

第24回日本耳鼻咽喉科感染症研究会シンポジウム

Roxithromycin の細菌 Biofilm 産生におよぼす影響

羽柴 基之 近藤 清隆 小関 晶嗣
宮本 直哉 馬場 駿吉

名古屋市立大学耳鼻咽喉科

SUPPRESSIVE EFFECT OF ROXITHROMYCIN ON BACTERIAL BIOFILM FORMATION

Hashiba, M., Kondoh, K., Ozeki, M., Miyamoto, N. and Baba, S.

Department of Otolaryngology, Nagoya City University Medical School.

The aim of the current paper is to address the suppressive effect of macrolide antibiotics on bacterial biofilm formation. Recently many authors demonstrated clinical usefulness of long term therapy of erythromycin (EM) and its derivatives on chronic sinusitis. However the reason why these drugs are effective has been still unknown. We observed bacterial biofilm formation on maxillary sinus mucosa extracted from chronic sinusitis patients. The bacterial biofilm formation involves pathogenesis of chronic infectious diseases in respiratory tracts. The experiment is

designed to identify the effect of EM derivative, Roxithromycin (RXM) on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *P.aeruginosa* was cultured in the broth containing various concentrations of RXM with a piece of Teflon sheet. Biofilm formed on the Teflon sheet was assessed by both morphological and quantitative ways. As the results the biofilm formation was suppressed by 10 μ g/ml and 100 μ g of RXM. This means RXM is possible to suppress the biofilm formation of *P.aeruginosa* within clinical dose.

はじめに

近年、細菌 Biofilm が難治性の感染症の原因として注目されている。細菌が Biofilm を形成する現象は菌の環境への適応化現象の一種として理解することができる。浮遊している菌には見られない現象であり、菌がなにかに付着してはじめて起きる現象である。付着した菌は、菌体外多糖体 (glycocalyx) を産生し、粘液状の保護膜に包まれ、互いに癒合

し Biofilm を形成する。Biofilm は菌の固着性の強化と防御能の強化に役立っている。すなわち、容易にはがれにくくなり、また Biofilm のなかに生息する菌は好中球の貪食能などの生体防御機構や抗菌剤から保護されるようになる^{1,2)} (Fig. 1)。従って、細菌感染巣において、いったん Biofilm が形成されると完全な除菌が難しくなり、感染の持続や Biofilm から持続的に放出される菌によって、

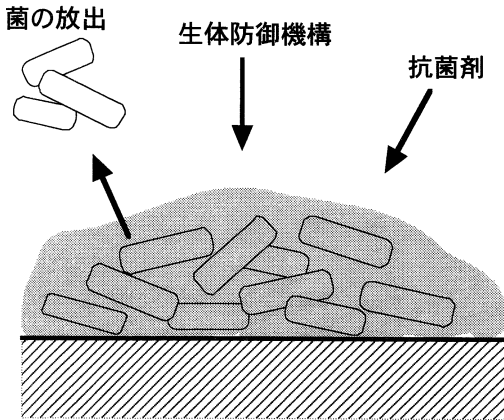


Fig. 1 Role of bacterial biofilm.

感染の再燃を繰り返すことになる。これを Biofilm 感染症と呼ぶ。Biofilm 感染症の臨床の特徴は、a. 感受性菌であっても除菌が困難、b. 炎症所見は必ずしも強くないが、慢性で緩慢な症状が持続する、c. しばしば症状が反復される、d. 組織障害は除々に悪化する³⁾であり、治療に難渋することになる。

上記のような Biofilm 感染症に合致する病態を持つ可能性のある疾患を、耳鼻咽喉科領域のなかにも求めれば、以下のような疾患が候補に挙げられる。(1) 慢性副鼻腔炎、(2) 慢性穿孔性中耳炎、(3) 鼓膜 tubing 後の感染、(4) 滲出性中耳炎、(5) 習慣性扁桃炎、(6) 扁桃病巣感染、(7) 唾石症などである。この中で慢性副鼻腔炎、鼓膜チュービング後の感染、習慣性扁桃炎では、我々はすでに細菌 Biofilm の存在を証明しており⁴⁾、Biofilm 感染症に合致すると考えてよい。

