

EFFECT OF ERYTHROMYCIN ON ANTI STAPHYLOCOCCAL ACTIVITY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATED FROM CLINICAL MATERIALS

Jun Ogino¹⁾, Kazuhito Kikushima¹⁾, Isao Fujimori¹⁾
Kenichi Hisamatsu¹⁾, Yoshihiko Murakami¹⁾
Toshihiko Yamada²⁾, Tarou Kozeni²⁾
Rei Goto³⁾

- 1) Department of Otorhinolaryngology, Yamanashi Medical College
- 2) Department of Microbiology, Yamanashi Medical College
- 3) Yamanashi Red Cross Hospital

Anti staphylococcal activity by *Pseudomonas aeruginosa* was investigated through the use of the reversed agar plate and the filter paper stamp methods. Investigation was also conducted on the dye production of different clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, the relationship between drug susceptibility and anti staphylococcal activity, and the influence of erythromycin on anti staphylococcal activity. 82 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were prepared which included 20 strains from pus, 34 strains from sputum, 20 strains from urine and 8 strains from otorrhea. These were then inoculated with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). They were then cultured for 48 hours by using the reversed agar plate and the filter paper stamp methods. Anti staphylococcal activity was observed in

16 strains from pus (80%) , 19 strains from sputum (55.9%) , 8 strains from urine (40%) and 6 strains from otorrhea (75%) . The *Pseudomonas aeruginosa* strains which have no pigment tended to show poor anti staphylococcal activity. Drug susceptibility was tested using PIP, C, AMK, IPM, CFS and OFLX. The strains which showed resistance to OFLX tended to show poor anti staphylococcal activity. Erythromycin inhibited the dye production of *Pseudomonas aeruginosa* but exhibited no effect on anti staphylococcal activity.

Consequently, these results suggest erythromycin has exhibited a previously unknown pharmacological effect, furthermore, anti staphylococcal activity was not caused by pigmentation only.

緑膿菌の示す黄色ブドウ球菌発育抑制作用に 及ぼすエリスロマイシンの影響について

荻野 純¹⁾ 菊島 一仁¹⁾ 藤森 功¹⁾
 久松 建一¹⁾ 村上 嘉彦¹⁾
 山田 俊彦²⁾ 小銭 太郎²⁾
 後藤 領³⁾

1) 山梨医科大学耳鼻咽喉科学教室

2) 山梨医科大学微生物学教室

3) 山梨赤十字病院耳鼻咽喉科

緒 言

我々は細菌相互の作用について注目し、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) と黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) との相互作用について既に報告した¹⁾。緑膿菌の示す抗黄色ブドウ球菌抑制作用の存在は、緑膿菌検出時に於ける化学療法施行に新たな問題を提起するものであり、今回我々は緑膿菌の由来別にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する発育抑制作用、緑膿菌の色素産生性と薬剤感受性との関連について検討を試みた。また、最近びまん性汎細気管支炎²⁾ や慢性副鼻腔炎³⁾⁴⁾ において、MIC 値以下の濃度で有効性が注目されているエリスロマイシンの緑膿菌の色素産生性および MRSA 発育抑制作用に対する影響についても検討を行った。

対象と方法

(1) 使用菌株

実験に使用した緑膿菌菌株は臨床分離株で耳漏由来 8 株、膿汁由来 20 株、喀痰由来 34 株、尿由来 20 株の計 82 株である。MRSA も同様に臨床分離株で本実験の指示菌として用いた。各菌株は Muller-Hinton 寒天培地 (Difco) を用い 24 時間好氣的に培養した集落を、Muller-

Hinton Broth に懸濁し約 10^8 cfu/ml の菌液とし以下の実験に用いた。

(2) MRSA 発育抑制作用の測定方法と判定基準

緑膿菌菌液をエーゼを用い Muller-Hinton 寒天平板に画線し、24 時間好氣的に培養した。その後寒天平板反転法及び滅菌濾紙スタンプ法を行い、指示菌接種 48 時間の好氣的培養後に指示菌の発育状況を観察した。指示菌の寸

