

緑膿菌バイオフィームに対する clindamycin の影響

一宮 朋来・竹岡 香織・山崎 透・那須 勝
大分医科大学医学部第二内科*

(平成7年2月9日受付・平成7年5月8日受理)

緑膿菌性慢性気道感染症の難治化の要因とされる biofilm 形成に対する clindamycin (CLDM) および erythromycin (EM), tobramycin (TOB), piperacillin, ceftazidime, ofloxacin の影響を *in vitro* にて検討した。Biofilm 形成の指標として、緑膿菌産生のアルギン酸と菌体外多糖類を定量的に測定した。緑膿菌ムコイド株のアルギン酸産生量は、普通寒天培地上で産生されたアルギン酸を高速度液体クロマトグラフィーにて定量し、非ムコイド株の菌体外多糖類 (glycocalyx) は、シリコン片上に形成させた biofilm 中の多糖類をトリプトファン法により定量化した。それぞれにつき最小発育阻止濃度以下の濃度 (sub-MIC) 作用下での影響を検討した。アルギン酸産生は CLDM $\geq 1/64$ MIC, EM $\geq 1/256$ MIC, TOB $1/4$ MIC において ($P < 0.02$), glycocalyx 産生は CLDM $\geq 1/16$ MIC, EM $\geq 1/16$ MIC にて有意に産生抑制が認められた ($P < 0.05$)。他の抗菌薬の sub-MIC はまったく影響を与えなかった。走査型電子顕微鏡による観察においても CLDM の sub-MIC 作用下にて biofilm の産生が抑制される像が得られた。以上より、CLDM は、EM と同様に sub-MIC において緑膿菌 biofilm 形成を抑制することが示唆された。

Key words: 緑膿菌, biofilm, CLDM

緑膿菌性慢性気道感染症の難治化の要因として、気道局所における緑膿菌の biofilm 形成が着目されている¹⁻³⁾。抗菌薬に感受性を示す緑膿菌においても、いったん biofilm が形成されるとそれが防御的に作用し、除菌されない場合が少なくない^{4,5)}。

慢性気道感染症の治療および難治化の予防のためには、biofilm 形成の前段階としての菌体外多糖類、いわゆる glycocalyx 産生を抑制することが重要と考えられる。ムコイド型緑膿菌の産生する glycocalyx は、ウロン酸のポリマーであるアルギン酸で構成されている⁶⁾。また、非ムコイド型緑膿菌は、菌体外にグルコース、フルクトースなどの多糖類を主成分とするポリマーである glycocalyx を産生し、菌の付着および局所でのマイクロコロニー形成に重要な役割を果たしている⁷⁾。

今回の研究は、ムコイド型緑膿菌についてはムコイド物質の主成分であるアルギン酸を、非ムコイド型緑膿菌については菌体外多糖類の産生量を最小発育阻止濃度以下の濃度 (sub-MIC) の clindamycin (CLDM) の存在下と非存在下で定量化し、他の5種の抗菌薬についても同様に検討を加え比較した。CLDM は erythromycin (EM) と同様に緑膿菌の glycocalyx 産生を抑制することが明らかとなったので、若干の考察を加え報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

ムコイド型緑膿菌は当科入院の気管支拡張症患者の喀痰より分離された臨床分離株 *Pseudomonas aeruginosa*

OMU 91008 を、非ムコイド型緑膿菌は、教室保存の *P. aeruginosa* PAO 2001-2 (pili 保有株)⁸⁾ を使用した。MIC 測定は、ムコイド株については日本化学療法学会規定の寒天平板希釈法にて測定し、非ムコイド株については同学会規定の微量液体希釈法にて測定した⁹⁾。

2. 使用抗菌薬

CLDM, EM, piperacillin (PIPC), ceftazidime (CAZ), tobramycin (TOB), ofloxacin (OFLX) の6薬剤を用いた。使用菌株に対する MIC は Table 1 に示す。

3. 使用培地

ムコイド株は、Mian¹⁰⁾ による alginate-promoting (AP) medium に 4°C に保存し、使用時に 5% のグリセロールを含む MacConkey 寒天培地 (栄研) に接種した。非ムコイド株は AP medium に 0.3 M NaCl を加え高浸透圧条件としたもの (modified AP medium) を

Table 1. MICs of antimicrobial agents to *Pseudomonas aeruginosa* OMU 91008 (mucoid type) and PAO 2001.2 (non-mucoid type)

