

緑膿菌臨床分離株 motility に対する麻黄湯の抑制効果の検討

浅野 育夢, 大溝 七菜子, 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

緑膿菌は自然環境に広く分布するが、病原性が低く、健常者に対して重篤な感染症を引き起こすことはほとんどない。しかし、易感染者には日和見感染症を引き起こす。近年では多剤耐性緑膿菌が出現し問題となっており、抗菌薬に代わる薬剤や有効成分などの探索が必要とされている。漢方薬である麻黄湯において、緑膿菌標準株 PAO1 の swarming motility に対する抑制効果が報告されている。そこで、本研究では、麻黄湯による緑膿菌臨床分離株の3種類の motility (swimming, swarming, twitching) に対する抑制効果を検討することを目的とした。麻黄湯添加により、11株中6株で swarming motility の抑制を認め、そのうち3株では大幅な抑制を示した。これらの結果より、緑膿菌標準株だけでなく臨床分離株に対しても、麻黄湯添加により鞭毛の運動性を抑制できる可能性が示唆された。

キーワード

漢方薬, 麻黄湯, 緑膿菌, motility

序論

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は土壌や水回りなどの自然環境に広く分布する偏性好気性グラム陰性桿菌である。通常では病原性が低く、健常者に対して重篤な感染症を引き起こすことはほとんどない。しかし、免疫力が低下した易感染者に対しては肺炎や敗血症などの日和見感染症を引き起こす。さらに、緑膿菌は多くの病原因子を産生、保持することで宿主に対する病原性を高めることが知られている。緑膿菌が持つ代表的な病原因子として、鞭毛や線毛, pyocyanin, elastase, protease などが挙げられる。鞭毛や線毛により行われる motility は、biofilm 形成や細胞付着・侵入性など複数の病原性に関与するため重要である。緑膿菌における motility は、鞭毛を用いて液体内を移動する運動能に関与する swimming motility, 鞭毛を用いて半流動内を移動する swarming motility, 線毛を用いて固体表面を移動する twitching motility の3種類が存在する²⁾。一方、biofilm は細菌が分泌した大量の粘性物質により構成され、流水などの物理的な力や抗菌薬などに抵抗性を示す。カテーテルや気管チューブなど様々な医療材料に形成されるため、緑膿菌は院内感染の起因菌としても重要な菌種である³⁾。さらに、近年では多剤耐性緑膿菌 (Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) が出現し、感染症の重症化や難治化を引き起こし問題となっている。そこで、抗

菌薬に代わる薬剤や有効成分などの探索が必要とされている。

既報より、金花茶やローズマリーなどさまざまな生物学的材料から得られた抽出物により緑膿菌病原因子抑制効果が報告されており、近年、注目を集めている^{4,5)}。生薬は、自然界にある植物の根や茎、菌類、昆虫、鉱物などを加工したものである。また漢方薬は、複数の生薬を組み合わせて薬効を高めた薬のことである。西洋薬は一般的にひとつの成分から作られることが多いが、漢方薬は有効成分を多く含むため、1剤で複数の症状に効果を示す。細菌感染症に対する治療にも用いられており、殺菌的、もしくは静菌的効果を示すものも知られている⁶⁾。

漢方薬である麻黄湯はマオウ、キョウニン、ケイヒ、カンゾウの4種類の生薬を含み、悪寒や発熱、頭痛などの風邪のひき始めや鼻詰まりなどに効果を示す。含有生薬であるマオウはエフェドリンやプソイドエフェドリンなどのアルカロイドを含み、交感神経を興奮させることで血管や気管などを拡張する作用をもつ。キョウニンはトリアシルグリセロールや脂肪油などの脂肪成分を多く含み、鎮咳作用を有する。ケイヒはシンナムアルデヒドを主成分とし、代謝や血流を改善する作用を有する。カンゾウは抗酸化、抗炎症作用を有するが、グリチルリチンを含み、多量の服用により偽アルドステロン症や高血圧、低カリウム血症などを引き起こす可能性がある⁷⁾。このように、漢方薬は様々

