

## *In vitro* における緑膿菌のバイオフィルムの性状について

藤巻 一雄・池田 靖・高畑 正裕・保田 隆

富山化学工業株式会社総合研究所\*

(平成3年12月16日受付・平成4年3月18日受理)

医療用テフロンシートを用いて、*in vitro* で緑膿菌によるバイオフィルムを作製した。電顕により、菌の産生した glycocalyx と菌体でバイオフィルムが形成されているのが確認できた。キノロン系薬剤の tosylloxacin (TFLX) および ciprofloxacin (CPFX) は、1 MIC 濃度では浮遊菌 (floating cell) に対して優れた殺菌力を示し、バイオフィルム形成菌 (sessile cell) に対しては菌数を 1/10 以下に減少させた。しかしながら、ceftazidime (CAZ) は sessile cell および floating cell に対し、1 MIC 濃度でもまったく殺菌作用を示さなかった。次に、TFLX および CPFX の 1 MIC 濃度と erythromycin (EM) 1/4 MIC 濃度の併用による生菌数の経時変化、あるいは TFLX 1 MIC 濃度と EM および clarithromycin 1  $\mu$ g/ml の併用による経日変化において、sessile cell に対し著しい併用効果が認められたが、CAZ と EM を併用しても協力作用は認められなかった。また sessile cell に対して、lysozyme, hyaluronidase, protease および streptokinase の多糖類あるいは蛋白分解酵素と TFLX を併用しても効果は認められなかった。

**Key words:** 緑膿菌, バイオフィルム, キノロン系薬剤, マクロライド系薬剤

細菌はその生育条件の悪い環境においては、しばしばバイオフィルムを形成し、外部環境から身を守ることが知られている。このバイオフィルムの形成は自然界における生活環境への適応の一つと考えられるが、これは生体内、すなわち感染状態においても認めることができる。血漿や各種蛋白などの生体成分と細菌分泌物とあいまって形成されたバイオフィルムという特殊な環境は、感染時においては白血球の貪食作用あるいは各種抗菌剤の殺菌作用への抵抗性をもたらし、感染症を難治化させる要因の一つとなっていると考えられる<sup>1-3)</sup>。また、いったん形成された強固なバイオフィルムに対しては、たとえば泌尿器科領域におけるカテーテルの物理的除去あるいは外科的処置が施されるが、効果的な化学療法が期待されているのも事実である。

今回我々は、この生体内バイオフィルムに対する化学療法の可能性を模索するため、*in vitro* において形成された緑膿菌性バイオフィルムを用いて基礎的検討を試みた。

### 1. 実験材料および方法

#### 1. 菌株

臨床分離の呼吸器由来株である *Pseudomonas aeruginosa* S-827 株を用いた。

#### 2. 薬剤および試薬

Tosylloxacin および erythromycin (TFLX および

EM, 富山化学工業), ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ) および clarithromycin (CAM, 大正製薬) を使用した。多糖類あるいはタンパク分解酵素として lysozyme, hyaluronidase (type I-S), protease (type IV) および streptokinase (いずれも Sigma) を使用した。

#### 3. MIC 測定

最小発育阻止濃度は、日本化学療法学会標準法<sup>4)</sup>に従い寒天平板希釈法および液体希釈法にて測定した。すなわち、液体希釈法は試験菌を Mueller Hinton broth (MHB, Difco) で一夜培養し、同培地で  $10^4$  CFU/ml となるように希釈し、その希釈菌液 4.5 ml と 2 倍希釈系列の薬液 0.5 ml を混合し、37°C, 18 時間培養し肉眼的に濁りの認められなかった濃度を MIC とした。

#### 4. バイオフィルムの作製方法

バイオフィルムの作製方法を Fig. 1 に示した。すなわち、*P. aeruginosa* S-827 株の一夜培養液を集菌し、生理食塩水にて 2 度洗浄した後、その菌体を 0.2 % のグルコースを含む生理食塩水に浮遊させ、その菌液中に滅菌した医療用テフロンシート (中川医療機器, 1 cm $\times$ 1 cm) を入れ、37°C で 7 日間培養した。7