Antimicrobial agent	MIC (mg/l)	
	OMU 91008	PAO 2001.2
Piperacillin	0.039	3.13
Ceftazidime	0.20	1.56
Tobramycin	0.78	0.78
Ofloxacin	0.78	1.56
Erythromycin	400	200
Clindamycin	800	800

* 大分県大分郡狭間町医大ケ丘 1-1

使用した。

4. Sub-MIC の濃度系列

薬剤濃度は、1 MIC より 2 ないし 4 倍希釈を行い、1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 MIC および薬剤不含のコントロールにて行い、それぞれの sub-MIC を含む 5 培地での産生量の平均値を算出した。

5. ムコイド株を用いたアルギン酸定量実験

MacConkey 寒天培地上のムコイドコロニーより Mueller Hinton (MH) broth (Difco) に接種したムコイド型緑膿菌を 37°C 6 時間培養した後、滅菌した pH 7.2 緩衝生理食塩水 (以下 PBS) にて 10^8 CFU/ml に希釈し、その 0.1 ml を各種抗菌薬の sub-MIC 濃度を含む普通寒天培地 (栄研) に接種した。24 時間培養後、培地上のムコイドコロニーを PBS にて懸濁し、一部は 10 倍希釈培養法にて菌数計算を行った。横井山ら¹¹⁾、豊田ら¹²⁾ の方法に従い懸濁液に硫酸銅溶液を加え、沈殿物をアンモニア水で溶解した後、ナフトレゾルシノール (和光) にて呈色し、酢酸ブチル抽出したものを高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC, 島津製作所 C-R 4 A) にて定量を行った。

6. 非ムコイド株を用いた glycolyx 定量実験

MH broth にて非ムコイド型緑膿菌を 37°C にて 6 時間培養し、これに 1 cm×2 cm のシリコン片を入れ 30 分静置した後、PBS で 3 回洗浄し緑膿菌付着片とした。これを各種の抗菌薬の sub-MIC を含んだ modified AP medium にて 37°C 3 日間培養し、glycolyx 産生菌とした。

測定可能な glycolyx を得るために 1 検体当たり 15 枚のシリコン片 (60 cm²) 付着菌から多糖類のエタノール抽出を行った。すなわち、PBS 5 ml 中にシリコン片を入れ菌体を破壊しない強さで 5 分間 sonication し、付着菌を PBS 中へ遊離させて懸濁させ、その後シリコン片を除いた。一部の懸濁液を希釈法にて菌数を算出した。Dall ら¹³⁾、Shetlar ら¹⁴⁾ の方法に従い、シリコン片 15 枚分の懸濁液にエタノールを少量ずつ加えアルコール濃度 35% にし、遠心して菌体を除き、さらに 45% エタノールを追加して、多糖類を沈殿させた。沈殿物は硫酸中でトリプトファンと加熱し呈色させ、波長 505 nm にて吸光度 (UV-120-01, 島津製作所) を測定した。

7 電子顕微鏡による観察

定量実験と同様の方法で作成したムコイド株の培地上のコロニー、および非ムコイド株のシリコン片付着菌は、2.5% glutaraldehyde と 8% tannic acid を含む 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) (以下 CB) および 1% osmium tetroxide を含む 0.1 M CB にて固定し¹⁵⁾、エタノール脱水、 γ -ブチルアルコール凍結乾燥、金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (日立 S-800) にて観察した。

8. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差にて示した。統計処理は non-paired *t*-test を用い、危険率 0.05 以下を有意差ありと判定した。

II. 成 績

1. HPLC によるアルギン酸の定量

コントロールとして既知の濃度の alginic acid (Sigma) の HPLC による成績を Fig. 1 に示した。アルギン酸は、保持時間 6 分にて溶出され、このピーク面積はアルギン酸の濃度と良好な相関性を示した。今回用いたムコイド株が産生したアルギン酸の HPLC による成績は、コントロールと同様に、6 分でピークを認めた。以下このピーク面積をアルギン酸産生量の指標とし、アルギン酸産生量は log 菌数当たりのピーク面積として表現した。

