

各種の臨床分離菌のコロニーレベルにおける生物学的性状

(IV) 緑膿菌の特定細胞の産生する増殖抑制因子について

小林 寅詰^{1,2)}・長谷川美幸¹⁾・内野卯津樹¹⁾

西田 実^{1,2)}・五島瑛智子²⁾

¹⁾ 三菱油化ビーシーエル・化学療法研究室*

²⁾ 東邦大学医学部微生物学教室

(平成4年11月6日受付・平成5年1月14日受理)

臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 株は serotype およびその他の生物学的性状が異なるコロニーが共存する菌株で、それらのコロニーから抗菌薬感性細胞 (1S) と耐性細胞 (1R) を分離した。1S の培養上清は 128 倍希釈液まで、1R の sub-culture の増殖を抑制した。また 1S 上清は *P. aeruginosa* No. 4 株より分離した 4R, 4S の増殖を強く抑制したが、*P. aeruginosa* No. 2 株の 2S, 2R の増殖には影響を与えなかった。さらに 1S 培養上清液中には、分子量約 20 万の蛋白成分が存在することが SDS-PAGE 電気泳動によって確認された。この蛋白成分が抑制活性を示す本体であるが、pyocin であることは証明できなかった。

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, growth inhibitor, co-existence of drug-susceptible and -resistant cells

我々は、さきに *Pseudomonas aeruginosa* の臨床分離 138 株のコロニーを詳細に検索し、そのうち 48 菌株に形態または色調の異なるコロニーが共存し、さらにその 17 菌株には serotype および β -lactamase 産出能がまったく異なるコロニーが共存することを報告した^{1,2)}。また一部の分離株でみられるこの種の共存コロニーを、多剤耐性細胞と感性細胞に分離した³⁾。このような性状をもつ典型的な菌株である *P. aeruginosa* No. 1 の感性細胞の培養液の上清は、共存する多剤耐性細胞の増殖を抑制することを報告した³⁾。

P. aeruginosa の臨床分離株に異質コロニーが共存する原因と、その意義については現在までに得られた成績をすでに報告した⁴⁾。今回は、一部の *P. aeruginosa* の臨床分離株の増殖抑制因子について検討を加えたのでその結果を報告する。

I. 材料および方法

1) 使用菌株

既報¹⁾のとおり、各種の臨床材料を 5% ヒツジ脱繊維血液寒天培地 (OXOID)、チョコレート培地 (BBL)、CLED 寒天培地 (OXOID)、EG 寒天培地 (栄研) を用い、35°C、18~48 時間培養を行った。培養後 CLED 培地上に発育したコロニーを肉眼的に観

察し、コロニー性状が異なるものを選択し、それらのグラム染色性を確認した後、各種性状試験により *P. aeruginosa* と同定した。

2) 薬剤感受性細胞と耐性細胞の選択

CLED 培地上に発育し、*P. aeruginosa* と同定された各コロニーを Mueller-Hinton broth (Difco) を用いて、それぞれ 37°C、一夜培養し、これらの sub-culture を接種菌液として、piperacillin, cefsulodin, ceftazidime, gentamicin, sisomicin および ofloxacin の各薬剤に対する感受性を日本化学療法学会標準法⁵⁾によって測定した。

3) 培養上清液の調製

P. aeruginosa No. 1 株その他の感性細胞は、Mueller-Hinton broth 中で 37°C、20 時間培養後、培養液を 4°C、5,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し、上清液を 0.45 μ m ミリポアフィルター (ミリポア社) で濾過除菌して用いた。

4) 増殖阻止活性

Micro-titer 用 micro-plate (8×12 穴、三光純薬) 中に、*P. aeruginosa* No. 1 の感受性細胞の培養上清の Mueller-Hinton broth による 2 倍系列希釈液を、それぞれ 100 μ l 分注し、その各上清液に臨床分離 *P.*

