

サンショウによる緑膿菌病原因子の抑制効果についての基礎的検討

水内 裕友, 後藤 優花, 眞野 容子, 古谷 信彦

文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

要旨

緑膿菌は湿潤環境中に棲息するが、毒性が低く健常者には症状が出ることはほとんどない。しかし、易感染者にしばしば日和見感染症を起こす。さらに、緑膿菌は多くの病原因子を産生し、緑膿菌感染症の重症化や難治化の原因となる。サンショウは生薬であり、「健胃、駆虫」などの効能が報告されているが、緑膿菌に対する報告はない。そこで、本研究では、サンショウによる緑膿菌病原因子の抑制効果を検討することを目的とした。検討は、緑膿菌標準株 PAO1 を用いて Biofilm 形成能、motility (swimming, twitching, swarming)、トータルプロテアーゼを行った。サンショウ添加により Biofilm 形成能、swarming, swimming motility、トータルプロテアーゼにて有意な抑制を認めた。これらの結果より、サンショウは緑膿菌感染症の重症・慢性化予防の一助となる可能性がある。

キーワード

緑膿菌, サンショウ, Biofilm, motility, トータルプロテアーゼ

I. 序論

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は好気性のグラム陰性桿菌で水回りなどの日常生活環境中やヒト口腔内、ヒト腸管内に広く常在している。通常では毒性が低く健常者に症状が出ることはほとんどない。しかし、易感染者にしばしば肺炎や敗血症などの日和見感染症を引き起こし、時には重篤化することがあることから、院内感染として問題視される代表的な菌種である¹⁾。これらの感染経路には、カテーテル汚染などから血液中に緑膿菌が侵入して起こる外因性感染や患者腸管内に棲息する緑膿菌が腸管膜を通過して血液中に侵入して起こる内因性感染がある²⁾。さらに、緑膿菌は多くの病原因子を産生し緑膿菌感染症の重症化や難治化をもたらす。緑膿菌の鞭毛や線毛を用いた motility は、宿主細胞への感染の確立のみならず薬剤耐性化の要因の一つとなる Biofilm 形成過程においても重要である。motility とは、細菌が行う運動性のことであり、緑膿菌が行う運動性には、鞭毛を用いて液体中を移動する swimming motility、半固体表面を移動する swarming motility、線毛を用いて固体表面を移動する twitching motility がある³⁾。緑膿菌の鞭毛は免疫原性が高く、急性感染に際して強い炎症を引き起こす。しかし、鞭毛は宿主貪食細胞の認識の標的になっていることから、慢性感染において緑膿菌はアルカリプロテアーゼで自らの鞭毛の主成分であり宿主 TLR5 に認識さ

れる分子パターンである Flagellin を分解し、遊離 Flagellin を活性化することにより菌体への貪食細胞の攻撃を回避する⁴⁾。さらに、プロテアーゼは宿主補体などの溶解による宿主免疫回避機構にも関与する。緑膿菌はこのような免疫回避機構を介して一旦宿主に定着すると完全に取り除くことが困難であると考えられている⁵⁾。

近年、漢方薬や生薬は顆粒や細粒などのエキス剤の出現で従来の煎じ薬の煎じる手間が省けることによる簡便さから現代人の生活に取り入れられ、広く利用されるようになってきた。漢方薬とは生薬を複数組み合わせたものであり、生薬とは、動物や鉱物、植物の根や葉、果実などを乾燥させたものである⁶⁾。

サンショウは生薬の1つであり、「健胃、駆虫」などの効能が報告されている⁶⁾。また、サンショウは「腹が冷えて痛み、腹部膨満感のあるもの」に適応される大建中湯に配合される。既報にて、漢方薬である麻黄湯の抗インフルエンザウイルス作用やサンシシ、センシンレン、ダイオウによる緑膿菌のクオラムセンシング機構の抑制効果などが報告されている。また、大黃牡丹皮湯やオウレンにて緑膿菌の病原因子の抑制に関する報告があるが、緑膿菌の病原因子に対するサンショウの影響についての報告は我々の知る限りではない^{7) 8) 9) 10)}。サンショウによる緑膿菌の病原因子を減弱させることができれば緑膿菌感染症治療の一助になる可能性がある。