\* 富山市下奥井 2-4-1

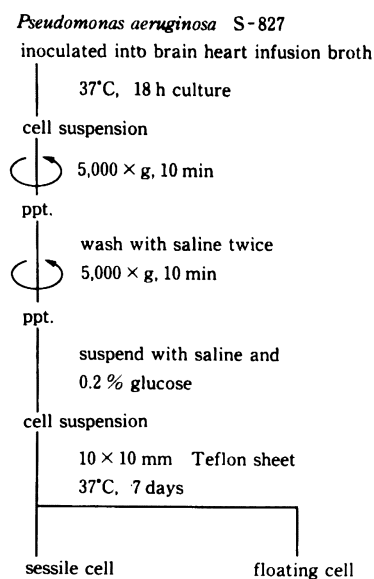


Fig. 1. Method of biofilm formation.

日後、そのテフロンシートに付着したものをバイオフィーム形成菌 (sessile cell) とし、付着せずに菌液中に浮遊していたものを浮遊菌 (floating cell) とした。

#### 5. 走査型電子顕微鏡による検鏡

菌が付着したテフロンシートを1.5%グルタルアルデヒド (和光純薬) および1%オスミウム酸 (和光純薬) で固定し、エタノールにて脱水後、第3級ブチルアルコール (和光純薬) に置換し乾燥した試料を金蒸着し、日立走査型電子顕微鏡 X-650 にて観察した。

#### 6. 菌体外膜タンパクの調製法

菌液とテフロンシートを接触させて3日後および8日後の floating cell と sessile cell を超音波にて破碎後、20分室温で2%ザルコシル (Sigma) 処理した。その後、10万×gにて40分超遠心を行いその沈澱を外膜タンパクとし、10% SDS-PAGE による電気泳動で外膜パターンの確認をした。

#### 7. Sessile cell に対する抗菌剤および多糖類等分解酵素の殺菌作用

上記の方法で作製したバイオフィームの付着したテフロンシートを含む菌液に、薬剤液あるいは分解酵素液を各種組み合わせ添加し、経時的にそのテフロンシートに付着した菌を強力なボルテックスにてはがし、薬剤を含まない寒天平板上に塗抹し、生菌数の変化を調べた。

#### 8. Broth 中における *P. aeruginosa* S-827 株に対する TFLX と EM の併用効果

試験菌を Brain Heart Infusion broth (BHIB, Difco) で一夜培養し、新鮮 BHIB に約  $10^4$  CFU/ml となるように接種し、37°Cで2時間振とう培養した後薬剤を添加した。その後、経時的に生菌数を測定し薬剤の影響を調べた。

### II. 実験結果

#### 1. *P. aeruginosa* S-827 株に対する各薬剤の抗菌力

*P. aeruginosa* S-827 株に対する TFLX, CPFX, CAZ, EM および CAM の MIC を Table 1 に示した。その結果、平板上ではキノロン剤2剤の MIC は共に  $0.2 \mu\text{g/ml}$  と最も優れた抗菌力を示し、CAZ は  $6.25 \mu\text{g/ml}$  であった。EM および CAM はそれぞれ  $400 \mu\text{g/ml}$  および  $100 \mu\text{g/ml}$  と抗菌力は弱かった。また平板上での MIC と液体培地中での MIC は、TFLX, CPFX, CAZ および CAM で同じであり、EM では液体培地中での MIC は平板上でのそれよりも1管上昇した。

#### 2. 電子顕微鏡による sessile cell の観察

菌液接触5日後および10日後のテフロンシート上の菌の走査型電子顕微鏡像を Fig. 2 に示した。それによると、5日目では菌体の他に菌が産生した粘着状物質である glycocalyx を認め、10日目ではさらに強固なバイオフィームを形成している像が確認された。また菌液接触後、7から10日目までのバイオフィーム像にほとんど差異は認められなかった (データ未発表)。