小林ら³⁾は、macrolide系抗生物質(Erythromycin (EM) とその誘導体)が緑膿菌の Biofilm の形成を抑制する現象を報告している。DPB(びまん性汎細気管支炎)においても、緑膿菌の Biofilm 形成がその病態に関与しているとする考え方があり、このような EM とその誘導体の効果は、DPB に対する EM の長期投与療法の効果⁵⁾を説明するもの

として、有力なもの1つにあげられる。

慢性副鼻腔炎に対する EM とその誘導体の長期投与療法の効果は広く認められるところとなったが⁶⁻⁹⁾、作用機序に関しても、慢性副鼻腔炎が Biofilm 感染症としての側面を持つことから、エリスロマイシンとその誘導体の Biofilm 形成抑制効果として説明し得る可能性がある。

今回我々は、エリスロマイシンの誘導体である Roxithromycin (RXM) の緑膿菌の Biofilm 形成抑制効果に関して実験を行った。Biofilm の形成の状態を、走査電顕による形態的観察と Biofilm 形成菌が抗菌剤に抵抗性であることを利用した、菌の生き残り率による間接的定量法で調べた。

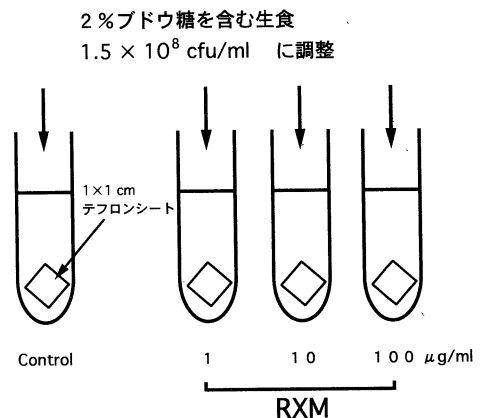
方 法

1. 形態的観察

ムコイド型の *Pseudomonas aeruginosa* (臨床分離株) を 2%ブドウ糖を含む生理的食塩水に浮遊させ、 1.5×10^8 cfu/ml に論じて実験に用いた。この浮遊液中に 1 × 1 cm の

RXM による細菌 Biofilm 形成抑制

ムコイド型 *Pseudomonas aeruginosa* (臨床分離株)



1 週間 37°C で保存

Fig. 2 Suppressive effect of RXM on biofilm formation: morphological assessment.

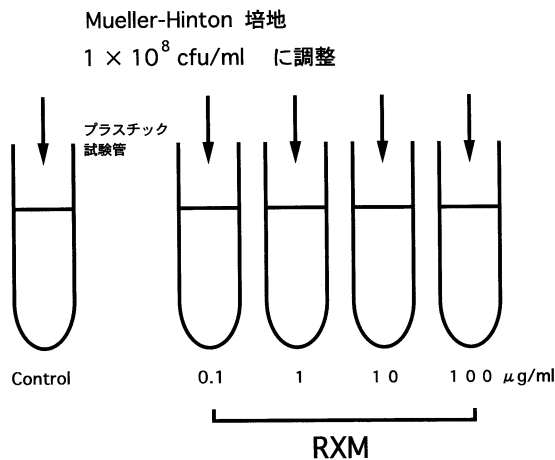
テフロンシートを留置し、一週間37℃で振盪培養した。この際、RXMを0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し比較した。シート表面に形成されたBiofilmを2.5%グルタルアルデヒドを含むPBSにて固定し、50から100%エチルアルコールにて段階的に脱水し、臨界点乾燥後白金パラジウムにてコーティングし走査電顕で観察した。(Fig. 2)

