

〈原著〉

緑膿菌のswarming motilityとbiofilm形成能を抑制する漢方薬の探索

水内 裕友¹⁾、眞野 容子¹⁾、古谷 信彦¹⁾

The search for herbal medicines that inhibit the swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*

Yuuyu Mizuuchi¹⁾, Yoko Mano¹⁾ and Nobuhiko Furuya¹⁾

Summary *Pseudomonas aeruginosa* causes opportunistic infections in immunocompromised hosts but is less fatal in healthy people. Previous studies have reported the suppression of pathogenic factors of *P. aeruginosa* PAO1 by Daiobotanpito and Coptidis rhizoma treatments, but few studies have examined the herbal effects on *P. aeruginosa* pathogenesis. Here, we investigated the effects of 13 herbal medicines on *P. aeruginosa* pathogenesis and measured swarming motility and biofilm formation after herbal medicine treatment. Motility was measured using the agar plate method, while biofilm formation was measured using the tissue culture plate method. Kakkonto addition decreased swarming motility by 62% in PAO1 compared with the control. Syofusan addition decreased biofilm formation in PAO1 and MDRP by 21% and 18%, respectively. Additionally, Sanoshashinto addition decreased biofilm formation in PAO1 and MDRP by 15% and 12%, respectively, compared to the control. These results reveal the potential of herbal medicines against *P. aeruginosa* associated pathogenesis.

Key words: Herbal medicine, *Pseudomonas aeruginosa*, motility, biofilm

I. 緒言

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は好気性のグラム陰性桿菌で水回りなどの日常生活環境中に広く常在している。通常では毒性が低く健

常者に症状が出ることはほとんどない。しかし、易感染者にしばしば肺炎や敗血症などの日和見感染症を引き起こし、時には重篤化することがある。そのため院内感染として問題視される代表的な菌種である¹⁾。緑膿菌は菌体の一端に極

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2-4-1

連絡先：水内 裕友
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2-4-1
Tel: +81-3-3811-0441
E-mail: yuuyu.mizuuchi@gmail.com

¹⁾ Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University, 4-1, Mukogaoka 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8668, Japan

受付日：2020年7月7日
採択日：2020年10月14日

鞭毛を持ち、この鞭毛運動は栄養状態の好ましい環境への移動や物質表面や生体組織表面への付着およびbiofilm形成を通じて病原性に寄与する。さらに、マウス感染モデルにて鞭毛を欠損した緑膿菌は鞭毛を有する緑膿菌に比べ侵襲性が低いことが報告されている¹⁾。また、biofilmを形成し、好中球などの貪食から逃れることや抗菌薬耐性遺伝子をコードする多剤耐性緑膿菌 (Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* ; MDRP) の出現もみられることから感染症治療の難治化をもたらす²⁾。このbiofilmは、鞭毛や線毛を用いた運動能やアルギン酸などの extracellular polymeric substances (EPS) の産生により形成される³⁾。

近年、漢方薬は顆粒や細粒などのエキス製剤の出現で従来の煎じ薬の煎じる手間が省けることによる簡便さから現代人の生活に取り入れられ、広く利用されるようになってきた。漢方薬とは生薬を複数組み合わせ合わせて薬効を高めたものであり、生薬とは、動物や鉱物、植物の根や葉、果実などを乾燥させたものである。一般的に、細菌感染症には抗生物質、ウイルス疾患には抗ウイルス薬による治療が行われる。しかし、免疫力の低下した高齢者や慢性疾患患者などの易感染者への治療は抗生物質による胃腸障害などの副作用をおこす危険性がある。漢方薬は副作用が少なく、易感染者への感染症の重症化を防止する目的としての使用に適していると考えられる。また、一部の漢方薬は、宿主の生体防御機能の向上による感染防御作用も期待できる⁴⁾。このような理由から、漢方薬を感染症治療薬として用いることは感染症治療の一助となる可能性があることから、緑膿菌の病原因子に対する効果をスクリーニングしていくことは重要である。