#### 3. 外膜蛋白のパターン

菌液接触3日後および8日後の floating cell および sessile cell の外膜パターンに、差異は認められなかった (Fig. 3)。

Table 1. Susceptibilities of antimicrobial agents on agar plate and in broth against *Pseudomonas aeruginosa* S-827

Drug	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	on agar plate <sup>a)</sup>	in broth <sup>b)</sup>
Tosufloxacin	0.2	0.2
Ciprofloxacin	0.2	0.2
Ceftazidime	6.25	6.25
Erythromycin	400	800
Clarithromycin	100	100

<sup>a)</sup> $10^6$  CFU/ml<sup>b)</sup> $10^4$  CFU/ml

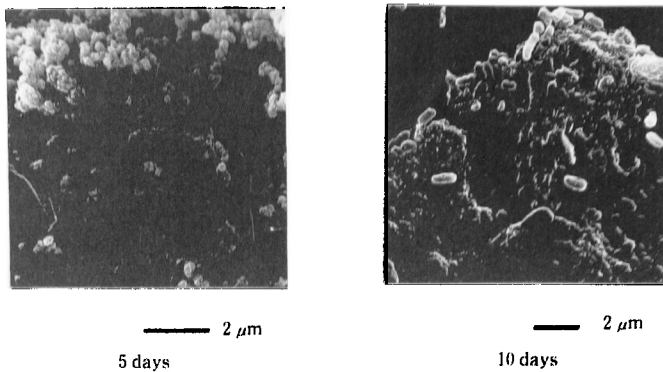


Fig. 2. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* S 827.

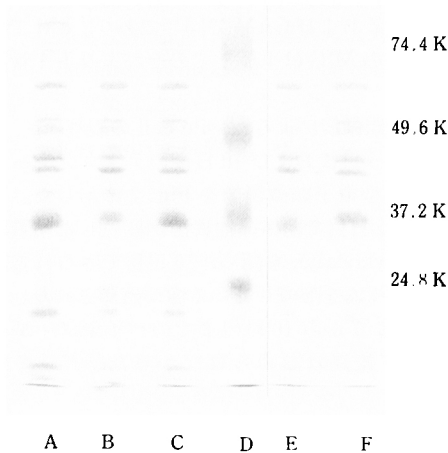


Fig. 3. Outer membrane profile of sessile and floating cells of *Pseudomonas aeruginosa* S-827. Lanes: A, S-827; B, S-827 sessile cell (8 days); C, S-827 floating cell (8 days); D, molecular size standards were Cytochrome c hexamer (74.4 KDa), Cytochrome c tetramer (49.6 KDa), Cytochrome c trimer (37.2 KDa), and Cytochrome c dimer (24.4 KDa); E, S-827 sessile cell (3 days); F, S-827 floating cell (3 days).

#### 4. Floating cellおよびsessile cellに対する薬剤の殺菌作用

Floating cellあるいはsessile cellに対するTFLX, CPFXおよびCAZの殺菌作用を、Fig. 4に示した。殺菌作用濃度は、3薬剤とも液体培地中での

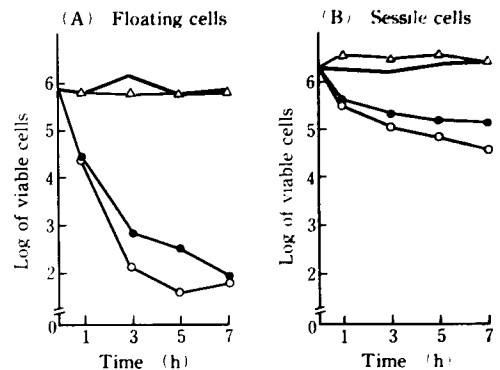


Fig. 4. Bactericidal activity of quinolones and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* S-827 (A) floating cells and (B) sessile cells in saline and 0.2% glucose. Symbols: (—), control; (○), tosofloxacin 0.2  $\mu$ g/ml; (●), ciprofloxacin 0.2  $\mu$ g/ml; (△), ceftazidime 6.25  $\mu$ g/ml.

