

# マクロライド薬長期投与患者から分離された *Pseudomonas aeruginosa* の病原因子に関する検討

青木 渉<sup>1</sup>, 藤田 和恵<sup>2</sup>, 三上 愛里<sup>1</sup>, 眞野 容子<sup>3</sup>, 古谷 信彦<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

<sup>2</sup> 日本医科大学 内科学 (呼吸器内科学)

<sup>3</sup> 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

## 要旨

本研究では、マクロライド薬長期投与患者から分離された *P. aeruginosa* (すべてムコイド型) と、標準株として *P. aeruginosa* PAO1 を用いて、増殖速度、キング培地による色素種類の判別、ピオシアニン産生量、細胞障害性の比較検討を行った。PAO1 に対し、臨床分離株すべてにおいて増殖速度の低下がみられた。キング培地を用いた色素種類の判別では、PAO1 がピオシアニン産生を認めたのに対し、臨床分離株では、色素非産生菌やピオルビン、フルオロセインの産生を認める菌株など、菌株により色素の種類に違いが認められた。ピオシアニンの産生量と細胞障害性との相関では、ピオシアニン産生量が少ない菌ほど細胞障害性が低く、いずれの臨床分離株においても PAO1 より細胞生存率は高値を示す傾向にあった。以上の結果より、マクロライド薬による *P. aeruginosa* の増殖速度抑制、クオラムセンシング機構抑制への関与が示唆された。今後、クオラムセンシング機構に関する遺伝子の発現など、さらなる検討を行う必要がある。

## キーワード

*Pseudomonas aeruginosa*, 毒性因子, マクロライド薬, クオラムセンシング機構

## 1. 序論

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) はグラム陰性の好気性桿菌であり、自然環境のいたるところに生息している。人に対する病原性があり、洗面台や浴槽、呼吸器系装置など身近な湿潤環境に生息するため、日和見感染や院内感染の原因菌となることがある。また、慢性下気道感染症患者の喀痰で高率に分離されており、緑膿菌及びその生成物であるピオシアニンや LPS, exotoxinA などが慢性下気道感染症の病原因子の一つであると考えられている。さらにこれらの病原因子の発現には *P. aeruginosa* のクオラムセンシング機構が関与しているとの報告がある<sup>1)</sup>。*P. aeruginosa* は接着因子や線毛により気道上皮細胞に付着し、biofilm を形成することで各種抗菌薬や宿主の食細胞から身を守る。これらが *P. aeruginosa* の気道表面への

長期定着を可能とし、気道の排出機構を傷害して難治性となり、慢性気道感染症となる<sup>2)</sup>。びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis; DPB) は、日本をはじめとするアジア地域に集積する難治性の慢性気道感染症で、1980 年代初頭には、予後不良な疾患であり、*P. aeruginosa* が死亡の大きな要因であった。しかし、工藤らによるエリスロマイシン少量長期療法の発見と普及により、著しい予後の改善が認められた<sup>3)</sup>。マクロライド薬はアグリコン部分のラクトン環の大きさにより、14 員環 (エリスロマイシン、クラリスロマイシン)、15 員環 (アジスロマイシン) などに分類される。細菌のリボソームに作用してタンパクの合成を阻害し、グラム陽性菌やマイコプラズマ属などに優れた抗菌力を発揮する<sup>4)</sup>。通常、*P. aeruginosa* はマクロライド薬に対して感受性を持たない<sup>5)</sup>。しかし、現在、慢性気道感染症の治療法としてマクロライド長期療法が行われ

ており、*P. aeruginosa* への有効性が報告されている。主な作用として ① 生体に対しては、気道における水分・粘液過剰分泌抑制、IL-8などを介した好中球集積・活性化抑制、② 菌側に対しては、細菌の毒素産生・biofilm形成などの機能抑制が知られている。さらに、これらの病原因子の制御機構そのものであるクオラムセンシング機構に対しても抑制効果を示すことが分かっている<sup>6)</sup>。しかし、これらの報告はマクロライド薬未投与の*P. aeruginosa*にマクロライド薬を作用させて行われた検討であり、マクロライド薬長期投与後に得られた*P. aeruginosa*については検討されていない。そこで、主に菌側に対する影響を検討するため、本研究ではマクロライド長期投与患者より分離された*P. aeruginosa*を用いて、増殖速度、キング培地による色素種類の判別、ピオシアニン産生量、肺胞上皮細胞に対する細胞障害性の比較検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1 使用菌株

某病院のマクロライド薬長期服用中の慢性下気道感染症患者（全て200-400mg/日、投与期間3カ月以上）より分離された*P. aeruginosa*（すべてムコイド型）7株（以下No.1～No.7）と、標準株として*P. aeruginosa* PAO1の計8株を用いた。