2. 吸光度計による glycolyx の定量

コントロールとして各濃度のデキストラン (和光) 溶

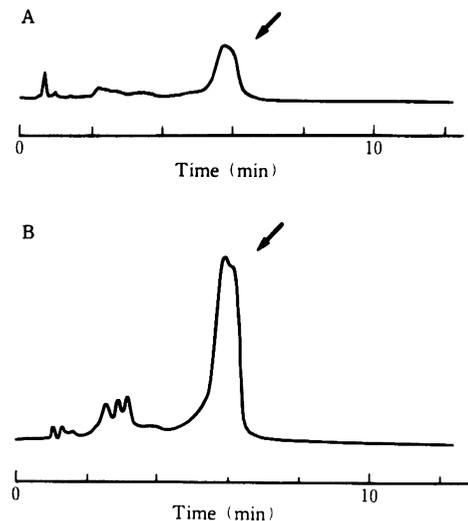


Fig. 1 Chromatograms of alginic acid. (A): Chromatogram of alginic acid solution (100 mg/l). The peak area of alginic acid was found within the 6 min retention time (arrow). (B): Chromatogram of alginic acid production by *Pseudomonas aeruginosa* OMU 91008. The peak area was found to be similar to (A) (arrow).

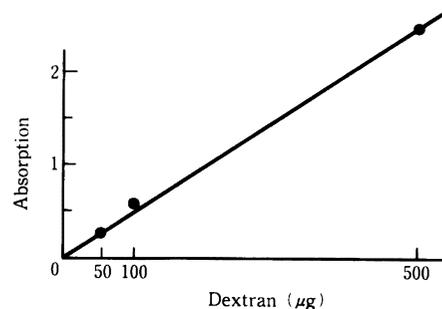


Fig. 2 Quantitative tryptophan assay with dextran solution showed a good correlations between concentration and absorbance.

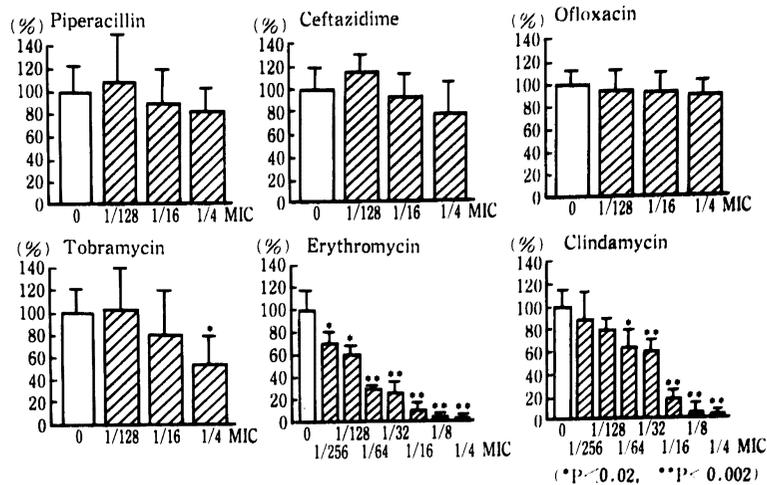


Fig. 3 Alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* OMU 91008 at subinhibitory concentrations of antimicrobial agents.

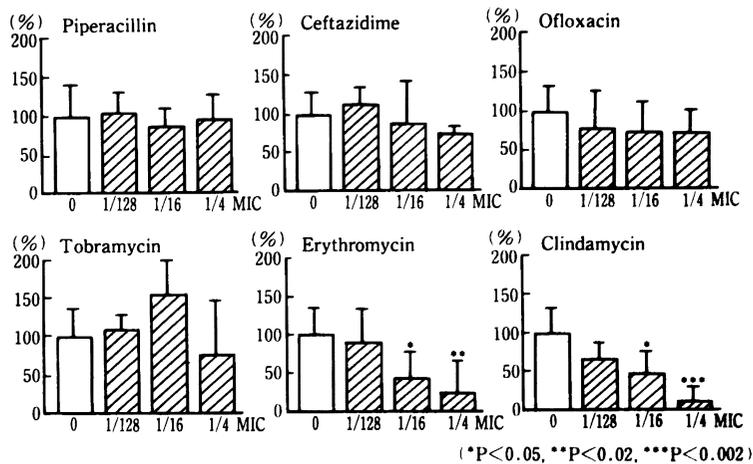


Fig. 4 Glycolyx production by *Pseudomonas aeruginosa* PAO 2001-2 at subinhibitory concentrations of antimicrobial agents.

