

## 【総説】

## 抗菌薬の有効性を高めるための工夫

—マクロライド系抗菌薬の効果と病原因子の制御について—

柳原 克紀<sup>1)</sup>・山田 康一<sup>1-3)</sup>・長岡健太郎<sup>1,3,4)</sup>・右山 洋平<sup>1,3,5)</sup>・小佐井康介<sup>1)</sup>・森永 芳智<sup>1)</sup>  
 中村 茂樹<sup>3)</sup>・金子 幸弘<sup>6,7)</sup>・掛屋 弘<sup>2)</sup>・興梠 博次<sup>5)</sup>・河野 茂<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座病態解析・診断学（臨床検査医学）\*

<sup>2)</sup> 大阪市立大学臨床感染制御学

<sup>3)</sup> 長崎大学病院第二内科

<sup>4)</sup> 北海道大学第一内科

<sup>5)</sup> 熊本大学医学部附属病院呼吸器内科

<sup>6)</sup> 国立感染症研究所真菌部

<sup>7)</sup> 大阪市立大学大学院医学研究科細菌学

（平成 26 年 3 月 26 日受付・平成 26 年 5 月 2 日受理）

**Key words:** immunomodulatory effect, combination therapy, quorum sensing

これまでの感染症治療の考え方は抗菌薬の抗微生物効果に主眼を置いていたが、近年の耐性菌の蔓延と新たな抗菌薬の開発が進まない現在、新しい視点からのアプローチを考えていく必要がある。感染症の制御には、今ある薬剤をどのように応用するのか、あるいは抗菌薬以外の新たな機序による治療法がないかなど、さまざまな工夫が求められている。微生物と抗菌薬の二者の関係だけに着目するのではなく、宿主も含めた Host-Pathogen-Antibiotics の視点から感染症をとらえ、新しい治療戦略を考えていく時代に来ているといえる。

### I. 抗菌薬の併用

*Acinetobacter baumannii* は院内感染症の重要な原因菌である。*A. baumannii* は肺、尿路、皮膚、創部などあらゆる部位に感染症を引き起こすとされる。日本では薬剤耐性 *A. baumannii* の頻度は低いものの、海外においては多剤耐性化が問題となっている。CDC の報告によると第一選択薬であるカルバペネム系薬の耐性率は約 40% とされる<sup>1)</sup>。多剤耐性株が分離された症例では感受性症例よりも死亡率が高い<sup>2)</sup>。さらに *A. baumannii* による人工呼吸器関連肺炎 (VAP) では他の菌種と比べて最も死亡率が高いとされる<sup>3)</sup>。したがって、多剤耐性 *A. baumannii* (MDRAB) による VAP の治療は非常に困難なものとなってきている。

マクロライド系薬は抗菌作用以外に免疫調節作用も有する。これまでマクロライド系薬は市中肺炎における予後改善を示す報告が存在する<sup>4)</sup>。さらに 14 員環マクロライドのクラリスロマイシン (CAM) では VAP の改善や人工呼吸器の離脱までの日数が短縮される報告もみられ

る<sup>5)</sup>。しかし、15 員環マクロライドであるアジスロマイシン (AZM) の *A. baumannii* 肺炎における有効性についてはほとんど不明である。これまで *A. baumannii* 肺炎マウスモデルでは免疫抑制剤やムチンを使用したモデルが使用されており、VAP モデルは存在しなかった。そこで今回われわれは MDRAB による VAP モデルを新たに作成し、AZM の有効性を検討した<sup>6)</sup>。

菌株は臨床分離された MDRAB 株 (MIC: イミペネム  $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ , アミカシン  $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ , シプロフロキサシン  $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ , AZM =  $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 株を使用した。この菌株は *A. baumannii* に特異的な *bla*OXA51like 遺伝子を有していた。ddY SPF マウス (雄, 6 週齢) に対してシクロフォスファミドの前投与を感染 4 日前 (150 mg/kg) と 1 日前 (100 mg/kg) に行うことで免疫抑制状態をつくり出し、感染当日に 5 mm の長さに切断した 3 Fr の静脈用カテーテルチューブをマウスに経気道的に挿入し、気管支内に留置した<sup>7)</sup>。その後  $1\sim 5 \times 10^7$  CFU/mL に調節した菌液を 50  $\mu\text{L}$  経気道的に投与して、VAP モデルを作成した。治療として AZM (10 mg/kg 群と 100 mg/kg 群) の皮下投与を感染 3 時間後より開始した。治療は 1 日 1 回計 7 日間行った。非治療群として生理食塩水を同様に投与した。感染後 7 日後の生存率、感染 2 日後の肺内生菌数、肺病理組織像、気管支肺胞洗浄 (BALF) 中の細胞数、好中球数、サイトカインの検討を行った。

