

〈原著〉

緑膿菌の各種病原因子に対する大黃牡丹皮湯の影響

栗田 友輔¹⁾、眞野 容子²⁾、古谷 信彦¹⁾

Influence of daiobotanpito on the pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*

Yusuke Kurita¹⁾, Yoko Mano²⁾ and Nobuhiko Furuya^{1),2)}

Summary Chinese herbal medicines have replaced allopathic medicines, as they are considered to be effective and have fewer side effects. The antimicrobial and bactericidal effects of daiobotanpito have already been reported previously. In this study, we investigated the influence of daiobotanpito on the pathogenic factors of *P. aeruginosa* PAO1 and measured its swarming motility, biofilm formation, and protease production after daiobotanpito treatment. Daiobotanpito treatment suppressed the swarming motility of *P. aeruginosa*, which is its pathogenic factor, by about 27%. Biofilm formation was also suppressed by about 24% at 100 mg/mL concentration of daiobotanpito. Finally, protease production was inhibited by 29% between 6.25–12.5 mg/mL and by 52% at 25 mg/mL concentration of daiobotanpito. These results reveal the potential of daiobotanpito against *P. aeruginosa*-associated pathogenesis.

Key words: Daiobotanpito, *P. aeruginosa*, Motility, Biofilm

I. 緒言

現在、薬剤耐性菌の感染により世界で年間約70万人が死亡していると推定されている。現在の治療よりもさらに効果的な対策を講じなければ、年間死者数は2050年には1000万人まで増えると2017年2月にWHO（世界保健機関）が発表した。この薬剤耐性菌の出現により、病原因子

の産生抑制剤は、新たな治療薬の選択肢として率先して開発していくべきである。

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は好気性のグラム陰性桿菌であり、日和見感染を起こす菌として知られている。また、緑膿菌は多数の病原因子を産生し、宿主の防御機構とそれらが相互に作用し病原性を発揮すると考えられている¹⁾。緑膿菌感染症は、多数の抗菌薬に自然耐

¹⁾ 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科
〒113-8668 東京都文京区向丘1-19-1
電話：049-261-7409、E-mail：nfuruya@bgu.ac.jp

²⁾ 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床学科
〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

¹⁾ Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University 19-1, Mukogaoka 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8668, Japan

²⁾ Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University 4-1, Mukogaoka 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

受付日：2017年11月30日

採択日：2018年2月13日

性を示すことからもともと治療が困難であったが、さらに抗菌薬の不適切な使用により、多剤耐性緑膿菌 (Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP) が出現し問題となっている^{2), 3), 4)}。

現在、MDRP感染症は5類感染症に指定されており、院内感染など社会的に問題視されている。MDRPとは感染症法において、imipenem (IPM) のMICが16 µg/mL以上、amikacin (AMK) のMICが32 µg/mL以上、ciprofloxacin (CPFX) のMICが4 µg/mL以上の緑膿菌と定義づけられている^{5), 6)}。また、近年の抗生物質発見および新薬開発の遅れが、既知の抗生物質の耐性化をさらに後押ししている⁷⁾。MDRPに対して有効な新規抗菌薬の開発が望まれるところであるが、一方で、抗菌活性はみられないが、その病原因子を著しく減弱させる薬剤をスクリーニングしていくことは、緑膿菌感染症の治療戦略上極めて重要な課題であると考ええる。

近年、アロマセラピーに使用される植物抽出物にも抗菌活性を有するものがあり、外用薬としての有効性がしばしば報告されている⁸⁾。しかし、外用では多剤耐性菌の肺炎、敗血症、尿路感染症など深部感染症に対する効果はほとんどないものと想定される。一方で、既知の報告では、大黄牡丹皮湯には抗菌、殺菌効果がみられることがすでに報告されている⁹⁾。さらに、大黄牡丹皮湯は、臨床で急性虫垂炎や便秘症の治療にも使用されている¹⁰⁾。大黄牡丹皮湯には、大黄、牡丹皮、桃仁、冬瓜子、芒硝の5つの生薬が含まれている。生薬とは、植物、動物、動物そのもの、またそれらの分泌物などを乾燥させて得られる薬効を有する天然物質である。さらに、生薬を複数組み合わせることで薬効を高めたものが漢方薬である。漢方薬は何千年も前から使われており、比較的副作用が少なく、多くの医療現場で用いられている。また、様々な細菌感染症に使用され、殺菌的もしくは静菌的効果を示すとされている¹¹⁾。生薬や、漢方薬は経口薬として内服投与されることから、多剤耐性菌の肺炎、敗血症、尿路感染症に対しても効果を示す可能性が考えられるが、現在までにその効果についてスクリーニングした研究はほとんどないのが現状である。今回我々は、緑膿菌の各種病原因子に対する大黄牡丹皮湯の