な作用を有する生薬を組み合わせることで複数の作用や相乗効果を示す。また、麻黄湯には感染症に対する効果も知られており、抗インフルエンザウイルス作用が報告されている⁸⁾。加えて先行研究では、麻黄湯において緑膿菌標準株PAO1のswarming motilityやtotal proteaseなどに対する抑制効果が明らかになっている⁹⁾。しかし、現時点では、緑膿菌臨床分離株に対する麻黄湯の効果については報告されていない。そこで本研究では、緑膿菌臨床分離株を用い、麻黄湯によるmotility抑制効果について検討した。

II. 方法

1. 使用漢方薬

漢方薬は、ツムラ麻黄湯エキス顆粒（医療用）（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（ATCC BAA-47, American Type Culture Collection, 米国）、緑膿菌精度管理株ATCC27853（American Type Culture Collection, 米国）、喀痰由来緑膿菌臨床分離株9株（BGU444, 445, 747-750, 752-754）を使用した。

3. 麻黄湯抽出液の作製方法⁹⁾

麻黄湯 100 mg を 1 mL の 1% Dimethyl sulfoxide 水溶液（DMSO, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪）で溶解し、37℃で一晩振盪させた。その後、15300 rpm, 20分の条件にて遠心分離し、得られた上清を10%麻黄湯抽出液とした。以下の検討については、最終的な麻黄湯抽出液濃度が1%の条件になるように調整し、検討を行った。

4. motility assay^{10, 11)}

4-1. swimming motility

swimming motility測定のため、NaCl（関東化学株式会社，東京）5g/L, Tryptone（関東化学株式会社）10g/L, 細菌用寒天（関東化学株式会社）3g/Lを添加し、寒天濃度0.3%の培地を作製した。作製した培地9mLと10%麻黄湯抽出液1mLを混合し、1%麻黄湯抽出液含有swimming培地を作製した。コントロールとして麻黄湯抽出液未添加の0.1% DMSO含有swimming培地を作製した。滅菌生理食塩水を用いて 10^9 CFU/mLに調整した菌液を、作製した培地中央に10 μ L滴下し、35℃にて18時間培養した。培地上に形成された混濁部分の直径を測定し、判定を行った。

4-2. swarming motility

swarming motility測定のため、Nutrient broth（関東化学株式会社）8.2g/L, 細菌用寒天（関東化学株式会社）5.1g/Lを添加し、最終的な寒天濃度が0.5%になるよう調整し培地を作製した。作製した培地を冷まし、0.5% Glucose溶液（富士フィルム和光純薬株式会社）をろ過滅菌後、添加した。Glucose添加後の培地9mLと10%麻黄湯抽出液1mLを混合し、1%麻黄湯抽出液含有swarming培地を作製した。コントロールとして麻黄湯抽出液未添加の0.1% DMSO含有swarming培地を作製した。滅菌生理食塩水を用いて 10^9 CFU/mLに調整した菌液を、作製した培地中央に10 μ L滴下し、35℃, 24時間培養した。培地上に形成された混濁部分の直径を測定し、判定を行った。

4-3. twitching motility

twitching motility測定のため、LB broth（日本BD, 東京）20g/L, 細菌用寒天（関東化学株式会社）10g/Lを添加し、寒天濃度1%の培地を作製した。作製した培地9mLと10%麻黄湯抽出液1mLを混合し、1%麻黄湯抽出液含有twitching培地を作製した。コントロールとして麻黄湯抽出液未添加の0.1% DMSO含有twitching培地を作製した。培地中央に滅菌爪楊枝を穿刺し、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、35℃, 48時間培養した。培地上に形成された混濁部分の直径を測定し、判定を行った。

5. 統計分析

各検討は3回ずつ行い、1%麻黄湯抽出液添加群と麻黄湯抽出液未添加群との有意差を決定するために、*t*検定を行った。なお、麻黄湯抽出液未添加のコントロールと比較し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