そこで、本研究ではサンショウを用いることで緑膿菌の日和見感染症の重症化・慢性化に関与する病原因子の抑制効果についての基礎的検討を行うことを目的とした。

II. 方法

1. 使用生薬

生薬は、サンショウ(ツムラ株式会社, 東京)を使用した。

2. 使用菌株

菌株は、緑膿菌標準株 PAO1 (American Type Culture Collection, 米国)を使用した。

3. 漢方薬抽出液の作製方法^{9,10)}

1 mL の 1% Dimethyl sulfoxide (DMSO, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) 中でサンショウを 100 mg 溶解して、37℃で一晩振蕩させた。その後、抽出液を 15,300 rpm, 20 分の条件で遠心分離し、得られた上清を 10% のサンショウ抽出液とした。

4. Biofilm formation の測定⁹⁻¹¹⁾

Lihua Qi らのクリスタルバイオレット染色法を改変して行った。Mueller-Hinton 液体培地 (MHB; 日本バクテリディッキンソン (BD), 東京) で McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した菌液を 1% サンショウ抽出液含有 MHB と非含有 MHB で 1.5×10^7 CFU/mL に希釈し 96 穴プレート (ビーエム機器株式会社, 東京) に作製した菌液を 200 μ L ずつ接種し、37℃で 18 時間培養した。培養後に各 well 内の菌液を除去し 1% クリスタルバイオレット (東京化成工業株式会社, 東京) を 200 μ L ずつ接種し、室温で 10 分間染色した。その後、pH 7.2 に調整した phosphate buffered saline (PBS) 200 μ L で well 内を 5 回洗浄した。各 well を十分に乾燥させ、99% エタノールを 200 μ L 添加し 15 分間静置することで色素を抽出した。抽出された色素はマイクロプレートリーダー (マイクロプレートリーダー マルチスキャン FC, サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 東京) を用いて波長 570 nm における吸光度を測定した。

5. Motility assay^{12) 13)}

5-1. swimming motility

swimming motility を測定するために、NaCl (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) 0.5%, Tryptone (関東化学株式会社, 東京) 1%, 細菌用寒天 (関東化学株式会社, 東京)

0.3% の培地を作製した。作製した培地 9 mL に対して 1 mL のサンショウ抽出液 (10%) を添加し 1% サンショウ抽出液含有の swimming 培地を作製した。コントロールとして、サンショウ抽出液未添加の 1% DMSO (1 mL) 添加培地を作製した。培地中央に滅菌生理食塩水を用いて 10^9 CFU/mL に調整した菌液を 10 μ L 滴下し、30℃, 18 時間で培養した。培地上に形成された混濁部分の直径を測定した。

5-2. swarming motility

swarming motility を測定するために、Nutrient broth (関東化学株式会社, 東京) 0.82%, 細菌用寒天 (関東化学株式会社, 東京) 0.5% の培地を作製した。作製した培地を冷ましてから Glucose (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) を濃度 0.5% になるようにろ過滅菌して添加した。作製した培地 9 mL に対して 1 mL のサンショウ抽出液 (10%) を添加し 1% サンショウ抽出液含有の swarming 培地を作製した。コントロールとして、サンショウ抽出液未添加の 1% DMSO (1 mL) 添加培地を作製した。培地中央に滅菌生理食塩水を用いて 10^9 CFU/mL に調整した菌液を 10 μ L 滴下し、35℃, 24 時間で培養した。培地上に形成された混濁部分の直径を測定した。

5-3. twitching motility

twitching motility を測定するために、LB 液体培地 (日本 BD, 東京) 2%, 細菌用寒天 (関東化学株式会社, 東京) 1% の培地を作製した。作製した培地 9 mL に対して 1 mL のサンショウ抽出液 (10%) を添加し 1% サンショウ抽出液含有の swarming 培地を作製した。コントロールとして、サンショウ抽出液未添加の 1% DMSO (1 mL) 添加培地を作製した。培地の中央に滅菌爪楊枝で穿刺し、穿刺部に滅菌生理食塩水を用いて 10^9 CFU/mL に調整した菌液を 10 μ L 接種し、37℃, 48 時間培養を行った。培地上に形成された混濁部分の直径を測定した。

