

抗菌剤の緑膿菌バイオフィーム透過性の測定法

内藤真智子・松下 忠弘・山口東太郎

田辺製薬株式会社薬理研究所*

横 田 健

順天堂医療短期大学

(平成5年3月22日受付・平成5年7月7日受理)

難治性感染症の原因の1つに細菌のバイオフィーム形成による抗菌剤の菌体への透過障害が考えられている。そこで、*in vitro*において緑膿菌バイオフィームを作成し薬剤の透過性を測定する方法を考案した。すなわち、プレインハートインフュージョン寒天平板培地上に底面にメンブランフィルターを張り付けた市販のインターセルを設置し、その中で緑膿菌を37°C、3日間培養したものをバイオフィーム形成菌とした。これを走査型電子顕微鏡で観察したところ、多量の網目構造をしたグリコカリックス層と菌体が厚さ約100 μmの厚い層を形成していることが確認できた。また、所々に膜状の物質や板状になったものが認められた。これを24穴マルチウェルプレートにセットし細菌用寒天で表面を保護し、インターセル内に薬剤溶液、外層に燐酸緩衝液を内層と外層の液面をそろえるように注入し、24時間後外層液に自然拡散した薬剤濃度をバイオアッセイ法にて測定し、薬剤のバイオフィーム透過率を算出した。この方法で、ceftazidime (CAZ) と gentamicin (GM) のバイオフィーム透過性を測定したところ、CAZは透過障害を受けなかったがGMは明らかな透過障害を受けた。また、緑膿菌から分離したスライムを薬液に添加しディスク法による阻止円形成におよぼす影響を検討した。その結果CAZの抗菌力はほとんど影響を受けなかったがGMは添加するスライム濃度に応じて抗菌力が低下した。同様の結果はスライム添加時における殺菌作用でも認められ、薬剤のバイオフィーム透過率の結果を反映していた。

Key words: 緑膿菌, バイオフィーム, 透過性, ceftazidime, gentamicin

異物挿入に伴う感染^{1,2)}や慢性炎症^{1,3)}などでは、細菌がグリコカリックスを産生しそれが生体内成分(フィブリン、血小板、細菌結合蛋白)を巻き込み、菌体がバイオフィームに埋もれた形で存在している⁴⁾様子が観察されている。また、マウス腹腔内に生体材料を挿入し菌を接種することにより、細菌はバイオフィームを形成し生体材料に付着している状態が顕微鏡的に観察されている⁵⁾。この細菌のバイオフィームは自然界でも観察され、細菌にとっての外界からの防御機構と考えられている⁶⁾。また、このようなバイオフィーム形成を伴う疾患では菌体表面から情報を得ることにより成立する宿主の免疫機構は活性化されず細菌は生体防御反応に抵抗性を示し、また、抗菌剤も十分細菌細胞に到達できないため難治性になるものと考えられている¹⁾。

*In vitro*でバイオフィームを作成し抗菌剤に対するバイ

オフィーム形成菌の感受性を測定する実験が現在までいくつか行われている⁷⁾。すなわち、生理食塩水中にテフロン片を入れ菌を接種してバイオフィームを作成し、浮遊菌とバイオフィーム菌に対する薬剤の抗菌作用の検討^{8,9)}やRobbins deviceを用いてのバイオフィームの形成過程と抗菌剤に対する抵抗性の検討¹⁰⁾などである。また、バイオフィーム形成を伴う疾患において適正な抗菌剤の用量を検討するために細菌の増殖速度を調整できるchemostat systemを用いた実験系が有効であるとの報告もある⁷⁾。さらに、old biofilmに比較してyoung biofilmは抗菌剤の透過が前者より良いこと、バイオフィーム内の細菌自体は抗菌剤に高い感受性を示すことが報告されている^{11,12)}。バイオフィームによる抗菌剤抵抗性のメカニズムは非常に複雑で抗菌剤の透過性の変化、酵素産生の変化などがあげられ、さらに個々の細菌のバイオフィーム内での存在位置によつ

* 埼玉県戸田市川岸2-2-50

でも生理状態が異なるとされている¹³⁾。このように複雑なバイオフィルムに対する抗菌剤の作用を明らかにするためには、バイオフィルム細菌の抗菌剤に対する抵抗性について抗菌剤の透過性と殺菌力とを分けて評価することが重要であると考えた。そこで、臨床重要な緑膿菌のバイオフィルムを *in vitro* で作成し、抗菌剤のバイオフィルム透過性を測定する方法を検討した。

