

細菌

緑膿菌 Twitching motility に対するマクロライド系薬の影響

宮島佳子 大濱 稔 岸 建志 時松一成 平松和史 永井寛之 門田淳一 那須 勝

はじめに

緑膿菌は慢性呼吸器疾患や悪性腫瘍などを有するコンプロマイズトホストにおいて、日和見感染症の原因菌として重要であり、同様に1本のflagellumと数本のtype VI piliを有するグラム陰性桿菌である。Type VI piliは, asialoGM1を介する菌の宿主細胞への付着や, その伸展, 収縮によって菌体が鞭毛非依存性に硬質境界表面を移動する能力 twitching motility (TM) に関与することが知られている。TMはバイオフィルム形成や組織侵入に関与し, 緑膿菌の病原性の発現に重要な役割を果たしていると考えられている。今回, 我々は緑膿菌 PAO-1株のTMに対する最小発育阻止濃度以下(sub-MIC)での各種マクロライド系抗菌薬の影響について検討した。

材料および方法

1) 菌株及び抗菌薬

菌株は緑膿菌PAO-1株を用いた。抗菌薬はエリスロマイシン (EM), アジスロマイシン (AZM), ロキタマイシン (RKM)の計3薬剤を使用した。緑膿菌PAO-1株の各マクロライド系抗菌薬への最小発育阻止濃度 (MIC) はそれぞれEM: 400 μ g/ml, AZM: 800 μ g/ml, RKM: 800 μ g/mlであった。

2) twitching motility (TM) 評価方法

各抗菌薬のsub-MIC (EM; 1/128MIC, 1/64MIC, 1/32MIC, 1/4 MIC, AZM; 1/128MIC, 1/64MIC, 1/32MIC, 1/4 MIC, RKM; 1/16MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC) を含有した2 mm厚のLuria-Betani medium (1.5% agar) を作成し, PAO-1株をプレート中央の底に接種した。37 $^{\circ}$ C, 48時間培養後, 寒天培地とシャーレの境界面に形成されたtwitching zoneの最長半径を計測した。薬剤を含まないコン

トロール群を1.0とし, コントロール群に対する比でtwitching zone半径を表示した。

3) マクロライド系抗菌薬のpili蛋白発現に対する影響

マクロライド系抗菌薬のpili蛋白発現への影響を検討するために, cell lysateを抗原としてウエスタンブロット法を用いて検討した。各薬剤を作用させた緑膿菌 1×10^8 CFUをSDS-ポリアクリルアミド法で泳動した後, PVDFメンブレンへブロットティングし, 1次抗体として抗piliモノクローナル抗体と反応後, ECL system[®]にてバンドを検出した。

4) マクロライド系抗菌薬の菌体に対する影響

マクロライド系抗菌薬の菌体形態への影響を検討するため, 各薬剤を作用させた緑膿菌PAO-1株をグルタルアルデヒド及びオスミウムテトロキシドにてフィルターに固定後, 電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。

結 果

1) マクロライド系抗菌薬のTMに対する影響

14員環系のEMでは1/64MICである6.25 μ g/ml, 15員環系のAZMでは1/64MICである12.5 μ g/mlより高濃度で濃度依存的に有意にTMの抑制を認めた (Figs. 1, 2)。一方16員環系のRKMでは1/8MIC (100mg/ml) 以上の濃度でTMの抑制が認められたが, 1/4MIC (200 μ g/ml) でもコントロールを1としたtwitching zoneの半径比は0.5であり, EM, AZMと比較しTMの抑制効果が弱かった (Fig. 3)。

2) 各種マクロライド系抗菌薬のpili蛋白発現に対する影響

Fig. 4に示すように, EMにおいては1/128MIC, 1/64MIC, 1/32MICではコントロールと比較しpili

Fig. 1. Effect of erythromycin on the twitching motility.