1 MIC濃度とした。Floating cellに対してキノロン剤2剤は共に優れた殺菌力を示し、薬剤接触後3時間で、両薬剤共生菌数を1,000分の1以下にまで減少せしめた。それに対しCAZはまったく生菌数を減少させえなかった。また、sessile cellに対してキノロン剤2剤の殺菌効果は、floating cellに対してより劣るものの、90%以上の生菌数の減少が認められた。しかし、CAZはfloating cellに対してと同様まったく効果を示さなかった。

#### 5. TFLXと多糖類あるいはタンパク分解酵素との併用効果

0.2  $\mu$ g/mlのTFLXと、0.125 mg/mlのlysozy-

me, hyaluronidase, protease および streptokinase 4 剤の分解酵素との sessile cell に対する併用効果を、Table 2 に示した。それによると、いずれの分解酵素を併用した場合においても TFLX 単独の場合との殺菌性に差はなく、併用効果は認められなかった。

6. Sessile cell に対する TFLX, CPFX および CAZ と EM との併用効果

1) 経時変化

TFLX および CPFX 0.2  $\mu\text{g/ml}$  と EM 200  $\mu\text{g/ml}$

は、単独では殺菌力が弱いにもかかわらず、各々を併用することにより、薬剤接触後 7 時間まで著しい協力作用が認められた。CAZ においては、EM との協力作用は認められなかった (Fig. 5)。

2) 経日変化

人血中濃度を考慮し、EM および CAM の濃度を 1  $\mu\text{g/ml}$  としたときの、TFLX との併用効果を検討した。その結果、TFLX 0.2  $\mu\text{g/ml}$  と EM あるいは CAM 1  $\mu\text{g/ml}$  各々単独では殺菌的に作用しないにも

Table 2. Activity of tosofloxacin combined with mucolytic enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* S-827 sessile cells

Mucolytic enzyme	Log. of viable cells (5 h. after inoculation)	
	tosufloxacin (0.2 $\mu\text{g/ml}$ ) and mucolytic enzyme	tosufloxacin (0.2 $\mu\text{g/ml}$ ) alone
Lysozyme (0.125 mg/ml)	4.50	4.34
Hyaluronidase (0.125 mg/ml)	4.15	4.47
Protease (0.125 mg/ml)	4.20	4.15
Streptokinase (0.125 mg/ml)	4.20	4.74

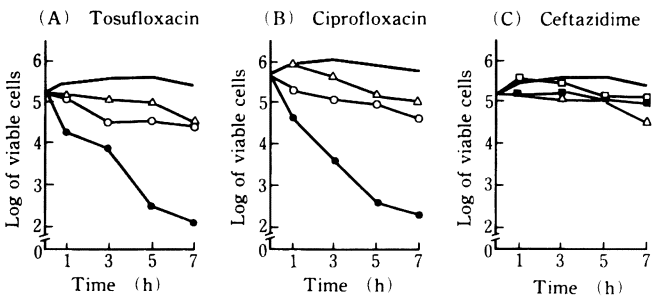


Fig. 5. Bactericidal activity of (A) tosofloxacin, (B) ciprofloxacin, and (C) ceftazidime combined with erythromycin against *Pseudomonas aeruginosa* S-827 sessile cells in saline and 0.2% glucose. Symbols: (A): (—), control; (○), tosofloxacin 0.2  $\mu\text{g/ml}$ ; (△), erythromycin 200  $\mu\text{g/ml}$ ; (●), tosofloxacin 0.2  $\mu\text{g/ml}$  and erythromycin 200  $\mu\text{g/ml}$ . (B): (—), control; (○), ciprofloxacin 0.2  $\mu\text{g/ml}$ ; (△), erythromycin 200  $\mu\text{g/ml}$ ; (●), ciprofloxacin 0.2  $\mu\text{g/ml}$  and erythromycin 200  $\mu\text{g/ml}$ . (C): (—), control, (□), ceftazidime 6.25  $\mu\text{g/ml}$ ; (△), erythromycin 200  $\mu\text{g/ml}$ ; (■), ceftazidime 6.25  $\mu\text{g/ml}$  and erythromycin 200  $\mu\text{g/ml}$ .

