

細菌 biofilm に関する基礎的ならびに臨床的研究

小林 宏 行

杏林大学医学部第一内科学教室*

(平成 9 年 9 月 27 日受付 平成 9 年 10 月 23 日受理)

第 45 回日本化学療法学会総会 平成 9 年 6 月 12 日 (会長: 齋藤 篤, 司会: 紺野昌俊)

Key words: 細菌バイオフィーム, バイオフィーム形成, アルギネート免疫反応, BPI-ANCA

およそ 10 年ほど前のことであります。1 人の患者さんがおりました。

この方は肺結核後遺症として気管支拡張が残存し、いつのころからか緑膿菌が付着し、いろいろな抗菌剤をいろいろな方法で用いても菌は除菌されず、感染症状は反復し、その都度呼吸機能が低下し、徐々に徐々に病状が進展するという経過をたどっておりました (Fig. 1)。

ある時この患者さんから、「先生、私は先生が効く効くという薬をつかっても、なぜ菌が消えないのでしょうか」という質問をうけました。しかしながらこの質問に対する正確な回答を私どもは持ち合わせていなかったわけでありました。と申しますのは、気道の緑膿菌感染症は除菌が困難であり、難治性であることなどがすでに教科書レベルでも記されており、私どももこのことをうのみにし、なんら疑問をいだくことなく日常の診療や教育にあたっていたわけでありました。

しかしながら、一步考えてみますと、このことは、MIC の上からは当然効果が期待できる薬でも除菌がで

きない、つまり効くはずの薬が効かないということであり、この狭間をうめる black box がわからなかったのであります。私どもの仕事は、このようなベッドサイドにおける患者さんの疑問に答えるべくはじまったのであります。

そこで、早速この患者さんの気道内における緑膿菌の生態を探索しようと試み、その日の午後研究室にいた武田君を誘い、気管支ファイバーを用いて、病巣部の擦過標本をとってまいりました。この患者さんの気道表面における単個の緑膿菌です (Fig. 2)。あとでわかったことですが、菌は周辺に alginate を産生し、これを介して隣接した菌は互に凝集し、いわゆる biofilm を形成して気道表面に強く付着しております (標本作製 谷尾知治氏)。当時我々はこの多糖体を glycocalyx と呼んでおりましたが、この多糖体は免疫染色で抗 alginate 抗体で強く染色されることから、近年 algi-

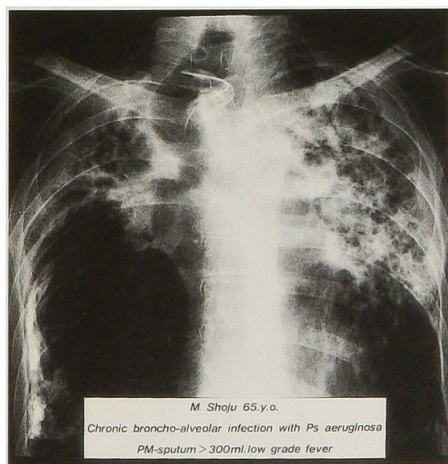


Fig. 1. A case of airway biofilm disease with *Pseudomonas aeruginosa*. He had post-tuberculous bronchiectasia on both lung.

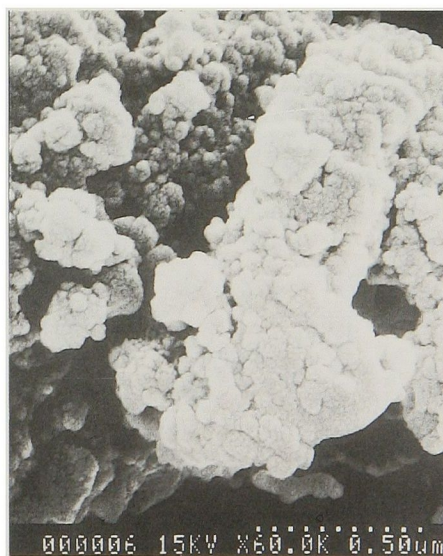


Fig. 2. High power view ($\times 150,000$) of a single strain of *Pseudomonas aeruginosa* inside biofilm on airway epithelium.

nate という言葉を用いております。

さて、当初この写真を 2~3 の細菌学者にみていただきましたが、いずれも「菌とはいえない、何か粘液にくるまったゴミかも知れない」との答えでした。考えてみますと、少なくとも医学微生物の研究は、Pasteur 以来でございしますが、「培地」というその菌にとって栄養環境がもっともすぐれた条件で生育された菌を対象として主としてなされ、かつまた当時細菌学の先端的研究は遺伝子レベルへと展開されていたわけでありませぬ。かかる背景にあつて、生体の中で姑息に生きている菌の形態などには興味がなかったのかも知れませぬ。