III. 結果

1. 麻黄湯が緑膿菌臨床分離株のswimming motilityに与える影響

1%麻黄湯抽出液添加により、11株中2株（BGU752, 754）でswimming motilityの有意な抑制を認め、それぞれの抑制率は14%, 18%であった（図1）。また、有意差は認めないがmotility zoneの軽微な減少を示す株も複数確認できた。

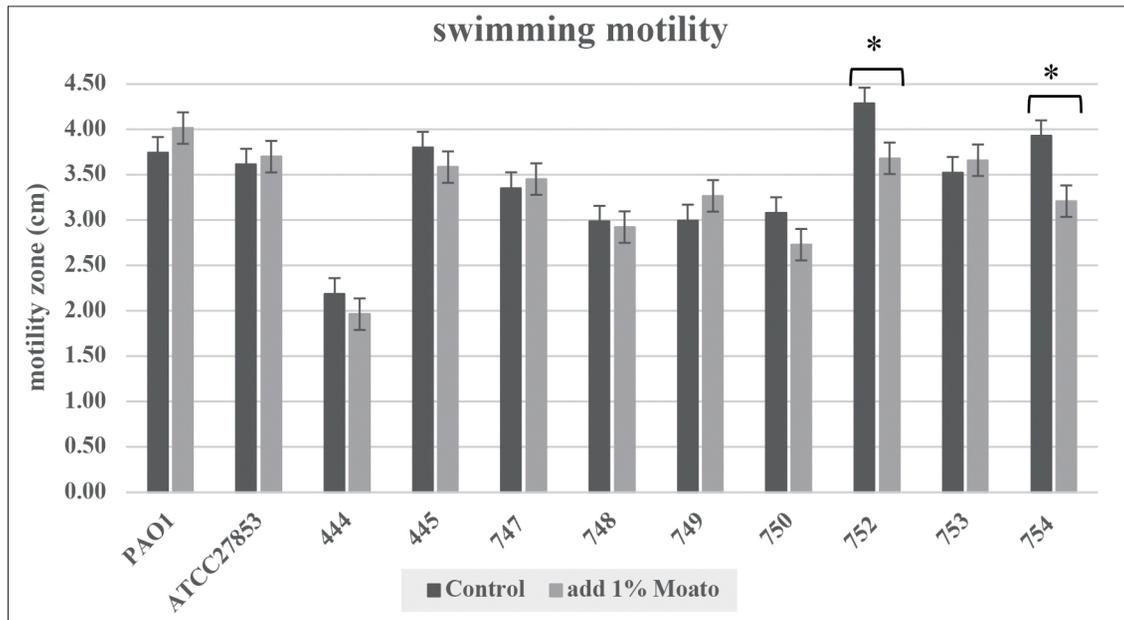


図1 麻黄湯が緑膿菌臨床分離株の swimming motility に与える影響
1% 麻黄湯抽出液添加により2株で swimming motility に対する有意な抑制を認めた。エラーバーは3回測定した標準偏差を示している。(*: $p < 0.05$)