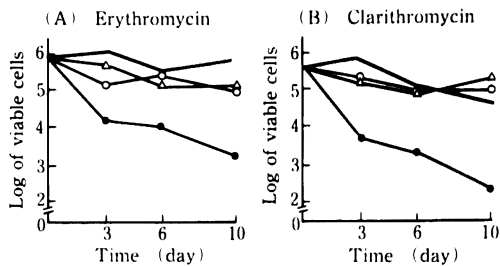


Fig. 6. Bactericidal activity of tosylloxacin and (A) erythromycin or (B) clarithromycin against *Pseudomonas aeruginosa* S 827 sessile cells in saline and 0.2% glucose. Symbols: (A): (—), control; (○), tosylloxacin 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; ( $\Delta$ ), erythromycin 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; (●), tosylloxacin 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and erythromycin 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . (B): (—), control; (○), tosylloxacin 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; ( $\Delta$ ), clarithromycin 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; (●), tosylloxacin 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and clarithromycin 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

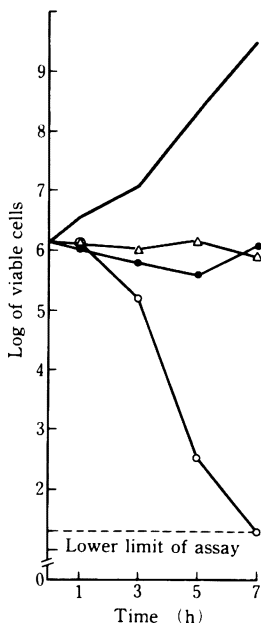


Fig. 7. Combined effect of tosylloxacin and erythromycin against *Pseudomonas aeruginosa* S-827 in brain heart infusion broth. Symbols: (—), control; (○), tosylloxacin 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; ( $\Delta$ ), erythromycin 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; (●), tosylloxacin 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and erythromycin 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

かわらず、併用することにより、薬剤接触後 10 日目で著しい協力作用が認められた (Fig. 6)。

#### 7. BHIB 中での TFLX と EM の併用効果

BHIB 中での TFLX と EM 併用効果を Fig. 7 に示した。その結果、TFLX 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  単独では速やかに殺菌されるのに対し、EM を加えることによりその殺菌作用が減弱され、拮抗作用が認められた。

### III. 考 察

慢性の感染症においては起因菌の同定および MIC を測定し、その結果に基づき MIC 値を超える血中濃度および臓器移行性を示す薬剤を投与しても、菌が排出し続けることが多い。その感染症難治化の要因の一つとして、バイオフィルムの形成が関与していると考えられる<sup>1-3)</sup>。これらバイオフィルム形成の起因菌となりうるものは、*P. aeruginosa* の他に *Staphylococcus aureus*<sup>5)</sup>, *Staphylococcus epidermidis*<sup>6)</sup>, *Streptococcus viridans*<sup>7)</sup> および *Escherichia coli*<sup>8)</sup> などである。なかでも *P. aeruginosa* は各種薬剤に自然耐性であり、compromised host においてはなかなか除菌しにくい菌の一つである。

ここでは今回我々は *in vitro* において臨床分離の呼吸器由来緑膿菌を用い、バイオフィルムを作製し、TFLX, CPFX, CAZ, EM および CAM の各薬剤と、多糖類等分解酵素単独あるいは併用した場合による影響について検討した。

走査型電子顕微鏡で観察すると、菌体が産生した glycocalyx を介して塊状になったバイオフィルムが形成されていた。また、このバイオフィルムはすでに報告されているように、形成されて日数を経るごとに一層強固なものへと変化していくこと<sup>1,9)</sup>が確認された。本実験に供試した医療用テフロンは、最も菌が附着しにくい材質であるが、それでも緑膿菌は附着し、バイオフィルムを形成した。このことは、もっと附着が容易である骨、金属およびシリコンなどにも当然バイオフィルムは形成されるであろうし、また生体内においては、フィブリンや血小板などのタンパクが存在、附着するためにさらに強固なバイオフィルムが形成されることが予想される<sup>1)</sup>。