そこで、私どもは培地以外の環境、つまり natural home における菌の生息状態を知るべく、富士山や多摩川の源流、下水管や医療器具の表面などいろいろな場所からの菌を採取し、観察いたしました。

これは、ある川床の石に付着している菌の様相ですが、緑膿菌もおります（標本作製 谷尾知治氏）。このように菌は石の表面に biofilm を形成し強く付着し生息している姿が自然界ではほぼ共通してみられ、本質的にはさきの気道表面におけるそれと変わりありませんでした (Fig. 3)。

つまり、自然界のような栄養条件がきびしい環境にあつては、細菌は周辺に多糖体を産生し、これを介してたがいが凝集し、かつ何かに付着して生きていく、つまり皆でよりそって生きて行けば怖くないという動物的本能までが伺える感じでした。

このようなヒントから試験管内での biofilm 形成を試みました。簡単にできたわけでありませぬ。栄養 poor という設定から生理的食塩水をこれに満ちし、付着対象物としてテフロン片をつり糸で垂らしておきます。

これに培地からとりたての緑膿菌を加えますと、1 日



Fig. 3. Bacterial biofilm on a stone in a stream.

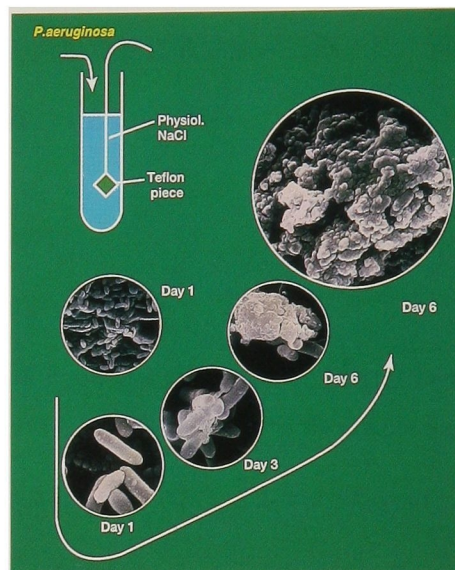


Fig. 4. Process of an experimental biofilm with *Pseudomonas aeruginosa*.

後に菌はそのままの形でテフロン片に付着し、3 日後に alginate 産生が始まり、6 日後にそれが増加し、互いの菌は凝集しテフロン表面に見事な biofilm が形成されませぬ (Fig. 4)。

さきほどの結果と合わせて、細菌の biofilm 形成は、細菌が自己の生息にとって不利な環境におかれた場合細菌自身の生命維持を目的とした適応形態ということが出来ます。

地球物理学者であるラモンド博士は、バクテリアが付着能を持つようになったのはおよそ 35 億年前と推定しております。つまりそれまでは海に漂うだけの不安定ないわば homeless な生物でありましたが、岩などに付着することにより居住圏を得てより確実にその生命を保つようになったと述べております。そして、さらにこの付着を強固にするため周辺に多糖体を産生することを覚えたものと推測出来ます。

つまり、ここに細菌のもつ adaptation とその有利な点を継代するという selection がみられるわけでありませぬ。この点において薬剤耐性の獲得と類似した適応現象とも考えられ、このような環境適応性は微細で単純な生物ほどすみやかに発現されると分子生物学者は述べております。

さて、biofilm bacteria の場合の variation と selection, すなわち alginate 産生とその維持という事象は、まず virulence の低下、すなわち少なくとも種々の virulent factor は biofilm membrane のためか周辺への放出は減少し、かりに動物に biofilm 菌を静注しても菌は長く存続いたしますが発症はみられませぬ (中川朋幸)。

また外界からの攻撃物質は biofilm 中へ十分量が透過せず、抗菌剤の場合は感受性があるにもかかわらず菌

が除菌されないという臨床的事象につながります（武田博明，大垣憲隆）。このことは、さきの患者さんの質問に対する適切な解答と考えられますが、この成績を得たとき、すでにその患者さんは死亡しておりました。

さらに好中球などの食細胞に対しても alginate は、blocking barrier となり、食細胞内の Ca^{++} チャンネルを block し、その結果食細胞表面の C3b receptor やその他の receptor の発現を抑制し、この結果、好中球は走化性・活性化とも抑制されます（渡辺秀裕，武田英紀，坂川英一郎）。