液を用い検量線を作製したところ、デキストラン量と吸光度は良好な相関性を示した (Fig. 2)。

3. アルギン酸産生におよぼす抗菌薬の影響

薬剤無添加群のアルギン酸産生量を 100% とした場合、CLDM $\geq 1/64$ MIC にて有意な産生抑制が認められた ($P < 0.02$)。EM $\geq 1/256$ MIC, TOB $1/4$ MIC 濃度においても有意なアルギン酸産生抑制が認められた ($P < 0.02$)。PIPC, CAZ, OFLX の各 sub-MIC 濃度では薬剤無添加群との間に産生性の差はみられなかった (Fig. 3)。

4. Glycolyx 産生におよぼす抗菌薬の影響

薬剤無添加群の菌体外多糖類産生量を 100% とした場合、CLDM $\geq 1/16$ MIC, EM $\geq 1/16$ MIC にて有意に多糖類の産生抑制が認められた ($P < 0.05$)。PIPC, CAZ, TOB, OFLX では薬剤無添加群との間に産生性の差はみられなかった (Fig. 4)。CLDM をさらに細かく検討し、10 日間の培養において $20 \mu\text{g/ml}$ にて有意に抑制し

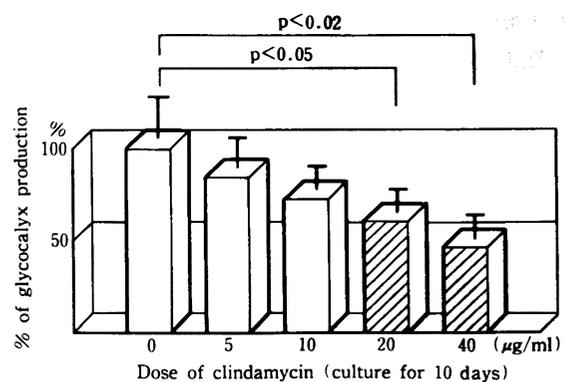


Fig. 5 Effect of sub-MICs of clindamycin on glycolyx production.

た (Fig. 5)。

5. 電子顕微鏡所見

1) ムコイド株のアルギン酸産生所見

走査型電子顕微鏡では、抗菌薬を加えない場合、菌体

はムコイド物質産生による顆粒状構造物の中に埋没して観察された (Fig. 6 A)。CLDM の 1/4 MIC を作用させた場合、菌体表面構造物の減少が認められ、ムコイド物質産生抑制が示唆された (Fig. 6 B)。

2) 非ムコイド株の glycocalyx 産生所見

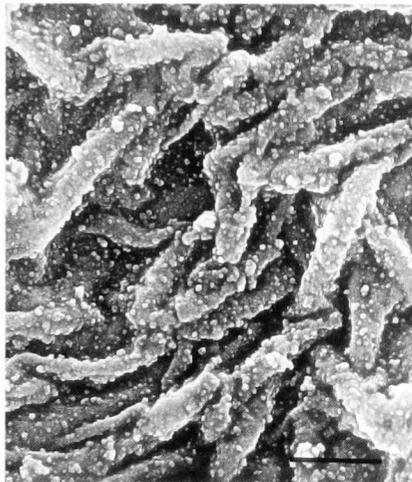
抗菌薬を加えない場合、3日間培養したシリコン片付着菌では、菌体表面が粗造となり、菌体自身は菌体外の網状、顆粒状の物質中に埋まっている状態で観察され、biofilm 形成が認められた (Fig. 7 A)。CLDM 1/4 MIC 作用下では、菌体外の構造物は著明に減少し、glycocalyx 産生抑制による biofilm 形成の抑制が示唆された (Fig. 7 B)。

III. 考 察

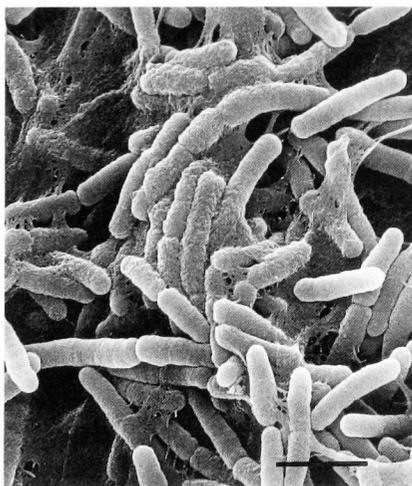
慢性気道感染症患者よりしばしば分離されるムコイド型緑膿菌は、菌体よりアルギン酸を主成分とする粘性物

