

Levofloxacin の細菌 Biofilm 産生におよぼす影響

小 関 晶 嗣 渡 部 啓 孝

NTT 東海総合病院耳鼻咽喉科

宮 本 直 哉 鈴 木 賢 二 馬 場 駿 吉

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

Inhibitory effect of Levofloxacin on bacterial biofilm formation

Masashi OZEKI, Hirotaka WATABE

NTT Toukai Hospital

Naoya MIYAMOTO, Kenji SUZUKI, Shunkichi BABA

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University Medical School

Recently, the biofilm formed by bacteria has been shown to be involved in making infectious diseases intractable. We indirectly evaluated whether Levofloxacin (LVFX) could destroy biofilm on a plastic surface by determining the number of living bacteria in the biofilm. As a result, LVFX was found to inhibit biofilm formation and to destroy biofilm. In addition, this inhibitory or destructive effect on biofilm was observed at *in vivo* concentrations which can be clinically achieved with LVFX. Thus, LVFX may be effective against infectious diseases in the field of otorhinolaryngology when biofilm formation is very likely to be pathologically involved.

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、また一面、細菌の集団としての耐性化とも考えられる。個々の細菌の浮遊状態時には見られない現象であり、細菌が、付着し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、粘液状の膜に包まれる。これを Biofilm と呼ぶ。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 の中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)}。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、感染を繰り返すことになる。これを Biofilm 感染症と呼ぶ。Biofilm 感染症の臨床的特徴は、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. 組織障害は徐々に悪化する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、耳鼻咽喉科領域で考えれば、(1) 慢性鼻副鼻腔炎、(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。この中で慢性鼻副鼻腔炎、鼓膜 tubing 後の感染、習慣性扁桃炎では、当教室はすでに細菌 Biofilm の存在を証明しており⁹⁾、Biofilm 感染症に合致すると考えてよい。

今回我々は Levofloxacin (LVFX) の臨床分離の *Staphylococcus aureus* (# 00083) (*S. aureus*) の Biofilm 破壊作用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。

対象と方法

1. 形態学的観察

S. aureus を Mueller-Hinton broth に浮遊させ、 1.5×10^8 cfu/ml に調整して実験に用いた。この浮遊液中に 1×1 cm のシリコンシートを、留置し、72 時間 37°C で培養した。培養後、

菌液を捨てて対照として生食及び、各濃度の LVFX 溶液 (1MIC, 2MIC, 4MIC, 8MIC) を入れ 24 時間作用させ、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。

2. 定量的観察

Mueller-Hinton broth に 1.5×10^8 cfu/ml に調製した *S. aureus* の菌液を作成し、72 時間プラスチックの試験管内で培養することにより、試験管の内壁に Biofilm を形成させ、培養後、菌液を捨て、試験管内の Biofilm を、対照として生食及び LVFX 溶液 (1MIC, 2MIC, 4MIC, 8MIC) で満たし、その後 24 時間培養した。

この各濃度の LVFX の試験管の抗菌剤を生理的食塩水に置換後、試験管外部より超音波を照射し、Biofilm を破砕することにより、Biofilm 内の細菌を露出浮遊させた。この菌液中の生存菌数を平板寒天培地にて塗抹培養で測定した。LVFX を作用させない群の生存菌数を control とし、1, 2, 4, 8MIC の濃度の 4 群の菌の生存率を比較した。(Fig. 1)

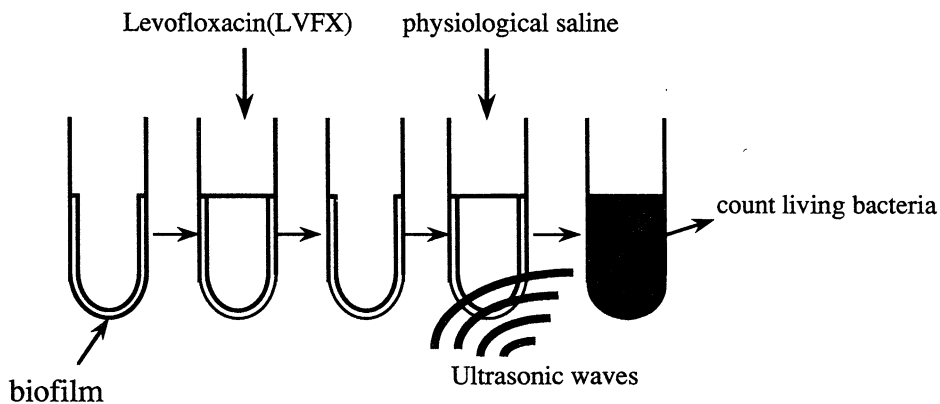


Fig. 1 Experimental method

LVFX was applied to biofilm formed on the inside of the plastic test tube and the surface bacteria were sterilized. Bacteria within the biofilm survived the sterilizing effect of LVFX. The LVFX solution was discarded and physiological saline was added. The biofilm were disrupted by ultrasonic vibrations and a bacterial solution was prepared. The living bacteria were counted.