2. 定量的検討

Mueller-Hinton broth $10^8 \text{ cfu}/\text{ml}$ に調製した標準菌株の *P.aureginosa* (ムコイド産菌株)の菌液を作成し、この菌液にRXMを0, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に添加し、72時間プラスチックの試験管内で培養する事により、試験管の内壁にBiofilmを形成させた(Fig. 3)。培養後、菌液を捨て試験管内に抗生剤溶液(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CAZ)を入れ24時間作用させ浮遊菌を殺菌した。CAZの使用した菌に対するMICは1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。この各濃度のRXMの試験管に生理的食塩水を加え

RXMによる細菌 Biofilm 形成抑制
(間接的定量)

ムコイド型 *Pseudomonas aeruginosa* (標準菌株)



72時間37℃で培養

Fig. 3 Suppressive effect of RXM on biofilm formation : quantitative assessment 1.

た後、試験管外部より超音波を照射し、Biofilmを破碎することにより、浮遊菌液を作成した。この菌液中の生存菌数を平板血液寒天培地にて希釈塗抹培養で測定した(Fig. 4)。RXMを作用させない群の生存菌数をcontrolとし、0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の4群の菌の生存率を比較した。

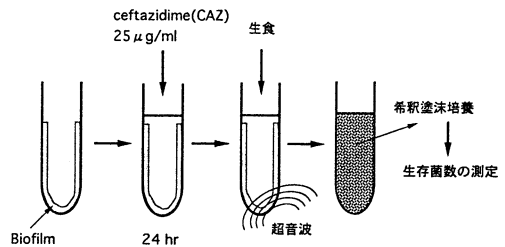


Fig. 4 Suppressive effect of RXM on biofilm formation : quantitative assessment 2.

結 果

1. 電顕による観察結果

写真1. はcontrol, 写真2. はRXM 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 写真3. は10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 写真4. は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度である。濃度依存的にテフロンシートへの菌の付着とBiofilm形成が抑制されているのがわかる。

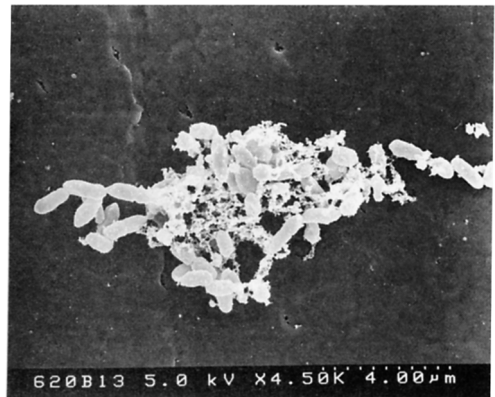


Photo. 1. Control.