影響を多角的に検討することを目的とした。

II. 材料と方法

1. 使用生薬及び使用薬剤

漢方薬は、大黄牡丹皮湯 (ツムラ株式会社、東京) を使用した。

2. 使用菌株

菌株は、創傷部由来の緑膿菌 PAO1 (American Type Culture Collection、米国) を用いた。

3. 大黄牡丹皮湯の溶液の作製方法

Dimethyl sulfoxide (DMSO、和光純薬株式会社、大阪) を各測定培地で1%になるように希釈した。1% DMSO 1mL中に大黄牡丹皮湯100 mgを37°Cで一晩浸漬し、その後遠心分離を行い残渣を取り除いた後、メンブランフィルター (0.2 µm、ADVANTEC、アメリカ) でろ過滅菌した上清を大黄牡丹皮湯の溶液とした。

4. スウォーミングモテリリティの測定

スウォーミングモテリリティの測定をするために、0.5% glucose含有nutrient培地 (日本BD、東京) を添加し、寒天濃度0.5%の培地を作製した。この培地9 mLに対して1 mLの大黄牡丹皮湯の溶液を加えて大黄牡丹皮湯含有のスウォーミング培地を作成した。コントロールには、大黄牡丹皮湯未添加の1% DMSOを1 mL加えた。培地中央に滅菌生理食塩水を用いて10⁷ CFU/mLに調整した菌液を10 µL滴下し、35°C、24時間培養を行った。培地上に形成された環状の混濁部分の直径を測定した^{11), 12)}。

5. バイオフィーム形成の測定

McFarland 0.5に調整した菌液を大黄牡丹皮湯添加のmuller-hinton broth (MHB、日本BD) に接種し、10⁷ CFU/mLの菌液を作製した。コントロールには、大黄牡丹皮湯未添加の1% DMSOを使用した。96穴プレートに10⁷ CFU/mLの菌液を180 µLずつ接種し、35°Cで24時間培養した。培養後、96穴プレート中の各菌液に1% クリスタルバイオレット (東京化成工業、東京) を20 µLずつ加え、室温で10分間染色した。ピペットでwell内の溶液を除去した後、pH 7.2に調整したphosphate buffered saline (PBS) を200 µL分注し、well内の洗浄を3回行った。各wellを十分に乾燥させた後、95%エタノールを200 µL加え、15分間静置した。抽出された色素は

波長570 nmの吸光度にて測定した^{11),13)}。

6. プロテアーゼの測定

プロテアーゼ産生の阻害効果を検討するために、スキムミルク培地（和光純薬株式会社）を用いて測定を行った。大黃牡丹皮湯添加のLB broth（日本BD）で緑膿菌 PAO1を18時間培養した。コントロールには、大黃牡丹皮湯未添加の1% DMSOを使用した。これら培養液をメンブランフィルターでろ過滅菌し、スキムミルク培地に10 μ L接種した。この培地を37 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、培地上のクリアランスゾーンを測定した^{11),14)}。

7. 統計分析

今回行った検討において、大黃牡丹皮湯と大黃牡丹皮湯未添加との間の有意差を決定するために、t検定を行った。

Ⅲ. 結果

1. PAO1のスウォーミングモティリティに対して大黃牡丹皮湯が与える影響

PAO1のスウォーミングモティリティの測定結果をFig. 1に示した。PAO1のスウォーミングモティリティの測定は、培地の混濁部分を測定した。結果は10 mg/mLの大黃牡丹皮湯を含む培地の方が大黃牡丹皮湯未添加の培地と比較して、約27%の抑制認められた。尚、予備検討で10 mg/mL未満の濃度では有意差が出なかったため、今回は10 mg/mLの結果を報告する。

2. PAO1のバイオフィーム形成に対して大黃牡丹皮湯が与える影響

PAO1のバイオフィーム形成の測定結果をFig. 2に示した。今回我々の研究では、クリスタル紫法を採用して行った。100 mg/mLの大黃牡丹皮湯の添加により、約24%のバイオフィーム形成の抑制を認められた。尚、予備検討で100 mg/mL未満の濃度では有意差が出なかったため、今回は100 mg/mLの結果を報告する。

3. PAO1が産生するプロテアーゼに対する大黃牡丹皮湯が与える影響

PAO1のプロテアーゼ産生の測定結果をFig. 3に示した。プロテアーゼの測定は、スキムミルク培地を用いて、半定量的に行った。その結果、濃度依存性にクリアランスゾーンが認められ、6.25-12.5 mg/mLでは29%、25 mg/mLでは52%の

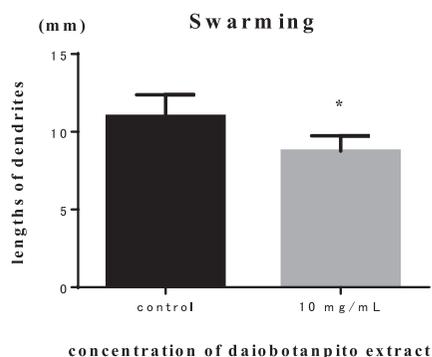


Fig. 1 Comparison of swarming motility between control and daibotanpito extract (10 mg/mL). Error bars indicate the standard deviations for four measurements. *: P = 0.0396 compared with the control.