まず、予備実験として *A. baumannii* 菌液のみの接種群とチューブ留置後の接種群の生存率と 48 時間後の気管支洗浄液中の炎症性サイトカインの産生量を比較検討し

\*長崎県長崎市坂本 1-7-1

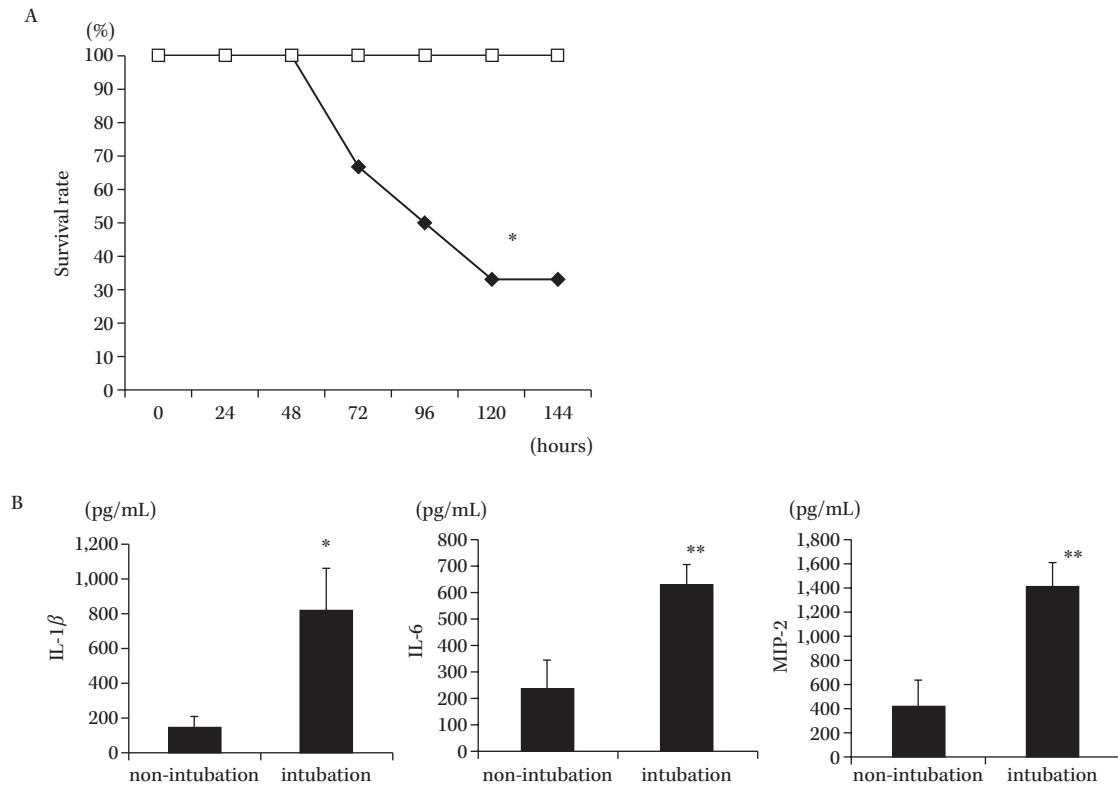


Fig. 1. Effect of the intubation in mouse model multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB)<sup>6)</sup>.

A) In the survival study, mice were divided into two groups: mice inoculated with MDRAB after intubation (filled diamonds) and mice that were not intubated with inoculation (empty squares). Each six mice were used. Survival was estimated at the indicated times and the results are displayed as a Kaplan-Meier plot. B) The cytokine levels in BALF were detected using ELISAs. Non-intubation represents mice that were not intubated with inoculation. Intubation means mice inoculated with MDRAB after intubation. The data are expressed as means  $\pm$  SEM. (n = 8 in each group)

\* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. non-intubation group, respectively.