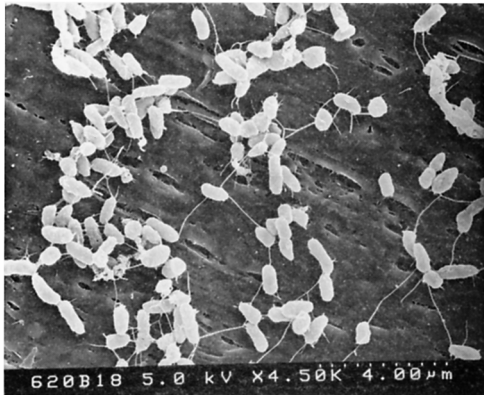


Photo. 2, RXM 1 μg/ml

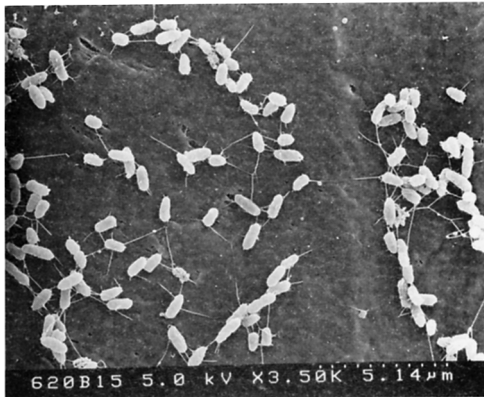


Photo. 3, RXM 10 μg/ml



Photo. 4, RXM 100 μg/ml

2. 定量的検討

RXMの濃度依存性に菌の生き残り率が低下した (Fig. 5). 生き残った菌は Biofilm 中に存在した菌で, CAZの作用を免れた菌であると考えられるので, 菌の生き残り率は間接的に Biofilmの形成量を反映していると考えられる。従って, RXMの作用により Biofilmの形成が抑制されたと考える。

Survival Rate

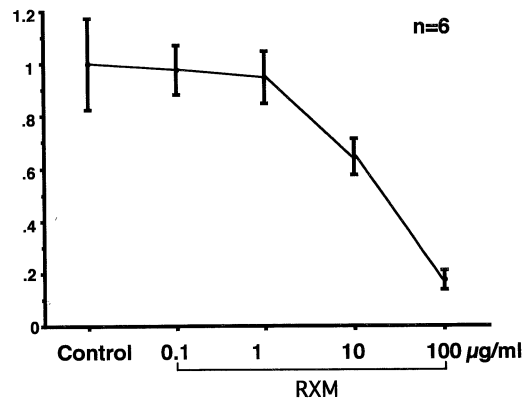


Fig. 5 Results of quantitative assessment.

考 察

DPBをはじめとする慢性気道感染症に対するEMおよびその誘導体の臨床効果はすでに異論の余地のないものとして認められている^{5,10-14)}。耳鼻咽喉科領域においても, 慢性副鼻腔炎⁶⁻⁹⁾, 滲出性中耳炎¹⁵⁾に適用されその有用性に関して多くの報告を見ている。このような臨床的效果についての作用機序の解明は内科領域を中心に精力的に展開されてきた。現在までに確認されている慢性気道感染症に関連したEMの作用としては, 宿主に対する作用として, 好中球に対する作用^{10,16-19)}, 上皮細胞に対する作用^{20,21)}, 単球・リンパ球に対する作用^{22,23)}, マクロファージに対する作用^{24,25)}等が報告されている。一方, 菌に対する作用としては, 慢性気道感染症に対する効果が検出菌のEMに対する感受

性に依存しないことから、主として非感受性菌に対する作用が注目されてきた。特に、DPBではその経過中に高率に緑膿菌感染を伴うため、非感受性菌である緑膿菌に対する作用が注目されている。このような作用として、エラスターゼ産生の抑制作用²⁶⁾、緑膿菌の付着抑制作用²⁷⁾が知られている。さらに、近年感染症の遷延化の原因として注目を集めている細菌 Biofilm に関連して、EM の誘導体が緑膿菌の Biofilm の形成を抑制するという報告がなされてきた³⁾。Biofilm 形成菌の抗菌剤に対する抵抗性を利用した Biofilm の間接的定量法は、Biofilm 感染症の本質である Biofilm 中に生存し生き延びる菌の量を評価する方法として、臨床的な意義を持つ。

最近 DPB に対する EM とその誘導体の長期投与の作用機序に関して、小林により Biofilm に関連して興味深い説が提唱されてきた。それは、ムコイド型緑膿菌が産生するアルギン酸に関するものである。すなわち、DPB はその経過中にムコイド型緑膿菌への菌交代を高率に起こし病状の悪化を招く、その原因として注目されている機序として、生体内でムコイド型緑膿菌の産生する Biofilm の主成分であるアルギン酸に対する抗体産生が起き、この抗体とアルギン酸との免疫複合体が組織に沈着し、これが好中球を局所で活性化することにより、局所の組織障害が進み慢性炎症が形成維持されるとする考え方がある。このような病態が存在するならば、エリスロマイシンとその誘導体はアルギン酸の産生を強力に抑制するので、免疫複合体の形成を抑制しムコイド型緑膿菌による慢性炎症の継続を阻止できると考えられる。このことが DPB に対する作用機序である可能性がある。