### 2.2 増殖速度の検討

McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) に調整した菌液を、滅菌生理食塩水を用いて  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL に希釈し、10 $\mu$ L を LB broth（三光純薬、東京）3mL に接種し、35 $^{\circ}$ C、137rpm で48時間振盪培養した。培養開始から0h、15h、17h、19h、20h、22h、24h、39h、41h、44h、46h、48h後の菌液を10 $\mu$ L サンプルングし、滅菌生理食塩水で $10^9$ 倍まで希釈し、LB agar（和光純薬、東京）を用いて生菌数の算定を行った。

### 2.3 キング培地による色素種類の判別

供試菌を LB agar（三光純薬、東京）に分離培養後、1コロニーをキング A 培地（栄研化学、東京）及びキング B 培地（栄研化学、東京）の斜面全体に塗抹し、キング A 培地では37 $^{\circ}$ C、1晩培養、室温で5日間放置し、キング B 培地では37 $^{\circ}$ C、6日間培養し色素種類の判定を行った。判定は添付文書に従い、キング A 培地で暗青色～緑色を示すものをピオシアニン産生、ピンク～エビ茶色を示すものをピオルビン産生、赤～青色の両者混合した色を示すもの

はピオシアニンとピオルビンの両者を産生しているものと判定した。一方、キング B 培地では黄～黄緑色を示すものをフルオロセイン産生、さらに鮮やかな緑色を示すものはピオシアニンを産生しているものとして判定した。

### 2.4 ピオシアニンの抽出

McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) に調整した菌液を、滅菌生理食塩水を用いて  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL に希釈後、10 $\mu$ L を LB broth 5mL に接種し、35 $^{\circ}$ C、44時間振盪培養を行った。菌液を3000rpm で10分遠心後、上清を4mL バキュティナに分離し、クロロホルムを2.4mL 加えボルテックスでよく混和後、遮光して3時間静置した。上層をマイクロピペットで取り除き、0.2N HCl を0.8mL 加え遮光して一晩静置した。下層までパスツールピペットを差し込み、クロロホルム層を取り除き、その後上清をセルに取り、UVmini-1240（島津製作所、京都）を用いて波長520nm で吸光度を測定した<sup>7)</sup>。

### 2.5 *P. aeruginosa* 培養上清による細胞障害性の検討

McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) に調整した菌液を、滅菌生理食塩水を用いて  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL に希釈後、10 $\mu$ L を LB broth 3mL に接種し、35 $^{\circ}$ C、137rpm で44時間振盪培養を行った。44時間振盪培養した菌液を3000rpm で10分遠心し、上清を0.22 $\mu$ m pore フィルターで濾過滅菌し、緑膿菌培養上清を得た。ヒト肺癌由来の細胞である A549 細胞を Confluent になる直前まで5% FCS 入り RPMI 1640 培地（Life Technologies Corp., CA）でフラスコを用いて培養し、 $10^5$ /mL になるよう調整し、96well 平底プレートに100 $\mu$ L 撒き CO<sub>2</sub> インキュベータで37 $^{\circ}$ C、一晩培養した。5% FCS 入りの RPMI 1640 を捨て、FCS free の RPMI 1640 を95 $\mu$ L と濾過滅菌した緑膿菌上清を5 $\mu$ L 添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータで37 $^{\circ}$ C、48時間反応させた後、Cell Counting Kit-8（和光純薬、東京）を各 well に10 $\mu$ L ずつ添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータで37 $^{\circ}$ C、3時間反応させた。Multiskan FC（Thermo Fisher Scientific Inc., MA）を用いて波長450nm で吸光度を測定した。

## 3. 結果

### 3.1 増殖速度の比較

No.1～No.7 および PAO1 の各時間における菌数算定結果及び培養の際の色素産生菌と産生までの時間を示す（図1、表1）。同時に、観察した培養前後の LB broth の色調変化を示す（写真1、写真2）。PAO1 と比較し、臨床分離