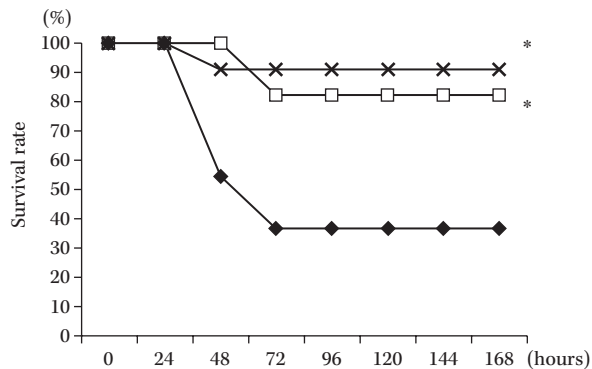


Fig. 2. Survival study of mice with MDRAB after treatment with azithromycin (AZM)<sup>6)</sup>.

Eleven mice in each group were treated with AZM at a dose of 10 mg/kg (filled squares) or 100 mg/kg (empty squares), or were treated with PBS (filled diamonds). Survival was then estimated at the indicated times and the results are displayed as a Kaplan-Meier plot. The survival times of AZM-treated groups were significantly longer than those of controls as determined by log-rank test.

\* indicates  $P < 0.05$  vs. control (PBS solution).

た。するとチューブ留置群では非留置群と比べ明らかに生存率が低く (Fig. 1A), 炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-2 (ヒトでの IL-8 に相当) の産生量が多かった (Fig. 1B)。この結果から以後の実験はチューブを留置したマウスを用いた。治療実験においては AZM 投与群ではコントロール群に比べ、明らかに生存率は高かった。さらに 10 mg/kg 群と 100 mg/kg では生存率に差はみられなかった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2)。感染 2 日後の肺内生菌数は 3 群間で差はみられなかった (コントロール群:  $7.49 \pm 0.58 \log_{10} \text{CFU/mL}$ , AZM 10 mg/kg 群:  $7.64 \pm 0.56 \log_{10} \text{CFU/mL}$ , AZM 100 mg/kg 群:  $7.49 \pm 0.72 \log_{10} \text{CFU/mL}$ )。病理学的検討ではコントロール群に比べて AZM 群で肺胸腔内への炎症細胞の浸潤は軽度であった。10 mg/kg 群と 100 mg/kg では明らかな差はみられなかった (Fig. 3)。気管支肺胞洗浄中の総細胞数, 好中球数は治療群で明らかに低下していた ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4)。炎症性サイトカインについても AZM 群で明らかに低下していた ( $P < 0.05$ )。AZM の投与量による炎症性サイトカインの産生に差はみられなかった (Fig. 5)。

*A. baumannii* は海外では VAP の重要な原因菌である

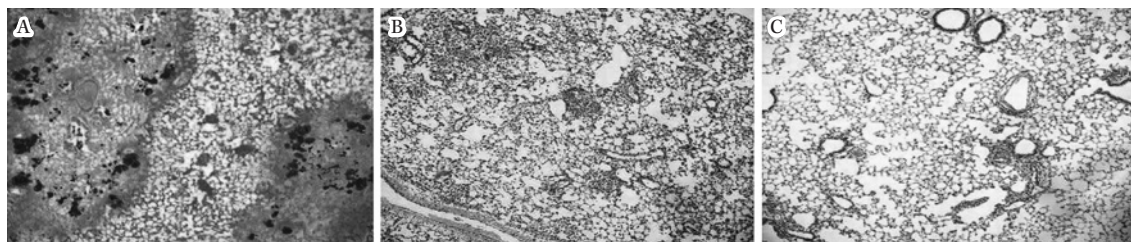


Fig. 3. Histopathological analysis the lungs infected mice following AZM treatment<sup>6)</sup>. Sections of the lungs 48 h post infection stained with hematoxylin ( $\times 40$ ) are shown. A) The lungs of control (PBS-treated) group showed large numbers of inflammatory cells, infiltrating the alveolar spaces and alveolar hemorrhage. B and C) AZM 10 mg/kg group (B) and AZM 100 mg/kg group (C) inhibited lung inflammation due to infection (n = 5 in each group).