質を産生し、菌の付着能を亢進させるとともに¹⁶⁾好中球やマクロファージによる食菌作用を阻止し^{17,18)}、さらに抗菌薬に対し抵抗性を示すことも報告されている¹⁹⁾。一方、非ムコイド株においても慢性気道感染症の難治化の要因として biofilm 形成が注目されている^{20~24)}。すなわち、慢性気道感染症成立の初期段階として、まず菌が粘膜面へ付着し、そこで菌は菌体外多糖類、いわゆる glycocalyx を産生し、これを介して細菌は凝集し、細菌は微少コロニーを形成する^{1,25)}。さらに生体内では周囲にフィブリンが蓄積し、食細胞、赤血球等を取り込み強固な biofilm が形成される²⁶⁾。

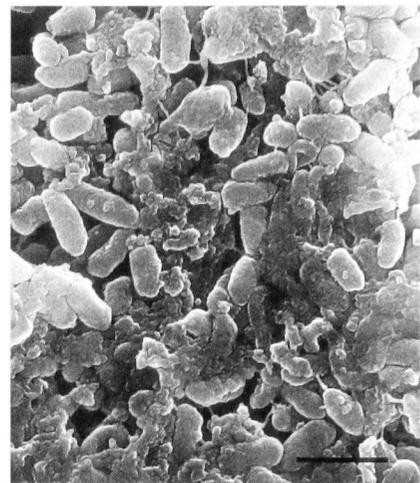
今回は、慢性気道感染症の難治化の要因といえる biofilm 形成について、*in vitro* にて緑膿菌ムコイド株の産生するアルギン酸、および非ムコイド株が産生する glycocalyx の産生性について CLDM および各種の抗



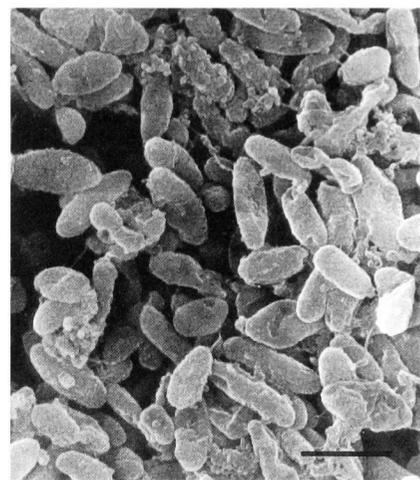
A



B



A



B

Fig. 6 On a picture of non-antimicrobial control groups of *Pseudomonas aeruginosa* OMU 91008 (A), the bacteria produced many granulous-structured mucoid substances extra-cellularly. On a picture of clindamycin under the 1/4 MIC (B), the mucoid substances were found to be decreased (bar=2 μ m).

Fig. 7 On a picture of non-antimicrobial control groups of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 2001.2 (A), the bacteria were found to be embedded in the glycocalyx layers. On a picture of clindamycin under the 1/4 MIC (B), the glycocalyx was found to be decreased (bar=2 μ m).

菌薬の影響を検討した。

ムコイド型緑膿菌は臨床では cystic fibrosis 患者にて高頻度に検出され、予後不良因子とされているが²⁷⁻²⁹⁾、わが国ではびまん性汎細気管支炎、その他の慢性気道感染症にてみられ、難治性の要因となっている。ムコイド型緑膿菌は、患者から分離された後、継代培養を繰り返すことにより容易に非ムコイド株へと変異していくが、逆に非ムコイド株からムコイド株への変異は *in vitro* では起こり難い。Terry ら²⁸⁾ は *in vitro* にて緑膿菌がムコイド変異を起こす条件として、高浸透圧条件や phosphorylcholine の存在を報告している。我々の非ムコイド株の glycocalyx 産生実験においては高浸透圧の broth を使用した。これは、予備実験においてこの条件下においてもっとも glycocalyx を産生したからであるが、今回の実験では非ムコイド株からムコイド変異株への出現は認めず、アルギン酸の産生も認められなかった。

緑膿菌ムコイド株の産生するムコイド物質の大部分がアルギン酸と言われている^{6,30)}。一方非ムコイド株の産生する glycocalyx の成分は複数の多糖類よりなり、その構成や成分比等の詳細はまだ明らかではない。本実験における培養シリコン片より超音波処理によって分離した附着菌は、走査型電子顕微鏡にて菌体が破壊されていないことが確認され、また生菌数の減少も認められなかったので、本実験系は菌体外多糖類のみを分離することができ、glycocalyx の産生量を定量するうえで有用な方法と考えられた。