このような DPB に対する作用機序が事実であるならば、慢性副鼻腔炎に対する EM およびその誘導体の長期投与療法的作用機序に

も関係する可能性がある。しかし、DPB と異なり慢性副鼻腔炎で緑膿菌感染が証明される例はそれほど多くない。従って、この図式を直ちに慢性副鼻腔炎に当てはめることには無理があると思われるが、慢性副鼻腔炎が Biofilm 感染症としての側面を持つ可能性が高いことから、緑膿菌以外の菌種での検討が必要となろう。

今回の検討から、緑膿菌に対しての Biofilm の形成抑制作用は RXM の 1 から 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度からみられることがわかった。この濃度は、実際の臨床的投与量での組織や鼻汁、喀痰などの分泌物中の RXM の濃度として現実的なものである。従って、緑膿菌に関する限り、耳鼻咽喉科領域での Biofilm 感染症に対して効果が期待でき、今後の臨床的検討が待たれる。

Biofilm を形成する菌は緑膿菌に限らず、むしろほとんどすべての菌が Biofilm を形成するものと考えてよい。しかしながら、EM とその誘導体による Biofilm 形成抑制の実験的検討は、現在のところ緑膿菌、表皮ブドウ球菌等のごく少数の菌種に限られている。今後、他の菌種についても検討することが必要である。幅広い菌種において Biofilm の形成が抑制されることが実証されれば、臨床的に Biofilm 感染症と考えられる病態に対して積極的に応用することが可能となろう。

ま と め

1. RXM による緑膿菌のテフロンシート上に形成する Biofilm の産生抑制実験を行った。
2. その結果、実際の臨床的投与量で Biofilm 産生抑制効果があると考えられた。
3. 耳鼻咽喉科疾患と Biofilm の関連を述べ、マクロライドの Biofilm 形成抑制効果の臨床的応用の可能性について述べた。

