

〈原著〉

## 喀痰由来緑膿菌のバイオフィーム形成における抗菌薬の影響

越川 拓郎<sup>1)\*</sup>、近藤 大樹<sup>2)</sup>、眞野 容子<sup>2)</sup>、古谷 信彦<sup>1),2)</sup>

### Effect of antimicrobial drugs on biofilm formation of sputum derived *Pseudomonas aeruginosa*

Takuro Koshikawa<sup>1)\*</sup>, Hiroki Kondo<sup>2)</sup>, Yoko Mano<sup>2)</sup> and Nobuhiko Furuya<sup>1),2)</sup>

**Summary** *Pseudomonas aeruginosa* is a typical biofilm-forming bacterium, but there are few reports comparing the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. In this study, we investigated the effect of biofilm formation on the viability and antibiotic susceptibility of multidrug-resistant *P. aeruginosa* and *P. aeruginosa* showing sensitivity to imipenem (IMP), ciprofloxacin (CPFX), and amikacin (AMK) (three-drug-sensitive *P. aeruginosa*). Antimicrobial susceptibility testing using IMP, CPFX, AMK, ceftazidime (CAZ), and doripenem revealed that antibiotic tolerance of *P. aeruginosa* within a biofilm was 10–2000-fold that observed outside the biofilm. In addition, introduction of CPFX and CAZ after biofilm formation was found to have an inhibitory effect on the biofilm formed by the three-drug-sensitive *P. aeruginosa*. These results show that the three-drug-sensitive *P. aeruginosa* developed resistance to the antibiotics via biofilm formation and that CPFX and CAZ might be useful for the treatment of biofilms.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, minimal biofilm inhibitory concentration, minimal biofilm eradication concentration

#### I. 緒言

緑膿菌は好気性グラム陰性桿菌で、環境中や生体内の常在菌として広く分布しており、日和見感染症をはじめ、院内における様々な急性感染症や慢性感染症の原因菌の一つである<sup>1)</sup>。近年、感染症法により緑膿菌に効果のあるイミベ

ネム (IPM,  $R \geq 16 \mu\text{g/mL}$ )、シプロフロキサシン (CPFX,  $R \geq 4 \mu\text{g/mL}$ )、アミカシン (AMK,  $R \geq 32 \mu\text{g/mL}$ ) に耐性を示す多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) が世界中で出現し、現行の治療法が困難になっている<sup>2),3)</sup>。さらに、緑膿菌による感染症の難治化の原因としてバイオフィームの形

<sup>1)</sup> 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

<sup>2)</sup> 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

<sup>1)</sup> Health Care Science, Graduate School of Bunkyo Gakuin University

<sup>2)</sup> Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology Bunkyo Gakuin University

受付日：2017年11月30日

採択日：2018年1月9日

成が報告されている。バイオフィームは、細菌が人工呼吸器の挿管チューブや尿道カテーテル等の壁に線毛を用いて付着し、一定数の菌が集まりアルギン酸や細胞外多糖体を産生する<sup>4)</sup>。さらに細菌を包み込むことで抗菌薬や好中球などの貪食に抵抗性を示している<sup>5)-9)</sup>。しかし、日本では、バイオフィーム形成時の抗菌薬感受性検査の報告はほとんどない。そこで本研究では、喀痰由来緑膿菌のバイオフィーム形成前後の抗菌薬感受性検査の比較検討及びバイオフィーム形成後の抗菌薬暴露におけるバイオフィーム形成量を測定した。

## II. 材料と方法

### 1. 使用菌株

本研究で使用した緑膿菌は本邦の複数の医療施設で分離された喀痰由来の臨床分離株20株である。これらは感染症法に準拠し<sup>2)</sup>、IPM ( $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ )、CPFX ( $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ )、AMK ( $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ ) の3薬剤耐性を同時に示す多剤耐性緑膿菌と、同3系統の薬剤に感性を示す緑膿菌(3剤感性緑膿菌)をそれぞれ10株ずつ使用した。