抗菌薬の緑膿菌菌体外産生物質に対する影響では、sub-MIC 濃度の作用下にて緑膿菌外毒素産生能抑制の報告がなされている³¹⁻³⁴⁾ が、アルギン酸や多糖類産生性に対する影響については、Trancassini ら³³⁾ は sub-MIC の β ラクタム剤とキノロン剤にて alginate の産生が著明に抑制することを報告している。さらに Verginia ら³⁵⁾ は *Bacteroides* 属菌において CLDM を接触させると glycocalyx 産生抑制がみられ、好中球貪食作用が亢進されることを報告した³⁵⁾。横井山¹¹⁾ は rokitamycin (RKM) がアルギン酸産生を抑制することを報告している。

我々の成績では、CLDM はマクロライド系薬と同様に 1/256 MIC から 1/64 MIC の低濃度 (1.56~12.5 μ g/ml) において有意にアルギン酸産生を抑制し、1/16 MIC (12.5~50 μ g/ml) において非ムコイド株の菌体外多糖類産生も有意に抑制した。これらの抗菌薬の濃度は、ヒトにおける体内動態において肺に到達しうる濃度である。TOB も 1/4 MIC 以上で有意なアルギン酸産生抑制は示したが、PIPC, CAZ および OFLX は抑制作用は示さなかった。

以上、緑膿菌のアルギン酸および菌体外多糖類である glycocalyx 産生に対して CLDM は EM と同様にその産生を抑制することが示された。これらは細菌蛋白合成

阻害作用を示す薬剤であることから、菌体外多糖類産生酵素の阻害作用が考えられる。

本論文の要旨は、第 40 回日本化学療法学会西日本支部総会、第 40 回日本化学療法学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 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. *Ann. Rev. Microbiol* 41: 435~464, 1987
- 2) Prosser L T, Taylor B D, Dix B A, Cleeland R: Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1502~1506, 1987
- 3) Warren J W, Muncie H L, Berquist E J, Hoppes J M: Sequelae and management of urinary infection in the patient requiring chronic catheterization. *J. Urol* 125: 1~8, 1981
- 4) Anwar H, Biesen T V, Dasgupta M, Lam K, Costerton J W: Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel *in vitro* chemostat system. *Antimicrob. Agents Chemother* 33: 1824~1826, 1989
- 5) Anwar H, Dasgupta M, Lam K, Costerton J W: Tobramycin resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm grown under iron limitation. *J. Antimicrob. Chemother* 24: 647~655, 1989
- 6) Linker A, Jones R S: A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 241: 3845~3851, 1966
- 7) Costerton J W, Geesey G G, Cheng K J: How bacteria stick. *Sci Am* 238: 86~95, 1978
- 8) Bradley D E: A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can. J. Microbiol.* 26: 146~154, 1984
- 9) 五島瑛智子, 徐慶一郎, 河喜多竜祥, 小酒井望, 三橋進, 西野武志, 大沢伸孝, 田波 洋: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 10) Mian F A, Jarman T R, Righelato R C: Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 134: 418~422, 1978
- 11) 横井山繁行: ムコイド型緑膿菌に対するマクロライド系薬剤の作用。 *感染症誌* 64: 1439~1446, 1990
- 12) 豊田正武, 四方田千佳子, 伊藤誉志男, 原田元夫: 高速液体クロマトグラフィーによる食品中のアルギン酸ナトリウムの分析法。 *食衛誌* 26: 189~194, 1985
- 13) Dall L, Herndon B: Quantitative assay of glycocalyx produced by viridans group streptococci that cause endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2039~2041, 1989
- 14) Shetlar M R, Foster J V, Everett M R: Determination of serum polysaccharides by the tryptophan reaction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67: 125~130, 1948
- 15) Takumida M, et al: Effect of acoustic overstimulation on the glycocalyx and the ciliary interconnections in the organ of Corti: High resolution scanning electron microscopic investigation. *J. Laryngo. Oto.* 103: 1125~1129, 1989