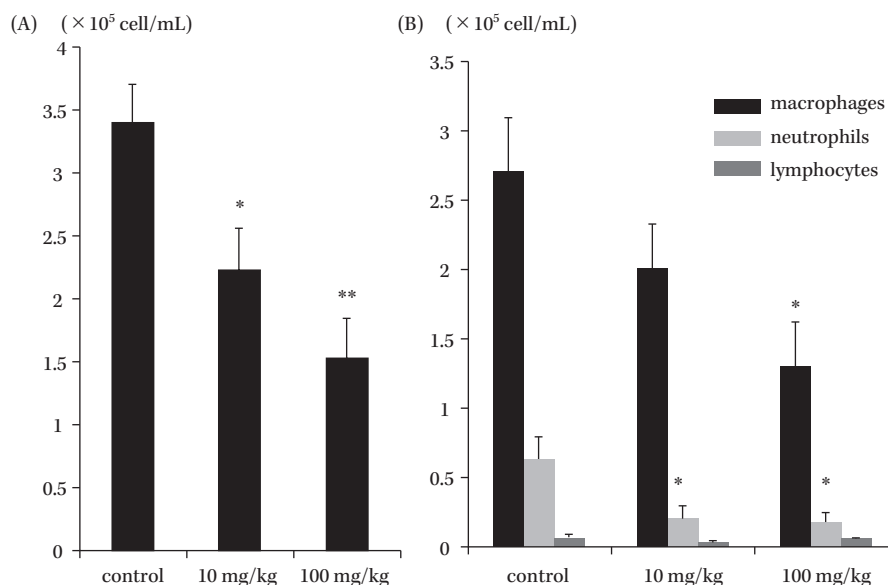


Fig. 4. Effect of AZM on number of inflammatory cells of infected mice<sup>6)</sup>. Numbers of total cells (A) and differential cells (B) in BALF were compared with control group and AZM (10 or 100 mg/kg). The data are expressed as means  $\pm$  SEM. \* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. control group, respectively (n = 7 in each group).

が、最近第一選択薬であるカルバペネム系薬に対する耐性化が問題となっている。Giamarellos-BourboulisらはCAMの投与にてVAPと人工呼吸器使用期間を短縮したと報告しているが、そのVAPの原因菌として最も多かったのが*A. baumannii*であった<sup>5)</sup>。マクロライド系薬は*A. baumannii*に対して基本的に抗菌作用は有さないことから、その有効性の要因は別にあると考えられた。

一般的にMDRAB感染症は免疫抑制患者で起きやすいとされる<sup>8)</sup>。また、われわれの以前の研究でも免疫抑制剤の使用が*A. baumannii*による感染症の予後因子となる傾向にあることが示されている<sup>9)</sup>。したがって今回われわれの研究においても過去の報告と同様に前処置としてシクロフォスファミドの投与を行った<sup>10,11)</sup>。

今回予備実験の結果としてチューブ留置群が非留置群と比較して死亡率が高く、炎症性サイトカインの産生能

も高かった。この結果はチューブ留置することでMDRABによる肺炎が重症化することを示している。この理由は明らかではないが、可能性としてチューブ留置により気管支表面が障害されたことや菌のクリアランスが障害されたことで菌の侵入が容易になったことが挙げられる。

AZMの治療でマウスの生存率が延長し、用量によってその差はみられなかった。*in vitro*の研究ではAZMがMDRABに対して他の抗菌薬との相乗作用を有することを報告されているが<sup>12~14)</sup>、われわれが検索した限りにおいて*in vivo*でMDRABに対するAZMの有効性を報告したものは存在しない。驚くべきことに今回の研究ではAZM単剤でその有効性が示された。肺内の生菌数では治療群とコントロール群で明らかな差はみられなかったことからAZMの有効性の要因は抗菌作用ではな

