

## 各種の臨床材料より分離された *Pseudomonas aeruginosa* の lipopolysaccharide の構成と gentamicin 感受性株

小林 寅 詰

三菱化学ビーシーエル・化学療法研究室\*

(平成 11 年 1 月 11 日受付・平成 11 年 2 月 22 日受理)

各種の臨床材料（血液、尿、膿、喀痰、糞便）より分離された 59 株の *Pseudomonas aeruginosa* の lipopolysaccharide (LPS) を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法で分析し、各菌株の LPS 構成と試験菌を分離した臨床材料および薬剤感受性との関連性を検討した。臨床分離株 59 株を LPS 構成の相違により 3 群に分類した。すなわち 35 株は長鎖 (B-band) LPS 保有株、14 株は短鎖 (A-band) LPS 保有株、そして残り 10 株は LPS 欠損株であった。血液由来の 13 株のうち 12 株 (92%) は長鎖 LPS 保有株、尿および便由来には長鎖 LPS 保有株がともに 67% 存在し、喀痰由来株には LPS 欠損株が 42% と高率に存在した。LPS 構成の異なる *P. aeruginosa* のうち LPS が欠損した 10 株中 7 株は gentamicin (GM) に対し高度耐性を示し、1 株は中等度耐性、残り 2 株は  $0.78 \mu\text{g/ml}$  以下の感受性であった。GM に感受性を示した 2 株に対する菌表層部への GM のイオン結合性を [ $^3\text{H}$ ] GM を用いて測定し、LPS 化学組成が既知の PAC 1 R シリーズ株を対照として比較した。その結果 GM に感受性を示した 2 株のうち、No.45 株は LPS が欠損するにもかかわらず LPS 長鎖株と同様に [ $^3\text{H}$ ] GM と高い結合性を示した。一方、対照菌株として用いた PAC 1 R シリーズ株のうち LPS 欠損が拡大し、core-oligosaccharide の中性糖残基が欠損して lipid A が露出した PAC 605 株では [ $^3\text{H}$ ] GM に対する結合性が高かった。また LPS の O-polysaccharide の繰り返し単位の欠損が高度になるにしたがい菌体表層の疎水性は高くなり、さらに欠損が拡大すると逆に疎水性は低くなった。さらに GM に感受性を示す臨床分離の LPS 欠損株 2 株の糖組成を分析したところ、No.45 株には中性糖残基がまったく検出されず PAC 605 株と同じ構造を示した。これらの結果は *P. aeruginosa* の LPS の O-polysaccharide 部位よりも深部構造の陰性荷電部位が、GM などの多価カチオン性物質の結合に関与することを示唆し、臨床分離 No.45 株は、このタイプの菌株であると推定された。次に、長鎖 LPS を保有する PAC 1 R 株とその LPS 変異株を、GM ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) と短時間 (10 分間) 接触させた場合の殺菌性を比較した。PAC 1 R 株では生菌数は最初の 70% に減少したが、LPS 深部の中性糖残基にまで欠損がおよんだ PAC 605 および No.45 株では、それぞれ 3.6 および 11.0% にまで減少し、これらの LPS 欠損株は GM により強く殺菌されることが判明した。治療の場における抗菌薬との接触、その他の環境要因の影響によって *P. aeruginosa* 臨床分離株の表層部の構造、特に LPS 構成は多様に変化し、その結果 O-抗原構造が変化するのみではなく、多価カチオン性抗菌物質、GM の結合性および感受性に変化が生じることを確認した。

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, LPS 構成, gentamicin 感受性, lipid A, cell hydrophobicity

*Pseudomonas aeruginosa* は難治性感染症の起原菌として、各種の臨床材料より分離頻度の高い病原細菌である。*P. aeruginosa* の各種の細菌学的性状、抗菌薬の作用機序、薬剤耐性、化学療法などに関してはすでに多くの研究がある。特に、この細菌の表層構造の多様性<sup>1,2)</sup>は無視できない特性で、個々の菌株および菌細胞間においてコロニー型、serotype<sup>1,2)</sup>、pyocin type<sup>3,4)</sup>、bacteriocin 様物質<sup>4,5)</sup>産生能などが、異なる原因となっている。*P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌の表層は lipopolysaccharide (LPS) によって形成されるが、構成成分の種類が表層性状の決定のための重要な要因であることが明らかにされている。また、aminoglycoside

および polymyxin-B などの多価カチオン性抗菌薬は、self-promoted uptake pathway<sup>6)</sup>を介しての菌体内への移行に表層の LPS の陰性荷電が関与する。これらの抗菌薬の活性または耐性には他の要因とともに、菌の LPS 構成が一定の影響を与えることが考えられる。