既報にて、漢方薬である麻黄湯の抗インフルエンザウイルス作用⁵⁾ や生薬である山梔子、大黄による緑膿菌のクオラムセンシング機構の抑制効果⁶⁾、大黄牡丹皮湯⁷⁾ による緑膿菌の病原因子の抑制に関する報告があるが、緑膿菌の病原因子に対する漢方薬の影響についての報告は少ない。そこで、本研究では緑膿菌の鞭毛運動であるswarming motility、その関与するbiofilm形成能の抑制する漢方薬の探索を行うことを目的とした。

II. 方法と材料

1. 使用漢方薬

漢方薬は、葛根湯 (1番)、半夏厚朴湯 (16番)、桂枝加朮附湯 (18番)、防己黄耆湯 (20番)、消風散 (22番)、人參湯 (32番)、苓桂朮甘湯 (39番)、桂枝湯 (45番)、六味丸 (87番)、大建中湯 (100番)、升麻葛根湯 (101番)、三黄瀉心湯 (113番)、麻黄附子細辛湯 (127番) の計13種 (ツムラ株式会社、東京) を使用した。本検討は、緑膿菌の病原因子を抑制する漢方薬の探索を目的としていることから、入手できる限りで様々な生薬を含有しているものを選択した。

2. 使用菌株

菌株は、緑膿菌標準株PAO1 (ATCC BAA-47)、喀痰由来のMDRPを使用した。

3. 漢方薬抽出液の作製方法⁷⁻⁸⁾

1 mLの1% Dimethyl sulfoxide (DMSO、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) 中で各漢方薬を100 mg溶解して、37℃で一晩振蕩させた。その後、抽出液を15,300 rpm、20分の条件で遠心分離し、得られた上清を10 w/v%漢方薬抽出液とした。また、以下の検討については1 w/v%漢方薬抽出液含有条件下になるように調整し、各検討を行った。

4. swarming motility assay⁹⁻¹⁰⁾

MDRPはmotility zone が小さくなること知られており、今回使用したMDRPもmotilityがほとんどなかったことからswarming motilityの検討はPAO1のみで行った。

swarming motilityを測定するために、Nutrient broth (関東化学株式会社、東京) 0.82%、細菌用寒天 (関東化学株式会社、東京) 0.5%の平板培地を作製した。作製した培地を冷ましてからGlucose (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) を濃度0.5%になるようにろ過滅菌して添加した。作製した培地9 mLに対して1 mLの漢方薬抽出液 (10 w/v%) を添加し1 w/v%漢方薬抽出液含有のswarming培地を作製した。コントロール (Ctl) として、漢方薬抽出液未添加の1% DMSO添加培地を作製した。培地中央に滅菌生理食塩水を用いて10⁹ CFU/mLに調整し

た菌液を10 μ L滴下し、35 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。培地上に形成された混濁部分の直径を測定した。

5. biofilm formationの測定⁹⁻¹¹⁾

Lihua Qi らのクリスタルバイオレット染色法を改変して行った。Mueller-Hinton broth (MHB、日本BD、東京)でMcFarland0.5 (1.5×10^8 CFU/mL)に調整した菌液を1 w/v%漢方薬抽出液含有MHBと非含有MHBで 1.5×10^7 CFU/mLに希釈し96穴プレート(ピーエム機器株式会社、東京)に作製した菌液を200 μ Lずつ接種し、37 $^{\circ}$ Cで18時間培養した。培養後に各well内の菌液を除去し1%クリスタルバイオレット(東京化成工業株式会社、東京)を200 μ Lずつ接種し、室温で10分間染色した。その後、pH 7.2に調整したphosphate buffered saline (PBS) 200 μ Lでwell内を5回洗浄した。各wellを十分に乾燥させ、99%エタノールを200 μ L添加し15分間静置する

ことで色素を抽出した。抽出された色素はマイクロプレートリーダー(マイクロプレートリーダー マルチスキャンFC、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)を用いて波長570 nmにおける吸光度を測定した。なお、1つの漢方薬あたりの試験数は10とした。