以上のことは、いずれも教室の研究で整理されたことですが、この結果、biofilm bacteria は局所で生息圏を得ることとなり、この段階で生体との間に symbiosis すなわち「共生」という現象が成立するわけでありませぬ (Table 1)。

つまり細菌は生体内で variation することにより、その生息様式が silent ではありますが persistent という性質へ変化していくわけでありませぬ。

このような、silent な付着様式も、生体内ではときとして活性化いたします。すなわち、floating 型菌の周辺への遊出であります。

この所見は、慢性気道感染症例での感染増悪時の喀痰所見であります。中央の小さな biofilm peace の周辺に沢山の遊離菌がみられます (Fig. 5)。

実験的には、このような floating 型菌の遊出は、周辺環境に糖や albumin を加えることにより一斉に活性化されるようです。つまり栄養条件の好転であります。

その光景はとても感動的ですからあります。昔、中学生のころ、寺田寅彦先生の「縁側に坐って外を眺めて

Table 1. Characteristics of Biofilm Bacteria

Lower Virulence Protection against Antibacterial Agents Poor Interaction with Phagocyte Cells
↓
SYMBIOSIS

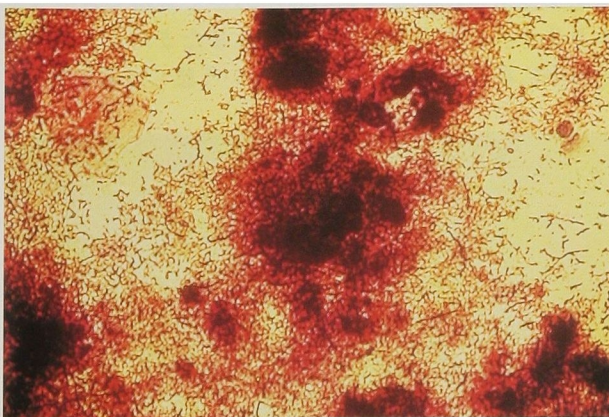


Fig. 5. Bacterial finding in sputum from a patient with *Pseudomonas*-biofilm at the time of infectious exacerbation (Pas stain).

いると一日のうちある時刻になると木の実が一斉に音をたててはじき出て、地上に落ちる」との随筆を読んだことがありました。先生は自然界の規律ある不思議な法則としてこれを結んでいたようでしたが、まさにそれを連想させるシーンです。

さて、このような周辺の floating 型菌は菌体の周辺に有意な alginate がないため、気道の他の部位に付着すると刺激性が強く、その部位へ新しい感染巣を形成いたします。そのとき症状も増悪し、この場合私どもは適合抗菌剤を用いるわけでありませぬが、これらはこの新しい感染巣に対しては効果があることが多いわけでありませぬ。つまり floating 菌によって起った感染巣であり、抗菌剤も MIC に準じた効果が期待でき、さらには好中球との干渉作用も強いからであります。

しかしながら、元菌となった biofilm 菌には抗菌剤は無効であり、したがって「症状の一時的改善は得られても biofilm 菌は除菌できない」という、この種の気道感染症に特徴的にみられる臨床的現象がここに理解できるわけでありませぬ。

すなわち、biofilm 菌の定着はときとして、このような acute on chronic という型の内因性感染として増悪を招来するわけでありませぬ。

もう一つは、細菌 biofilm の長期定着は、その基質である alginate が抗原性を獲得するということでありませぬ。

今、alginate で免疫したマウスにムコイド型菌を噴霧感染いたしますと、1日から4日後に気道周辺へリンパ球が集積してまいります (Fig. 6)。すなわち alginate を介した抗原抗体反応の出現であります。このような免疫反応はマイコプラズマ肺炎や過敏性肺臓炎でもみられ、この段階で決して alginate に特異的なものではありません。ここで得られた知見は alginate が抗原になりうること、そしてこの反応はさらに mucoid 型菌を反復感染することにより濾胞形成にまで発展するという病状の進展にとって重要な意味をもつことを教

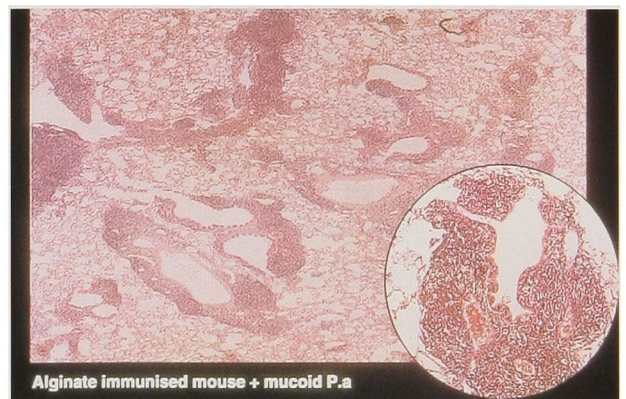


Fig. 6. Morphologic finding on the alginate-immunized mice lung at 3 days after *Pseudomonas aeruginosa* PT 1252 inhalation.