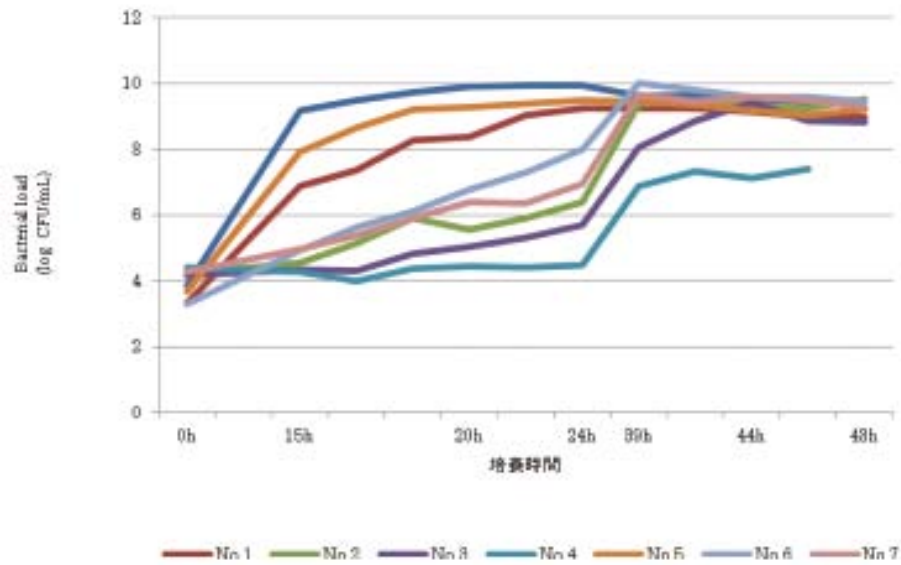


図1 増殖速度

各検体の増殖速度. No.1 から No.7 のすべての臨床分離株で増殖速度の低下がみられた.

表1 色素産生菌と色素産生までの時間

検体	色素産生までの時間
PAO1	15~17h
No.1	24h
No.5	19h
No.7	39h



写真2 色素産生後 (左から PAO1, No.1, No.5, No.7)

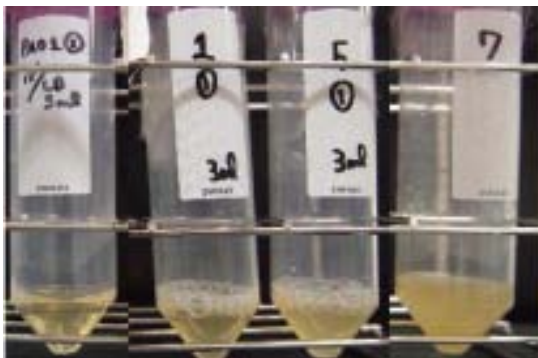


写真1 色素産生前 (左から PAO1, No.1, No.5, No.7)

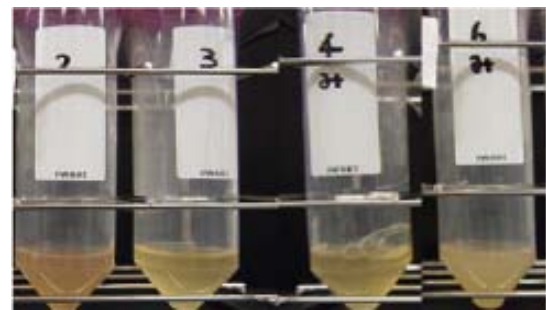


写真3 色素非産生 (左から No.2, No.3, No.4, No.6)

株全てにおいて増殖速度の低下がみられた.

### 3.2 キング培地を用いた色素判別と確認

キングA培地, キングB培地による培地の変化を示す(写真4, 写真5). キングA培地では色素種類は以下のような結果になり(表2), PAO1ではピオシアニン, マクロライド投与緑膿菌では色素非産生およびピオシアニン,

ピオルピン産生株を認めた. キングB培地では色素種類は以下のような結果になり(表3), PAO1ではピオシアニンを, マクロライド投与緑膿菌では色素非産生の株とフルオロセイン産生の株を認めた.



写真4 キング A 培地による色素判別 (左より PAO1, No.1 ~ No.7, コントロール)

表2 キング A 培地による判定結果

検体	培地の色	色素
PAO1	褐色	ピオシアニン
No.1	暗緑色	ピオシアニン
No.2	ピンク色	ピオルビン
No.3	変化なし	非産生
No.4	変化なし	非産生
No.5	黄緑色	ピオシアニン
No.6	暗青色	ピオシアニン
No.7	暗青色	ピオシアニン

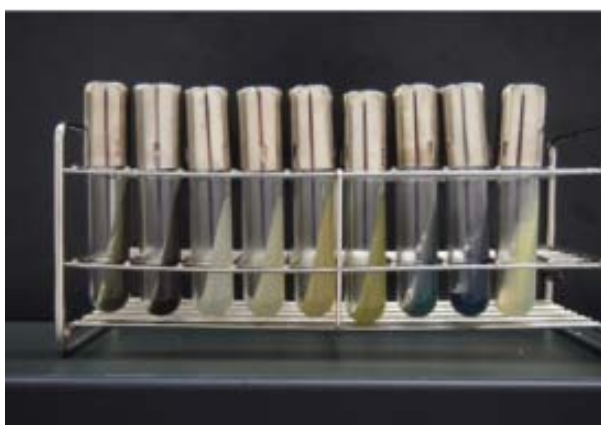


写真5 キング B 培地による色素判別 (左より PAO1, No.1 ~ No.7, コントロール)