* 東京都板橋区志村 3-10-1

aeruginosa の Mueller-Hinton broth による一夜培養液を 10^4 CFU/ml になるよう接種した。これを 35°C , 18 時間培養後、菌の発育の有無を肉眼的に判定した。

5) 増殖抑制活性の安定性

3) で記載した方法により得られた増殖抑制活性を有する 1S 上清を -20°C , 4°C , 室温で放置して経日的に 5 日目までの安定性を、*P. aeruginosa* の耐性細胞に対する増殖抑制効果を指標として求めた。

6) 培養上清中の蛋白の電気泳動

P. aeruginosa No.1 を含む合計 4 株の培養上清を前記の方法で調製し、SDS sample buffer (pH 6.8) で 100°C , 1 分間加熱処理したものを試料とした。泳動ゲルは SDS-PAGE mini (4~12%) (TEFCO) を用い、20 mA, 1 時間泳動した。泳動後、Coomassie Brilliant Blue で蛋白染色を行った。分子量標準マーカーとして、バイオ・ラッド社製の低分子用 (MW 97,400, MW 66,200, MW 45,000, MW 31,000, MW 21,500, MW 14,400) および高分子用 (MW 200,000, MW 116,250, MW 97,400, MW 66,200, MW 45,000) を使用した。

7) pyocin typing 試験

pyocin 様物質の検討は、Gillies & Govan の方法⁶⁾ に準じて行った。すなわち試験株を、シャーレ中の 5% 馬血液加 Trypticase soy agar (BBL) の中央に、上から下へ 1 cm 幅で塗抹し、 32°C で 14 時間培養を行った。発育した試験株をスライドグラスでかきとり、その平板をクロロホルム蒸気で 15 分間殺菌した。クロロホルムを蒸散させ、pyocin 型別指示菌 8 株および 1S, 1R 株を 1 cm 幅の菌発育帯に直角方向に塗抹し、 37°C , 18 時間培養した。培養後、発育阻止帯の有無を肉眼的に判定し、型別を決定した。

II. 実験結果

1. *P. aeruginosa* No.1 の感性細胞培養上清の *P. aeruginosa* 臨床分離株に対する増殖抑制活性

実験の項に記載した方法に従い、*P. aeruginosa* No.1 株の薬剤耐性細胞 (1R), *P. aeruginosa* No.2 株の感性細胞 (2S) および耐性細胞 (2R), No.4 株の 4S および 4R の各 sub-culture の増殖に対する 1S 培養上清の影響を検討した。

Fig. 1 のとおり、1S 上清は当然 1S の増殖にはまったく影響を与えない。しかし 1R の増殖に対しては、128 倍希釈濃度まで抑制作用を示す。2S および 2R の増殖には影響を与えないが、4S および 4R の増殖にはそれぞれ 32 倍および 128 倍まで抑制作用を示す。以上の結果から、*P. aeruginosa* No.1 株の感

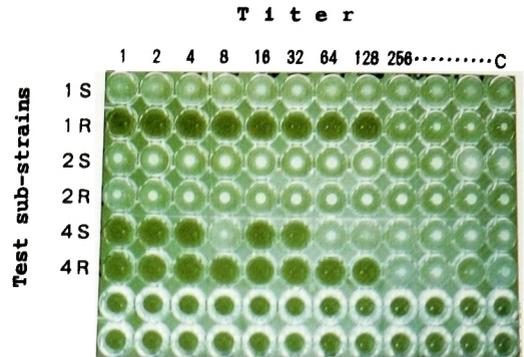


Fig. 1. Growth inhibition of sub-strains from *Pseudomonas aeruginosa* isolates by supernatants of overnight culture of *P. aeruginosa* No. 1-1 S.

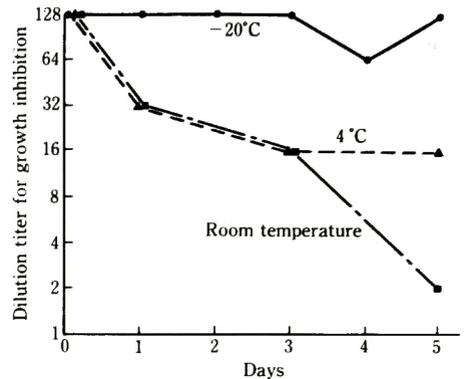


Fig. 2. Stability of growth inhibiting factors in supernatants of overnight culture of *Pseudomonas aeruginosa* No. 1-1 S.