えてくれました (太田見宏, 小林 治)。

かつて熊澤教授から「びまん性汎細気管支炎におけるマクロライドの作用機序」という宿題を下命されたことがありました。当初, 思惑どおりの実験結果を得ることができず, 悶々とした日々の連続でしたが, この1枚の所見を得たときは, あたかも key と lock が合致し, 閉ざされた扉がようやく開いたという感激がいたしました。あとは坂道を転がるような勢いで次々と成績が得られ, 以来熊澤教授の顔が天女か菩薩か如来様にみえてまいりました。人それぞれの研究生活のうちで, 「硬く閉ざされた扉が音もなく開く」という体験はここにおられる先生方は, それぞれ何度かお持ちのことではあると思いますが, この一枚の所見は私にとっては数少ないそのような体験の一つでもありました。

この免疫反応を起点にして緑膿菌による慢性気道感染症を解いてまいりますとこのようになります。

すなわち, biofilm 形成の基質である alginate が抗原となり, 生体側に抗 alginate 抗体が作られ, これが末梢気道に定着している菌体表面の alginate との間に抗原抗体反応を反復する。さらに, biofilm 菌の長期定着は抗原過剰となり免疫複合体が形成され, この免疫複合体は肺組織に付着すると (Fig. 7), 補体が活性化され, 好中球が走化され, 免疫複合体の Fc portion に付着し, 付着した好中球の releasing substance により肺組織が破壊されていくという系になります (Table 2)。

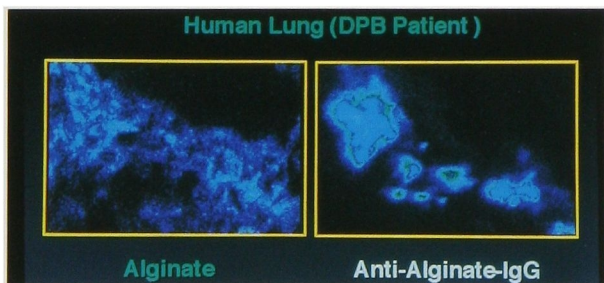
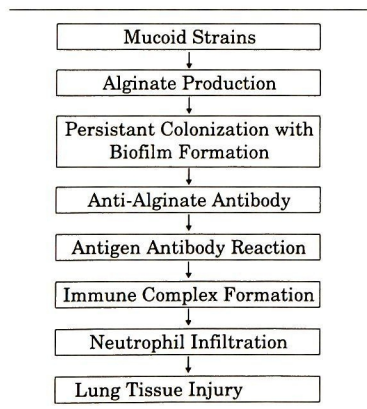


Fig. 7. Immunohistological Examination (LSM).

Table 2. Immunological Manifestation of Mucoïd-Alginate in Infected Diffuse Panbronchiolitis



そして 14 員環・15 員環マクロライドは, alginate 産生, alginate を介した抗原抗体反応, そして結果的には免疫複合体産生という現象に対して, いずれも抑制的に作用することが構造活性的にもわかってまいりました。ここに, かかるマクロライドの臨床的有効性の原点が見出されるわけであります (榎野健司)。

この所見は肺組織に付着した免疫複合体を示しておりますが, 組織破壊の強い部でその付着がよくみられます。またこれら免疫複合体の成分には alginate と抗 alginate 抗体が含まれていること, さらにほぼ 160K dulton の分子量に近いことも分かってまいりました。

ここまで参りますと, もはや緑膿菌自身が固有に有する virulent factor とそれにもとづく感染発症という単純な姿はすでになく, むしろ細菌の生体内での variation に端を発する免疫学的プロセスが主役となってしまっているわけであります。

また慢性気道感染症, 特に緑膿菌感染症は新しい問題を提起しております。つまりかかる疾患においては血清中 BPI-ANCA が特異的に高いということであります (小林 治, 太田見さつき) (Fig. 8)。BPI すなわち Bactericidal Permeability Increasing Protein は好中球内に存在し, 特にグラム陰性菌に対する重要な殺菌物質であります。問題はこの物質に対する自己抗体, すなわち BPI-ANCA が好中球内に産生されるということであります。単純に考えれば菌に対する好中球殺菌能が低下することになります, 特に biofilm を有する慢性気道感染症において何故にこのような自己抗体ができるのか, いやできなければならないのかそれが病像修飾の上でいかなる意義を有しているかということが, 今後の問題になって参ります。