6. Skim milk agar assay¹⁴⁾

トータルプロテアーゼ産生の阻害効果を検討するために、skim milk agar assay を行った。5 mL の 1% サンショウ抽出液添加と未添加の LB broth (日本 BD, 東京) に 10^8 CFU/mL の菌液を 10 μ L 添加し 24 時間培養した。これらの培養液をメンブランフィルター (0.2 μ m, ADVANTEC, 米国) でろ過滅菌し、1.5% skim milk 含有 LB 寒天培地 (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) の中央に 10 μ L 滴下した。この培地を 37℃, 24 時間培養後、培地上の clearance zone を測定した。

7. 統計分析

サンショウ抽出液添加群とサンショウ抽出液未添加群の統計学的な差はt検定によって確認した。なお、 $p < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

Ⅲ. 結果

1. 緑膿菌の Biofilm 形成能にサンショウが与える影響

1% サンショウ抽出液添加にて、緑膿菌の Biofilm 形成能は未添加のものと比較して有意な抑制を認めた (図 1)。

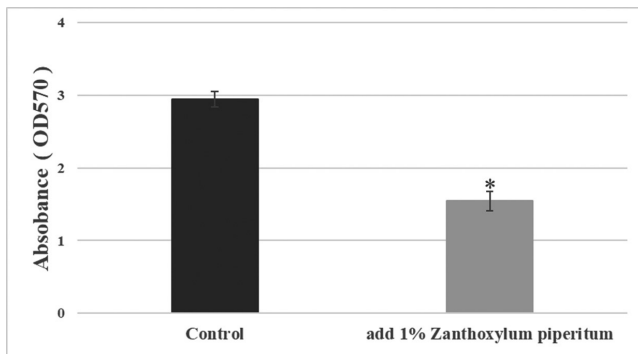


図 1. 緑膿菌の Biofilm 形成能にサンショウが与える影響
1% サンショウ抽出液添加により緑膿菌の Biofilm 形成能は有意な抑制を認めた。(p= 0.0017)

2. 緑膿菌の motility にサンショウが与える影響

図 1 で示したように Biofilm 形成にて有意な抑制効果を認めたことから、Biofilm 形成過程において重要である motility (swimming, swarming, twitching) について検討を行った。

結果は、1% サンショウ抽出液未添加のものに比べ添加のもので swimming motility (図 2), swarming motility (図 3) にて有意な抑制を認めた。twitching motility では有意な抑制効果を認めなかった。

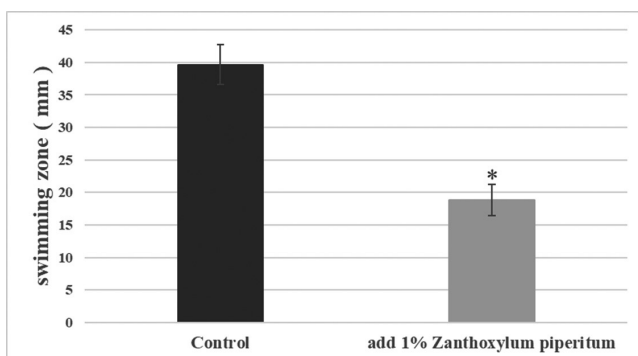


図 2. 緑膿菌の swimming motility にサンショウが与える影響
1% サンショウ抽出液添加により緑膿菌の swimming motility は有意な抑制を認めた。(p= 0.00059)

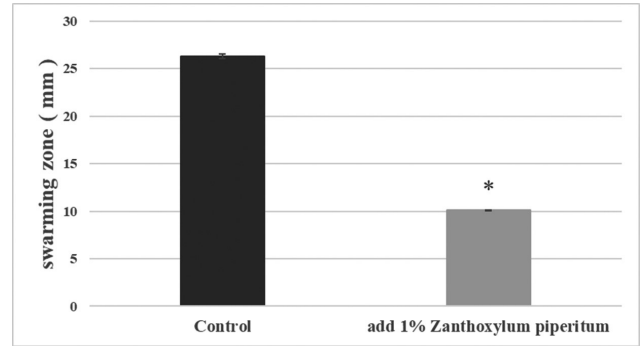


図 3. 緑膿菌の swarming motility にサンショウが与える影響
1% サンショウ抽出液添加により緑膿菌の swarming motility は有意な抑制を認めた。(p= 0.012)