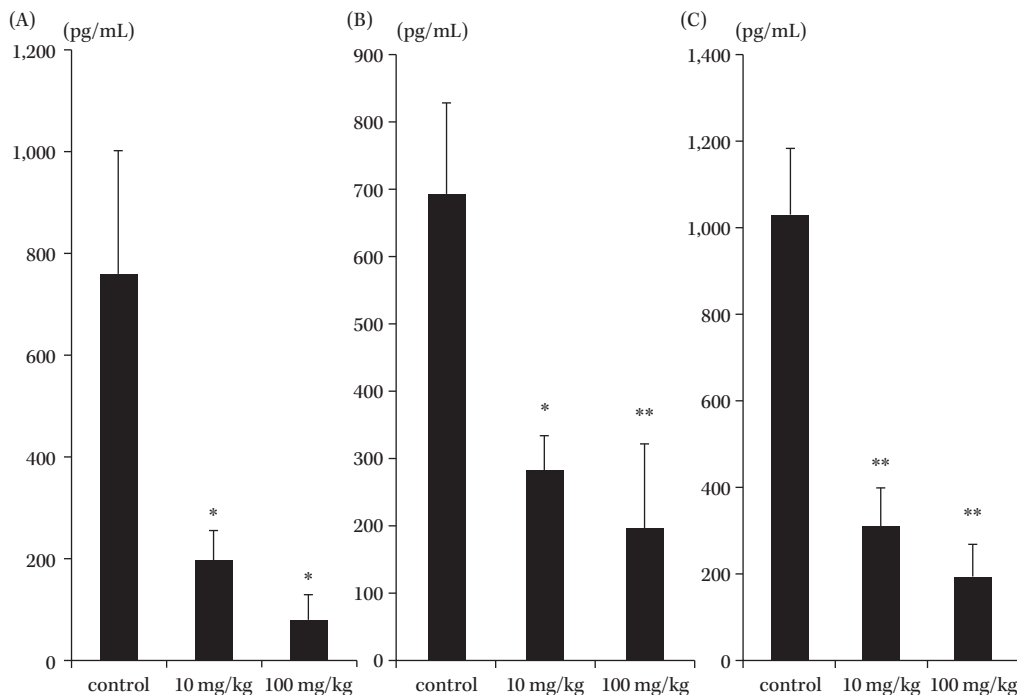


Fig. 5. Effect of AZM on inflammatory cytokines in BALF of infected mice<sup>6)</sup>.

The cytokines levels in BALF on control and AZM groups (10 mg and 100 mg/kg) were detected using ELISAs: IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) and MIP-2 (C). The data are expressed as means  $\pm$  SEM.

\* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. control group, respectively (n = 7 in each group).

いものと考えられる。さらに AZM 投与群では肺の組織学的所見も改善し、気管支洗浄液中の細胞数、サイトカイン濃度も改善した。Terao らは LPS 刺激を行ったマウスに AZM を投与することで炎症性サイトカインの産生を抑制することを報告しており<sup>15)</sup>、またウイルス性気管支炎マウスモデルにおいても AZM の投与により気道の炎症が抑制されたと報告されている<sup>16)</sup>。これらの研究は今回の結果を支持するものである。今回の研究では AZM が過剰な炎症性サイトカインを抑制することで肺障害や多臓器不全への進展を防ぎ、生存率が改善したと考えられる。

免疫抑制患者におけるマクロライドのような免疫調節作用を有する薬剤の使用はアシネトバクター感染症の有効な治療戦略となりうるであろう。しかし、その有効性を実証するには *A. baumannii* の病原因子、またそれに対する宿主の免疫反応をより理解し、AZM がどのように作用するかを研究していく必要がある<sup>17)</sup>。また、AZM と MDRAB に感受性のある薬剤 (例えばコリスチンやチゲサイクリン) との併用効果も今後の検討すべき問題である。

結論として AZM は MDRAB による VAP モデルにおいて肺の炎症を抑制した。この結果は AZM がその抗炎症作用により、MDRAB による VAP の新たな治療戦略となる可能性がある。

## II. 肺炎とマクロライド

高齢者では、口腔内分泌物の誤嚥による、誤嚥性肺炎を発症することが少なくない。誤嚥性肺炎は、多くの場合で原因菌が不明であり、この理由として、①誤嚥性肺炎患者では喀痰の喀出が困難な場合があり、喀痰を用いた原因菌検索が困難となること、②誤嚥性肺炎の原因菌に偏性嫌気性菌が含まれる場合が多くあり、嫌気培養による原因菌の分離は困難であること、③さまざまな口腔内微生物を含む口腔内容物を誤嚥していることが多く、原因病原菌を同定することが困難であること、などが挙げられる。