性細胞の培養上清は、同一菌種の特定菌株の増殖に抑制的に作用する。この場合、1S 上清が抑制作用を発揮するため、その対象となる *P. aeruginosa* の菌細胞は、どのような性状を有しているのか現在のところ不明で、引き続き検討が必要である。

2. *P. aeruginosa* 1S 培養上清中の増殖抑制活性の安定性

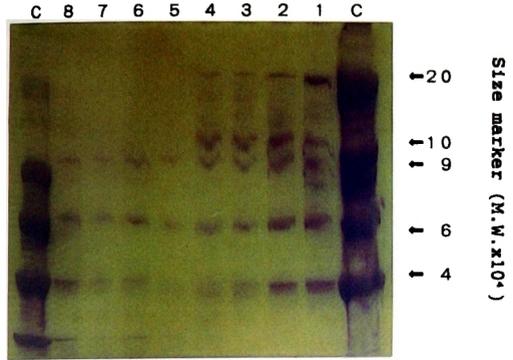
1S 培養上清中の一部の *P. aeruginosa* に対する増殖抑制因子の活性の安定性を、 -20°C , 4°C および室温 (20°C) に 1~5 日間保存後、上清液の活性が認められる希釈倍数の判定によって求めた。

Fig. 2 のとおり、 -20°C の保存では 5 日間は安定に保たれる。しかし 4°C および室温 (20°C) では失活し、その傾向は室温においてより顕著であった。活性

の本体は熱に不安定であることが判明した。

3. 培養上清中の増殖抑制に関与する蛋白性物質の検索

P. aeruginosa No. 1 の 1 S の培養上清に、同菌種に対する増殖抑制活性が認められ、その活性が熱不安定で、経日的に失活することが判明した。この結果は、1S 培養上清中には *P. aeruginosa* の増殖抑制に関与する特異蛋白の存在が示唆された。



C : Size marker
 1, 2 : 1S culture-supernatant
 3, 4 : 4S culture-supernatant
 5, 6 : 1R culture-supernatant
 7, 8 : 4R culture-supernatant

Fig. 3. SDS-Page of proteins in supernatants of overnight cultures of cells selected from *Pseudomonas aeruginosa* No. 1 and 4.

実験の項に記載した方法により、上清中の蛋白成分を検索した。活性を有する 1S 培養上清、ほとんど活性のない 1R, 4S, 4R の培養上清についても同様に検討した。Fig. 3 のとおり、1S 上清には分子量、約 20 万に相当する蛋白成分の存在を示すバンドが認められた。しかし他の 1R, 4S および 4R 培養上清には、この種の蛋白の存在を示すバンドは認められなかった。1S とともに *P. aeruginosa* No. 1 を構成する 1R 上清に、この種の蛋白が認められなかった点が注目される。

4. *P. aeruginosa* 1S 培養上清中の活性物質の pyocin typing

前述のとおり、*P. aeruginosa* 1S および他の臨床分離 *P. aeruginosa* の一部の培養上清中に存在し、同菌種の増殖を抑制する物質が pyocin として分類し得るものであるかどうかを Gillies & Govan の方法に準じて行った。試験菌株として、増殖に対する抑制活性がもっとも強い *P. aeruginosa* 1S の培養上清を用いた。また対照として pyocin type 6 株を用いた。

Table 1 のとおり、*P. aeruginosa* 1S 培養上清は、type 6 株を除く他の指示菌の増殖を抑制した。また 1S 株そのものを試験菌として、pyocin typing 法に準じ阻止帯の形成の有無を検討した。その結果、pyocin type としては type 31 と判定された。この場合、1S 株の上清で抑制されることが認められている *P. aeruginosa* 1R では阻止帯は形成されなかった。