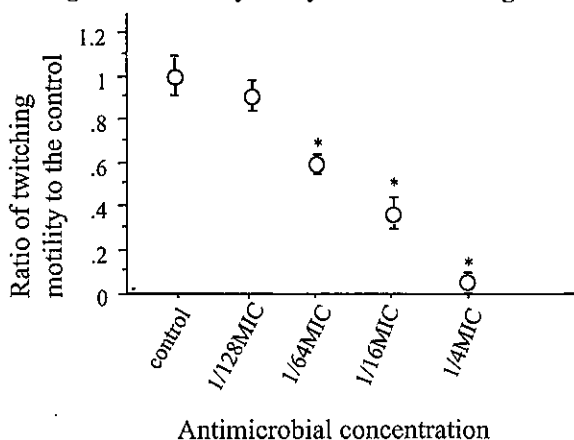
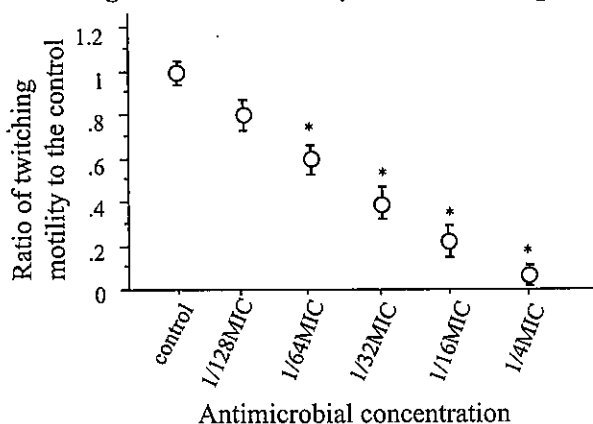
* : significant differences to control $p < 0.05$

Fig. 2. Effect of azithromycin on the twitching motility.

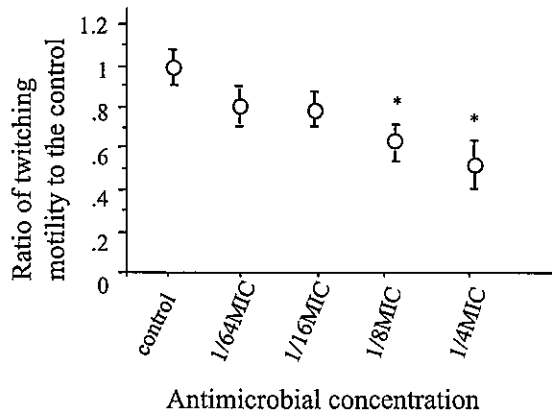
* : significant differences to control $p < 0.05$

蛋白発現量は抑制されておらず、差が認められなかったが、1/4MICでは発現量が抑制されていた。AZMにおいては1/128MIC、1/64MIC、1/32MIC、1/4MICの全ての濃度で著明なpili蛋白発現量の抑制が濃度依存的に認められた。一方、RKMでは1/16MIC、1/8MIC、1/4MICの各濃度においてもpili蛋白発現量の抑制は認められなかった。

3) EM, AZM, RKMの菌体形態変化に対する影響
各マクロライド系抗菌薬のTMを抑制する最低

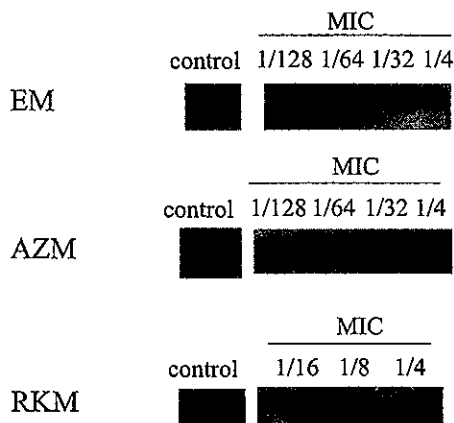
濃度を作用させた緑膿菌PAO-1株をSEMにて観察したところ、EM (1/64MIC) においては菌体の伸長化が認められた (Fig. 5)。AZM (1/64MIC) においては菌体の伸長化、膨化及び表面の粗造化が認められ、形態変化が著明であった。RKM (1/8MIC) では抗菌薬非作用群のコントロールと比較し、ほとんど形態に変化は認められなかった。

Fig. 3. Effect of rokitamycin on the twitching motility.