表3 キング B 培地による判定結果

(No.6, No.7 は変化した培地の色が判定項目にな  
いたため判定不能とした)

検体	培地の色	色素
PAO1	抹茶色	ピオシアニン
No.1	褐色	フルオロセイン
No.2	変化なし	非産生
No.3	変化なし	非産生
No.4	黄緑色	フルオロセイン
No.5	黄緑色	フルオロセイン
No.6	淡青色	判定不能
No.7	暗青色	判定不能

### 3.3 ピオシアニン産生量の測定および *P. aeruginosa* 培養上清による細胞障害性の検討

ピオシアニン産生量と *P. aeruginosa* 培養上清による細胞障害性を示す (図2)。ピオシアニンの産生量が PAO1 に対して 20% 以下である No.2 ~ 4 および No.6 においては細胞生存率が PAO1 と比べ 150% 以上となった。また、ピオシアニンの産生量が PAO1 に対して 70% 以上であった No.1, No.5, No.7 においては細胞生存率が PAO1 と比べ 140% 未満となった。

## 4. 考察

マクロライド療法の慢性気道感染症に対する主な作用機序は、① 細菌側に対しては菌体外毒素・酵素産生抑制、接着因子産生抑制、biofilm 形成抑制、クオラムセンシング機構抑制などが、② 宿主側に対しては気道分泌抑制作用、炎症性サイトカイン産生抑制、好中球機能抑制、気道

粘液線毛輸送機構改善作用などが知られている。

しかし、これらの報告はマクロライド未投与の *P. aeruginosa* にマクロライド薬を作用させて行われた検討である。そこで私共は、マクロライド薬長期投与患者より分離された *P. aeruginosa* を用いて増殖速度、色素種類の判別、ピオシアニン産生用量、*P. aeruginosa* 上清による細胞障害性についての検討を行なった。

増殖速度の検討では、マクロライド長期投与後に分離された *P. aeruginosa* (No.1 ~ No.7) はマクロライド薬未投与の PAO1 に比べ、増殖速度の低下がみられた。よって、マクロライド薬には菌の増殖速度を抑制する作用があることが示唆された。

キング A, B 培地による色素種類の判別結果では、増殖速度を求める際に菌液が着色した PAO1, No.1, No.5, No.7 の色素はピオシアニンであることが確認できた。しかし、着色しなかった No.6 においてもピオシアニンの産生が認められた。また、No.2, No.4 においてはそれぞれピオルビン、フルオロセイン産生が認められた。以上より、マクロライド薬投与により、色素産生は抑制される傾向にあること、しかし、菌株により色素産生抑制作用には差があること、抑制される色素の種類が異なる可能性があるこ

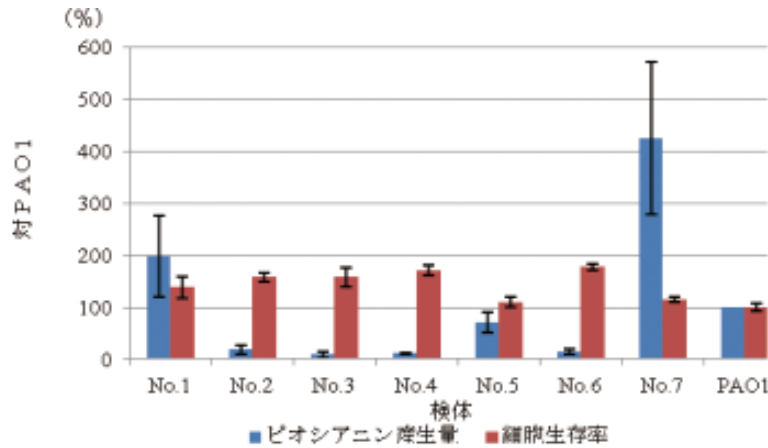


図2 ピオシアニン産生量と細胞障害性

各検体別のピオシアニン産生量と細胞生存率. ピオシアニンの産生量が PAO1 に対し 20% 以下である No.2~No.4 及び No.6 では細胞生存率は PAO1 に対し 150% 以上となった. また, ピオシアニンの産生量が PAO1 に対し 70% 以上である No.1, No.5, No.7 では細胞生存率は PAO1 に対し 140% 未満となった.