口腔内微生物による主要な疾病である歯周病は、口腔内に及ぼす病的影響に加え、近年糖尿病や早産などの全身疾患との関連性が指摘されている<sup>18,19)</sup>。呼吸器疾患との関連性については、口腔内不衛生が肺炎に病的影響を及ぼすことはさまざまな研究結果から指摘されている<sup>20,21)</sup>、歯周病との関連性は明らかではない。そこで今回、われわれは歯周病の主要な病原菌である *Fusobacterium nucleatum* に注目して、その生成物が下気道に及ぼす病的影響について検証を行った。

*F. nucleatum* は歯周病のほか、膿胸や口腔外臓器感染を発症する偏性嫌気性菌である。近年、その生成物に含まれる酪酸が、ヒト免疫不全症候群 (HIV) や潰瘍性大腸炎などの疾患に、病的影響をもつことが報告されている<sup>22,23)</sup>。さらに、*F. nucleatum* は、遺伝子学的細菌叢解析

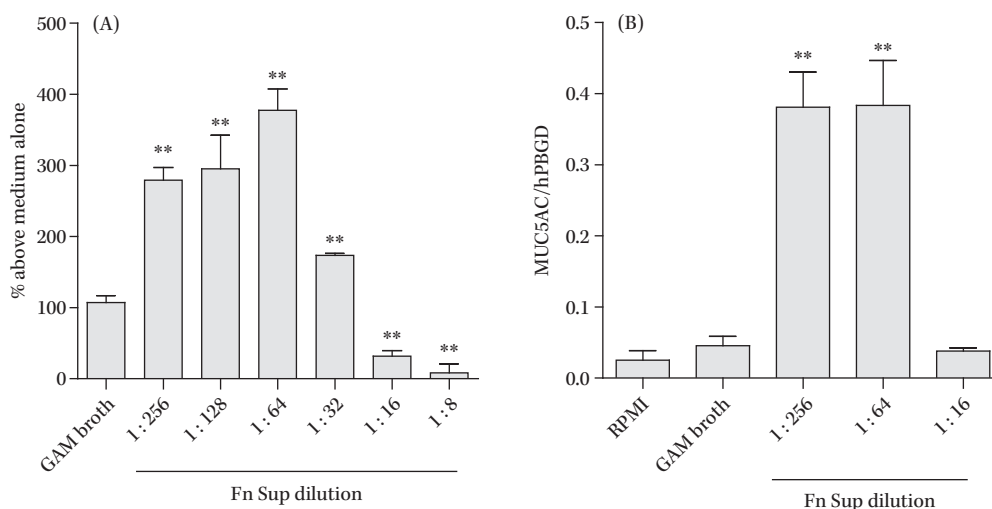


Fig. 6. Dose-dependent effect of *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant (Fn Sup) on MUC5AC expression<sup>26)</sup>.

Confluent NCI-H292 cells were stimulated using modified GAM medium (1:9 dilution), or various concentrations of Fn Sup (dilution ratio, from 1:319 to 1:9). A) MUC5AC protein was measured by performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at 24 h after the addition of Fn Sup (n=3). B) The mRNA level of MUC5AC expression at 10 h after the addition of Fn Sup was analyzed by RT-PCR (n=3). Data are expressed as the mean and SEM for 3 experiments.

\*\* indicates P value of <0.01 for comparison with modified GAM stimulation.

で大腸癌の組織中に高頻度に検出され、大腸癌の癌化に寄与する可能性が報告されており<sup>24,25)</sup>、現在最もその病原性が注目されている菌種の一つでもある。

今回われわれは、*F. nucleatum* の培養上清が、気道上皮産生細胞の粘液産生能に与える影響を検証した。粘液産生については、気道上皮から分泌される主要な高分子成分であるムチンのコア蛋白である MUC5AC に注目し、検証を行った<sup>26)</sup>。