対照とした pyocin type 6 株についても同様な検討を行った。この菌株の培養上清は、指示菌 type 1, 2, 3, 5 株の増殖を抑制した。また阻止帯形成試験では、type 6 と 8 以外の指示菌および *P. aeruginosa* 1S お

Table 1. Inhibitory patterns of *Pseudomonas aeruginosa* 1S and its culture supernatant for eight pyocin producers

Test isolate or type strain	Inhibition	Indicator strain for pyocin typing								Test isolate		Pyocin type
		1	2	3	4	5	6	7	8	1S	1R	
<i>P. aeruginosa</i> 1S isolate Culture supernatant	Inhibitory zone	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Type 31
	Growth inhibition	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
<i>P. aeruginosa</i> type 6 strain Culture supernatant	Inhibitory zone	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Type 6
	Growth inhibition	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	

+: Positive, -: Negative

よび1Rにも阻止帯を形成した。

以上の結果から、*P. aeruginosa* 1Sが培養液中に遊離する同種菌の増殖抑制物質は、pyocinとは性状を異にする蛋白と考える。

III. 考 察

P. aeruginosa の一部の臨床分離株では、serotype その他の生物学的性状の異なる細胞が共存し、さらにそれらの一部の異質細胞間では薬剤感受性が異なり、この種の同一分離菌で薬剤耐性細胞と感性細胞が共存することを報告してきた¹⁻³⁾。

P. aeruginosa の臨床分離株で、異質細胞が共存する原因については、単純に異質の同一菌種の混合感染の可能性も否定できないが、cystic fibrosisの患者の*P. aeruginosa* 感染例では、喀痰中に高率に存在するbacteriophageによるtransductionによるO-抗原構造の変化が認められている^{7,8)}。この問題に関連して、我々も所定の保存培地中における長期保存によるserotypeの変化⁹⁾、および*in vitro*⁴⁾および*in vivo*¹⁰⁾において数種の抗緑膿菌薬によりserotypeが変化することを認めた。このような原因は*P. aeruginosa*の外膜O-抗原構造部のlipopolysaccharides repeating unitのautotransformationまたは抗緑膿菌薬による変化と考えられる。

このような検討とは別に前報において、同一の分離菌より分離した異質の菌細胞のうち、薬剤耐性細胞の増殖が感性細胞によって抑制され、その増殖抑制因子が培養液中に放出されることを報告した³⁾。*P. aeruginosa* No. 1の感性細胞の培養上清中の活性物質の作用は菌種特異的で、*P. aeruginosa*の一部の菌株に作用し、他のブドウ糖非発酵菌を含むグラム陰性菌の増殖には影響を与えない³⁾。また*P. aeruginosa* No. 1の感性細胞の培養上清は、この種の増殖抑制作用以外に、*P. aeruginosa*の一部の臨床分離株のserotypeの変化を誘発する⁹⁾。このserotypeの変化も上記のようにlipopolysaccharideのO-抗原構造部の変化が、培養上清によって生ずるためと考えている。一方、増殖抑制活性は前述のとおり*P. aeruginosa* No. 1株の薬剤耐性細胞以外の*P. aeruginosa* 臨床分離菌でも認められ、この種の活性の有無は産生細胞の薬剤感受性とは関係がない。

活性物質は分子量約20万の蛋白性物質であること以外、詳細は未検討である。ただ従来よりの知見として、*P. aeruginosa*は同種または近縁の細菌に殺菌的に作用するpyocinを産生し^{11,12)}、pyocin感受性菌のpyocin receptorに吸着され、殺菌作用を発揮することが知られている。本報の実験結果によれば、*P.*

aeruginosa No. 1株の感性細胞の培養上清中の活性物質は、Gillies & Govan法で分類し得るpyocinとは判定できなかった。しかし一種のbacteriocinと推定される。