I. 材料および方法

1. 使用菌株

緑膿菌のバイオフィルムに対する抗菌剤の透過性測定に、当研究所保存の臨床分離株 10 菌株を使用した。また、薬剤透過性におよぼすバイオフィルム形成菌の培養日数、ならびに、薬剤作用濃度の影響の検討には、臨床分離株 10 菌株中特に粘性の強い *Pseudomonas aeruginosa* 201-3 株を用いた。

2. 使用薬剤

抗緑膿菌作用を有する薬剤の中から ceftazidime (CAZ, 田辺製薬^株), gentamicin (GM, シェリング・プラウ^株) を用いた。

3. 感受性測定法

最小発育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会標準法⁴⁾に従い測定培地にミュラーヒントン S 寒天培地 (栄研化学^株) を用いた寒天平板希釈法、および、測定培地に感受性ブイオン培地 (栄研化学^株) を用いた液体希釈法により接種菌量 10^5 CFU/ml にて測定した。

4. バイオフィルムの薬剤透過性測定法

ブレインハートインフュージョン寒天平板 (BHIA; 栄研化学^株) に底面にメンブランフィルターを張り付けたインターセル (ポリカーボネイト製; 倉敷紡績^株) を設置し、生理食塩水に懸濁し調整した菌液 (約 3.0×10^8 CFU/ml) 200 μ l をインターセル内に接種し 37°C で 3 日間培養した。このインターセルを 24 穴マルチウェルプレート (住友ベークライト^株) にセットし表面を保護するために 0.7% 細菌用寒天 (栄研化学^株) 100 μ l を重層し、インターセル内に 1/15 M 磷酸緩衝液 (PB, pH 7.0) に溶解した薬剤溶液 500 μ l, 外層に PB 1,300 μ l を注入し内層と外層の液面の高さをそろえて室温下に 24 時間放置した。その後、外層液を採取し濾過滅菌を行い外層液中に拡散した薬剤濃度をバイオアッセイ法にて測定し、0.7% 細菌用寒天処理のみ行ったインターセルの透過薬剤濃度を 100% とした相対値を薬剤透過率とした。なお成績は、試料 3 個の平均透過率で示した。

5. スライムの抽出

ブレインハートインフュージョン寒天平板 100 枚に無

菌的に滅菌セロファンを密着させ、その上に *P. aeruginosa* 201-3 株の一夜培養菌液 100 μ l を塗抹し 37°C で 2 日間培養後、尾花の方法¹⁵⁾によりスライムを得た。得られたスライムは凍結乾燥を行い、PB または生理食塩水で用時溶解して用いた。

6. 阻止円形成におよぼすスライム添加の影響

P. aeruginosa 201-3 株から分離したスライムを PB で溶解し、その濃度が最終的に 0, 0.1, 0.5% となるように添加した薬剤溶液を調整し、ディスク法により阻止円形成におよぼす影響を検討した。CAZ, GM の濃度測定には検定菌としてそれぞれ *Proteus mirabilis* ATCC 21100, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を使用した。

7. 殺菌作用におよぼすスライム添加の影響

P. aeruginosa 201-3 株を感受性ブイオン培地にて 37°C で一夜培養し、この培養菌液を 5% の割合で同培地に接種し 2 時間振盪培養を行った。この対数増殖期にある菌を約 10^5 CFU/ml に希釈調整し薬剤を添加した直後にスライムを最終濃度 0.1% となるように添加し、37°C で振盪培養した。薬剤添加後、1, 2, 4 時間目に生菌数測定を行い、スライム未添加時の殺菌作用と比較した。薬剤濃度は液体希釈法により測定した MIC, すなわち、CAZ, 25 μ g/ml, GM, 6.25 μ g/ml を用いた。