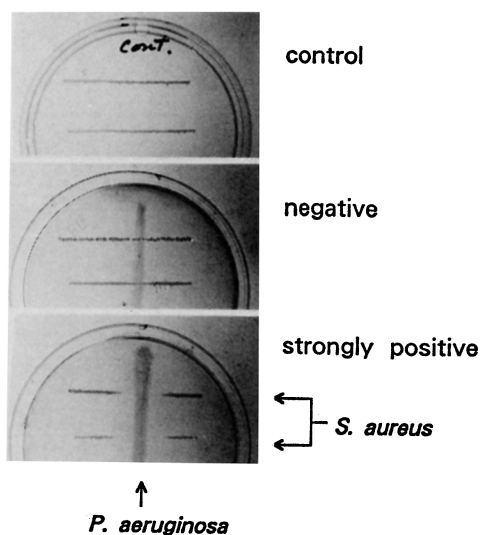


Fig. 1 Anti staphylococcal activity of *Pseudomonas aeruginosa*

断なく発育が認められるものを発育抑制作用陰性(-), 緑膿菌との交点付近において発育阻止が認められるものを陽性(+), さらに拡散性に発育の阻止されるものを強陽性(++)とした。

なお, 緑膿菌の接種していない培地に指示菌であるMRSAを接種し, その発育状況を基準として上記の判定を行った(Fig. 1)

(3) 緑膿菌の色素産生性

Muller-Hinton寒天培地で好氣的に発育させた部分の培地の色調をGreen, Yellow, Red, Noneに区分し, MRSA発育抑制作用との比較を行った。

(4) 薬剤感受性

緑膿菌の薬剤感受性は, piperacillin (PIP C), amikacin (AMK), imipenem (IPM), cefsulodin (CFS), ofloxacin (OFLX)の5薬剤について1濃度ディスク(BECTON DICKINSON)を用い, 24時間後にKirby-Bauer法にて判定し, 感性(susceptible)を示す頻度を由来別及びMRSA発育抑制作用と比較した。

(5) エリスロマイシンによる緑膿菌の色素産生性とMRSA発育抑制作用への影響

緑膿菌菌液をエーゼを用いMuller-Hinton寒天平板に画線し, その直上にエリスロマイシンディスク(15μg含有: BECTON DICKINSON)を置き24時間好氣的に培養した。その後寒天平板反転法を行い, 指示菌であるエリスロマイシン耐性のMRSAを滅菌濾紙スタンプ法でエリスロマイシンディスク接地部及び遠隔部に接種した。

48時間の好氣的培養後にエリスロマイシンディスク周辺部の緑膿菌色素産生性に与える影響と, MRSA発育抑制作用とを比較した。

結 果

(1) 緑膿菌のMRSA発育抑制作用

耳漏由来6株(75%), 膿汁由来16株(80%), 喀痰由来19株(55.9%), 尿由来8株

(40%)がMRSA発育抑制作用を示した(Fig. 2)。

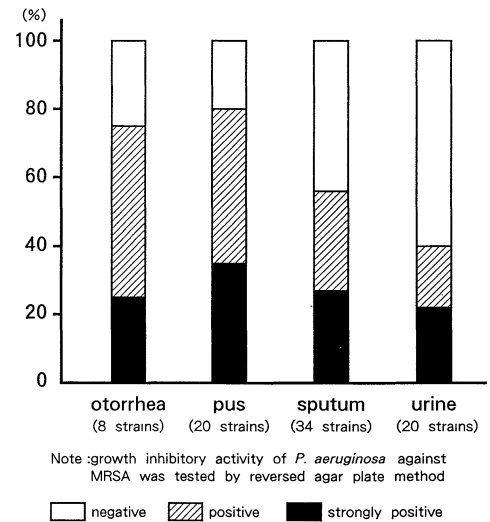


Fig. 2 Variation of growth inhibitory activity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical materials (otorrhea, pus, sputum and urine) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

dye production*)	material	number of strain	anti staphylococcal activity(%)		
			++	+	-
None	pus	6	2	3	1
	urine	7	0	1	6
	sputum	2	0	0	2
	otorrhea	5	0	3	2
	sub total	20 (100)	2 (10)	7 (35)	11 (55)
Yellow	pus	6	4	2	0
	urine	6	3	0	3
	sputum	13	4	4	5
	otorrhea	2	1	1	0
	sub total	27 (100)	12 (44.4)	7 (25.9)	8 (29.6)
Red	pus	3	1	0	2
	urine	4	3	1	0
	sputum	0	0	0	0
	otorrhea	0	0	0	0
	sub total	7 (100)	4 (57.1)	1 (14.3)	2 (28.6)
Green	pus	4	0	3	1
	urine	1	1	0	0
	sputum	12	5	2	5
	otorrhea	1	1	0	0
	sub total	18 (100)	7 (38.9)	5 (27.8)	6 (33.3)
Total	72 (100)	25 (39.7)	20 (27.8)	27 (37.5)	