われわれは過去に *P. aeruginosa* の臨床分離菌のコロニー形態、serotype、薬剤感受性の相違が生ずる原因として、感染症患者に投与された抗菌薬が原因となる可能性を報告した<sup>7-9)</sup>。*P. aeruginosa* などの薬剤感受性または耐性は、作用点に対する親和性、分解酵素の作用などから解明され、表層構造との関連についてはほとんど報告されていない。本研

究では、異なった化学療法薬の影響を受けたことが推測される各種臨床材料由来の *P. aeruginosa* の LPS 構成 (O-polysaccharide の長鎖, 短鎖および欠損株) と gentamicin (GM) 感受性および殺菌性の関係について検討した。

### I. 材料と方法

#### 1. 試験菌株

1994 年国内の医療機関において、異なる患者から採取した血液, 尿, 膿, 喀痰および糞便検体より分離し, 同定<sup>10)</sup>した *P. aeruginosa* 59 株を用いた。また LPS の化学組成が既知の PAC 1 R シリーズの菌株<sup>11)</sup>は, 住友製薬株式会社総合研究所の横田伸一博士より分与されたもので, 化学組成は Fig.1 のとおりである。

すなわち PAC 1 R 株の LPS に, それぞれ次のような組成変化が生じた 5 変異株である。

PAC 608; O-polysaccharide の繰り返し単位が 1 組のみの菌株, PAC 557; O-polysaccharide の繰り返し単位がすべて欠損した菌株, PAC 609; core-oligosaccharide 部位の D-glucose が 1 分子欠損した菌株, PAC 611; 上記の繰り返し単位がすべてと, core 部位の D-glucose が 2 分子および L-rhamnose が 1 分子欠損した菌株, PAC 605; 繰り返し単位のすべてと, core 部位のすべての中性糖残基が欠損した株。

#### 2. LPS の分析と分類

LPS の抽出は Hitchcock ら<sup>12)</sup>の方法に従い, 各試料は sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。泳動後銀染色を施し, Kadurugamuwa ら<sup>13)</sup>と同様に泳動像によって長鎖 LPS 株, 短鎖 LPS 株および LPS 欠損株と分類した。

#### 3. 薬剤感受性

試験抗菌薬は piperacillin (PIPC, 富山化学), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), imipenem (IPM, 萬有製薬), gentamicin (GM, 日本シエリング), norfloxacin

(NFLX, 杏林製薬) の 5 薬剤を用い, MIC は日本化学療法学会標準法<sup>14)</sup>に準じ, 寒天平板希釈法によって測定した。

#### 4. Cell hydrophobicity

Rosenberg らの *n*-hexadecane による分配法<sup>15)</sup>を用いた。すなわち, 1.2 ml の菌懸濁液に 0.8 ml の *n*-hexadecane を加え攪拌した後静置し, 水層の OD<sub>600nm</sub> を測定した。有機層に移行した菌体成分量を算出し, hydrophobicity (%) を求めた。

#### 5. 菌体への [<sup>3</sup>H] GM の結合

Bryan と Van Den Elzen の方法<sup>16)</sup>の Kadurugamuwa らによる変法<sup>13)</sup>を利用した。試験菌を Antibiotic medium 3 (Difco) に接種し, 対数増殖期まで振盪培養して 10<sup>8</sup>CFU/ml (OD<sub>460nm</sub>: 0.15) の菌液を調製した。各菌液にシアン化カリウムおよび 2,4-ジニトロフェノールをそれぞれ 1 mM および 2 mM になるように添加して 10 分間放置した。非標識 GM と [<sup>3</sup>H] GM を混和して 40 μg/ml 液を作製し, 菌液と 1: 1 の容量比で混合し室温 (20°C) で 2 分間放置した。反応液の 200 μl をあらかじめ非標識 GM で処理したフィルターでろ過し, ろ液中の [<sup>3</sup>H] GM を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。乾燥菌量の 1 μg あたりの [<sup>3</sup>H] GM の結合量を求めた。なお [<sup>3</sup>H] GM の結合に対する Mg<sup>2+</sup>の影響は, シアン化カリウムおよび 2,4-ジニトロフェノール添加 8 分後, Mg<sup>2+</sup>濃度が 25 mg/l となるように菌液に MgCl<sub>2</sub> を加えて 2 分間放置した後, [<sup>3</sup>H] GM と混和し, 上記のとおり処理して測定した。なお [<sup>3</sup>H] GM は American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, USA) 製造の specific activity 200 mCi/g の物質を, 日本アイソトープ協会 (東京) を通じて購入した。