3. 緑膿菌のトータルプロテアーゼ産生能にサンショウが与える影響

1% サンショウ抽出液添加 MHB にて培養した緑膿菌は未添加のものに比べ、トータルプロテアーゼの産生量は有意な抑制を認めた (図 4)。

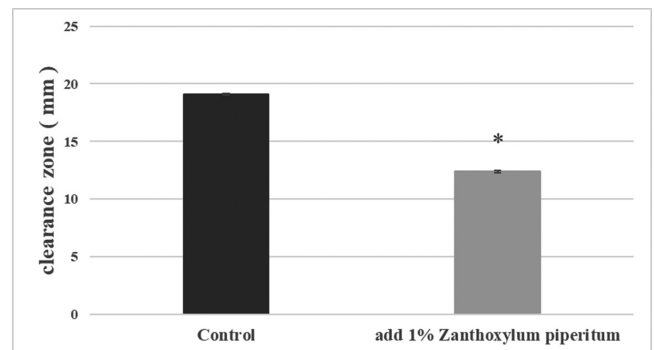


図 4. 緑膿菌のトータルプロテアーゼ産生能にサンショウが与える影響
1% サンショウ抽出液添加により緑膿菌のトータルプロテアーゼ産生能は有意な抑制を認めた。(p= 0.0079)

Ⅳ. 考察

Biofilm は緑膿菌が宿主の免疫機構を回避する方法の 1 つであり、物質表面に付着後に菌体外多糖などを産生することにより形成される。緑膿菌は Biofilm をカテーテル上や宿主細胞上にて形成し抗菌薬や抗体などの浸透を阻害することから、感染症の重症化や慢性化に関与する。1% サンショウ抽出液添加により Biofilm 形成能の抑制を認めたことから、サンショウは感染症重症化の予防に応用できる可能性が示唆された。また、その形成過程において重要である swimming, swarming motility の抑制を認めたことから、サンショウは Biofilm 形成過程を抑制することにより Biofilm 形成能を抑制したことが考えられる。しかし、同じく形成過程において重要である twitching motility は抑制

が認められなかったことから、線毛運動には影響を与えないことが示唆された。swimming motility と swarming motility は同じ鞭毛運動であることからサンショウは鞭毛運動の抑制に関与すると考えられる。また、トータルプロテアーゼの抑制が認められたことから、宿主補体の溶解による感染症の重症化を予防する可能性が示唆された。さらに、プロテアーゼは自己鞭毛の主成分である Flagellin を分解することで免疫系の回避にも関与するが、サンショウは緑膿菌の宿主免疫回避機構を阻害することにより感染症の重症化や慢性化を阻害すると考えられる。

内因性感染において患者腸管内に棲息する緑膿菌の腸管粘膜のトランスロケーションには、プロテアーゼや鞭毛運動が関与する²⁾。プロテアーゼは、腸管細胞のムチン層の粘性の低下による易侵入性に関与し、鞭毛運動は物理的侵入に関与する。今回の検討でトータルプロテアーゼ、鞭毛運動の抑制を認めたことから、サンショウは内因性感染の予防の一助になる可能性が示唆された。しかし、今回の検討では細胞侵入性についての検討は行っていないことから、今後、検討を行っていく必要がある。

サンショウはサンショオールやシトロネラルなどの成分を含有する生薬である。既報にてシトロネラルでは、グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* やグラム陰性菌である *Escherichia coli* にて最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度の抑制が認められている¹⁵⁾。今回の検討で新たに緑膿菌の病原因子に対する効果が認められたことから、今後の課題として、サンショウの成分であるサンショオールやシトロネラルにて検討を行っていく必要がある。