*) dye production of *Pseudomonas aeruginosa* on the Muller-Hinton agar plate were recorded after 48 hours cultured at 37°C

Table 1 Correlation between dye production and anti staphylococcal activity of clinical isolated *Pseudomonas aeruginosa*

(2) 緑膿菌の色素産生性と MRSA 発育抑制作用

緑膿菌の色素産生性と MRSA 発育抑制作用との関連では、Green 66.7%, Yellow 70.3%, Red 71.4%と各色調間に有意な差は認められなかったが、色素産生を示さなかった株では45%と MRSA 発育抑制作用を示す株が少ない傾向を示した (Table 1).

(3) 薬剤感受性

MRSA 発育抑制作用を示した緑膿菌48株の薬剤感受性は、PIPC91.7%, IPM95.8%, CFS89.6%, AMK97.9%, OFLX77.1%であったが、発育抑制作用を示さなかった32株では PIPC84.4%, IPM90.6%, CFS75.0%, AMK65.6%, OFLX53.1%と薬剤感受性が低かった (Table 2).

material	anti staphylococcal activity	number of strains	susceptibilities to				
			PIPC	IPM	CFS	AMK	OFLX
pus	+	16	15 (93.8)	16 (100)	15 (93.8)	16 (100)	11 (68.8)
	-	4	2 (50)	4 (100)	3 (75)	3 (75)	1 (25)
urine	+	8	5 (62.5)	8 (100)	6 (75)	7 (87.5)	6 (75)
	-	12	10 (83.3)	11 (91.7)	7 (58.3)	3 (25)	2 (16.7)
sputum	+	18	18 (100)	16 (88.9)	16 (88.9)	18 (100)	16 (88.9)
	-	14	13 (92.9)	12 (85.7)	13 (92.9)	13 (92.9)	12 (85.7)
otorrhea	+	6	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	4 (66.7)
	-	2	2 (100)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)
sub total	+	48	44 (91.7)	46 (95.8)	43 (89.6)	47 (97.9)	37 (77.1)
	-	32	27 (84.4)	29 (90.6)	24 (75)	21 (65.6)	17 (53.1)
Total		80	71 (88.8)	75 (93.8)	67 (83.3)	68 (85)	54 (67.5)

note: drug susceptibilities were tested by sensi disk (BECTON DICKINSON) and frequency (%) obtained as S were shown in the Table
PIPC: piperacillin IPM: imipenem CFS: cefsulodin AMK: amikacin OFLX: ofloxacin

Table 2 Correlation of anti staphylococcal activity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from pus, urine, sputum, otorrhea and thier drug susceptibility

(4) エリスロマイシンの緑膿菌色素産生性への影響と MRSA 発育抑制作用

エリスロマイシンによる緑膿菌の色素産生性への影響について検討し得たのは耳漏由来

3株, 膿汁由来19株, 喀痰由来29株, 尿由来11株の計62株であったが, その内耳漏由来3株 (100%), 膿汁由来18株 (94.7%), 喀痰由来28株 (96.9%) 尿由来11株 (100%) において緑膿菌の色素産生抑制が観察された, この抑制作用は Green, Yellow, Red の色素産生株すべてに共通して認められた. しかし MRSA 発育抑制作用は, エリスロマイシンによって色素産生が抑制された株においても保持されていた.

考 察

今回我々は臨床材料別に緑膿菌を比較検討したが, MRSA 発育抑制作用には由来株間に差が存在する事が判明した. また薬剤感受性にも由来株間で差を認め, MRSA 発育抑制作用を有する緑膿菌では, 薬剤感受性が比較的良く保たれていた. この結果は施設に於ける抗菌剤の使用状況と, 抗菌剤の体内動態の反映と考えられ, 特に尿由来のオフロキサシン耐性株では16.7%, アミカシン耐性株の30%しか MRSA 発育抑制作用を示さなかった. この事は緑膿菌の耐性獲得が MRSA 発育抑制作用に変化をもたらす可能性を示唆している.