#### 6. LPS-core 部位の糖組成分析

フェノール抽出によって得られた全多糖を弱酸加水分解

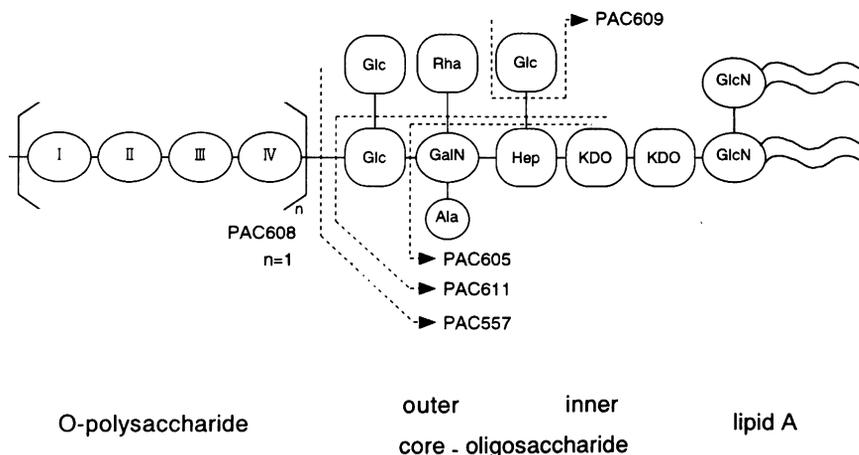


Fig. 1. LPS structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAC 1 R.

Glc: D-glucose, Rha: L-rhamnose, GalN: D-galactosamine, GlcN: D-glucosamine, Hep: heptose, KDO: 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

解にて lipid A を除去し、可溶性多糖を Biogel P 6 ゲルクロマトグラフィーにて分析した<sup>17)</sup>。

### 7. GM による短時間殺菌

上記「菌体への [<sup>3</sup>H] GM の結合」の項と同様に 10<sup>8</sup> CFU/ml の菌液を調製し、GM 40 μg/ml 液と 1: 1 の容量比で混合した。混合後、室温 (20℃) で 10 分間静置し、寒天平板コンラージ法によって経時的に残存生菌数を測定した。結果は混合直後の生菌数に対する残存率 (%) で表した。

## II. 結 果

### 1. 臨床材料由来別 P. aeruginosa の LPS 構成

臨床材料由来別 P. aeruginosa の LPS 構成の分類を Table 1 に示した。表示の成績から特徴的な事実は、血液由来の 13 株のうち 12 株 (92%) は長鎖 LPS によって構成され、LPS 欠損株は認められなかった。また喀痰由来の 12 株では LPS 欠損株が 5 株 (42%) と高率に認められた。他方、尿および便由来株では長鎖 LPS を有する菌株がともに 67% で、短鎖 LPS 株より明らかに多い傾向にあった。また両群それぞれ 12 株のうち 1~2 株は LPS 欠損株が認められた。膿由来 10 株では、長鎖 LPS 株および短鎖 LPS 株がそれぞれ 4 株 (40%)、欠損株が 2 株 (20%) という分布になった。

Table 1. LPS-compositions of 59 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical specimens

Specimen	LPS-composition			Number of strains 59
	long chain 35	short chain 14	LPS-deficient 10	
Blood	12 (92)	1 (8)	0 (0)	13
Urine	8 (67)	2 (17)	2 (17)	12
Pus	4 (40)	4 (40)	2 (20)	10
Sputum	3 (25)	4 (33)	5 (42)	12
Feces	8 (67)	3 (25)	1 (8)	12

Number of strains (%)

Table 2. Drug susceptibility of LPS-deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Strain no.	Origin	MIC (μg/ml)				
		piperacillin	ceftazidime	imipenem	gentamicin	norfloxacin
21	feces	6.25	3.13	3.13	0.78	6.25
30	urine	1.56	1.56	3.13	200	6.25
31	urine	1.56	1.56	3.13	>400	6.25
45	pus	3.13	0.78	3.13	0.39	6.25
48	pus	25	25	3.13	6.25	12.5
49	sputum	1.56	1.56	6.25	200	12.5
50	sputum	1.56	1.56	6.25	>400	12.5
51	sputum	1.56	1.56	6.25	400	12.5
53	sputum	1.56	1.56	6.25	100	12.5
54	sputum	1.56	1.56	6.25	200	12.5

### 2. LPS 欠損株の各種抗菌薬感受性

前記で分類した P. aeruginosa のうち LPS が欠損した 10 株に対する各種抗菌薬の MIC を Table 2 に示した。3 種類の β-lactam 薬および NFLX の MIC は一部を除きほとんどが 1.56~12.5 μg/ml の感受性から中等度耐性域に分布した。しかし GM に対しては今回用いた 10 株のうち 8 株が耐性を示し、No.48 株を除く 7 株は GM の MIC が 100 μg/ml 以上と高度耐性を示した。しかし No.21 株と No.45 株は GM の MIC がそれぞれ 0.78 μg/ml および 0.39 μg/ml と低い値を示した。