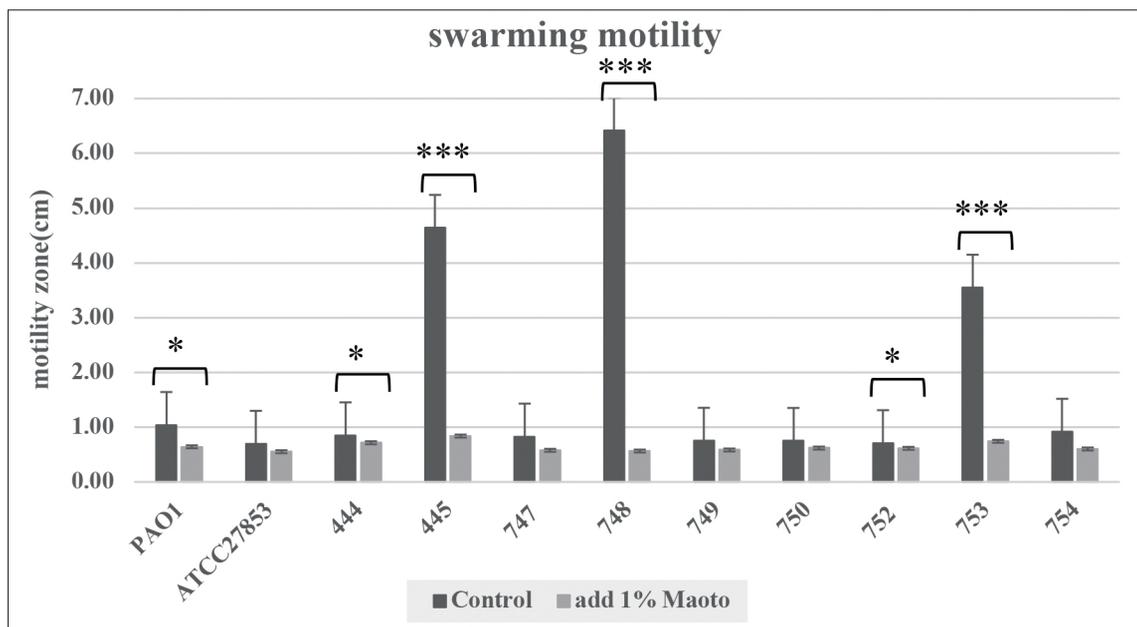


図2 麻黄湯が緑膿菌臨床分離株の swarming motility に与える影響
1% 麻黄湯抽出液添加により6株で swarming motility に対する有意な抑制を認めた。エラーバーは3回測定した標準偏差を示している。(*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$)

2. 麻黄湯が緑膿菌臨床分離株の swarming motility に与える影響

1% 麻黄湯抽出液添加により、全ての菌株で motility zone の減少がみられ、6株 (PAO1, BGU444, 445, 748, 752, 753) で swarming motility の有意な減少を認めた (図2)。特に、麻黄湯未添加のコントロールで高度の swarming motility を示した3株 (BGU445, 748, 753) ではそれぞれ82%, 91%,

79%と大幅な抑制効果を認め、他の株での抑制は軽微であった。

3. 麻黄湯が緑膿菌臨床分離株の twitching motility に与える影響

1% 麻黄湯抽出液添加により、11株中5株で motility zone の減少が確認された。そのうち2株 (BGU752, 753)