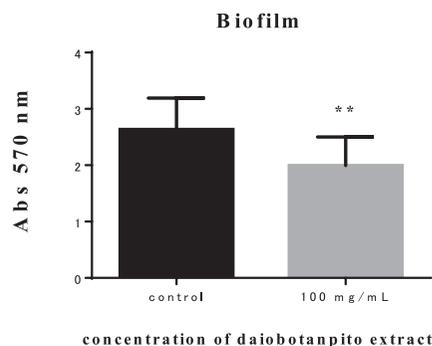


Fig. 2 Comparison of biofilm formation between control and daibotanpito extract (100 mg/mL). Error bars indicate the standard deviations for fourteen measurement. **: P = 0.0037. compared with the control.

抑制を認められた。また、50-100 mg/mLの高濃度では、クリアランスゾーンを認めなかった。尚、予備検討で、今回使用した濃度では、緑膿菌の発育に影響を与えないことを確認している。

Ⅳ. 考察

緑膿菌は免疫力の低下した患者に、日和見感染症を引き起こす院内感染の代表的な細菌であり、多くの抗菌薬に対し耐性を示す。その中で、カルバペネム系抗菌薬は緑膿菌感染症の有効な薬剤の一つである¹⁵⁾。薬剤耐性菌による「抗菌

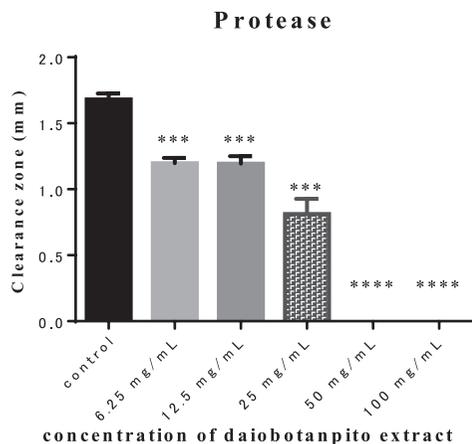


Fig. 3 Comparison of production of protease between control and daibotanpito extract(6.25-100 mg/mL). Error bars indicate the standard deviations for three measurements. ****: $P < 0.0001$. ***: $P < 0.001$. compared with the control.

薬耐性の危機」は、近年の抗生物質発見および新薬の開発プログラムの遅れによって悪化し、現在の医療行為における抗生物質の役割を危険にさらしている⁷⁾。

緑膿菌が宿主の免疫機構を回避する方法としてバイオフィルムの産生がある。バイオフィルムの主成分は、アルギン酸と呼ばれる、粘液性の高い細胞外多糖体 (EPS: extracellular polymeric substances) である。バイオフィルム形成能が高い緑膿菌は、バイオフィルム内の細菌に対して抗菌薬や、消毒薬が浸透しにくく、白血球の貪食なども受けにくいいため、抗菌薬や宿主免疫に対する抵抗性上がり、大きな医療問題となっている^{16), 17)}。また、バイオフィルム形成には、鞭毛や線毛を用いて行うモティリティが関与している。モティリティとは、細菌が行う運動性のことであり、緑膿菌が行う運動性には、鞭毛を用いて液体中を泳ぐスイミングモティリティと、半固体表面を移動するスウォーミングモティリティ、そしてIV線毛を用いて固体表面を移動するトゥイッチングモティリティがある。その中で、スウォーミングモティリティは、ヒト体内での感染拡大や環境中での微生物汚染の拡大に繋がり、バイオフィルムの離脱と密接に関与している^{18), 19)}。緑膿菌の外毒素で

ある数種類のプロテアーゼは、上皮を直接破壊することや、免疫グロブリンやフィブリンを分解することで、眼感染症や敗血症を発症させる²⁰⁾。更に、プロテアーゼは宿主の肺サーファクタントの分解を含めて、呼吸器感染巣に障害を与えていることも報告されている²¹⁾。