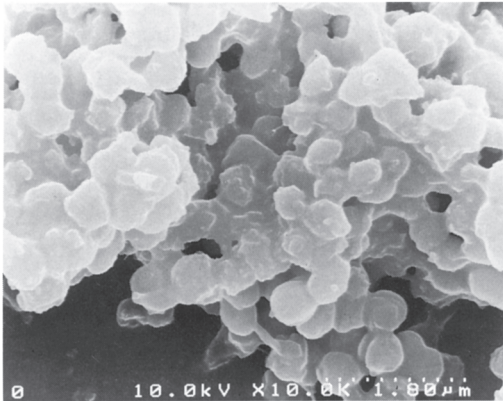


Fig.2 Scanning electron microscopic view of control (without LVFX)

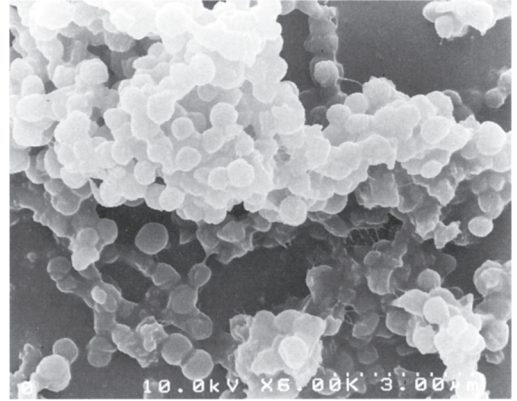


Fig.5 Scanning electron microscopic view of 4 MIC (LVFX)
Biofilm on the bacteria were decreased at 4MIC LVFX

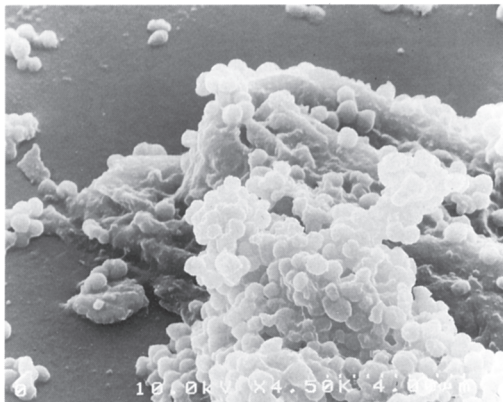


Fig.3 Scanning electron microscopic view of 1 MIC (LVFX)
Bacteria biofilm did not have change markedly compared with the control. (without LVFX)

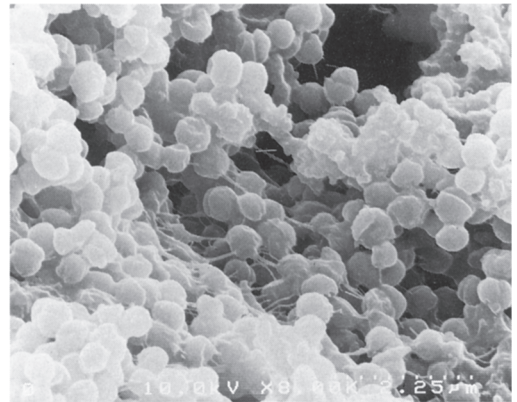


Fig.6 Scanning electron microscopic view of 8 MIC (LVFX)
Fig.6 show significant destruction of the biofilm.