8. バイオフィルム形成菌の走査型電子顕微鏡観察

ブレインハートインフュージョン寒天平板上に設置したインターセル内で 3 日培養したメンブランフィルター上の *P. aeruginosa* 201-3 株を 0.15% ルテニウム・レッド (ナカライテスク^株) を含むグルタルアルデヒド、オスミニウム酸にて二重固定し、上昇エタノール系列で脱水し、酢酸イソアミルで置換後臨界点乾燥 (JCPD-5, JEOL) を行った。その後、金でスパッタ・コーティング (JFC-1100, JEOL) し、走査型電子顕微鏡 (JSM-T 220, JEOL) で観察した。

II. 結果

1. 薬剤のバイオフィルム透過性

当研究所保存の臨床分離株中、CAZ, GM に感受性であるムコイド型緑膿菌 10 菌株について薬剤透過性を検討した。CAZ 50 μ g/ml 濃度では平均 95.6 \pm 14.2% (71.8%~120.7%) の透過率を示した。一方、GM 200 μ g/ml 濃度では平均 42.0 \pm 9.0% (25.5%~58.1%), 50 μ g/ml 濃度では 1 株が 23.7% の透過率を示したが、他の 9 株は測定限界以下の濃度で、濃度低下に伴って透過率が減少した (Table 1)。

試験菌株中もっとも粘性の強い *P. aeruginosa* 201-3 株を用いてバイオフィルム形成菌の培養日数による

Table 1. Antibiotic permeability through biofilm of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Permeability (%)		
	CAZ	GM	CAZ (50 $\mu\text{g/ml}$)	GM (200 $\mu\text{g/ml}$)	GM (50 $\mu\text{g/ml}$)
Control			100	100	100
201-3	3.13	6.25	93.7	45.2	<10.2
152	0.39	0.78	112.7	46.8	<10.2
158	0.78	6.25	88.0	25.5	<10.2
216	3.13	6.25	120.7	46.2	<10.2
220-8	0.78	3.13	92.1	36.8	<10.2
160	0.39	3.13	106.6	58.1	23.7
270	1.56	6.25	93.8	46.2	<10.2
269	1.56	6.25	92.6	37.0	<10.2
161	3.13	1.56	71.8	33.5	<10.2
274	3.13	1.56	84.4	44.5	<10.2
Average \pm SD			95.6 \pm 14.2	42.0 \pm 9.0	<11.6

CAZ: ceftazidime, GM: gentamicin.

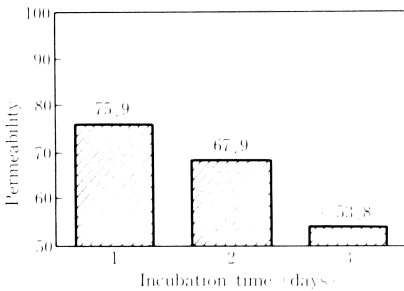
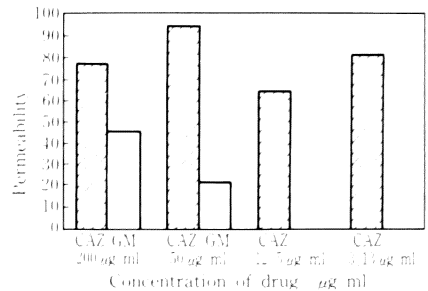


Fig. 1. The effect of incubation periods on permeability of gentamicin through *Pseudomonas aeruginosa* 201-3 biofilm at a concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$.



CAZ: ceftazidime, GM: gentamicin.

Fig. 2. Permeability of ceftazidime and gentamicin through *Pseudomonas aeruginosa* 201-3 biofilm.

薬剤透過の変動を検討した。その結果、明らかな透過障害を受けたGMは1日、2日、3日と培養日数が増えるにつれ透過率が減少した (Fig. 1)。一方、CAZは3日培養したバイオフィーム形成菌に対しても良好な透過性を示した (Table 1)。

薬剤濃度 200, 50, 12.5, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 作用においてバイオフィームに対する透過率を測定したところCAZは65.0%~93.7%の透過率を示したが、GMは濃度が低くなるにつれて透過率の低下が認められた (Fig. 2)。なお、本方法では、コントロールに寒天層のみを用いているため薬剤が非特異的に菌体へ吸着されることが懸念されたが、測定条件と同一の菌数を薬液に添加しバイオアッセイ法により力価を測定したところ影響のないことが確認された。