次に同じ抗菌薬に対する PAC 1 R 由来株の感受性を Table 3 に示した。臨床分離株と同様 3 種類の β-lactam 薬の MIC は 0.78~6.25 μg/ml と感受性から中等度耐性域に分布したが、NFLX には各菌株とも感受性を示した。GM の MIC は 1.56~3.13 μg/ml の中等度耐性であったが PAC 605 株は 0.20 μg/ml と他の株に比べ低い値を示した。

この結果から LPS が欠損した P. aeruginosa のなかには GM に対し比較的高度に感受性を示す株が存在することが判明した。

### 3. LPS 欠損株の cell hydrophobicity

Table 4 に PAC 1 R シリーズ 6 株および臨床分離株 No.21, No.45 株の hydrophobicity を示した。長鎖 LPS を保有する PAC 1 R 株は hydrophobicity が 15.3% と低く、core 部位の欠損が強くなるにしたがって hydrophobicity の上昇がみられた。しかし、core 部位の中性糖残基すべてを欠損した PAC 605 株は 12.5% と PAC 1 R 株と同程度の低い hydrophobicity を示し、臨床分離 No.21, No.45 株は PAC 605 株よりもさらに低い値を示した。

### 4. LPS 欠損株に対する [<sup>3</sup>H] GM 結合性

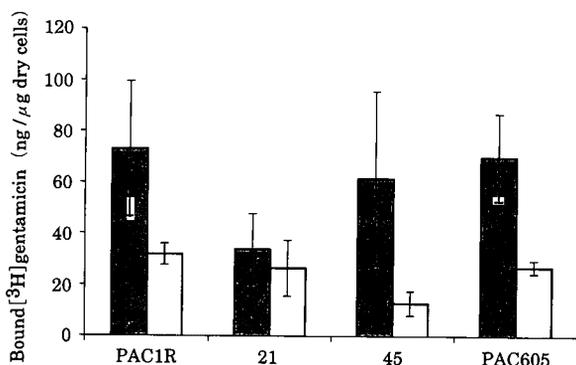
Fig. 2 に長鎖 LPS 株と LPS 欠損株への [<sup>3</sup>H] GM の結合量および Mg<sup>2+</sup> による [<sup>3</sup>H] GM の結合阻害を示し

Table 3. Drug susceptibility of LPS-defective mutant series of *Pseudomonas aeruginosa* PAC 1 R

Strain no.	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	piperacillin	ceftazidime	imipenem	gentamicin	norfloxacin
PAC 1 R	6.25	1.56	0.78	1.56	0.39
PAC 609	6.25	1.56	0.78	1.56	0.39
PAC 608	6.25	1.56	1.56	3.13	0.39
PAC 557	6.25	1.56	1.56	3.13	0.39
PAC 611	6.25	3.13	0.78	1.56	0.39
PAC 605	6.25	3.13	1.56	0.20	0.20

Table 4. Cell surface hydrophobicity of PAC 1 R series strains and LPS-deficient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Strain no.	Hydrophobicity (%)
PAC 1 R	15.3
PAC 609	28.8
PAC 608	61.7
PAC 557	70.7
PAC 611	72.1
PAC 605	12.5
No. 21	-0.5
No. 45	1.5

Fig. 2. [<sup>3</sup>H] gentamicin binding to *Pseudomonas aeruginosa*.

■ without Mg<sup>2+</sup>, □ with Mg<sup>2+</sup>.

た。LPS 欠損株である PAC 605 株および臨床分離 No.45 株は LPS 長鎖株の PAC 1 R と同程度の高い [<sup>3</sup>H] GM 結合性を示し、また、Mg<sup>2+</sup>によりこの結合は強く阻害された。一方、No.21 株は従来の LPS 欠損株同様 [<sup>3</sup>H] GM の結合量は少なく、Mg<sup>2+</sup>による結合阻害もほとんど受けなかった。

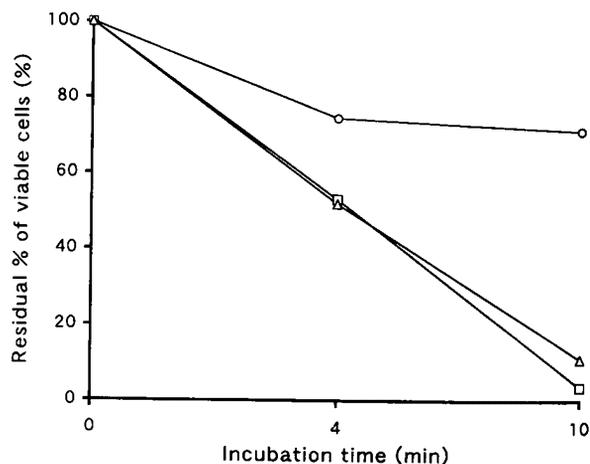
##### 5. LPS 欠損株の core 部位の糖組成分析

Table 5 に PAC 1 R, PAC 605, No.21, No.45 株の LPS-core 部位の糖組成分析の結果を galactosamine を 1 としたモル比で示した。Fig.1 で示したとおり PAC 1 R は galactosamine 1 分子につき glucose 3 分子と rhamnose 1 分子が結合しているが、PAC 605 株では

Table 5. Neutral sugar composition of outer-core region in LPS from *Pseudomonas aeruginosa* PAC 1 R, PAC 605, No. 21 and No. 45

Strain no.	Component <sup>a)</sup>		
	galactosamine	glucose	rhamnose
PAC 1 R	1	3	1
PAC 605	1	N. D. <sup>b)</sup>	N. D.
No. 21	1	0.84	N. D.
No. 45	1	N. D.	N. D.

