンはこれまで食品業界や水産業界において、空気や水質を汚染する産業廃棄物として問題にされてきたカニ殻やエビ殻などに多く含まれている。そのため、このキトサンを有効利用する技術の研究開発は環境汚染物質の削減と資源の再利用という面からも非常に価値のあるものと考えられる。

キトサンはグルコサミン残基の2位の炭素にアミノ基を有し、このアミノ基が容易に陽電荷を示すことから非常に特徴的な性質を示すようになる。キトサンの抗菌活性に関してもこのアミノ基に由来する正電荷が関与していると考えられている。微生物の菌体表面は様々な糖類やタンパク質の影響でわずかに負の電荷を帯びている。このためキトサンの陽電荷が細胞表面と静電的に吸着し、細胞の生育を阻害するといわれている。カビの細胞表面に吸着したキトサンはカビの生産する酵素により分解されオリゴ糖になり、このオリゴ糖がカビの細胞内に侵入しDNAからRNAへの転写を阻害するためにカビの生育が阻害されるという報告がされている。しかし、細胞内に侵入することにより生育抑制が起こるのであれば、細胞内に取り込まれやすい低分子量のオリゴ糖の方が抗菌性が強いと考えられるが、高分子量のキトサンの抗菌力はオリゴ糖の抗菌力よりもかなり強いという報告もなされている。このようにキトサンによる抗菌作用のメカニズムについてはまだほとんど明らかにされておらず、その解明が期待されている。

本研究は、細菌に対するキトサンオリゴ糖の抗菌活性とその分子量依存性、抗菌メカニズムの解明を目的として行われた。ほとんどの細菌は水分を含まない環境では生息しない。そのため、水溶性を示すということが抗菌性物質としての応用に重要であると考えられる。キトサンは水に不溶な高分子である。キト

サンに水溶性を持たせるための方法としては化学修飾や低分子化が考えられる。化学修飾はキトサンに水溶性を与えるだけでなく、その抗菌力を高めることも可能である。しかし、化学修飾することにより天然物由来の抗菌性物質とは言えなくなる。本研究では、低分子化することによりキトサンに水溶性を持たせ、より天然物に近い形でのキトサンオリゴ糖の抗細菌活性を検討した。キトサンの低分子化には亜硝酸分解法を用いた。従来行われてきた、酵素や濃塩酸などによる分解方法では、分解されたキトサンオリゴ糖の分子量を制御することが非常に困難である。しかし、亜硝酸分解法では分解反応に用いる亜硝酸ナトリウムの量を調節することにより分解物の分子量を制御することができる。この方法により様々な分子量のキトサンオリゴ糖を調製した。調製されたキトサンオリゴ糖は、アルコールに対する溶解度の差を利用して分画された。さらに分子量分布の狭いオリゴ糖を調製するために、透析による分画を試みた。透析分画は分画分子量の異なる3種の透析膜を用いて段階的に行われた。この方法により、多量のサンプルを比較的狭い分子量分布で得ることに成功した。しかし、透析分画では多くの試料を調製することが困難であるため、より詳細な分子量依存性を明らかにすることは難しい。そこでカラムクロマトグラフィーによる分画を行い、分子量の異なるサンプルを多数調製することに成功した。透析とカラムクロマトグラフィーにより分画されたキトサンオリゴ糖の抗細菌活性を測定し、その分子量依存性を検討した。本研究では5つの抗菌性測定法を用いた。pH測定法と濁度測定法により相対的な細胞数の変化を観察し、生菌数測定法により細菌のコロニー形成の変化を観察することにより抗菌活性を測定した。また、最小阻止濃度の測定により、抗菌剤としての活性の強さを検討し、MTT法により呼吸系酵素への影響を観察した。指標菌としては食中毒菌として知られている大腸菌、病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、セレウス菌の5菌種を用いた。測定の結果、キトサンオリゴ糖の抗細菌活性は細菌の種に対して活性の強さが異なるということ、その抗菌活性はキトサンオリゴ糖の分子量に依存すること、菌種に対して濃度依存的に活性を示すことなどが明らかにされた。特に分子量依存性に関しては分子量が高い方が抗菌活性が強く、低分子量のキトサンオリゴ糖では増殖抑制効果はまったく見られず、むしろ増殖を促進させるような結果が示すことが明らかになった。キトサンオリゴ糖が分子量依存的に抗細菌活性を示すメカニズムを解明するために、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光顕微鏡観察を行った。蛍光試薬であるフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を結合させたキトサンオリゴ糖 (FITCラベル化キトサンオリゴ糖) を調製し、細菌とFITCラベル化キトサンオリゴ糖由来の蛍光との関係を蛍光顕微鏡下で観察したところ、分子量の大きいキトサンオリゴ糖は細菌の細胞表面に吸着し強い抗細菌活性を示すこと、抗細菌活性をまったく示さない低分子量のキトサンオリゴ糖は細菌内に取り込まれていることが明らかになった。細胞表面に吸着したキトサンオリゴ糖が細胞壁や細胞膜に与える影響などを検討した結果、細胞壁の破壊や膜代謝阻害などが起きていないことが確認された。