2. 阻止円形成におよぼすスライム添加の影響

スライムを最終濃度 0, 0.1, 0.5% となるように添加した薬剤溶液についてディスクからの薬剤の拡散におよぼすスライム添加の影響について検討した。CAZは低濃度域で阻止円が若干縮小しスライム添加の影響がわずかに認められたが、高濃度域では影響はほとんど認められなかった。一方、GMはスライム添加の影響を大きく受け、低濃度域から高濃度域まで全般に阻止円の縮小が認められた。また、その程度はスライムの添加濃度に依存的であった (Fig. 3)。

3. 殺菌作用におよぼすスライム添加の影響

0.1%スライム添加時において、CAZは1/16 MICの作用においてもスライム未添加時と同様の殺菌力を示したが、GMは0.1%のスライムの添加により1

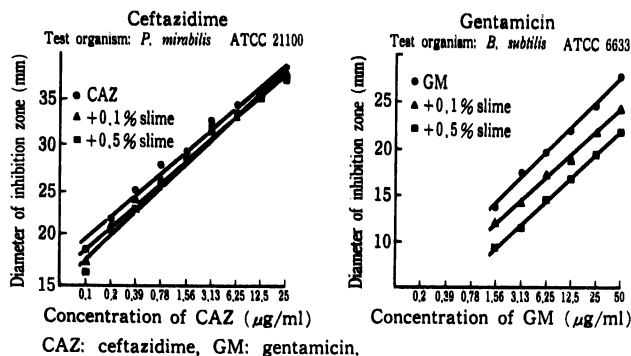


Fig. 3. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* slime on the standard curves of antibiotics.

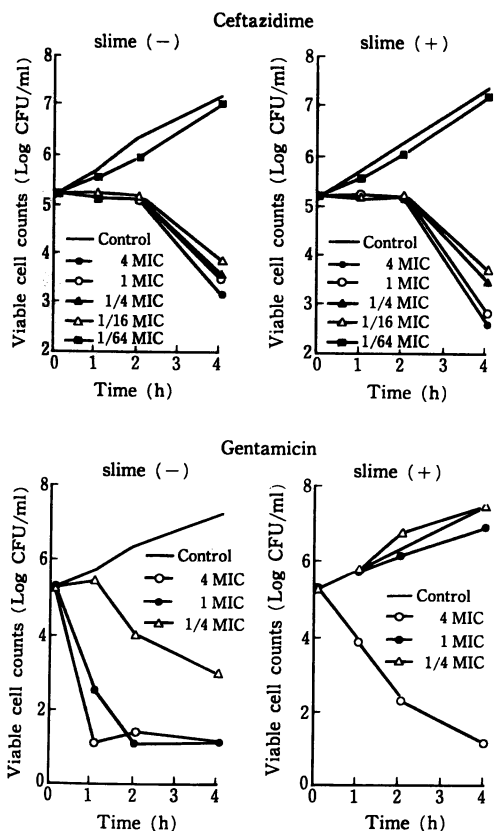


Fig. 4. The effect of slime on bactericidal activities of ceftazidime and gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa* 201-3.

MIC 以下の濃度での殺菌力は完全に阻害され薬剤無添加時とほぼ同様の増殖曲線を示した。また、4 MIC 作用においても殺菌力の減弱が認められた (Fig.

4)。

4. バイオフィルム形成菌の電顕的観察

インターセル内のメンブランフィルター上で3日培養した *P. aeruginosa* 201-3 株を走査型電子顕微鏡で観察したところ、試料の大部分が剝がれ落ちてメンブランフィルターが露出した部分ではその付近に菌体が発生したと思われるフィルム状の物質 (Fig. 5(a)), または厚い板状となった構造物が広く観察された (Fig. 5 (b), (c))。その上方に多量の菌体 (Fig. 5 (d)) と密集した繊維状物質 (Fig. 5 (e)) が層状に重なり合っている像が観察された (Fig. 5 (f))。また、所々に様々な厚さと形状のフィルム状物質が存在し (Fig. 5 (g)) 全体的には約 60~100 μm の厚い層を形成していることが確認できた (Fig. 5 (h))。