<sup>a)</sup>Molar ratios, <sup>b)</sup>N. D.: not detectable

Fig. 3. Bactericidal effect of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa* PAC 1 R, PAC 605 and No.45 in a short incubation.

○: PAC 1 R, □: PAC 605, △: No.45.

glucose, rhamnose とすべて欠損した株である。臨床分離 No.21 株は PAC 1 R と PAC 605 株の中間の糖組成を示し、No.45 株は PAC 605 株と同様すべての中性糖残基が欠損していた。

##### 6. LPS 欠損株に対する GM の短時間殺菌作用

[<sup>3</sup>H] GM の高い結合性を示した LPS 欠損の PAC 605 株および臨床分離 No.45 株と長鎖 LPS を有する PAC 1 R 株に 20  $\mu\text{g/ml}$  の GM を 10 分間作用させた際の生菌数の変化を Fig. 3 に示した。PAC 1 R 株では、薬剤作用直後に約 30% の生菌数の減少がみられ、残存率は

71.3%となった。一方、LPSの欠損したNo.45株、およびLPS構成に広い欠損をもつPAC 605株は、PAC 1 R株よりも生菌数の減少はより顕著で、10分後における生菌の残存率はそれぞれ11.0および3.6%で、両菌株に対するGMの強い殺菌効果が観察された。

### III. 考 察

*P. aeruginosa* は周知のとおり、compromised hostのopportunistic pathogenとして現在においても抗菌化学療法における重要な菌種である。またこの細菌は、不活化酵素による薬剤耐性ととも impermeability-resistance が注目を浴びている。この問題に加えて、*P. aeruginosa* の生物学的性状の多様性; serotype, phage type, bacteriocin type, biotype などが菌株間で異なり、この細菌による感染の解析、疫学的検討を複雑なものにしている<sup>18,19)</sup>。

この点に関連して、われわれは同一の臨床材料より分離された*P. aeruginosa* を詳細に検討し、一部の分離菌の形態, serotype または薬剤感受性などが異なるコロニーが共存することを報告した<sup>1,2)</sup>。さらに、一部の*P. aeruginosa* 臨床分離株に異質の菌細胞が存在する原因として、治療のために投与された抗菌薬により菌の表層構造の変化<sup>7-9)</sup>、または血清および好中球などの感染防御因子によるbacterial stressなど、感染菌を取り巻く環境の相違が影響することを報告した<sup>20)</sup>。同様な結果は、他の研究者らの観察によっても証明されている<sup>21)</sup>。このような*P. aeruginosa* の変化として、outer membrane proteins (OMPs) の特定のporinの消失と $\beta$ -lactam系薬などの感受性の低下が観察されている<sup>8,21)</sup>。なおporinsを経由する $\beta$ -lactam薬などの細胞内透過に懐疑的な意見もあるが、排出機構の研究とともに多くの成績が報告されている<sup>22)</sup>。

Lamら<sup>23)</sup>は*P. aeruginosa* PAO 1株のLPSを2種類; A-band LPS (chain sizeの短い、小分子量のLPS)とB-band LPS (chain sizeの長い、大きい分子量のLPS)に分類した。A-band LPSはInternational antigen typing schemeのどの菌株とも凝集せず、これらの抗原のdeterminantではないが、non-typableに分類される菌株の抗原のdeterminantであると推定した。またB-band LPSはO-抗原のdeterminantであることを示唆した<sup>23)</sup>。特にcystic fibrosisの症例における*P. aeruginosa* 感染では、分離250株中170株(68%)からA-band LPSが検出されている。しかし感染の過程でantigen variationが生じ、感染菌のserotypeが特定のtypeからnon-typableに変化し、これに対応してLPS構成もA-bandに転換したと報じている。また上述のLamらのLPSの分類に関する報告と相前後してRiveraおよびHancockらもSDS-PAGEおよびgel-filtrationにより*P. aeruginosa* PAO 1由来株を検討し、同様の結果を確認している<sup>24)</sup>。