### 2. 使用薬剤

セフェム系のセフトジジム (CAZ、東京化成工業株式会社、東京)、カルバペネム系のIPM (LKT Laboratories inc、USA)、ドリベネム (DRPM、LKT Laboratories inc)、アミノグリコシド系のAMK (和光純薬株式会社、大阪)、キノロン系のCPFX (和光純薬株式会社) の計5薬剤を用いた。

### 3. 抗菌薬感受性検査

#### 3.1. 最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration; MIC)

抗菌薬感受性検査はClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠し<sup>10)</sup>、cation-adjust Mueller-Hinton broth (CAMHB; 日本ベクトンディッキンソン; BD、東京) を用いて微量液体希釈法にて測定した。各抗菌薬の濃度は0.06-128  $\mu\text{g/mL}$ に調整し、35℃の好気環境下で20時間培養後、CLSIの各ブレイクポイント判定基準に基づき感性 (Susceptible; S)、中間 (Intermediate; I)、耐性 (Resistant; R) の判定を

した<sup>11)</sup>。

#### 3.2. 最小バイオフィーム発育阻止濃度 (minimal biofilm inhibitory concentration; MBIC) と最小バイオフィーム撲滅濃度 (minimal biofilm eradication concentration; MBEC)

MBICとMBECの測定はCalgary Biofilm methodに準拠し実施した<sup>12)</sup>。Mueller-Hinton寒天培地 (MHA; BD) で前培養した集落をCAMHB 5 mLに懸濁し、一晚振盪培養し、培養後の菌液を McFarland (以下McF) 0.5に調整し、さらにCAMHBで10倍希釈して $10^7$  CFU/mLの濃度に調整した。調整した菌液をCalgary Biofilm Device (CBD; サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、東京) に150  $\mu\text{L}$ 接種し24時間、35℃の好気環境下で培養した。培養後、CBDの蓋を生理食塩水にて2回洗浄し、新しい2.5-1024  $\mu\text{g/mL}$ に調整した各抗菌薬を接種したCBDにバイオフィームが付着したCBDの蓋を被せ、24時間、35℃の好気環境下で培養した。その後、再度CBDの蓋を生理食塩水にて2回洗浄し、CAMHBを接種した96wellマイクロプレートにCBDの蓋を被せ、EpiSonic Multi-Functional Bioprocessor 1100 (フナコシ株式会社、東京) を用いて超音波処理を行った。超音波処理後、24時間、35℃の好気環境下で培養し、MBIC及びMBECを測定した。MBECはバイオフィーム内細菌が除菌された最小濃度と定義した<sup>13)</sup>。

#### 4. バイオフィーム形成試験

O'tooleら<sup>14)</sup> の方法を改変して実施した。Trypticase soy agar (TSA; 日水製薬株式会社、東京) で前培養した集落をTrypticase soy broth (TSB; 日水製薬株式会社) 5 mLに懸濁し、一晚振盪培養し、培養後の菌液を McF0.5に調整し、さらにTSBで10倍希釈して $10^7$  CFU/mLの濃度に調整した。調整した菌液を96wellマイクロプレート (ビーエム機器株式会社、東京) に180  $\mu\text{L}$ ずつ接種し、24時間、35℃で培養した。培養後、生理食塩水で2回洗浄し2.5-1024  $\mu\text{g/mL}$ に調整した抗菌薬を接種した後、さらに24時間培養した。その後、各wellに1%クリスタル紫液20  $\mu\text{L}$ ずつ加え、室温で10分間染色した。染色後、各wellに生理食塩水を200  $\mu\text{L}$ ずつ加え

脱色を繰り返し、プレートを十分乾燥させた。乾燥後、各well内に99%エタノールを200  $\mu$ Lに加え、15分間静置後、吸光度計（サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社）にてOD<sub>570</sub>で測定した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 抗菌薬感受性検査