III. 考 察

細菌のバイオフィルム形成を伴う感染症が難治化する原因の1つに抗菌剤浸透のバリアーとしてのグリコカリックス層があげられる。このグリコカリックス層について Slack らは (a) 抗菌剤が菌体表面に到達するために拡散するのに障害となる (グリコカリックスの表層と深層部での薬剤濃度が平衡に達するまでの時間が延長される)。(b) polysaccharide の構造そのものが内部摩擦や粘性を供給するため抗菌剤の通過を減少させる。(c) グリコカリックスの成分である多糖体は陰イオンに帯電していることから、イオン交換樹脂様のはたらきをしてイオン化した抗菌剤を吸着し細菌への到達を阻止している、ことなどを提唱している¹⁶⁾。

また最近では、バイオフィルムによる抗菌剤抵抗性はバイオフィルム内の細菌の増殖速度が遅いことにあるとし¹⁷⁾, Robert らは carbapenem, fluoroquinolon,

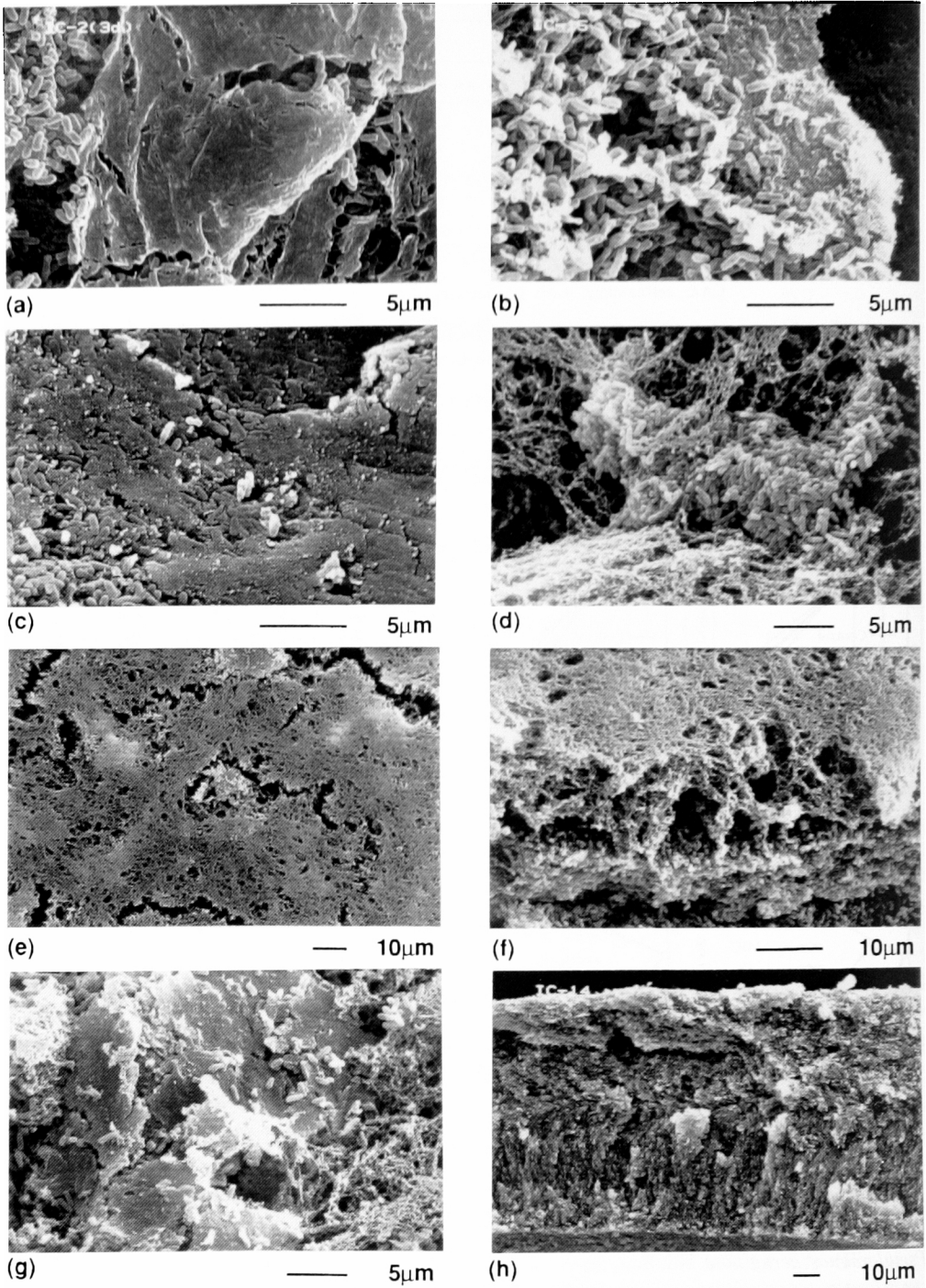


Fig. 5. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* 201-3 grown on the membrane filter.