また、*F. nucleatum* によって誘導される気道上皮細胞の粘液産生に対し、マクロライドや抗嫌気活性をもつ抗菌薬が与える影響も併せて検証を行った。マクロライドは、気道粘液産生亢進が問題となる慢性呼吸器疾患に対し、免疫修飾作用を介して治療効果を有するとされる抗菌薬である<sup>27)</sup>。また、クリンダマイシン (CLDM) やメトロニダゾール (MNZ) は、いずれも偏性嫌気性菌感染時に用いられる抗菌薬である。*F. nucleatum* は、最も頻繁に呼吸器感染の原因菌となる偏性嫌気性菌であり、マクロライドに自然耐性を有する菌種である。このため、抗嫌気活性をもつ抗菌薬と比較して、マクロライドが *F. nucleatum* による粘液産生亢進を抑制するようであれば、治療に際して有用な知見が得られるものと考えた。

*F. nucleatum* は、長崎大学病院検査部にて保存されている臨床株 (FNU-191 株) を用いた。気道上皮細胞は、粘液産生気道上皮である NCI-H292 細胞を使用した。実験は、*F. nucleatum* の培養上清を H292 細胞に添加し細胞刺激を行い、MUC5AC 産生能、細胞内伝達シグナルなどを ELISA 法、RT-PCR 法、WB 法で検証した。また、薬

剤はアジスロマイシン (AZM; ファイザー製薬)、クラリスロマイシン (CAM; 大正富山製薬)、クリンダマイシン (CLDM; ナカライテスク)、メトロニダゾール (MNZ; ナカライテスク) を使用し、*F. nucleatum* により誘導される MUC5AC 蛋白産生への影響を検証した。

*F. nucleatum* 上清は、H292 細胞の MUC5AC 蛋白発現を高濃度 (1:9, 1:19 希釈) で抑制し、比較的低濃度 (1:79 以下) で促進的に作用することが ELISA 法、RT-PCR 法で示された (Fig. 6A, B)。続いて、*F. nucleatum* 上清による MUC5AC 蛋白産生亢進に対する薬剤効果の検証を行った結果を Fig. 7 に示す。CAM, AZM を加えた群で、全用量群でコントロール群と比較して有意な MUC5AC 蛋白発現の低下が認められた。MUC5AC 発現量は薬剤用量に伴った減少がみられた。一方で、CLDM 群は 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を加えた群でのみ、MUC5AC 蛋白の有意な減少がみられた。MNZ 群では全容量で MUC5AC 蛋白発現量に減少は認められなかった。

これらの結果から、*F. nucleatum* 上清は、MUC5AC 誘導を蛋白量、mRNA 量ともに促進することが示された。また、*F. nucleatum* 上清に誘導される MUC5AC 発現への薬剤効果を検証した実験結果より、CAM, AZM は用量依存性に *F. nucleatum* 上清誘導性の MUC5AC 産生を抑制し、CLDM, MNZ では、CAM, AZM と同様の効果がないことが示された。