V. 結語

今回の検討はサンショウにおける緑膿菌の病原因子の抑制効果についての基礎的検討を行った。結果は、Biofilm 形成能、swimming, swarming motility, トータルプロテアーゼの抑制効果を認めたことから、緑膿菌病原因子を抑制することにより緑膿菌感染症の重症化・慢性化の予防の一助となる可能性が示唆された。

文献

- 1) 嶋田高広、松村到. 緑膿菌の免疫回避機構. 日本臨床免疫学会会誌. 2014; 37: 33-41.
- 2) 奥村龍、竹田潔. 腸管上皮細胞と腸内細菌との相互作用. 領域融合レビュー. 2016; 5: e007.
- 3) George A *et al.* Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Molecular Microbiology 1998; 30(2): 295-304.
- 4) Bart WB *et al.* *Pseudomonas* Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. PLoS Pathogens 2011; 7(8): e1002206.
- 5) 山田陽城. 漢方薬の作用機序の解明と臨床応用の現状. Organ Biology. 2018; 25(1): 56-70.
- 6) 矢作忠弘、石内勘一郎、渥美聡孝・他. 歴代教科書・解説書に見られる生薬の効能に関する記載のデータベース化(1). 生薬学雑誌. 2017; 71(1): 1-19.
- 7) 牧野健司. 気管支喘息の漢方治療. 日本東洋医学雑誌. 1996; 47(1): 71-78.
- 8) S Masui *et al.* Maoto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, Inhibits Uncoating of Influenza Virus. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2017; 2017: 12.
- 9) 栗田友輔、眞野容子、古谷信彦. 緑膿菌の各種病原因子に対する大黃牡丹皮湯の影響. 生物試料分析. 2018; 41(3): 142-146.
- 10) 栗田友輔、眞野容子、古谷信彦. 緑膿菌に対するオウレンの抗菌活性及び病原因子の産生に与える影響. 生薬学雑誌. 2018; 72(2): 65-70.
- 11) Manmohit K *et al.* Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE 2015; 10(8): e0135495.
- 12) Rashid MH, Kornberg AJ. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Rashid and Kornberg 2000; 97 (9): 4885-4890.
- 13) Krishnan T *et al.* Inhibition of quorum sensing controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Ayurveda spice clove (*Syzygium aromaticum*) bud extract. Sensors 2012; 12: 4016-4030.
- 14) Vijayaraghavan P, Vincent SGP. A simple method for the detection of protease activity on agar plate using bromocresolgreen dye. J Biochem Tech 2013; 4(3): 628-630.
- 15) Julio CLR *et al.* Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015; 795435: 9.

Effect of *Zanthoxylum piperitum* on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors

Yuuyu Mizuuchi, Yuka Goto, Yoko Mano, Nobuhiko Furuya

Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University

Abstract

Pseudomonas aeruginosa causes opportunistic infections in immunocompromised hosts but is less fatal in healthy people. In addition, *P. aeruginosa* produces many virulence factors, which lead to aggravation and intractability of *P. aeruginosa* infections. *Zanthoxylum piperitum* is an herbal drug and has been reported to have anthelmintic effects. Previous studies have reported the suppression of pathogenic factors of *P. aeruginosa* PAO1 by Daio botanpito and Coptidis rhizoma treatments, but few studies have examined the effects of herbal treatment on *P. aeruginosa* pathogenesis. Here, we investigated the effects of *Zanthoxylum piperitum* on *P. aeruginosa* pathogenesis and measured biofilm formation, motility (swimming, swarming, twitching), and total protease quantity after *Zanthoxylum piperitum* treatment. Biofilm formation was measured using the tissue culture plate method. Motility was measured using the agar plate method. Protease activity was measured using a skim milk assay. The addition of *Zanthoxylum piperitum* significantly suppressed biofilm-forming ability, swarming, swimming motility, and total protease activity. These results reveal the potential of herbal medicines against *P. aeruginosa*-associated pathogenesis.

Key words ——— *Pseudomonas aeruginosa*, *Zanthoxylum piperitum*, Biofilm, motility, total protease

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.13: 1-5