今回我々の研究では、大黃牡丹皮湯の添加によりバイオフィルム形成の減少を認め、更にスウォーミングモティリティ、プロテアーゼ産生の抑制も認めた。これは、Chu Wらの漢方薬を用いた報告と一致した⁴⁾。しかし、多くの文献より、バイオフィルム形成とモティリティの関連性の意見は割れており、未だに関連性の結論は出ていない。2009年Rampioni Gらの緑膿菌 PAO1を用いた研究では、スウォーミングモティリティが抑制された株では、バイオフィルムの形成が顕著に増強されたと報告している²²⁾。その一方で、2015年Kalia MらのCinamon Oilを用いた報告では、スウォーミングモティリティが抑制された株では、バイオフィルム形成も抑制されると報告している¹¹⁾。我々の研究は、後者のKalia Mらの報告を支持する結果となった。しかし、これらの報告より、緑膿菌が産生する病原因子の発現機構は、共通するものもあるが、完全に一致するとは言いきれない。

本研究の結果より大黃牡丹皮湯は、緑膿菌が産生する病原因子を抑制させる、病原因子の抑制剤として応用ができる可能性が示唆された。

V. 結語

今回我々は、緑膿菌が産生する病原因子産生に対して大黃牡丹皮湯が与える影響について検討した。大黃牡丹皮湯の添加で*P. aeruginosa*の病原因子であるスウォーミングモティリティ、バイオフィルム形成、プロテアーゼ産生の減少を認めた。したがって、大黃牡丹皮湯は緑膿菌感染症の治療薬としての可能性があると考えられる。

謝辞

本論文の投稿に際して、漢方薬をご提供下さいましたツムラ株式会社に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 奥田研爾, 福島淳: 緑膿菌病原因子の分子生物学最近の進歩. 日細菌誌, 49: 3-4, 1994.
- 2) Poole K: *Pseudomonas aeruginosa* resistance to the max. Front Microbiol, 2: 2011.
- 3) Morita Y, Tomida J and Kawamura Y: Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. Front Microbiol, 4: 422, 2014.
- 4) Chu W, Zhou S, Jiang Y, Zhu W, Zhuang X and Fu J: Effect of Traditional Chinese Herbal Medicine with Antiquorum Sensing Activity on *Pseudomonas aeruginosa*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 7, 2013.
- 5) 厚生労働省 院内感染対策サーベイランス 薬剤耐性菌 判定基準 (Ver.3.1) . (2015).
- 6) 長沢光章: 多剤耐性緑膿菌(MDRP)をめぐって - 疫学・検査・臨床 - 多剤耐性緑膿菌の疫学情報. 臨と微生物, 34: 113-118, 2007.
- 7) Rossolini GM, Arena F, Pecile P and Pollini S: Update on the antibiotic resistance crisis. Curr Opin Pharmacol, 18: 56-60, 2014.
- 8) 今西二郎: 香りと医療-メディカル・アロマセラピー. におい・かおり環境学会誌, 39: 221-230, 2008.
- 9) 元村洋一, 荒木久生, 申基詔, 宮田隆: 歯周疾患関連細菌 に対する生薬 の抗菌効果. 日歯周病会誌, 39: 72-76, 1997.
- 10) 中永士師明: 急性虫垂炎に対して漢方治療を併用した1例. 日職災医誌, 59: 45-48, 2011.
- 11) Kalia M, Yadav VK, Singh PK, Sharma D, Pandey H, Narvi SS and Agarwal V: Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One, 10: 8, 2015.
- 12) Rashid MH and Kornberg A: Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 4885-4890, 2000.
- 13) Nathan E Head and Hongwei Yu: Cross-Sectional Analysis of Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm Formation, Virulence, and Genome Diversity. Infect Immun, 72: 133-144, 2004.
- 14) Vijayaraghavan P and Vincent SGP: A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. J Biochem Tech, 4: 628-630, 2013.
- 15) 宮崎博章, 入江利行, 素元美佐: カルバペネム薬の使用制限下によるイミベネム耐性緑膿菌と多剤耐性緑膿菌の検出率の推移. 日環境感染会誌. 21: 162-167, 2006.
- 16) 森川正章: バイオフィルムを調べてみよう. 生物工会誌, 90: 246-250, 2012.
- 17) 嶋田高広, 松村到: 緑膿菌の免疫回避機構. 日臨免疫会誌, 37: 33-41, 2014.
- 18) 大浦啓, 田代陽介, 豊福雅典, 中島敏明, 内山裕夫, 野村暢彦: ナフトレン誘導体による運動性抑制を介した緑膿菌バイオフィルムの制御. 環境バイオテクノロジー学会誌. 11: 61-67, 2011.
- 19) Williams BJ, Dehnbostel J and Blackwell TS: *Pseudomonas aeruginosa* host defence in lung diseases. Respirology, 15: 1037-1056, 2010.
- 20) Kipnis E, Sawa T and Wiener-Kronish J: Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect, 36: 78-91, 2006.
- 21) Fleiszig SM and Evans DJ: The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Exp Optom, 85: 271-278, 2002.
- 22) Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Zennaro E and Leoni L: Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. FEMS Microbiol Lett, 301: 210-217, 2009.