諸外国からのいままでの報告は、主としてcystic fibrosisの患者の*P. aeruginosa* 感染についての菌の表層構造と性状に関する研究が多い<sup>24)</sup>。われわれは、国内の複数の診療施設より入手した各科領域よりの分離株、59株のLPS構成を検討した<sup>25,26)</sup>。全菌株のうち59.3%がB-band保有株、23.7%がA-band保有株、17.0%がLPS欠損株であった。各材料由来株を比較すると、血液よりの分離株13株中12株すなわち90%以上、ついで尿および糞便由来株の約70%がB-band LPS保有株であった。また喀痰由来株ではLPS欠損株が42%と他の臨床材料由来株より高率であった。各臨床材料によってA-bandおよびB-band保有株の出現率が異なる理由を説明する明確な根拠は得ていない。しかし本報の59菌株についての検討結果では、それぞれの感染部位の環境下で、感染菌に対するstressや薬剤の作用条件が異なり、そのような条件でOMPsに限らずLPSの構成も影響を受けたのではないかと考えられる。

さらに、われわれは長鎖LPS株とLPS欠損株では、GMなどの多価カチオン性抗菌薬に対する感受性も異なる傾向がみられ、前者の菌株ではGM感受性株が多く、後者では耐性株が多いことを報告した<sup>25-27)</sup>。既知のとおり、この結果はGMなどの多価カチオン性抗菌薬はself-promoted uptake pathway<sup>6)</sup>により菌体内に移行するが、その第一段階として、この種の抗菌薬は菌表層のLPSの陰性荷電部位にイオン結合し、その結合度が抗菌作用の発現に反映すると考えられている。

しかし本研究において、LPSのかかなりの部分が欠損すると推定される臨床分離株No.45株は、O-polysaccharideの繰り返し単位を多数保有する長鎖LPS株と、ほとんど同程度の高い<sup>3</sup>H GM結合性を示した。横田らは*P. aeruginosa* PAC 1 R株とそのLPS変異株を用い、LPSのO-polysaccharideの一部分または完全欠損株およびcore-oligosaccharideの中性糖残基の一部分または高度欠損株の化学組成と生物学的性状の関係を報告した<sup>11,17,28)</sup>。臨床分離No.45株が比較的高い<sup>3</sup>H GM結合を示す理由としては、われわれが既報の実験に用いたPAC 1 R株とその変異株で、O-polysaccharideの繰り返し単位の欠損が高度になるにともない<sup>3</sup>H GMの結合量が減少すること、さらにcore-oligosaccharideの中性糖残基の欠損が進行し、lipid Aが露出する状態では、陰性荷電は増加するため<sup>3</sup>H GMの結合も増える傾向を認めている。今回の成績でNo.21株およびNo.45株に対するGMのMICはそれぞれ0.78  $\mu$ g/ml、0.39  $\mu$ g/mlと低い値を示し、対照としたO-polysaccharideの繰り返し単位すべてとcore部位の中性糖残基(glucose, rhamnose)すべてを欠損したPAC 605株と同程度にGM感受性で、cell hydrophobicityでも類似性が認められた。このことからLPS欠損株のなかでもその欠損の割合によってはGMに対し感受性を示す株

が存在することが判明した。しかし、GM 結合性に関しては No.21 株および No.45 株間で異なる現象がみられた。データは示さなかったが anti-lipid A 抗体や anti-Opr G 抗体との反応性にも違いが認められた。そこで、LPS-core 部位の糖組成分析を行った結果、No.45 株は PAC 605 株と同様、中性糖残基をすべて欠損した株であることが判明した。一方、No.21 株は LPS の core 部位の rhamnose を欠くものの glucose は 1 分子残っている株であり、これが GM 結合性等において No.45 株との相違の原因であると考えられた。すなわち PAC 605 株や No.45 株のように GM 結合性を示す理由としては、中性糖残基の欠損が進行したことにより陰性荷電をもつ lipid A が露出した状態となり、そこに GM が結合するためであろう。また、 $Mg^{2+}$  は *P. aeruginosa* の LPS の陰性荷電部位にイオン結合し、近接する LPS と架橋を形成することが知られ<sup>29,30</sup>、この部位の  $Mg^{2+}$  に多価カチオン性抗菌薬が競合的に置換してイオン結合する。しかし No.21 株と No.45 株に対して  $Mg^{2+}$  の添加による [<sup>3</sup>H] GM の結合抑制効果は異なり、両菌株の LPS の陰性荷電の状態およびその [<sup>3</sup>H] GM 結合親和性には相違があることがわかる。