同一菌種の、同一の分離菌が異質のコロニーを形成することは、*P. aeruginosa*の場合、heterogenous cell populationとして理解されるかも知れない。しかし本報の結果では、*P. aeruginosa*で、共存細胞の一方が他方の細胞の増殖を抑制することが確認された。このような*in vitro*における現象が、この種の病原菌による感染の成立と経過で相互にどのように影響するか、またはhostにどのような影響を与えるか、さらに化学療法により両群細胞の共存がどのように影響を受けるか、などの問題があり、引き続き検討中である。

文 献

- 1) 小林寅詔, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 西田 実, 五島 聡智子: 各種の臨床分離菌のコロニーレベルにおける生物学的性状と薬剤感受性, (II) 緑膿菌について。Chemotherapy 39: 753~760, 1991
- 2) 小林寅詔, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 金山明子, 西田 実, 五島聡智子: 臨床分離緑膿菌に共存する異質コロニーについて、コロニー形態および生物学的性状と薬剤感受性との関連性。臨床と微生物 19: 97~101, 1992
- 3) 小林寅詔, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 西田 実, 五島 聡智子: 各種の臨床分離菌のコロニーレベルにおける生物学的性状, (III) 緑膿菌の単一菌株に共存する感性細胞による多剤耐性細胞の増殖抑制。Chemotherapy 40: 721~726, 1992
- 4) 小林寅詔, 長谷川美幸, 宮崎修一, 西田 実, 五島聡智子: 各種の抗緑膿菌薬による*Pseudomonas aeruginosa*の血清型変化について。感染症学雑誌 66: 1572~1579, 1992
- 5) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 6) Gillies R R, Govan J R W: Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocin production. J Pathol Bacteriol 91: 339~345, 1966
- 7) Lanyi B, Lantos J: Antigenic changes in *P. aeruginosa* in vivo and after lysogenisation in vitro. Acta Microbiol Acad Sci Hung 23: 337~351, 1976
- 8) Tejedor C, Foulds J, Zasloff M: Bacteriophages in sputum of patients with bronchopulmonary *Pseudomonas* infection. Infection and Immunity 36: 440~441, 1982
- 9) 小林寅詔, 長谷川美幸, 宮崎修一, 西田 実, 五島聡智子: 臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* の血清型の変化に対する各種要因の影響。臨床と微生物 19: 807~811, 1992

- 10) 長谷川美幸, 小林寅詔, 宮崎修一, 西田 実, 五島遼智子: 臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* に共存する感性細胞による耐性細胞の増殖抑制, *In vitro* と *In vivo* の相関について。第 39 回日本化学療法学会 東日本支部総会発表, 1992 年 11 月, 東京
- 11) Govan J R W: Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, production of contractile and flexuous pyocins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microb* 80: 17~30, 1974
- 12) Ito S, Kageyama M, Egami F: Isolation and characterization of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen & Sppl Microb* 16: 205~214, 1970

Biological characteristics of clinically isolated bacteria at colony levels

IV Growth-inhibiting factors produced by cells of *Pseudomonas aeruginosa* No. 1

Intetsu Kobayashi^{1,2)}, Miyuki Hasegawa¹⁾, Shuichi Miyazaki²⁾,
Minoru Nishida^{1,2)} and Sachiko Goto²⁾

¹⁾ Chemotherapy Division, Mitsubishi-Yuka Bio-Clinical Laboratories, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University

Drug-susceptible cells (1 S) and -resistant cells (1 R) were isolated from *Pseudomonas aeruginosa* No.1, a typical isolate, forming colonies different in serotypes and other biological characteristics. The supernatant fluid of the overnight culture of *P. aeruginosa* 1 S inhibited the growth of *P. aeruginosa* 1 R completely at a 128-fold dilution, and inhibited that of 4 R and 4 S isolated from *P. aeruginosa* No.4, but did not affect that of 2 R and 2 S from *P. aeruginosa* No.2. A protein component (M.W. about 2×10^5) was detected in the supernatant fluid of the overnight culture of 1 S, and is considered to be an active substance that inhibits growth.