6. 統計分析

漢方薬抽出液添加群と漢方薬抽出液未添加群の統計学的な差はt検定によって確認した。なお、 $p < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

Ⅲ. 結果

1. 漢方薬がPAO1のswarming motilityに与える影響

PAO1のswarming motilityの測定結果をFig. 1に示した。swarming motilityではCtlと比較して1 w/v%の各漢方薬抽出液添加により、葛根湯(1

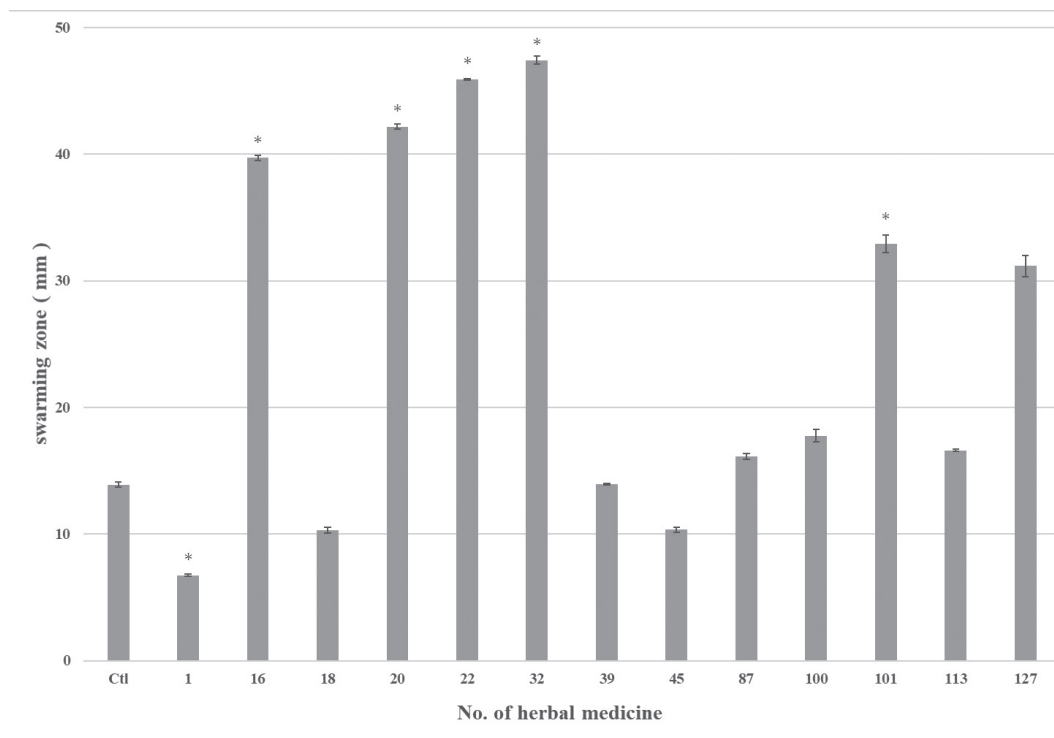


Fig. 1 Effect of herbal medicines (1 w/v%) on the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) on PAO1. *: $p < 0.05$ compared with the control. The bar displays mean \pm SD of three independent experiments.

No. of herbal medicine means 1: Kakkonto, 16: Hangekobokuto, 18: Keishikajutubuto, 20: Boiogito, 22: Shofusan, 32: Ninjinto, 39: Ryokeijuthukanto, 45: Keishito, 87: Rokumigan, 100: Daikenchuto, 101: Syomakakkonto, 113: Sanoshasinto, 127: Maobushisaishinto.