また、今回実験に供試した *P. aeruginosa* S-827 株はムコイドタイプの菌株であり、ムコイドタイプの株は薬剤に対する感受性は高いもののバイオフィルムを形成しやすく、また除菌しにくいあるいは細胞等に対する附着能が高いとの報告<sup>9)</sup>もある。実際、臨床由来の非ムコイドタイプの菌株を用い、同上の条件でバイオフィルムを作製して電顕下で確認すると、非ムコイドタイプの方がバイオフィルム形成は少なかった (デ

ータ未発表)。なぜムコイドタイプの緑膿菌が非ムコイドタイプのものよりバイオフィルムを作りやすく、また除菌しにくいのかという点については、今後さらなる検討が必要であろうと思われる。

Floating cell と sessile cell の薬剤に対する抵抗性に差異があるのは菌自体の何らかの耐性化によることも考えられるが、SDS 電気泳動による外膜パターンは、floating cell および sessile cell ともにまったく変化はなく、バイオフィルム形成がその抵抗性に関与していることが考えられる。バイオフィルムがいったん形成されると一種の被膜に覆われることによって薬剤が菌に到達しにくいばかりでなく、菌自体が静止期の状態にあり、静止期の菌に対して殺菌力が劣る CAZ のような  $\beta$ -ラクタム剤が殺菌し得なくなる<sup>10)</sup>。ところが TFLX<sup>11)</sup> のようなキノロン剤は、静止期の状態にある菌に対しても十分とはいかないまでも sessile cell の菌数を減少させること<sup>12)</sup>ができる。しかしながら、臨床での除菌効果を考えた場合にはまだまだ殺菌力を高めると同時に、バイオフィルムへの薬剤の透過をよくするか、あるいは形成されたバイオフィルムを崩壊させる薬剤を開発していく必要がある。

そこで、形成されたバイオフィルムを溶解する目的で、TFLX と多糖類あるいはタンパク分解酵素の併用について検討を行った。それによると、lysozyme, hyaluronidase, protease および streptokinase と TFLX を併用しても効果は認められなかった。しかしながら、lysozyme<sup>13)</sup>あるいは dextranase<sup>7)</sup>と抗生剤の併用でバイオフィルムに対する効果が認められたとの報告もあり、分解酵素の濃度あるいは pH 等については今後さらに検討を要すると思われる。

次に、マクロライド系薬剤はグラム陽性菌と一部のグラム陰性菌に対して抗菌力を有するものの、緑膿菌に対してはほとんど抗菌活性を有していない<sup>14)</sup>のは周知のことである。ところが緑膿菌が起因菌とみられ、また生体内でバイオフィルムの形成が疑われる症例に対してこのマクロライド系薬剤を長期少量投与することによって、症状の著しい改善が認められたことが報告<sup>15,16)</sup>されるようになってきた。このマクロライド系薬剤には、菌の付着能の低下<sup>17)</sup>、pili の運動能の低下<sup>17)</sup>、エラスターゼ産生抑制<sup>18,19)</sup>あるいは glycocalyx の産生能の低下<sup>1,20)</sup>などの作用を有することがわかってきた。そこで我々は、キノロン剤とマクロライド系薬剤のバイオフィルムに対する併用効果について検討した。