##### 1.1. MIC

MICの結果をTable 1、Table 2に示した。3剤感性緑膿菌におけるCAZ、IPM、DRPM、AMK、CPFXに対する90%の株が発育阻止される最小濃度（90% minimum inhibitory concentration; MIC<sub>90</sub>）はそれぞれ、128, 8, 2, 8, 0.25  $\mu$ g/mLであった。多剤耐性緑膿菌におけるMIC<sub>90</sub>はCPFXを除く4剤では>128  $\mu$ g/mLであり、CPFXでは64  $\mu$ g/mLであった。CLSIが示した各抗菌薬のブレイクポイントの判定基準に基づく<sup>11)</sup>、3剤感性緑膿菌はIPM、DRPM、AMK、CPFXに対して感性を示したが、CAZに対しては耐性を示す株が多く、多剤耐性緑膿菌はすべての抗菌薬に対して耐性を示した。

##### 1.2. MBIC、MBEC

MBIC、MBECの結果をTable 1、Table 2に示した。3剤感性緑膿菌における90%の株のバイオフィルムが阻止される最小濃度（90% minimal biofilm inhibitory concentration; MBIC<sub>90</sub>）、90%の株のバイオフィルム内細菌が除菌される最小濃度（90% minimal biofilm eradication concentration; MBEC<sub>90</sub>）は、CPFXを除く4剤でそれぞれ>1024、>1024  $\mu$ g/mLであり、CPFXでは256、512  $\mu$ g/mLであった。多剤耐性緑膿菌におけるMBIC<sub>90</sub>、MBEC<sub>90</sub>は全ての抗菌薬でそれぞれ>1024、>1024  $\mu$ g/mLであった。

##### 1.3. MICとMBIC、MBECの比較

Table 1より、3剤感性緑膿菌はMICとMBIC、MBECを比較すると、CAZでは3管差以上（8倍以上）、IPMでは7管差以上（128倍以上）、DRPMでは9管差以上（512倍以上）、AMKでは7管差以上（128倍以上）、CPFXでは11管差（2048倍以上）耐性が上昇した。Table 2より、多剤耐性緑膿菌はMICとMBIC、MBECを比較すると、CAZ、IPM、DRPM、AMKでは3管差以上（8倍以上）、CPFXでは4管差以上（16倍以上）耐性が上昇した。3剤感性緑膿菌において、バイオフィルムを形成する前ではIPM、DRPM、

Table 1 Antimicrobial susceptibility tests of three-drug-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* [ $\mu$ g/mL]

Antimicrobial	MIC <sub>90</sub>	MBIC <sub>90</sub>	MBEC <sub>90</sub>
CAZ	128	>1024	>1024
IPM	8	>1024	>1024
DRPM	2	>1024	>1024
AMK	8	1024	>1024
CPFX	0.25	256	512

Table 2 Antimicrobial susceptibility tests of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [ $\mu$ g/mL]

Antimicrobial	MIC <sub>90</sub>	MBIC <sub>90</sub>	MBEC <sub>90</sub>
CAZ	>128	>1024	>1024
IPM	>128	>1024	>1024
DRPM	>128	>1024	>1024
AMK	>128	>1024	>1024
CPFX	64	>1024	>1024

AMK、CPFXは感性だったが、バイオフィルムを形成することで同4剤に対して耐性を示した。多剤耐性菌に関しては、バイオフィルム形成後でも耐性を示していた。

2. バイオフィルム形成試験

バイオフィルム形成量をFig. 1に示した。抗菌薬を接種せずにバイオフィルムを形成させた3剤感性緑膿菌、多剤耐性緑膿菌を基準（100%）として比較した。CAZを接種した3剤感性緑膿菌が形成するバイオフィルムは1-128  $\mu\text{g/mL}$ の抗菌薬濃度で7-39%の形成低下を認め、多剤耐性緑膿菌の形成するバイオフィルムは、全ての抗菌薬濃度で26-75%の形成増加を認めた。IMP、DRPMを接種した3剤感性緑膿菌の形成