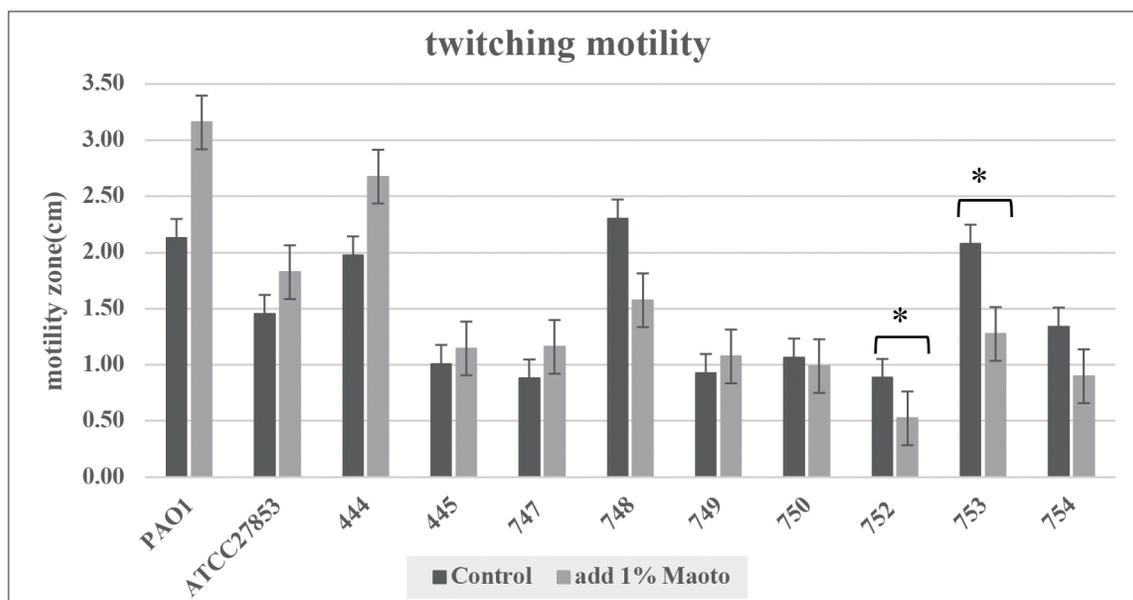


図3 麻黄湯が緑膿菌臨床分離株の twitching motility に与える影響
1% 麻黄湯抽出液添加により2株で twitching motility に対する有意な抑制を認めた。エラーバーは3回測定した標準偏差を示している。(*: $p < 0.05$)

で twitching motility の有意な抑制を認め、抑制率はそれぞれ41%、39%であった(図3)。

IV. 考察

本研究では、緑膿菌標準株PAO1を用いた先行研究⁹⁾と同様に、1%麻黄湯抽出液添加により swarming motility で高い抑制効果を認めた。そのため、緑膿菌標準株だけでなく臨床分離株に対しても、麻黄湯抽出液添加により鞭毛の運動性を抑制できる可能性が示唆された。

swimming motility と swarming motility はともに鞭毛に関与する運動性である。しかし結果より、これら2つの運動性に相違がみられた株を認めた。これは、鞭毛を構成する成分の比率や遺伝子発現量などが菌種により異なるためだと考えられる。今後、本研究で確認された抑制効果の要因探索のため、鞭毛染色や電子顕微鏡などを用い、形態的な鞭毛の長さに対する検討や、鞭毛関連遺伝子などについて検討していくことが課題である。また、twitching motility は線毛に関連した運動性である。そのため、twitching motility の抑制がみられた菌株では麻黄湯抽出液添加により線毛の運動性が低下したと考えられた。

motility は biofilm 形成に大きく関与する。swimming motility は液体内の移動に関与し、菌体が宿主体内を移動するために貢献する。twitching motility は物質表面の付着に関与し、菌体の宿主細胞表面への付着、微小コロニーやマッ

シユーム型の立体構造の形成に関与する。swarming motility はバイオフィーム内部から外部への菌体の脱離に重要な役割を果たす²⁾。今回、biofilm に対する検討は行っていないが、本研究では3種類の motility に対して複数の臨床分離株で抑制効果を認めた。そのため、今回 motility の抑制がみられた菌株では biofilm を抑制する可能性が示唆された。

麻黄湯には、4種類の生薬が含まれている。ケイヒと同じくシナムアルデヒドを主成分とするシナモンオイルにて、緑膿菌 PAO1 の swarming motility に対する抑制効果が確認されている¹²⁾。また、シナムアルデヒドにて、緑膿菌 PAO1 の3種類 (swimming, swarming, twitching) すべての motility に対する抑制効果が報告されている¹³⁾。そのため、今回得られた麻黄湯による緑膿菌臨床分離株に対する motility の抑制効果には、シナムアルデヒドが大きく関与した可能性が考えられる。

緑膿菌は多くの病原因子を保有し、宿主免疫系障害機構や宿主免疫系回避機構に大きく寄与する¹⁾。そのため、病原因子を抑制することが緑膿菌感染症に対抗する手段になると考えられる。つまり、緑膿菌感染症に対する有効な治療法開発のため、重症化や難治化に関与する病原因子を減弱させるための検討を行うことが重要である。本研究により、緑膿菌標準株だけでなく臨床分離株に対しても motility を阻害できる可能性が示唆された。motility は biofilm の形成や細胞付着・侵入性などにも関与する重要な病原因子である。

そのため、今回の結果より、緑膿菌感染症の治療に麻黄湯が応用できる可能性が示された。また、本研究では motility に対する検討のみを行ったが、biofilm や total protease, pyocyanin 産生能など、他の病原因子に対する検討を継続して行っていく必要がある。加えて、今回は感性株を用いたが、MDRP 治療に応用できる可能性を検討するため、耐性株を用いた検討も行う必要があると考える。