aminoglycoside, および β -lactam の中で fluoroquinolone のみが分裂の遅いグラム陰性菌にも殺菌力を示したと報告している¹⁹⁾。したがって、バイオフィーム内の細菌を殺菌するために抗菌剤はバイオフィームに対して透過性が良く、かつ静止期の状態にある細菌にも殺菌的に作用することが重要であると考えられる。

以上のことから、我々は抗菌剤のバイオフィーム透過性に着目し、インターセルを用いた透過性の測定法を考案した。データは示さなかったが、GM 200 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた時の透過率を試料 10 個で測定したところ、変動係数は 15.4% であった。また、CAZ に関して、臨床分離株である緑膿菌 10 菌株のバイオフィーム透過性を測定したところ、120.7% を示す菌株が認められたことから (Table 1)、本方法には 20% 前後のバラツキがあると考えられる。

まず、aminoglycoside である GM について *P. aeruginosa* 201-3 株のバイオフィーム透過性を測定したところ、3 日目には 53.8% 以下となり、バラツキを考慮しても培養日数の延長に伴い透過性が著しく減少した。また、同様に作用濃度の低下に伴い透過率が著しく減少し、この現象は試験した緑膿菌 10 菌株で共通に認められた。スライム添加時の阻止円形成におよぼす影響でも GM はスライムの添加濃度が増すにつれ阻止円の縮小が認められ、さらに GM の殺菌力もスライムの添加により明らかに低下した。これらの結果はムコイド型緑膿菌のスライムの主な構成成分であるアルギン酸¹⁹⁾ に GM がトラップされたとの報告^{20,21)} と同様の結果であった。一方、弱酸性の CAZ はバイオフィームによる透過障害をほとんど受けておらず、緑膿菌バイオフィームの培養日数や添加薬剤濃度にも影響を受けなかった。また、緑膿菌スライムの添加によって CAZ の阻止円形成および殺菌効果の阻害が認められなかったことは、CAZ が緑膿菌のバイオフィームをよく透過した結果と一致していた。以上の結果は Slack らの提唱 (c)¹⁶⁾ を支持するものであった。

現在では細菌バイオフィームに対し高い透過性を有し、中の細菌を完全に殺菌する抗菌剤は見つかっていない⁹⁾。しかし、今回 CAZ で認められたごとく、バイオフィームの透過障害を受け難い薬剤の存在することは、バイオフィーム形成菌に対する有効な薬剤、すなわち、バイオフィームの透過障害が少なく、分裂速度の遅い菌にも殺菌的に作用する薬を見つけ出すために重要な知見と考える。今回は、緑膿菌のバイオフィームについて抗菌剤の透過性を測定したが、本法はインターセル内でバイオフィームを作成するため多数の菌株について試験することが可能であり、他の菌種に

も応用することは十分可能と考えている。

なお、本論文の要旨は第 39 回日本化学療法学会西日本支部総会にて発表した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、走査型電子顕微鏡の観察に御協力頂きました田辺製薬㈱、薬物代謝研究所 八十島昭氏に深謝致します。