するバイオフィルムは、全ての抗菌薬濃度でそれぞれ22-64%、16-55%の形成増加を認め、多剤耐性緑膿菌の形成するバイオフィルムでも全ての抗菌薬濃度でそれぞれ、14-66%、29-88%の形成増加を認めた。AMKを接種した3剤感性緑膿菌の形成するバイオフィルムは32-128  $\mu\text{g/mL}$ の抗菌薬濃度で18-27%の形成低下を認め、多剤耐性緑膿菌の形成するバイオフィルムは、全ての抗菌薬濃度で21-69%の形成増加を認めた。CPFXを接種した3剤感性緑膿菌の形成するバイオフィルムは4-128  $\mu\text{g/mL}$ の抗菌薬濃度で7-29%の形成低下を認め、多剤耐性緑膿菌の形成するバイオフィルムは、64-128  $\mu\text{g/mL}$ の抗菌薬濃度で3-25%の形成低下を認め、0.25-32  $\mu\text{g/mL}$ の抗菌薬濃度で7-54%の形成増加を認め

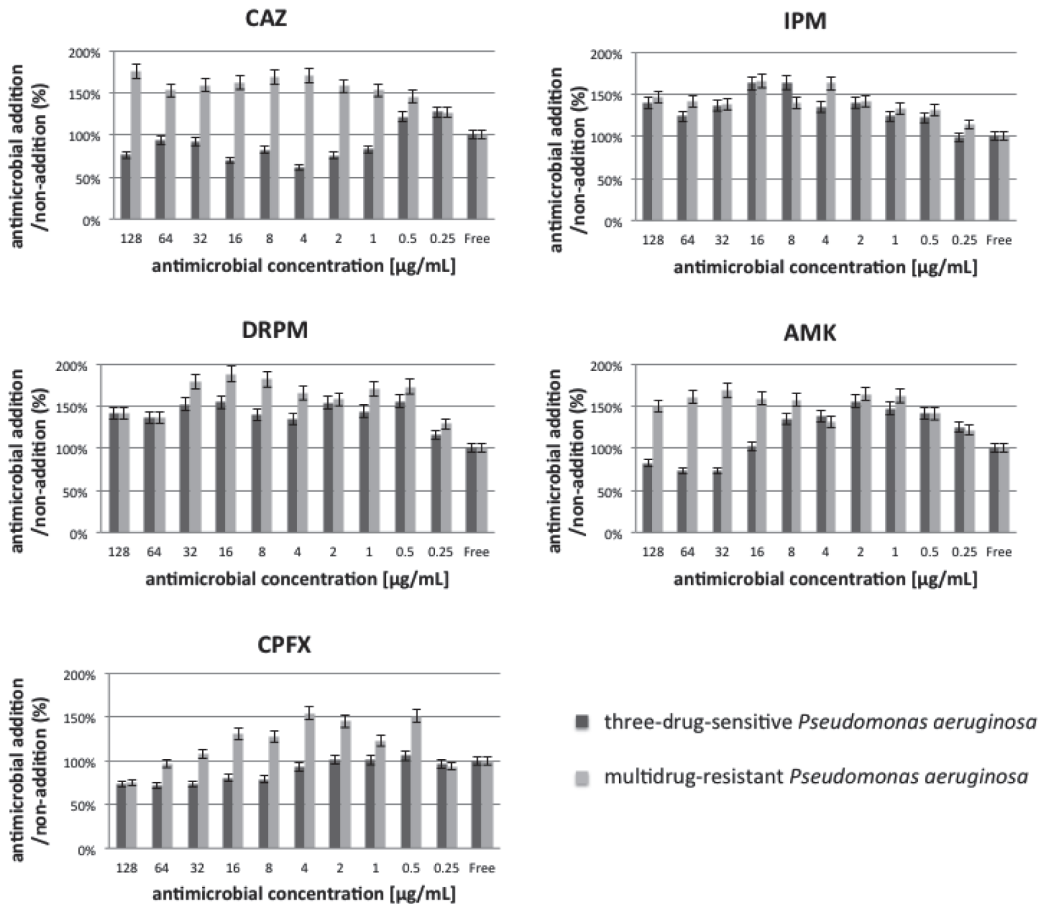


Fig. 1 Effect of biofilm on antimicrobial agents  
Comparison of biofilms formed by three-drug-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* and untreated multidrug-resistant *P. aeruginosa*