ご存知のように PR3-ANCA は Wegner 肉芽腫と, MPO-ANCA は多発性血管炎と強い関連が示唆されており, いずれも自己免疫疾患であり, また難病であります。

このような点から考えれば, biofilm を有する慢性気道感染症も自己免疫疾患の範疇の中で理解できそうです。正直申し上げて何やらまたまたえらい大変な渦中に巻き込まれてしまったという感じであります。

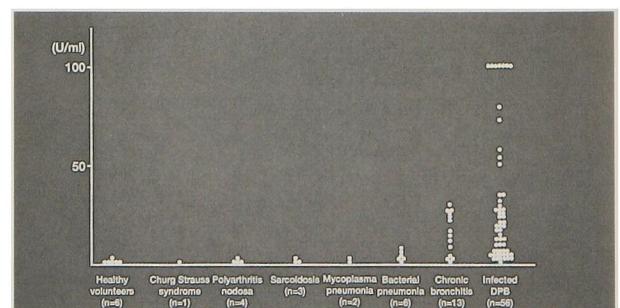


Fig. 8. BPI-ANCA (IgG) in sera samples (BPI: Bactericidal Permeability-Increasing Protein).

すでに申しましたとおり、この研究はベットサイドにおける一患者の質問を契機にはじまったものであります。

気道表面における緑膿菌 biofilm の検出、その生態圏の特性や抵抗性、生体への免疫現象これらに対するマクロライド作用とその構造活性相関など、きわめて紆予曲折はしていましたが一本の坂道を登ってまいりました。この坂道で後押ししてくれたのが若い教室員であり、引っぱってくれたのは、ここにおられる諸先輩、同僚の先生方です。こうやって、たいして高くない峠ですが登りつめてみますと、にわかには景色が変わって見えるものであります。つまり峠をのぼりつめるとさきにはいままで見えなかった広々とした畠や森や海がみえるのと似ております。そうした視野から私なりに慢性感染症というものを考えてみますと、これらはすでにコッホの原則で説明できる枠を越えたものとして眺めることができるのであります。すなわち advanced reaction として慢性という名における独特の生体反応が出現し、時を得るにしたがってこれが症状修飾の主役になっていくようになります (Table 3)。Biofilm Disease の場合の advanced reaction としては harmful な免疫反応や自己抗体の出現であります。

このような考え方を進めてまいりますと、リウマチ・膠原病のみならず、そのさきにはきっとクローンや潰瘍性大腸炎がありましようし、また *Helicobacter* による胃障害、クラミジアによる動脈硬化、さらにその延長線上にはプリオン病までも影がちらついて参ります。

ずいぶん自分勝手なことを申しましたが、このよ

Table 3.

慢性感染症 = 微生物 + Advance Reaction

うなことが今回の研究過程を通じて生まれたつつみかくしのない私の印象でございます。

ご静聴ありがとうございました。

文 献

- 1) 小林宏行: 細菌バイオフィーム。感染症 21: 161~169, 1991
- 2) 小林宏行, 大垣憲隆: 慢性気道感染症—biofilm disease としてのアプローチ。呼吸 11: 1260~1271, 1992
- 3) 小林宏行: 病原体の産生する glycoalyx と化学療法。化学療法の領域 8: 227~234, 1992
- 4) Kobayashi H, Ohgaki N, Takeda H: Therapeutic possibilities for diffuse panbronchitis. Int J Antimicrob Ag 3: 81~86, 1993
- 5) 小林宏行: 細菌 biofilm の基礎と臨床。日内会誌 83: 286~290, 1994
- 6) Ohgaki N: Bacterial biofilm in chronic airway infection. J J A Inf Dis 68: 138~156, 1994
- 7) Kobayashi H: Airway Biofilm Disease Clinical Manifestation and Therapeutic Possibilities Using Macrolides. J Infect Chemother 1: 1~15, 1995
- 8) Kobayashi H: Biofilm Disease. Am J Med 99: (6A): 26~30, 1995
- 9) Nagino K, Kobayashi H: Influence of macrolides on mucoid alginate biosynthetic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Microbiology and Infection 3: 432~439, 1997
- 10) 小林宏行: 慢性気道感染症における細菌バイオフィームの意義。平成 7~8 年度文部省科学研究費 (一般研究 B) 研究報告書 (平成 9 年 3 月)