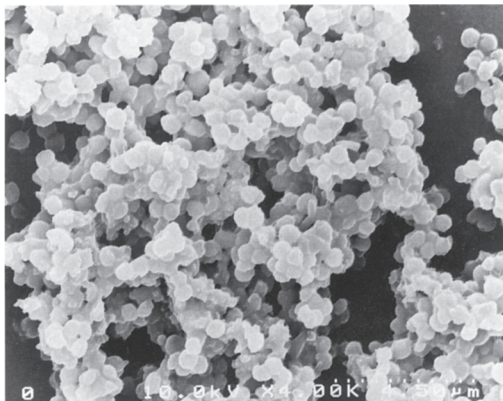


Fig.4 Scanning electron microscopic view of 2 MIC (LVFX)

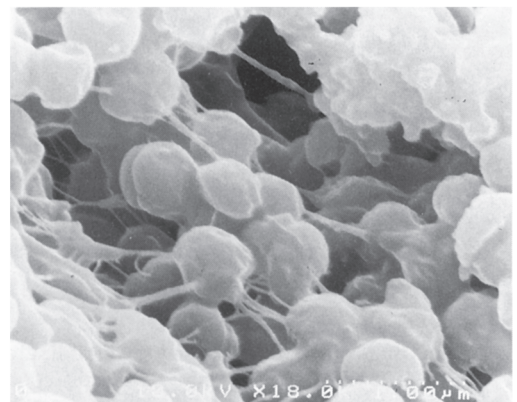


Fig.7 High magnification scanning electron microscopic view of 8MIC (LVFX)
Fig.7 show the density of biofilm decreased

結 果

1) 形態学的観察

走査型電子顕微鏡による形態学的観察に Bacterial biofilm の抑制破壊が認められた。(Fig. 2-7)

control (Fig. 2) では細菌群の表面に slime 状の biofilm が認められたが 1MIC (Fig. 3) 及び 2MIC (Fig. 4) では control と比較して著明な変化は認められない。

4MIC (Fig. 5) ではやや biofilm の密度が疎になり網目状構造が認められる様になる。8 MIC (Fig. 6) ではさらにその程度は進む。(Fig. 7) は 8MIC の強拡大であるが biofilm の細糸状変化が顕著になり破壊抑制が濃度依存性に認められた。

2) 定量的観察

biofilm 破壊作用のない Cefotiam dihydrochloride (CTM) と比較し、LVFX の Bacterial biofilm の抑制破壊を示したものです。LVFX の濃度依存性に細菌の生き残り率が低下し、生き残った細菌は Biofilm 中に存在した細菌で、LVFX の作用を免れた細菌であると考えられる。従って、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ることができ、LVFX の作用により Biofilm の抑制破壊されたと考えられる。(Fig. 8)

考 察

Biofilm disease (感染症) には二つの病態が考えられる。第一は Biofilm により抗菌剤に対して細菌が抵抗性を示すことにより感染症の遷

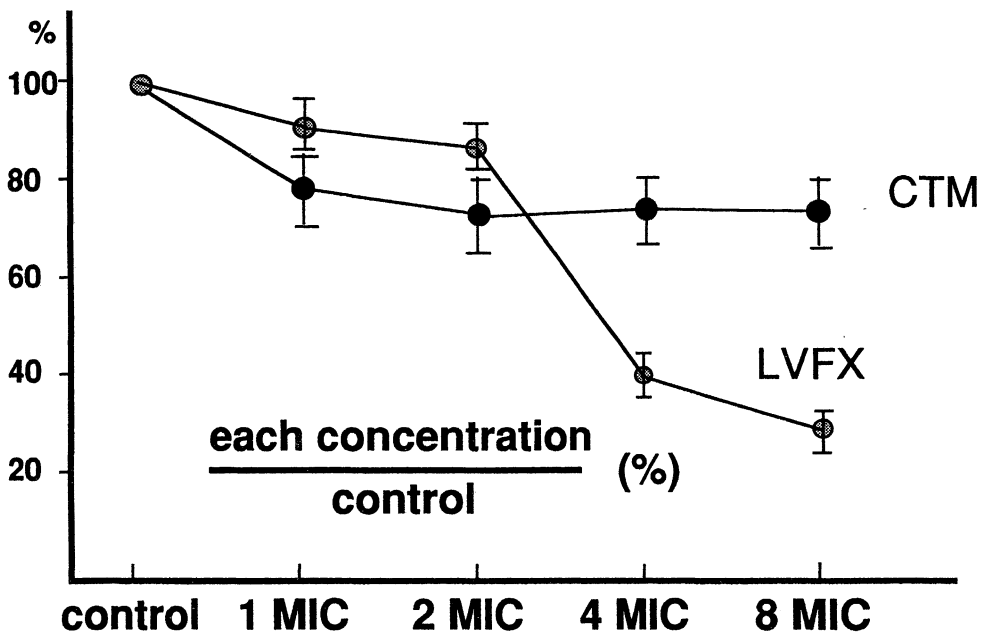


Fig. 8 Survival rate of bacteria. The ordinate indicate the survival rate of bacteria. The abscissa indicate antibiotic concentrations of Cefotiam dihydrochloride (CTM) and LVFX. A black circle indicates the survival rate of bacteria after CTM application. A shaded circle indicates the survival rate of bacteria after LVFX application. The mean values and standard deviations at different antibiotic concentrations are shown. The number living of bacteria at a LVFX concentration over 4MIC decreased remarkably.