た。多くの抗菌薬でバイオフィーム形成は有意に増加したが ( $p<0.01$ )、3剤感性緑膿菌の形成するバイオフィームにおいてCAZ及びCPFXは低濃度であってもバイオフィーム形成有意に低下させた ( $p<0.01$ )。

#### Ⅳ. 考察

慢性閉塞性肺疾患および嚢胞性線維症患者では、緑膿菌によるバイオフィーム感染症が起こると抗菌薬治療が困難となり、呼吸不全から死に至ることが多い<sup>10)</sup>。さらにバイオフィームは院内感染症の65%に関連していると言われており、バイオフィームを形成すると抗菌薬耐性が非形成時よりも10-1000倍にまで上昇することで難治化の原因になると報告されている<sup>9)</sup>。今回の検討においてもTable 1、Table 2に示すように、多くの抗菌薬でバイオフィーム非形成時よりも形成時で抗菌薬耐性が上昇していたため既存の報告と一致している。しかし、3剤感性緑膿菌が形成するバイオフィームではCPFXが他の抗菌薬の濃度よりも低値であり、バイオフィームに浸透していることが認められた。SuciらはCPFXのバイオフィーム表面の濃度はバイオフィーム形成前よりバイオフィーム形成後の方が低下しており、CPFXがバイオフィームに浸透していることを報告した<sup>15)</sup>。そのため、CPFXが他の抗菌薬よりバイオフィームに対して有用であることが考えられる。他の抗菌薬のMBIC<sub>90</sub>とMBEC<sub>90</sub>は、3剤耐性菌と感性菌とではほとんど差がなかった。バイオフィームの抗菌薬耐性メカニズムの一つとして、菌体外毒素により抗菌薬の浸透が物理的に妨げられたり、浸透が遅れることが知られている<sup>16), 17)</sup>。これにより、3剤感性緑膿菌ではバイオフィーム内部にTable 1で示した抗菌薬濃度より非常に低い濃度で、バイオフィーム内生菌が抗菌薬に暴露されている可能性が考えられる。したがって、バイオフィームを形成したままバイオフィーム内生菌が長期間抗菌薬に暴露されると耐性を獲得し得ることが示唆される。その結果、バイオフィーム内で3剤感性緑膿菌が耐性を獲得し、抗菌薬治療の難治化を促進していることが考えられる。

MDRPは様々な抗菌薬に対して耐性を示す菌であるが、2015年に日本ではこれらの多剤耐性菌に対する治療薬としてコリスチン (CL) 投与を承認した<sup>18)</sup>。Table 2で示したようにMDRPがバイオフィームを形成すると抗菌薬を1024  $\mu\text{g/mL}$ を暴露してもバイオフィーム内生菌は撲滅されない。したがって、今回使用していないCLに対しても同等の結果を示し、治療の最終手段としてのCL投与も無効になる可能性が考えられる。多剤耐性緑膿菌は耐性遺伝子を獲得するだけでなくバイオフィームを形成することで抗菌薬治療から逃れていることが推測され、今後、現行の抗菌薬では治療が困難を極める可能性がある。