Kadurugamuwa らは *P. aeruginosa* PAO 1 株 (A と B-band LPS 保有株) とその LPS-isogenic strains (A<sup>+</sup>B<sup>-</sup>; A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>; A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>) の 4 種の LPS 構成の異なる菌株の [<sup>3</sup>H] GM 結合性を比較し、B-band (長鎖) LPS 保有株はいずれも A-band (短鎖) LPS 保有株または両 band-LPS を欠損する株よりも [<sup>3</sup>H] GM 結合性が高く、GM による短時間殺菌を受けやすいことを報告している<sup>31</sup>。しかしこれに反して、横田は上記の *P. aeruginosa* PAC 1 R 株とその LPS 欠損変異株、PAC 605 株に対する GM の MIC を比較し、それぞれ 3.13 μg/ml および 0.20 μg/ml と PAC 605 株が GM により感受性であると報告している<sup>31</sup>。これらの背景をもとに、われわれは PAC 1 R、PAC 605 および臨床分離 No.45 株に対する GM の短時間殺菌作用を比較した。GM の *P. aeruginosa* に対する短時間の接触による殺菌作用は、横田の報告した MIC 値に対応して、O-polysaccharide のみでなく core-oligosaccharide 領域にまで欠損がおよぶ高度 LPS 欠損株、PAC 605 および No.45 株に対して強かった。おそらく LPS の深部構造におよぶ欠損や lipid A の露出が、菌の溶菌抵抗性の低下を引き起こしていると考えられる。

抗菌薬との接触、その他の環境要因による *P. aeruginosa* の表層部、特に LPS 構成の変化は多様で、それぞれの変化の段階に応じて表層の性状も変化する。薬剤に対する耐性化、抗菌薬の殺菌作用に対する感受性の変化なども例外ではない。この種の問題のより詳細な検討は、*P. aeruginosa* 感染症に対する効果的な化学療法のために必要であると考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究は第 8 回上田泰記念感染症・化学療法研究奨励基金により行われたものであることを付記し、ここに深甚なる謝意を表します。

また本論文の実験に多大な助力をいただいた同研究室の方々および終始指導を賜りました西田 實博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 小林寅詔, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 他: 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。Chemother. 39: 753~760, 1991
- 2) Kobayashi I, Hasegawa M, Nishida M, et al.: Co-existence of colonies with different serotypes and other biological characteristics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Immun. 36: 1113~1118, 1992
- 3) Gillies R R, Govan J R W: Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocin production. J. Pathol. Bacteriol. 91: 339~345, 1966
- 4) 小林寅詔, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 他: 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。Chemother. 40: 721~726, 1992
- 5) 小林寅詔, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 他: 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。Chemother. 41: 535~539, 1993
- 6) Hancock R E W, Raffle V J, Nicas T I: Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 777~785, 1981
- 7) 小林寅詔, 長谷川美幸, 宮崎修一, 他: 各種の抗緑膿菌薬による *Pseudomonas aeruginosa* の血清型変化について。感染症誌 66: 1572~1579, 1992
- 8) Kobayashi I, Hasegawa M, Nishida M, et al.: *In vitro* and *in vivo* changes of serotype in *Pseudomonas aeruginosa* isolates by anti-pseudomonal drugs. J. Antibiot. 47: 72~79, 1994
- 9) 小林寅詔, 長谷川美幸, 西田 実: 臨床分離緑膿菌の抗緑膿菌薬による serotype の変化と生物学的性状、薬剤感受性および外膜蛋白の関連性について。感染症誌 68: 183~190, 1994
- 10) Gilligan P H: *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In Manual of Clinical Microbiology 6th ed. p. 509~519, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1995
- 11) Yokota S, Ochi H, Ohtsuka H, et al.: Heterogeneity of the L-rhamnose residue in the outer core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, characterized by using human monoclonal antibodies. Infect. Immun. 57: 1691~1696, 1989
- 12) Hitchcock P J, Brown T M: Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silverstained polyacrylamide gels. J. Bacteriol. 154: 269~277, 1983