番)にて62%の抑制が認められた。それに対して、半夏厚朴湯(16番)、防己黄耆湯(20番)、消風散(22番)、人參湯(32番)、升麻葛根湯(101番)ではPAO1にて有意な増強作用を認めた。(p < 0.05)

2. 漢方薬がPAO1とMDRPのbiofilm形成能に与える影響

PAO1とMDRPのbiofilm形成能の測定結果をFig. 2に示した。biofilm形成能では、Ctlと比較して1 w/v%の各漢方薬抽出液添加により消風散(22番)ではPAO1にて21%、MDRPにて18%、三黄瀉心湯(113番)ではPAO1にて15%、MDRPにて12%の抑制が認められた。(p < 0.05)

Ⅳ. 考察

緑膿菌の様々な病原性に関与する鞭毛運動を抑制することは緑膿菌の病原性を減弱させる一助となる。また、MDRPに対して有効な新規治

療薬の開発が必要であると同時に、抗菌活性は認められなくとも薬剤への耐性化や病原因子を減弱させる薬剤や成分をスクリーニングしていくことは緑膿菌感染症の治療において重要であると考ええる。

今回我々の研究では、様々な病原性に関与する鞭毛運動であるswarming motilityとそれが関与するbiofilm形成能に焦点を当て漢方薬による抑制効果の検討を行った。鞭毛運動であるswarming motilityはbiofilm形成やbiofilmからの脱離による感染巣の広がりや環境汚染¹²⁾、宿主細胞への侵入性に関与する。今回、葛根湯(1番)ではPAO1のswarming motilityへ有意な抑制を認めたことから、葛根湯(1番)が含有する葛根、大棗、麻黄、桂皮、甘草、芍薬、生姜という生薬がswarming motilityの抑制に関与すると考えられる。しかし、甘草はswarming motilityの増強を示した防己黄耆湯(20番)、消風散(22番)、人參湯(32番)、升麻葛根湯(101番)にも含まれる。桂皮は抑制傾向を示した桂枝湯(45番)

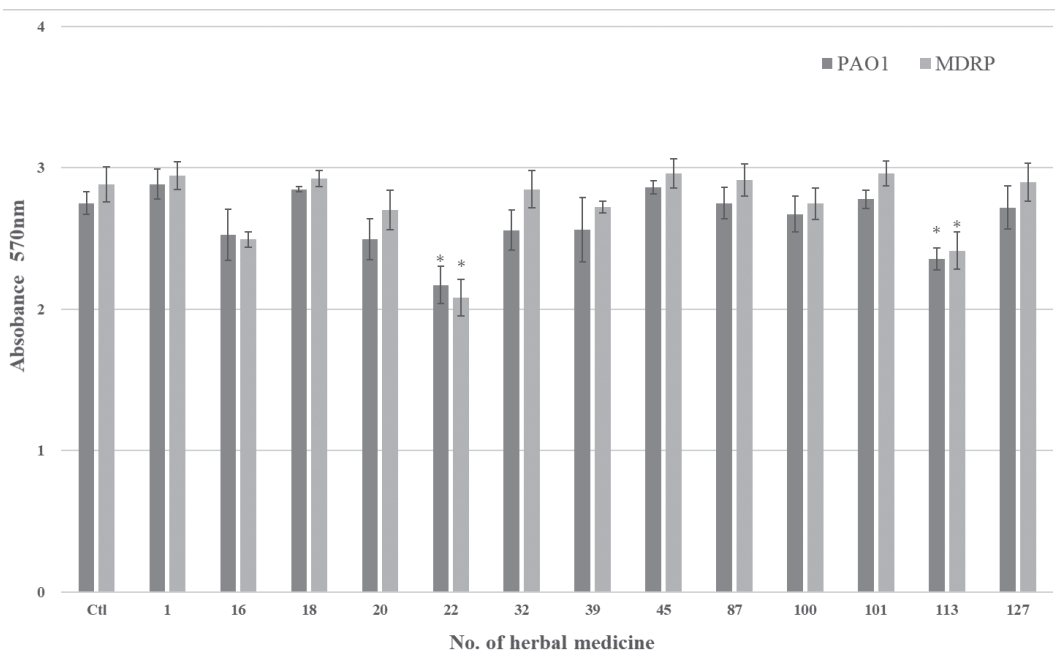


Fig. 2 Effect of herbal medicines (1 w/v%) on biofilm formation of *P. aeruginosa*. *: p < 0.05 compared with the control. The bar displays mean ± SD of three independent experiments.