バイオフィームはQuorum-sensing機構 (QS機構) とcyclic diguanylate (C-di-GMP) によって制御されている。QS機構は細菌の増殖が進み、菌密度が高まるとホモセリンラクトンと呼ばれるAutoinducer濃度も高まり一定の閾値に達するとバイオフィームなどの各種病原因子の発現を促進すると言われていた<sup>19)</sup>。また、C-di-GMPはC-di-GMP合成酵素とホスホジエステラーゼ含有タンパク質により濃度を制御され、そのC-di-GMP濃度によりバイオフィームを調整するとされている<sup>20), 21)</sup>。Fig. 1に示したように3剤感性緑膿菌、多剤耐性緑膿菌では多くの抗菌薬でバイオフィームの増強作用が認められた。抗菌薬がQS機構のAutoinducer及びC-di-GMPの濃度を高める誘発因子となったために増強したと推定される。しかし、CPFX、CAZは3剤感性緑膿菌においてバイオフィームを抑制した。CPFXはバイオフィームを透過しバイオフィーム内の緑膿菌の発育を阻止することで、バイオフィーム内の菌密度が低下し、Autoinducer濃度 (ホモセリンラクトン) も低下することでバイオフィームの発現が抑制されたと考えられる。CAZはTable 1で示したようにバイオフィーム透過性は認められないので、C-di-GMPを制御する酵素になんらかの作用を及ぼしバイオフィームを抑制したものと推測できる。本報ではCPFXとCAZのバイオフィーム減少作用は異なると考えられるため、今後2つの抗菌薬を用いた時のQS機構、C-di-GMPの変化について検討する必要があると考える。

## V. 結論

本報においてバイオフィーム形成前より、バイオフィーム形成後におよそ10-2000倍耐性上昇が認められたので、臨床において抗菌薬の早期使用が必要である。また、3剤感性緑膿菌はバイオフィームを形成すると、多剤耐性緑膿菌と同様に抗菌薬に対して高い耐性を示すことから、3剤感性であっても抗菌薬治療が困難になることが示唆される。

### 文献

- 1) Sibel D and Elif K: Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, 62: 32-37, 2014.
- 2) 薬剤耐性緑膿菌. 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-42-01.html> (2016年10月30日)
- 3) Satoh R, Tsukada H, Tanabe Y, Tamura Y, Yamamoto T, Takano M, Ozaki K, Tamura T and Gejyo F: An outbreak and isolation of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Niigata University Hospital, Japan. *J Infect Chemother*, 14: 325-329, 2008.
- 4) Zhao T and Liu Y: N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol*, 10: 1471-2180, 2010.
- 5) Rodney MD: Biofilm Formation: A clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*, 33: 1387-1392, 2001.
- 6) Michael JS: Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, psl or alginate?. *J Bacteriol*, 8: 1623-1626, 2013.
- 7) Amy LS and Kim L: Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*, 23: 6746-6751, 2001.
- 8) Jyotsna C, Duncan MK, Pranab KM, Lois LH, McCormick T and Mahmoud AG: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J Bacteriol*, 18: 5385-5394, 2001.
- 9) Thien-Fah CM and O' toole GA: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9: 34-39, 2001.
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-Edition, M07-A10, Wayne, PA, 2015
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Fifth Informational Supplement, M100-S25, Wayne, PA, 2015
- 12) Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D and Buret A: The calgary biofilm device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol*, 37: 1771-1776, 1999.
- 13) Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, Du X, Liu X, Qiu S and Song H: Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*, 7: 1-10, 2016.
- 14) George A. O' Toole GA and Roberto K: Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 28: 449-461, 1998.
- 15) Suci PA, Mittelman MW, Yu FP and Geesey GG: Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 9: 2125-2133, 1994.
- 16) Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322, 1999.
- 17) Donlan RD: Role of biofilms in antimicrobial resistance. *Asaio J*, 46: S47-S52, 2000.
- 18) Aloush V, Shiri NV, Yardena SI, Shaltiel C, and Yehuda C: Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 43-48, 2006.
- 19) コリスチンの適正使用に関する指針 改訂委員会: コリスチンの適正使用に関する指針—改訂版—. *日化療会誌*, 63: 289-329, 2015.
- 20) 館田一博: 緑膿菌感染症とQuorum-Sensing機構. *日内会誌*, 94: 151-156, 2005.
- 21) Song LC, Krishnakumar S, Morten R, Mingjun Y, Jens BA, Thomas EN, Michael G, Tim TN, Bin C, Staffan K and Liang Y: C-di-GMP regulates *Pseudomonas aeruginosa* stress response to tellurite during both planktonic and biofilm modes of growth. *Sci Reports*, 5: 1-13, 2015.