- 16) Ramphal R, Pier G B: Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infect. Immun.* 47: 1~4, 1985
- 17) Schwarzmann S, Boring J R: Antiphagocytic effect of slime for a mucoid strain *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 3: 762~767, 1971
- 18) Baltimore R S, Michell M: Immunologic investigation of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of susceptibility to opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains. *J. Inf. Dis.* 141: 238~247, 1980
- 19) Govan J R W, Fyfe J A M: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: resistance of the mucoid form to carbenicillin, flucloxacillin, and tobramycin and the isolation of the mucoid variants in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 4: 233~240, 1978
- 20) Hoyle B D, Jass J, Costerton J W: The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 1~6, 1990
- 21) Jensen E T, Kharazmi A, Hoiby N, Costerton J W: Some bacterial parameters influencing the neutrophil oxidative burst response to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS.* 100: 727~733, 1992
- 22) Costerton J W, Lam J, Lam K, Chan R: The role of the microcolony mode of growth in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Rev. Infect. Dis.* 5 Suppl 5: S 867~873, 1983
- 23) Costerton J W: The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev. Infect. Dis.* 6 Suppl 3: S 608~616, 1984
- 24) Bergan T: Pathogenetic factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* 29: 7~21, 1981
- 25) Costerton J W, Irvin R T, Cheng K J: The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 299~324, 1981
- 26) Buret A, Ward K H, Olson M E, Costerton J W: An in vivo model to study the pathobiology of infectious biofilms on biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 25: 865~874, 1991
- 27) Lam J, et al: Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 28: 546~556, 1980
- 28) Terry J M, Pina S E, Mattingly S J: Environmental conditions which influence mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1. *Infect. Immun.* 59: 471~477, 1991
- 29) Pedersen S S, Hoiby N, Espersen F, Koch C: Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibroi. *Thorax.* 47: 6~13, 1992
- 30) Evans L, Linker A: Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 116: 915~924, 1973
- 31) Grimwood K, To M, Rabin H R, Woods D E: Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme expression by subinhibitory antibiotic concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 41~47, 1989
- 32) Ogaard A R, Bjoro K, Bukholm G, Berdal B P: *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors: modifications by sub-inhibitory concentrations of carbenicillin or gentamicin. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B.* 84: 63~68, 1986
- 33) Trancassini M, Brenciaglia M I, Ghezzi M C, Cipriani P, Filadoro F: Modification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by sub-inhibitory concentrations of antibiotics. *J. Chemother.* 4: 78~81, 1992
- 34) Geers T A, Baker N R: The effect of sublethal levels of antibiotics on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* for tracheal tissue. *J. Antimicrob. Chemother.* 19: 569~578, 1987
- 35) Verginia E M, et al: The role of glycocalyx in surface phagocytosis of bacteroides spp., in the presence and absence of clindamycin. *Antimic. Chem.* 2: 71~720, 1989

Effect of clindamycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation

Tomoku Ichimiya, Kaori Takeoka, Tohru Yamasaki and Masaru Nasu
The Second Department of Internal Medicine, Oita Medical College, 1-1 Idaigaoka,
Hazama-cho, Oita-gun, Oita-ken 879-55, Japan

An *in vitro* study was conducted on the effects of clindamycin (CLDM), erythromycin (EM), tobramycin (TOB), piperacillin (PIPC), ceftazidime (CAZ) and ofloxacin (OFLX) on biofilm formation, which is considered to be a contributing factor to the intractability of chronic respiratory infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Alginate acid and extracellular polysaccharides produced by *P. aeruginosa* were determined as indices reflecting the level of biofilm formation. Alginate acid production by *P. aeruginosa* mucoid strains was investigated by determining alginate acid produced in standard agar culture medium using high performance liquid chromatography. Extracellular polysaccharide (glycocalyx) produced by non-mucoid strains was quantified by determining polysaccharides contained in biofilms formed on silicon strips using the tryptophan method. The effects of the antibiotics on these indices at concentrations below the minimum inhibitory concentration (sub-MIC) were investigated. The production of alginate acid was significantly inhibited at CLDM $\geq 1/16$ MIC, EM $\geq 1/128$ MIC and TOB $\geq 1/4$ MIC ($p < 0.02$), and that of glycocalyx at CLDM $\geq 1/16$ MIC and EM $\geq 1/16$ MIC ($p < 0.05$). The indices were not affected by other drugs at sub-MIC concentrations. Observations under a scanning electron microscope showed inhibition of biofilm formation by CLDM at sub-MIC concentrations. These results suggested that CLDM as well as EM inhibit *P. aeruginosa* biofilm formation at sub-MIC concentrations.