まず、キノロン剤あるいは  $\beta$ -ラクタム剤の液体培地中での 1 MIC 濃度と EM 1/4 MIC 濃度で併用効果

を生菌数の経時変化によって検討したところ、TFLX および CPFX 0.2  $\mu\text{g/ml}$  と EM 200  $\mu\text{g/ml}$  で、単独では殺菌されないにもかかわらず併用することによりその協力作用が認められた。また、CAZ と EM の併用については、その協力作用をまったく認めなかった。さらに、マクロライド系薬剤の常用量での血中濃度を考慮して、EM および CAM とともに 1  $\mu\text{g/ml}$  とした時の併用効果を生菌数の経時変化で検討した。その結果、キノロン剤およびマクロライド系薬剤単剤ではさほど殺菌されないにもかかわらず、各々を併用することにより、著しい協力作用が認められた。ところが、一般的に broth 中においてキノロン剤とマクロライド系薬剤の併用は、マクロライド系薬剤の菌に対する作用によりキノロン剤の殺菌作用が減弱され、どのような菌種においても拮抗現象が認められることがすでに報告されている<sup>22)</sup>。また、この実験に用いた *P. aeruginosa* S-827 株を用いて broth 中で TFLX と EM を併用すると、やはり拮抗現象が認められた。この形成されたバイオフィルムに対してのみキノロン剤とマクロライド系薬剤の間で併用効果が認められた原因については、マクロライド系薬剤のバイオフィルムに対する何らかの作用により、キノロン剤がバイオフィルムそのものを透過しやすくなったためと思われるが、詳細については現在検討中である。他系統の薬剤の併用効果については、緑膿菌の sessile cell に対して *in vitro* において piperacillin と tobramycin との協力作用が認められたとの報告もある<sup>9)</sup>が、その作用機作については言及していない。また、福岡<sup>23)</sup>らは、この薬剤の組み合わせで通常の状態の緑膿菌においても併用効果が認められるとしている。このことより、piperacillin と tobramycin との併用効果は sessile cell に対してだけではないと思われる。

いずれにせよ、生体内においてはフィブリンなどの血漿成分や各種タンパクが複雑にからみあい、より強固なバイオフィルムが形成されていることが予想される。そのことより、*in vitro* においても生体内でのバイオフィルム形成の条件により近づけるために、人血清を添加し強固なバイオフィルムを作製中である。

今後は、このバイオフィルムに対しキノロン剤とマクロライド系薬剤の間に併用効果が現れる原因、薬剤のバイオフィルムの透過等についてさらに検討する予定である。

#### 謝 辞

最後に、本稿を終えるに当たり懇切なる御指導、御助言を賜りました杏林大学第一内科小林宏行教授、富山医科薬科大学薬学部微生物学教室岡村昭治助教授、

富山医科薬科大学電子顕微鏡室および実験全般にわたり尽力していただいた当研究所荒川由美子嬢にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。なお、本論文の要旨は第39回日本化学療法学会総会(1991年6月, 浦安)にて発表した。