延化する病態。第二は biofilm に対して免疫複合体が形成され、この複合体が局所に付着し、これが好中球を賦活化し、慢性的に局所組織障害が起こり、感染、炎症が継続、維持されるという病態である⁶⁻¹¹⁾。前述の第一番目の病態からすると、今回我々の行った in vitro における 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、生き延びる菌量を評価する方法として、臨床的な意義を持つと考えられる。内科領域において、最近、慢性感染症、例えば慢性汎細気管支炎 (DPB) 等に対する 14 員環マクロライド系抗生剤有用性¹²⁻¹⁶⁾ や、ニューキノロン系抗生剤併用の Biofilm に対する有用性¹⁷⁾ に関して興味深い説が提唱されている。また当教室においても、このムコイド型 *P. aeruginosa* に対して in vitro での 14 員環マクロライド系抗生剤とセフェム系抗生剤の併用の効果は確認されている¹⁸⁾。今回の我々の検討から、*S. aureus* に対しての Biofilm の抑制破壊作用は LVFX の 0.4 から 1.6 μ 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 LVFX の移行濃度として現実的なものである。*S. aureus* 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 *S. aureus* に限らず、多くの菌が Biofilm を形成するものと考えてよいと思われるが、Levofloxacin による Biofilm 抑制破壊の実験的検討は、現在のところ *P. aeruginosa*, *S. aureus* 等のごく少数の菌種に限られており、今後、他の菌種、他剤についても検討する必要がある、幅広い菌種において Biofilm 感染症と考えられる慢性感染症の寛解期だけでなく急性増悪期における病態に対して 14 員環マクロライド系抗生剤とキノロン系抗生剤の併用を積極的に取り入れることが可能と

なる^{19,20)}。

ま と め

1. LVFX による *S. aureus* の Biofilm の抑制破壊実験を行った。
2. その結果、実際の臨床的投与量で Biofilm 抑制破壊効果があると考えられた。

参 考 文 献

1. 小林宏行: 最近の宿主の 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. 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 健康者および 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.
6. Hahn D: Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolytic-like activity in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients [letter ; comment]. Am Rev Respir Dis 147 : 1064-5 Issn : 0003-0805 1993.
7. Ichikawa Y Ninomiya H Koga H et al. : Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolytic-like in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients [see comments]. Am Rev Respir Dis 146 : 196-203 Issn : 0003-0805 1992.
8. 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 Issn : 0305-7453 1992.
9. Tamaoki J Isono K Sakai N et al. : Erythromycin inhibits Cl secretion across canine tracheal epithelial cells [see comments]. Eur Respir 5 : 234-8 Issn : 0903-1936 1992.

10. 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.
11. 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.
12. 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. 日胸疾学会誌 22 (増): 254 1984.
13. 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 *S. aureus* 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.
14. 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.
15. 柳生善彦: 慢性下気道感染症に対する Erythromycin 長期投与治療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.
16. 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.
17. Anderson R: Erythromycin and Levofloxacin potentiate human neutrophil locomotion in vitro by inhibition of lekoattractant-activated superoxide generation and autooxidation. J Infect Dis 159: 966-973 Issn: 0022-1899 1989.
18. MASASHI OZEKI NAOYA MIYAMOTO MOTOYOKI HASHIBA and SHUNKICHI BABA: Inhibitory Effect of Roxithroycin on Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*: Acta Otolaryngoi (Stockh) Suppl 526: 61-63 1996.
19. 山崎 透: *S. aureus* の気道粘膜附着能とそれらに及ぼす抗菌剤の影響. 感染症誌 64 (5): 575-583 1990.
20. 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体 (クラリスロマイシン) の効果. 日鼻科 31: 17-28 1992.

連絡先: 小関晶嗣

〒460 名古屋市中区松原 2-17-5

NTT 東海総合病院耳鼻咽喉科