- 13) Kadurugamuwa J L, Lam J S, Beveridge T J: Interaction of gentamicin with the A band and B band lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and its possible lethal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 715~721, 1993
- 14) 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。 *Chemother.* 29: 76~79, 1981
- 15) Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E: Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 29~33, 1980
- 16) Bryan L E, Van Den Elzen H M: Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 928~938, 1976
- 17) Yokota S: Novel O-polysaccharide expression, as a lipid A-core-free form, in a lipopolysaccharide-core-defective mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 142: 289~297, 1996
- 18) Homma J Y, Kim K S, Yamada H, et al.: Serological typing of *Pseudomonas aeruginosa* and its crossinfection. *Jpn. J. Exp. Med.* 40: 347~359, 1970
- 19) Pitt T L: Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 238~247, 1988
- 20) 小林寅喆, 長谷川美幸, 西田 実: ヒト血清と好中球による臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* の外層部の変化と薬剤感受性。 *感染症誌* 68: 500~507, 1994
- 21) Ojeniyi B, Wolz C, Doring G, et al.: Typing of polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 98: 423~431, 1990
- 22) Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382~387, 1994
- 23) Lam M Y C, McGroarty E J, Kropinski A, et al.: Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 962~967, 1989
- 24) Rivera M, Bryan L E, Hancock R E W, et al.: Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of lipopolysaccharide chain length. *J. Bacteriol.* 170: 512~521, 1988
- 25) 長谷川美幸, 小林寅喆, 雑賀 威, 他: 臨床分離 *Pseudomonas aeruginosa* の Lipopolysaccharide のサイズと Gentamicin 感受性および生物学的性状。 *感染症誌* 69: 811~817, 1995
- 26) Hasegawa M, Kobayashi I, Saika T, et al.: Drug-resistance patterns of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with reference to their lipopolysaccharide-compositions. *Chemother. (Swiss)* 43: 323~331, 1997
- 27) 雑賀 威, 長谷川美幸, 小林寅喆, 他: *Pseudomonas aeruginosa* 臨床分離株の lipopolysaccharide の構造と <sup>3</sup>H-gentamicin の結合および gentamicin の短時間における殺菌作用について。 *感染症誌* 72: 97~104, 1998
- 28) Yokota S, Terashima M, Chiba J, et al.: Variable cross-reactivity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide-core-specific monoclonal antibodies and its possible relationship with serotype. *J. Gen. Microbiol.* 138: 289~296, 1992
- 29) Bryan L E, Van Den Elzen H M: Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: A model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 163~177, 1977
- 30) Nicas T I, Hancock R E W: Outer membrane protein H 1 of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement in adaptive and mutational resistance to etylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamicin. *J. Bacteriol.* 143: 872~878, 1980
- 31) 横田伸一: 緑膿菌リボ多糖のコア領域の欠損による菌体表層の性状変化。第 30 回緑膿菌感染症研究会講演記録 (福岡): 80~83, 1996

Lipopolysaccharide-compositions and gentamicin-susceptibilities of  
*Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens

Intetsu Kobayashi

Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories Inc.,  
3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

The lipopolysaccharide (LPS)-compositions of 59 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical sources such as blood, urine, pus, sputum and feces were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and the relationship between the LPS-compositions and gentamicin (GM)-susceptibilities of these strains was investigated. The 59 isolates tested were divided into three groups; a long-LPS chain (B-band LPS) group of 35 strains, a short-LPS chain (A-band LPS) group of 14 strains and an LPS-deficient group of 10 strains. The majority of the clinical isolates (12 of the 13 strains; 92%) from the blood specimens possessed the long-LPS chain. About 67% of the isolates from both urine and feces possessed the long-LPS chain while a minority in both groups possessed the short chain. The LPS-deficient isolates were found in the sputum specimens at a considerably high rate (42%). Nineteen of the 35 isolates with the long-LPS chain (54%) were susceptible to GM, a poly-cationic antibiotic, and 12 isolates (34%) were resistant. Fourteen isolates with the short-LPS chain were divided into three groups, GM-resistant, GM-susceptible and intermediate. It was notable that 7 of the 10 LPS-deficient isolates were resistant to GM, 1 strain was moderately resistant, and the remaining 2 strains were susceptible. The ionic binding of [<sup>3</sup>H] GM to the negative charge sites on the surface structures of *P. aeruginosa* differing in LPS-structures was the highest in the long-LPS strains followed in descending order by the short-LPS strains and LPS-deficient strains. The [<sup>3</sup>H] GM-binding was also investigated with some LPS-deficient strains from *P. aeruginosa* PAC 1 R series. The [<sup>3</sup>H] GM-binding to these strains decreased with an increase in a lack of the repeated units of O-polysaccharide. On the other hand, PAC 605 strain, an LPS-mutant of the PAC 1 R of *P. aeruginosa*, was completely lacking in the repeated units of O-polysaccharide and also in some neutral sugar residues of the core-oligosaccharide region. This mutant strain was highly bound to [<sup>3</sup>H] GM, suggesting that the sites negatively charged in the deep core-oligosaccharide region and/or lipid A participated in the binding of [<sup>3</sup>H] GM. This manner of binding may be applied to *P. aeruginosa* No. 45, a clinical isolate. *P. aeruginosa* PAC 1 R, PAC 605 and No. 45 strains were each exposed to GM at a low concentration (20 µg/ml) for 10 min. The viable cell counts of PAC 1 R strain decreased to about 70% of the initial count, whereas those of PAC 605 and No. 45 strains markedly decreased to 3.6 and 11.0%, respectively, indicating that the vulnerability of both types of the LPS-deficient strains was enhanced by the bactericidal action of GM after a short incubation. The surface structure, such as LPSs, of clinical isolates of *P. aeruginosa* was changed by contact with various types of environmental factors including exposure to the antibiotics used, and changes in O-antigen structures and also in the susceptibility to poly-cationic antibiotics such as aminoglycosides, including GM, were observed. This type of drug resistance due to a decrease in the transport of antibiotics poses important problems in antibacterial chemotherapy and the development of new drugs which need to be resolved.