# 文 献

- 1) 大垣憲隆, 小林宏行: 難治感染症と biofilm. ファルマシア 26: 1129~1132, 1990
- 2) 藤井良知: 細菌の Biofilm 形成と難治感染症. 化学療法の領域 7: 2188~2194, 1991
- 3) Costerton J W, Cheng K J: The bacterial glycocalyx in nature and disease. Ann Rev Microbiol 35: 299~324, 1981
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度測定法再改訂について. Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 5) Buxton T B, Horner J, Hinton A, Rissing J P: In vivo glycocalyx expression by *Staphylococcus aureus* phage type 52/52 A/80 in *S. aureus* osteomyelitis. J Infect Dis 156: 942~946, 1987
- 6) 池田文昭, 横田好子, 峯 靖弘: *Staphylococcus epidermidis* の slime 産生株による biofilm 形成と抗菌剤の作用について. 感染症学雑誌 65: 875~882, 1991
- 7) Dall L, Barnes W G, Lane J W, Mills J: Enzymatic modification of glycocalyx in the treatment of experimental endocarditis due to viridans streptococci. J Infect Dis 156: 736~740, 1987
- 8) Dix B A, Cohen P S, Laux D C, Cleeland R: Radiochemical method for evaluating the effect of antibiotics on *Escherichia coli* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 32: 770~772, 1988
- 9) Anwar H, Costerton W: Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 34: 1666~1671, 1990
- 10) Widmer A F, Wiestner A, Frei R, Zimmerli W: Killing of non-growing and adherent *Escherichia coli* determines drug efficacy in device-related infections. Antimicrob Agents Chemother 35: 741~746, 1991
- 11) Fujimaki K, Noumi T, Saikawa I, Inoue M, Mitsuhashi S: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-3262, a new fluoroquinolone. Antimicrob Agents Chemother 32: 827~833, 1988
- 12) 西野武志: キノロン薬の殺菌作用からみた形態学的変化. キノロン薬 (上田 泰, 清水喜八郎, 紺野昌俊, 松本文夫編), P 54~69, ライフサイエンス社, 1991
- 13) 渋谷秋彦, 西村昌宏, 小六幹夫, 広瀬崇興, 熊本悦明, 大屋 哲: 尿中抗菌薬濃度自動シュミレーター装置を用いた *in vitro* における実験的複雑性尿路感染症治療の検討. 第39回日本化学療法学会総会抄録, P 119, 1991
- 14) 小野武夫, 沼田和生, 井上松久, 三橋 進, 新マクロライド系抗生物質 TE-031 に関する細菌学的検討. Chemotherapy 36 (S-3): 1~34, 1988
- 15) 工藤翔二, 植竹健司, 萩原弘一, 平山雅清, 許 栄宏, 木村 仁, 杉山幸比古: びまん性汎細気管支炎にたいするエリスロマイシン少量長期投与の臨床効果に関する研究 - 4 年間の治療成績. 日胸疾会誌 25: 632~642, 1987
- 16) 山本正彦, 近藤有好, 田村昌士, 泉 孝英, 伊奈康孝, 野田正治: びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシンおよびニューキノロン系薬剤の長期投与の検討. 日胸疾会誌 28: 1305~1313, 1990
- 17) 山崎 透: 緑膿菌の気道粘膜付着能とそれに及ぼす抗菌剤の影響. 感染症学雑誌 64: 575~583, 1990
- 18) 三上正志: 慢性気道疾患の膿性痰中の elastase. 化学療法の領域 5: 1461~1466, 1989
- 19) 本馬恭子, 岩永正明: 微量抗生剤の緑膿菌に対する作用 - エリスロマイシンおよびクロラムフェニコール. 感染症学雑誌 65: 286~292, 1991
- 20) Goswami S K, Kivity S, Marom Z: Erythromycin inhibits respiratory glycoconjugate secretion from human airways *in vitro*. Am Rev Respir Dis 141: 72~78, 1990
- 21) 斉藤 篤, 他: TE-031 に関する臨床的研究. Chemotherapy 36 (S-3): 576~585, 1988
- 22) Neu H C: Synergy of fluoroquinolones with other antimicrobial agents. Rev Infect Dis 11 (S-5): S 1025~S 1035, 1989
- 23) 福岡義和, 山城芳子, 池田 靖, 高畑正裕, 保田隆, 高井 明, 才川 勇: Piperacillin および cefoperazone とアミノグリコシド系抗生剤との臨床分離菌に対する *in vitro* 併用効果. Chemotherapy 34: 837~846, 1986

Characteristics of biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro*

Kazuo Fujimaki, Yasushi Ikeda, Masahiro Takahata and Takashi Yasuda

Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimookui, Toyama, Japan

Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* was investigated by using medical teflon sheet as an artificial foreign device *in vitro*. Biofilm formed by the glycocalyx and cells was observed by scanning electron microscopy. Ceftazidime (CAZ) at 1 MIC did not show any bactericidal activity against sessile or floating cells. Tosufloxacin (TFLX) and ciprofloxacin (CPFX) had excellent bactericidal effects at 1 MIC against floating cells and a >90% decrease was observed in the number of viable sessile cells. Enhanced activities were observed against sessile cells not only with a combination of TFLX and CPFX at 1 MIC and erythromycin (EM) at 1/4 MIC to when the hourly changes of viable cells were observed but also for TFLX at 1 MIC and EM or clarithromycin at 1 µg/ml when the changes were observed over days. However, synergism was not observed when CAZ and EM were combined. The activity of TFLX was not enhanced when it was combined with lysozyme, hyaluronidase, protease or streptokinase.