V. 結語

本研究は、漢方薬麻黄湯を用い、喀痰由来緑膿菌臨床分離株の motility への抑制効果について検討した。1% 麻黄湯抽出液添加により、11 株中 6 株で swarming motility の抑制効果を認めた。また、swimming motility と twitching motility に対して抑制効果を示した株も確認された。そのため、麻黄湯は臨床分離株に対し、鞭毛や線毛の運動性を抑制する可能性が示唆され、緑膿菌感染症への治療に応用できる可能性が示された。本研究は今後、緑膿菌臨床分離株に対する研究を進めていく上での重要なデータになり得ると考える。

VI. 謝辞

本論文の投稿に際して、漢方薬をご提供くださいましたツムラ株式会社に深謝申し上げます。

引用文献

- 1) 嶋田高広, 松村到. 緑膿菌の免疫回避機構. 日本臨床免疫学会誌. 2014; 37: 33-41.
- 2) 大浦啓, 田代陽介, 豊福雅典・他. ナフタレン誘導体による運動性抑制を介した緑膿菌バイオフィルムの抑制. 環境バイオテクノロジー学会誌. 2011; 11: 61-67.
- 3) 水之江義充. 院内感染とバイオフィルム. 耳鼻咽喉科展望. 2013; 56: 199-203.
- 4) Yang R, Guan Y, Zhou J, et al. Phytochemicals from *Camellia nitidissima* Chi Flowers Reduce the Pyocyanin Production and Motility of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 8: 1-13.
- 5) Araby E, El-Tablawy SY. Inhibitory effects of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2016; 159: 24-32.
- 6) Chu W, Zhou S, Jiang Y, et al. Effect of Traditional Chinese Herbal Medicine with Antiquorum Sensing Activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; Article ID 648257, 1-7.
- 7) 森本靖彦, 中島智子. 甘草製剤による偽アルドステロン症のわが国における現状. 和漢医薬学会誌. 1991; 8: 1-22.
- 8) Masui S, Nabeshima S, Ajisaka K, et al. Maoto, a traditional Japanese herbal medicine, inhibits uncoating of Influenza Virus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017; Article ID 1062065, 1-12.
- 9) 水内裕友, 眞野容子, 古谷信彦. 麻黄湯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. 医学検査. 2021; 70: 595-601.
- 10) Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. 2000; 97: 4885-4890.
- 11) Priya JL, Prajna L, Mohankumar V. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from post-cataract endophthalmitis patients. *Microbial Pathogenesis*. 2015; 78: 67-73.
- 12) Kalia M, Yadav VK, Singh PK, et al. Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*. 2015; 10: 1-18.
- 13) Chadha J, Ravi, Singh J, et al. Gentamicin Augments the Quorum Quenching Potential of Cinnamaldehyde In Vitro and Protects *Caenorhabditis elegans* From *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022; 12: 1-18.

Inhibition Effects of the Chinese Herbal Medicine Maoto on Motility of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Narumu Asano, Nanako Omizo, Yuka Goto, Yoko Mano, Nobuhiko Furuya

Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University

Abstract

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), widely distributed in the natural environment, has low virulence and rarely causes serious symptoms in healthy individuals. However, it can cause opportunistic infections in susceptible individuals. In recent years, the emergence of multidrug-resistant *P. aeruginosa* has become a problem, and a search for alternative drugs and active ingredients to antimicrobial agents is necessary. It has been reported that the Chinese herbal medicine “Maoto”, has an inhibitory effect on the swarming motility of the *P. aeruginosa* standard strain, PAO1. Therefore, this study investigated the inhibitory effect of Maoto on the motility of the *P. aeruginosa* clinical isolates. In this study, we examined three types of motility (swimming, swarming, and twitching). All of the isolates showed inhibition of swarming motility by the addition of Maoto, and three of them showed significant inhibition of swarming motility. These results suggest that the addition of Maoto may suppress flagellar motility not only in standard strains of *P. aeruginosa* but also in clinical isolates.

Key words ——— Herbal medicine, Maoto, *Pseudomonas aeruginosa*, motility

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.15: 23-28