文 献

- 1) 大賀正義, 有菌 剛, 杉岡洋一: 医用材料と感染。整形外科と災害外科 30: 939~948, 1987
- 2) Anwar H, Dasgupta M K, Costerton J W: Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. Antimicrob Agent Chemother 34: 2043~2046, 1990
- 3) 小林宏行: 細菌と宿主の interaction。呼吸 9: 510~521, 1990
- 4) 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
- 5) 有菌 剛, 大賀正義, 神宮司誠也, 杉岡洋一: In vivo における細菌の生体材料への付着状態の観察。整形外科と災害外科 35: 1104~1107, 1987
- 6) Costerton J W, Cheng K-J, Geesey G G, Ladd T I, Nickel J C, Dasgupta M, Marrie T J: Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol 41: 435~464, 1987
- 7) Prosser BLaT, Taylor D, Dix B A, Cleeland R: Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. Antimicrob Agent Chemother 31: 1502~1506, 1987
- 8) 有菌 剛, 大賀正義, 杉岡洋一: 生体材料付着細菌の抗生物質への抵抗性 (経時的变化について)。整形外科と災害外科 37: 306~308, 1988
- 9) 大垣憲隆, 菊地直美: 細菌 Biofilm と抗菌剤の interaction。化学療法の領域 8: 236~242, 1992
- 10) Nickel J C, Ruseska I, Wright J B, Costerton J W: Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. Antimicrob Agent Chemother 27: 619~624, 1985
- 11) Anwar H, van Biesen T, Dasgupta M, Lam K, Costerton J W: Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel *in vitro* chemostat system. Antimicrob Agent Chemother 33: 1824~1826, 1989
- 12) Anwar H, Costerton J W: Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agent Chemother 34: 1666~1671, 1990
- 13) Anwar H, Strap J L, Costerton J W: Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrob Agent Chemother 36: 1347~1351,

- 1992
- 14) 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
- 15) Obana Y: Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. Microbiol Immunol 30: 645~657, 1986
- 16) Slack M P E, Nichols W W: Antibiotic penetration through bacterial capsules and exopolysaccharides. J Antimicrob Chemother 10: 368~372, 1982
- 17) Gilbert P, Collier P J, Brown M R W: Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. Antimicrob Agent Chemother 34: 1865~1868, 1990
- 18) Eng R H K, Padberg F T, Smith S M, Tan E N, Cherubin C E: Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. Antimicrob Agent Chemother 35: 1824~1828, 1991
- 19) Murakawa T: Slime production by *Pseudomonas aeruginosa* IV. Chemical analysis of two varieties of slime produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Japan J Microbiol 17: 513~520, 1973
- 20) Slack M P E, Nichols W W: The penetration of antibiotics through sodium alginate and through the exopolysaccharide of a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet II: 502~503, 1981
- 21) Tannenbaum C S, Hastie A T, Higgins M L, Kueppers F, Weinbaum G: Inability of purified *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide to bind selected antibiotics. Antimicrob Agent Chemother 25: 673~675, 1984

A new method of measuring antibacterial agents through biofilms

Machiko Naito, Tadahiro Matsushita and Totaro Yamaguchi

Pharmacological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co, Ltd, 2-2-50,
Kawagishi, Toda, Saitama 335, Japan

Takeshi Yokota

Juntendo Medical College of Nursing

The formation of biofilm is a cause of chronic infection because biofilm blocks the diffusion of antibacterial agents, preventing them from reaching bacteria. To assess the permeability of antibacterial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, we devised a simple method using an Intercell® and a multi-well plate. *P. aeruginosa* cells were inoculated in an Intercell® placed on a brain heart infusion agar plate. Biofilm was formed on the membrane filter of the Intercell® during incubation at 37°C for 3 days. Scanning electron micrographs showed that the biofilm formed was about 100 μm in thickness and consisted of bacterial and spongy glycocalyx layers. The biofilm-formed Intercell® was placed in a multi-well plate, and the surfaces of the biofilm were coated with agar to prevent peeling. A solution of antibacterial agent was added to the Intercell® and phosphate buffer was poured into the outside of the Intercell® until the levels of the solution on both sides were equal. After incubation at room temperature for 24 hours, the concentration of the antibacterial agents outside the Intercell® was measured by bioassay. The diffusion rate of gentamicin (200 μg/ml) in the presence of biofilm was 42% of that in the absence of biofilm. In addition, the slime prepared from *P. aeruginosa* lowered the antibacterial potency of gentamicin, and its bactericidal activity decreased with an increase in the concentration of the slime. These findings suggest that biofilm forms a barrier to diffusion of gentamicin, attributable to binding of the drug to alginate which is a primary constituent of *P. aeruginosa* biofilm. On the other hand, in the case of ceftazidime, no change was observed in the diffusion rate regardless of the presence or absence of biofilm. Furthermore, addition of *P. aeruginosa* slime did not affect the potency of ceftazidime and its bactericidal activity, suggesting that ceftazidime diffuses freely through biofilm.