エリスロマイシンが緑膿菌の色素産生性を抑制したのにも拘らず, MRSA 発育抑制作用を保持したという結果は, 緑膿菌の示す MRSA 発育抑制作用が, ピオシアニン等色素以外の関与を示唆するものである. エリスロマイシンの緑膿菌に対する薬理作用としては, 繊毛運動障害性を持つピオシアニンの産生抑制⁵⁾⁶⁾, 菌体外酵素であるエラスターゼ⁷⁾⁸⁾及びプロテアーゼの産生抑制⁹⁾, ムコイド型緑膿菌の slime の主要成分であるアルギン酸の産生抑制¹⁰⁾, またピオシアニンの白血球からの活性酸素抑制作用¹¹⁾等が報告されている. さらにこの度の成績からエリスロマイシンは緑膿菌の示す MRSA 発育抑制作用に影響を及ぼさない事が明かになり, エリスロマイシ

ンの新たな薬理作用, 及び臨床への有用性を示すものと考えられる。

緑膿菌が検出された際の化学療法には, 検出部位や宿主の状態によって左右されると考えられるが, 漫然とした抗緑膿菌作用を有する化学療法剤の投与はMRSAを主体とする菌交代症を招く危険性をはらんでおり, 化学療法剤の選択には注意を払う必要があると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 荻野 純, 山田俊彦, 後藤 領, 菊島一仁, 藤森 功: 臨床材料より分離される緑膿菌の黄色ブドウ球菌に対する発育抑制作用, 感染症誌, 66: 909-913, 1992.
- 2) 工藤翔二, 植竹健司, 萩原弘一, 平山雅清, 許 栄宏, 木村 仁, 杉山幸比古: びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシン小量長期投与の臨床効果-4年間の治療成績-, 日胸疾会誌, 25: 632-642, 1987.
- 3) 菊池 茂, 洲崎春海, 青木彰彦, 伊東修, 野村恭也: 副鼻腔炎とエリスロマイシン小量長期投与, 耳鼻臨床, 84: 1; 41-47, 1991.
- 4) 高北晋一, 北村溥之, 大八木章博, 西川益子, 田淵圭作, 山脇吉朗, 宮田耕志, 金子賢一, 安里 亮: 慢性副鼻腔炎と小量エリスロマイシン療法, 耳鼻臨床, 84: 4; 489-498, 1991.
- 5) Wilson, R., Pitt, T, Taylor, G., Watson, D., MacDermot, J., Sykes, D., Roberts, D., Cole, P.: Pyocyanin and 1-Hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro, J. Clin. Invest. 79: 221-229, 1987.
- 6) Wilson, R., Sykes, D., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G., Cole, P.: Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium, Infect. Immun. 56: 2515-2517, 1988.
- 7) 坂田憲史, 田中弘二, 坂本芳雄, 吉田哲, 山本恵一郎: エリスロマイシンの緑膿菌に対する効果, 医学のあゆみ, 149: 6; 513-514, 1989.
- 8) 増谷喬之, 沢木政好, 三笠桂一, 古西満, 柳生善彦, 成田巨啓, 播 金収, 佐野麗子, 宗川義嗣, 間瀬 忠, 中野 博: Erythromycinによる*Pseudomonas aeruginosa*のElastase産生能抑制作用について, 感染症誌, 63: 1212-1214, 1989.
- 9) 本間恭子, 岩永正明: 微量抗生剤の緑膿菌に対する作用-エリスロマイシンおよびクロラムフェニコール-, 感染症誌, 65: 286-292, 1991.
- 10) 横井山繁行: ムコイド型緑膿菌に対するマクロライド系薬剤の作用, 感染症誌, 64: 1439-1446, 1990.
- 11) Ras, G. J., Anderson, R., Taylor, G. W., Savage, J. E., van Niekerk, E., Joone, G., Koornhof, H. J., Saunders, J., Wilson, R., Cole, P. J., Clindamycin, Erythromycin, and Roxithromycin inhibit the proinflammatory interactions of *Pseudomonas aeruginosa* pigments with human neutrophils in vitro, Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1236-1240, 1992.