以上の結果から、キトサンオリゴ糖は細菌の表面に吸着することで細菌の生育を抑制し、菌体内に取り込まれたキトサンオリゴ糖が抑制作用を示すことはないということからキトサンオリゴ糖の抗細菌活性には分子量依存性が認められるということが明らかになった。また、その分子量依存性はキトサンオリゴ糖の膜透過が分子量に依存するために起こると考えられる。さらにキトサンオリゴ糖の生育抑制メカニズムの最初の段階が細胞表面への吸着であり、吸着したキトサンオリゴ糖が細胞壁の破壊などを起こさずに抑制作用を示すことが明らかにされた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 倉 清 一

副 査 教 授 西 則 雄

副 査 教 授 松 山 英 俊 (北海道東海大学工学部)

副 査 助 教 授 坂 入 信 夫

## 学 位 論 文 題 名

### STUDIES ON MOLECULAR WEIGHT DEPENDENT ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOSAN OLIGOMER

(キトサンオリゴ糖の分子量依存的抗細菌活性の研究)

近年、病原性微生物により引き起こされる感染症が大きな社会問題となっている。それに伴い微生物の生育を抑制する抗菌性物質が注目されてきている。これまでは微生物による感染症対策として抗生物質による治療が頻繁に行われてきた。しかし、抗生物質の汎用は微生物による感染症対策として非常に有効であった反面、抗生物質に耐性を持つ微生物の出現を誘導する結果を引き起こした。このため、ここ数年の間に抗生物質の使用を控える動きが出始め、抗生物質に代わり天然物由来の抗菌性物質が注目され始めた。これらの抗菌性物質は抗生物質と比較して抗菌力は劣るものの、天然物由来ということで生分解性を示し、人体に対する毒性もほとんど見られないという利点があり、その応用が大いに期待されている。これまで天然物由来の抗菌性物質としては発酵生産物であるアルコールや有機酸類、植物構成成分である香辛料やサポニン類、テルペン系化合物、タンニンなど、さらにアミノ酸系のアルカロイドやタンパク質などが知られている。

申請者は、これらの抗菌性物質と同様にキトサンにも抗菌性物質としての作用が認められており、天然物由来の抗菌性物質としてその応用が期待されているが、その抗菌機構がはっきりしないことに注目してこの研究を始めた。

キトサンはグルコサミン残基の2位の炭素にアミノ基を有し、このアミノ基が容易に陽電荷を示すことから非常に特徴的な性質を示すようになる。キトサンの抗菌活性に関してもこのアミノ基に由来する正電荷が関与していると考えられている。微生物の菌体表面は様々な糖類やタンパク質の影響でわずかに負の電荷を帯びている。このためキトサンの陽電荷が細胞表面と静電的に吸着し、細胞の生育を阻害するといわれている。カビの細胞表面に吸着したキトサンはカビの生産する酵素により分解されオリゴ糖になり、このオリゴ糖がカビの細胞内に侵入しDNAからRNAへの転写を阻害するためにカビの生育が阻害されるという報告がされている。しかし、細胞内に侵入することにより生育抑制が起こるのであれば、細胞内に取り込まれやすい低分子量のオリゴ糖の方が抗菌性が強いと考えられるが、高分子量のキトサンの抗菌力はオリゴ糖の抗菌力よりもかなり強いという報告もなされている。このようにキトサンによる抗菌作用のメカニズムについてはまだほとんど明らかにされておらず、その解明が期待されている。