No. of herbal medicine means 1: Kakkonto, 16: Hangekobokuto, 18: Keishikajutubuto, 20: Boiogito, 22: Shofusan, 32: Ninjinto, 39: Ryokeijuthukanto, 45: Keishito, 87: Rokumigan, 100: Daikenchuto, 101: Syomakakkonto, 113: Sanoshasinto, 127: Maobushisaishinto.

と桂枝加朮附湯（18番）にも含まれ、さらに桂皮はシナモンオイルにも含まれるシンナムアルデヒドを主成分としており、シナモンオイル¹⁰⁾やシンナムアルデヒド¹³⁾による緑膿菌PAO1のswarming motilityの抑制が認められていることから桂皮がswarming motility抑制に関与することが示唆された。しかし、葛根湯（1番）よりも桂皮を多く含む桂枝湯（45番）や桂枝加朮附湯（18番）では抑制効果が葛根湯（1番）よりも小さかったことから、葛根湯（1番）の含有する桂皮以外の生薬の影響や生薬の配合比率や組み合わせによる相乗作用や拮抗作用があると示唆された。今後、生薬や成分についてさらに検討を深めていく必要がある。

また、biofilm形成能の抑制を認めた消風散（22番）は地黄、石膏、当帰、牛蒡子、蒼朮、防風、木通、胡麻、知母、甘草、苦参、荆芥などの複数の生薬を含むことから、これらの生薬が抑制に関与した可能性や生薬の相乗効果による可能性が示唆された。同じくbiofilm形成能の抑制を認めた大黃牡丹皮湯（113番）は黄連、黄芩、大黃を同比率で含む。先行研究にて大黃を含む大黃牡丹皮湯と生薬である黄連にてbiofilm形成能とswarming motilityの抑制が認められている。このことから、大黃や黄連がswarming motilityの抑制に関与すると考えられる。しかし、大黃や黄連を含む三黄瀉心湯でswarming motilityの抑制は認められなかったことから、黄芩によるswarming motilityの増強効果や生薬の組み合わせにより影響が変化する可能性があると考えられる。

本研究では、biofilm形成能の抑制とswarming motilityの抑制効果には相関がみられなかった。消風散（22番）では、swarming motilityは増強作用、biofilm形成能は抑制を認めた。三黄瀉心湯（113番）では、biofilm形成能のみ抑制を認めた。biofilmは物質表面に定着した後にEPS等を産生することにより生成されることから、消風散や三黄瀉心湯は定着後の因子を抑制したものによるのではないかと考える。しかし、今回の検討では鞭毛運動であるswarming motilityに焦点を当て検討を行ったことから、EPS産生能などの検討は行っていない。従って、今後、検討を深めていく必要がある。

さらに、葛根湯（1番）ではswarming motility

の抑制は認められたが、biofilm形成能では抑制が認められなかった。このことから、biofilm形成能はswarming motilityのみの抑制では影響が出にくいことが示唆された。

抑制効果を示した漢方薬に対して、半夏厚朴湯（16番）、防己黄耆湯（20番）、消風散（22番）、人參湯（32番）、升麻葛根湯（101番）ではswarming motilityの増強作用を示した。しかし、これらのswarming motility増強作用を示した漢方薬ではbiofilm形成能の増強は認められなかったことから、biofilm形成にはmotility以外の要素であるEPS産生などの関与が大きいと考えられる。biofilm形成能とmotilityの関係については意見が割れており、結論は出ていない。Rampioniら¹⁵⁾はswarming motilityの抑制された株にてbiofilm形成能の増強を認めたと報告し、Chongら⁶⁾はswarming motilityが抑制された株にてbiofilm形成能の抑制も報告している。我々の研究は前者を支持する結果となった。