参 考 文 献

- 1) 小林宏行：細菌と宿主の interaction. 呼

- 吸 9 : 510-526, 1990.
- 2) 公文裕巳 : Biofilm 感染症 : 総論. 化学療法の領域 10 : 15-23, 1994.
 - 3) 小林宏行 : 病原体の産生する glycoalyx と化学療法 : 総論. 化学療法の領域 8 : 15-22, 1992.
 - 4) 鈴木賢二, 小関晶嗣, 馬場駿吉 : Biofilm 感染症 : 耳鼻咽喉科感染症と細菌 Biofilm. 化学療法の領域 10 : 63-66, 1994.
 - 5) 工藤翔二, 木村 仁, 植竹健司 : びまん性汎細気管支炎に対するマクロライド系抗生剤の少量長期投与. 日胸疾会誌 22 (増) : 254, 1984.
 - 6) 菊池 茂, 洲崎春海, 青木彰彦 : 副鼻腔炎とエリスロマイシン少量長期投与. 耳鼻臨床 84 (1) : 41-47, 1991.
 - 7) 菊池 茂, 山岨達也, 洲崎春海 : 副鼻腔炎とエリスロマイシン少量長期投与 - 第2報-. 耳鼻臨床 85 (8) : 1245-1252, 1992.
 - 8) 高北晋一, 北村溥之, 大八木章博 : 副鼻腔炎と少量エリスロマイシン療法. 耳鼻臨床 84 (4) : 489-498, 1991.
 - 9) 羽柴基之, 宮本直哉, 木村利男, 馬場駿吉, 小林武弘 : 慢性副鼻腔炎に対するエリスロマイシン誘導體 (クラリスロマイシン) の効果. 日鼻科 31 : 17-28, 1992.
 - 10) 門田淳一, 織田裕繁, 崎戸 修 : 難治性下気道感染症におけるエリスロマイシンの好中球機能に及ぼす影響 緑膿菌への作用と気管支肺胞洗浄液の検討. 感染症誌 65 (3) : 277-285, 1991.
 - 11) 三上正志, 中村清一, 小関 隆 : 慢性気道疾患の喀痰中エラスターゼとエリスロマイシンの臨床効果. Therapeutic Res 10 (10) : 4379-4387, 1989.
 - 12) 三笠桂一, 沢木政好, 古西 満 : 慢性下気道感染症患者におけるエリスロマイシン治療の Natural Killer 細胞活性に与える影響について. 感染症誌 63 (8) : 811-815, 1989.
 - 13) 柳生善彦 : 慢性下気道感染症に対する E-rythromycin 長期投与療法の作用機序に関する研究 第1報 ヒト好中球機能などに及ぼす作用. 奈良医学雑誌 40 (5) : 694-703, 1989.
 - 14) 山口哲生, 倉島篤行, 竹内浩一郎 : エリスロマイシンはどのような疾患・病態に有効か 2. DPB と DPB 以外の副鼻腔気管支症候群 有効例と非有効例の臨床的特徴. Therapeutic Res 11 (3) : 530-532, 1990.
 - 15) Iino Y, Sugita K, Toriyama M, et al. : Erythromycin therapy for otitis media with effusion in sinobronchial syndrome. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 119 : 648-51, 1993.
 - 16) Anderson R : Erythromycin and roxithromycin potentiate human superoxide generation and autooxidation. J Infect Dis 159 : 966-73, 1989.
 - 17) 有岡 仁 : エリスロマイシンはなぜ効くのか 1. 好中球への作用 健常者および DPB 患者におけるエリスロマイシン服用前後の好中球走化能の変化. Therapeutic Res 11 (3) : 547-549, 1990.
 - 18) Hahn D : Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolyticlike activity in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients. Am Rev Respir Dis 147 : 1064-5, 1993.
 - 19) Ichikawa Y, Ninomiya H, Koga H, et al. : Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolytic-like activity in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients. Am Rev Respir Dis 146 : 196-203, 1992.

- 20) Tamaoki J, Chiyotani A, Sakai N, et al. : Effect of erythromycin on ciliary motility in rabbit airway epithelium in vitro. *J Antimicrob Chemother* 29 : 173-8, 1992.
- 21) Tamaoki J, Isono K, Sakai N, et al. : Erythromycin inhibits Cl secretion across canine tracheal epithelial cells. *Eur Respir J* 5 : 234-8, 1992.
- 22) 杉山幸比古, 菅間康夫, 北村 諭 : びまん性汎細気管支炎患者における末梢血活性化リンパ球とエリスロマイシン治療による変化, *日胸疾学会誌* 28 (12) : 1574-1580, 1990.
- 23) 杉本峯晴, 松本充博, 今村文哉 : エリスロマイシンはなぜ効くのか 3. リンパ球への作用 HTLV-1-Associated Myelopathy (HAM) 患者のリンパ球を用いての検討. *Therapeutic Res* 11 (3) : 554-556, 1990.
- 24) 片平潤一, 清水喜八郎 : エリスロマイシンのマクロファージ増殖・機能刺激作用. *医学のあゆみ* 147 (3) : 209-210, 1988.
- 25) 片平潤一, 清水喜八郎 : エリスロマイシンはなぜ効くのか 5. マクロファージ単球系への作用 エリスロマイシンなど14員環系マクロライド剤のマクロファージ系前駆細胞増殖刺激作用. *Therapeutic Res* 11 (3) : 561-563, 1990.
- 26) 増谷喬之, 澤木政好, 三笠桂一 : Erythromycin による *Pseudomonas aeruginosa* の Elastase 産生抑制作用について. *感染症誌* 63 (10) : 1212-1214, 1989.
- 27) 山崎 透 : 緑膿菌の気道粘膜附着能とそれに及ぼす抗菌剤の影響. *感染症誌* 64 (5) : 575-583, 1990.