申請者は、細菌に対するキトサンオリゴ糖の抗菌活性とその分子量依存性、抗菌メカニズムの解明を目的として研究を行った。ほとんどの細菌は水分を含まない環境では生息しない。そのため、水溶性を示すということが抗菌性物質としての応用に重要であると考えられる。キトサンは、本来水に不溶な高分子で

ある。キトサンに水溶性を持たせるための方法としては化学修飾や低分子化が考えられる。化学修飾はキトサンに水溶性を与えるだけではなく、その抗菌力を高めることも可能である。しかし、化学修飾することにより天然物由来の抗菌性物質とは言えなくなる。本研究では、低分子化することによりキトサンに水溶性を持たせ、より天然物に近い形でのキトサンオリゴ糖の抗細菌活性を検討した。キトサンの低分子化には亜硝酸分解法を用いた。従来行われてきた、酵素や濃塩酸などによる分解方法では、分解されたキトサンオリゴ糖の分子量を制御することが非常に困難である。しかし、亜硝酸分解法では分解反応に用いる亜硝酸ナトリウムの量を調節することにより分解物の分子量を制御することができる。この方法により様々な分子量のキトサンオリゴ糖を調製した。調製されたキトサンオリゴ糖は、アルコールに対する溶解度の差を利用して分画された。さらに分子量分布の狭いオリゴ糖を調製するために、透析による分画を試みている。透析分画は分画分子量の異なる3種の透析膜を用いて段階的に行われた。この方法により、多量のサンプルを比較的狭い分子量分布で得ることに成功した。しかし、透析分画では多くの試料を調製することが困難であるため、より詳細な分子量依存性を明らかにすることは難しい。そこでカラムクロマトグラフィーによる分画を行い、分子量の異なるサンプルを多数調製することに成功した。透析とカラムクロマトグラフィーにより分画されたキトサンオリゴ糖の抗細菌活性を測定し、その分子量依存性を検討するため、5つの抗菌性測定法を用いている。pH測定法と濁度測定法により相対的な細胞数の変化を観察し、生菌数測定法により細菌のコロニー形成の変化を観察することにより抗菌活性を測定した。また、最小阻止濃度の測定により、抗菌剤としての活性の強さを検討し、MTT法により呼吸系酵素への影響を観察した。指標菌としては食中毒菌として知られている大腸菌、病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、セレウス菌の5菌種を用いている。測定の結果、キトサンオリゴ糖の抗細菌活性は、細菌の種に対して活性の強さが異なるということ、その抗菌活性はキトサンオリゴ糖の分子量に依存すること、菌種に対して濃度依存的に活性を示すことなどを明らかにしている。特に分子量依存性に関しては分子量が高い方が抗菌活性が強く、低分子量のキトサンオリゴ糖では増殖抑制効果はまったく見られず、むしろ増殖を促進させるような結果が示すことが明らかになった。キトサンオリゴ糖が分子量依存的に抗細菌活性を示すメカニズムを解明するために、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光顕微鏡観察を行った。蛍光試薬であるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)を結合させたキトサンオリゴ糖(FITCラベル化キトサンオリゴ糖)を調製し、細菌とFITCラベル化キトサンオリゴ糖由来の蛍光との関係を蛍光顕微鏡下で観察したところ、分子量の大きいキトサンオリゴ糖は細菌の表面に吸着し強い抗細菌活性を示すこと、抗細菌活性をまったく示さない低分子量のキトサンオリゴ糖は細菌内に取り込まれていることが明らかになった。細胞表面に吸着したキトサンオリゴ糖が細胞壁や細胞膜に与える影響などを検討した結果、細胞壁の破壊や膜代謝阻害などが起きていないことが確認され、物理的な栄養透過阻害によるものと考えている。

以上の結果から、キトサンオリゴ糖は細菌の表面に吸着することで細菌の生育を抑制し、菌体内に取り込まれたキトサンオリゴ糖が抑制作用を示すことはないということからキトサンオリゴ糖の抗細菌活性には分子量依存性が認められるということを明らかにした。また、その分子量依存性はキトサンオリゴ糖の膜透過が分子量に依存するために起こると考えられ、さらにキトサンオリゴ糖の生育抑制メカニズムの最初の段階が細胞表面への吸着で、吸着したキトサンオリゴ糖が細胞壁の破壊などを起こさずに細菌生育の抑制作用を示すことを示した。

この様に、申請者が提出した論文の内容及び研究の将来性等から、審査員一同は申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるにふさわしい資格を有するものと判定した。