今回の我々の研究では様々な病原性に関与する鞭毛運動であるswarming motilityとbiofilm形成能の関係に焦点を当て検討を行ったが、swarming motilityとbiofilm形成能の結果に相関が認められなかったことから今後、biofilm形成に関与する因子についてさらに検討を行う必要があると考える。また、本研究は、緑膿菌鞭毛運動とbiofilm形成能の抑制に関与する漢方薬のスクリーニングを行ったことから、緑膿菌の病原因子を減弱させる漢方薬や成分の探索を行う上での基礎的検討となったと考える。さらに緑膿菌感染症の重症化の要因となる病原因子（protease、pyocyaninなど）に対する漢方薬の影響も検討していく必要があるだろう。

V. 結語

今回我々は、緑膿菌の鞭毛が関与するswarming motilityとbiofilm形成能について13種類の漢方薬の影響を検討した。葛根湯（1番）ではswarming motility、消風散（22番）、三黄瀉心湯（113番）ではbiofilm形成能の有意な抑制を認めた。従って、本検討は緑膿菌のswarming motilityやbiofilm形成能を減弱させる漢方薬や成分の探索を行う上での基礎的検討となった。

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。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文献

- 1) 嶋田高広、松村到：緑膿菌の免疫回避機構.日本臨床免疫学会誌, 37: 33-41, 2014.
- 2) 稲葉知大、清川達則、尾花望、豊福雅典、八幡穰、野村暢彦：集団微生物学のすすめ.化学と生物, 52(9): 594-601, 2014.
- 3) George A. O' Toole and Roberto Kolter: Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2): 295-304, 1998.
- 4) 山田陽城：漢方薬の作用機序の解明と臨床応用の現状. *Organ Biology*, 25(1): 56-71, 2018.
- 5) Shinta Masui, Shigeki Nabeshima, Kazuhiko Ajsaka, Kei Yamauchi, Ryota Itoh, Kazunari Ishii, Toshinori Soejima, Kenji Hiromatsu: Maoto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, Inhibits Uncoating of *Influenza Virus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017: doi:10.1155/2017/1062065, 2017.
- 6) Yee Meng Chong, Kah Yan How, Wai Fong Yin, Kok Gan Chan: The Effects of Chinese Herbal Medicines on the Quorum Sensing Regulated Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecules*, 23(972): doi:10.3390/molecules23040972, 2018.
- 7) 栗田友輔、眞野容子、古谷信彦：緑膿菌の各種病原因子に対する大黃牡丹皮湯の影響. *生物試料分析*, 41(3): 142-146, 2018.
- 8) 栗田友輔、眞野容子、古谷信彦：緑膿菌に対するオウレンの抗菌活性及び病原因子の産生に与える影響. *生薬学雑誌*, 72(2): 65-70, 2018.
- 9) Manmohit Kalia, Vivek Kumar Yadav, Pradeep Kumar Singh, Deepmala Sharma, Himanshu Pandey, Shahid Suhail Narvi, Vishnu Agarwal: Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 10(8): doi:10.1371/journal.pone.0135495, 2015.
- 10) M. Harunur Rashid, Arthur Kornberg: Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(9): 4885-4890, 2000.
- 11) Lihua Qi, Chuanfu Zhang, Beibei Liang, Jie Li, Ligui Wang, Xinying Du, Xuelin Liu, Shaofu Qiu, Hongbin Song: Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 7: doi:10.3389/fmicb.2016.00483, 2016.
- 12) 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.
- 13) Syed A. K. S. Ahmed, Michelle Rudden, Thomas J. Smyth, James S. G. Dooley, Roger Marchant, Ibrahim M. Banat: Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8): 3521-3535, 2019.
- 14) Charlène Leneveu-Jenvrin, Amar Madi, Emeline Bouffartigues, Kelly Biaggini, Marc Feuilloley, Sylvie Chevalier, Nathalie Connil: Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients. *BMC Microbiology*, 13(123): doi:10.1186/1471-2180-13-123, 2013.
- 15) 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.