* : significant differences to control $p < 0.05$

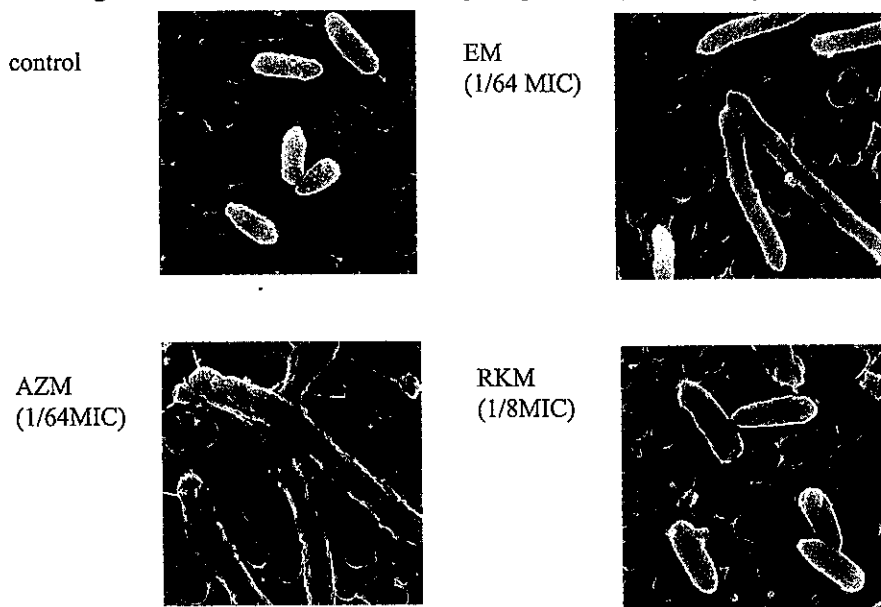
Fig. 4. Effect of macrolides on the expression of pili protein.



考 察

マクロライド系抗菌薬は、免疫担当細胞、分泌細胞、上皮細胞に対する影響といった宿主側への作用と細菌側への作用の両面を有しており、非感受性菌が検出される難治性慢性気道感染症においても臨床的有効性を示すことが知られている。細菌側への抗菌作用以外の効果に関する検討は多く、本来マクロライド系抗菌薬に高度耐性を示す緑膿菌において、最小発育阻止濃度以下 (sub-MIC) のマクロライド系薬で exotoxin A, プロテアーゼ産生¹⁾, アルギン酸産生²⁾や鞭毛蛋白 (flagel-

lin) 発現量³⁾などの virulence factor が抑制されるという数々の報告がなされている。今回、緑膿菌における type VI pili 依存性の移動能力である twitching motility (TM) に対する sub-MIC でのマクロライド系抗菌薬の影響について検討したが、EM, AZM, RKM はいずれも TM を有意に抑制した。TM はバイオフィーム形成段階において microcolony 形成など重要な役割を果たし⁴⁾, 組織への侵入における関与も報告されている⁵⁾ ことから、マクロライド系抗菌薬の TM 抑制効果によって、成熟したバイオフィームの形成や菌体の組織侵入が抑制さ

Fig. 5. Effect of macrolides on the morphological changes of *P. aeruginosa*.

れることが予想され、慢性気道感染症の病態改善につながる可能性が考えられた。

検討した3薬剤のなかでは、EMおよびAZMは、RKMと比較してより低濃度 ($\geq 1/64$ MIC) で濃度依存性に有意にTMを抑制した。特にAZMでは著明なpili蛋白発現抑制と菌体の伸長化、膨化及び表面の粗造化が認められた。EMでは、より高濃度 (1/4MIC) でpili蛋白発現量を抑制し、菌体の伸長化も認められたものの、AZMと比較するとその効果は弱かった。一方、RKMではpili蛋白発現量及び菌体に対する影響はほとんど認められなかった。以上よりTM抑制効果の程度にはそれぞれの薬剤の作用の差が影響していると考えられた。このほかにもマクロライド系抗菌薬のTM抑制効果には、薬剤作用時間の影響、quorum-sensingとの関連、菌体外にassemblyされるpiliの数や、piliそのものの動きへの影響などが考えられ、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

文 献

1) HIRAKATA Y., KAKU M., YAMAGUCHI K. *et al.* :

Potential Effects of Erythromycin on Host Defense Systems and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36 : 1922~1927, 1992

- 2) ICHIMIYA T., HIRAMATSU K., NASU M. *et al.* : The Influence of Azithromycin on the Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *Chemother.* 42 : 186~191, 1996
- 3) KAWAMURA-SATO K., IINUMA Y., OHTA M. *et al.* : Effect of Subinhibitory Concentrations of Macrolides on Expression of Flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 : 2869~2872, 2000
- 4) GEORGE A. O'TOOLE, ROBERTO K : Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30 : 295~304, 1998
- 5) IRANDOKHT ZOLFAGHAR, DAVID J. EVANS, SUZANNE M. J. FLEISZIG : Twitching Motility Contributes to the Role of Pili in Corneal Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 71 : 5389~5393, 2003