とが示唆された.

ピオシアニン産生と肺胞上皮細胞に対する細胞障害性との関連については, マクロライド薬長期投与患者から分離された *P. aeruginosa* (No.1~7) より分離した上清による細胞障害性は, マクロライド薬未投与の PAO1 に比べ, 低い傾向を示した. よって, マクロライド薬には細菌の毒素による細胞障害性を抑制する効果があることが示唆された. しかし, No.1 や No.7 に見られるように, ピオシアニンの産生量と細胞障害性の高さとの間に関連性は認められない菌株も認められた. これは, 細胞障害を引き起こす *P. aeruginosa* の病原因子がピオシアニン以外にも LPS や alginate, Elastase, exotoxinA, exoenzyme-S, T, U, Y などがあり, これらの因子も関与しているためであると考えられる. 今後はピオシアニンと細胞障害性との関連だけでなく, 他の病原因子の関与についても検討する必要があると考えた. さらに, これらの病原因子の発現にはクオラムセンシング機構が関与していることが知られており, クオラムセンシング関連遺伝子発現の検討も必要であると考ええる.

また, 今回標準株として比較検討を行なった PAO1 はムコイド型ではないため, 増殖速度などは単純には比較することが出来ない可能性がある. 今後, さらにマクロライド未投与のムコイド型の *P. aeruginosa* も含めて比較検討を行なっていく必要がある.

## 5. 結語

本研究ではマクロライド長期投与患者より分離された *P. aeruginosa* を用いて, 増殖速度, 色素種類の判別, ピオシアニン産生量, 細胞障害性の比較検討を行った. *P. aeruginosa* の病原因子を抑制することにより, マクロライド薬が慢性緑膿菌気道感染症の臨床効果発現に寄与していると考えられた.

## 6. 引用文献

- 1) 館田一博: 緑膿菌の Quorum-Sensing 機構—新しい感染症治療のターゲットとして—. 日本細菌学雑誌 2004; 59: 543-549
- 2) Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS: *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* 2010; 15: 1037-56
- 3) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, et al: Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 829-32
- 4) 藤田和恵, 館田一博, 吾妻安良太・他: 抗菌薬選択のポイント III 抗菌薬の特性から考えること 6. マクロライド系抗菌薬. 化学療法の領域 増刊号 24: 2008: 202-211
- 5) 中田絢一郎: びまん性汎細気管支炎. 東邦医学会誌

2004 : 51 : 257-264

- 6) 前田光一：慢性下気道感染症に対するマクロライド療法の有効性と今後の課題. *J Nara Med Association* 2008 ; 59 : 189-199
- 7) Ra'oof WM, Latif IAR: In vitro study of the swarming

phenomena and antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different human infections. *Eur J Sci Research* 2010; 47: 405-421

## Macrolides Decrease the Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from the Patients with Long-term Macrolide Therapy

Wataru Aoki<sup>1</sup>, Kazue Fujita<sup>2</sup>, Airi Mikami<sup>1</sup>, Yoko Mano<sup>3</sup>, Nobuhiko Furuya<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Health Care Science, Graduate School of Bunkyo Gakuin University

<sup>2</sup> Department of Pulmonary Medicine and Oncology, Graduate School of Medicine,  
Nippon Medical School

<sup>3</sup> Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology,  
Bunkyo Gakuin University

### Abstract

The pathogenesis and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) lower respiratory infection depends on the virulence factors displayed by the bacteria as well as the host response. Kudoh, et al reported that improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis (DPB) treated with long-term and low-dose erythromycin in 1998. Many studies showed that macrolides suppress the virulence of *P. aeruginosa* by inhibiting the production of toxins, protease, elastase and biofilm. However, in most cases, these studies used laboratory reference strains of *P. aeruginosa* or mutants. The aim of our study was to evaluate the *in vitro* action of macrolides on *P. aeruginosa* isolated from the patients with long-term macrolide therapy. We found that *P. aeruginosa* isolated from the patients with long-term macrolide therapy decrease bacterial growth, production of pigments by *P. aeruginosa* such as pyocyanin and cytotoxicity of the supernatants of *P. aeruginosa* against lung epithelial cells compared with laboratory reference strain of *P. aeruginosa* PAO1. These results suggest that macrolide may decrease the virulence factors of *P. aeruginosa* isolated from the patients with long-term macrolide therapy.

**Key words** — *Pseudomonas aeruginosa*, Long term macrolide therapy, Virulence factors, Quorum sensing mechanism

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.6: 19-25