気道における粘液産生は、病原体や刺激物に対する宿主防御機構として重要である。一方、粘液の過剰産生は、喘息、嚢胞線維症、びまん性汎細気管支炎、COPD など



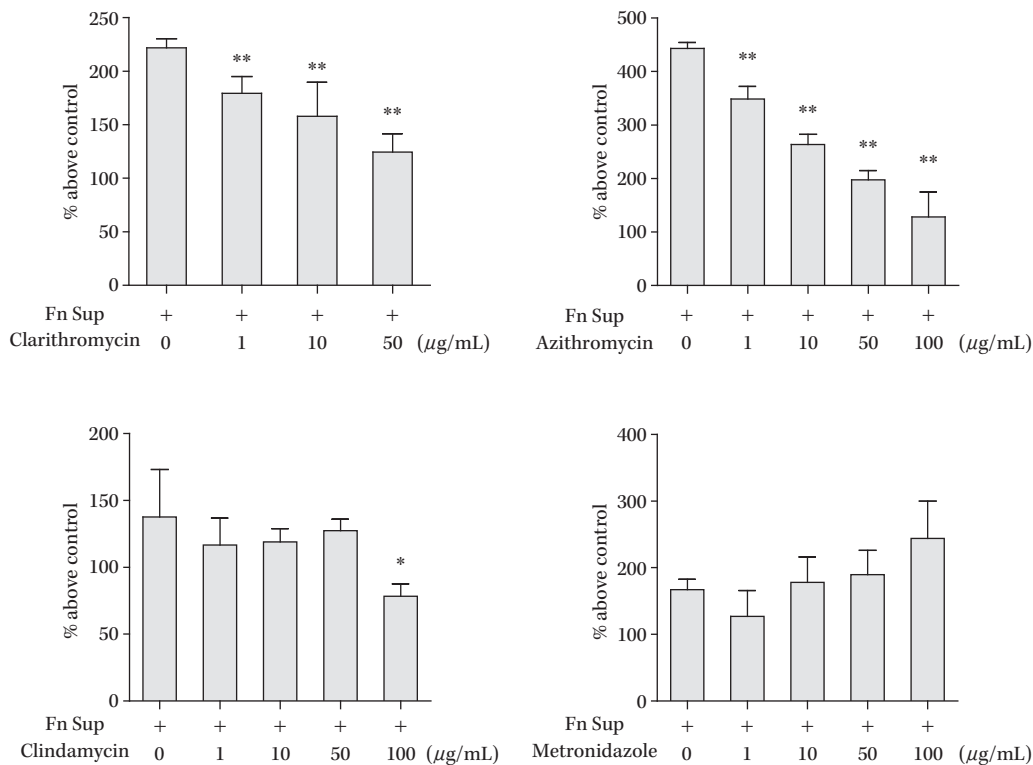


Fig. 7. Effects of azithromycin (AZM), clarithromycin (CAM), clindamycin (CLDM), and metronidazole (MNZ) on MUC5AC production induced by *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant (Fn Sup)<sup>26</sup>. Cells were treated with 1 to 100 µg of each drug. (CAM for 1 to 50 µg/mL; As maximal dose of CAM diluted in DMSO was available for 50 µg/mL) CAM and AZM dose-dependently suppressed Fn Sup-induced MUC5AC production. CLDM significantly suppressed Fn Sup-induced MUC5AC production only with 100 µg/mL, while MNZ presented no reduction of MUC5AC at any concentration. Data are expressed as the mean and SEM for 4 experiments. An asterisk and a dagger indicate P values of <0.05 and <0.01, respectively, for comparison with Fn Sup stimulation alone.

の慢性呼吸器疾患において、気道閉塞やガス交換の障害を引き起こすため、粘液過剰産生の抑制は、こうした疾患において有益となる<sup>28, 29</sup>。今回、*F. nucleatum*の上清は比較的低濃度で、気道上皮細胞の粘液産生を亢進する結果が認められた。*F. nucleatum*は、歯周病の原因菌として知られる偏性嫌気性菌であり、口腔内細菌叢の一部を形成する菌種である。歯周病原菌は、菌の生成物質が唾液を介して気道に流入することで、下気道に病的影響をもつ可能性が指摘されている<sup>30</sup>。健常人でも、睡眠中などには少量の口腔内容物の不顕性誤嚥を生じることが知られている<sup>31</sup>。これらのことと併せて、今回のわれわれの研究結果から、口腔内に存在する*F. nucleatum*は、その生成物の下気道への微量な誤嚥を介して、粘液過剰産生に寄与する可能性が示唆された。

本研究では、*F. nucleatum*上清誘導性のMUC5AC産生が、マクロライド系薬により抑制される結果も示された。マクロライド系薬の長期間の内服は、びまん性汎細気管支炎や嚢胞線維症において抗炎症作用を介し有益な効果があることが知られている<sup>26</sup>。最近、CAMの静脈注射が

人工呼吸器関連肺炎患者の有症状期間や生存率を改善することが、多施設2重盲検ランダム化試験で報告されており、マクロライドは慢性呼吸器疾患以外に、急性期の肺炎にも有益であることが示唆されている<sup>5</sup>。

これまで、気道上皮細胞のMUC5AC産生については、*Haemophilus influenzae*、緑膿菌、LPSなどの刺激による粘液産生をマクロライドが抑制的に作用する報告がなされている<sup>32-34</sup>。一方、CLDMやMNZは、細菌による炎症性サイトカインの亢進を抑制する作用を有することが、基礎実験で報告されているものの、気道上皮細胞の粘液産生への効果については、報告されていない<sup>35, 36</sup>。

今回、*F. nucleatum*上清誘導性のMUC5AC産生は、マクロライドで抑制され、CLDM、MNZでは有意な抑制が観察されない結果となった。これらより、マクロライド系薬は、*F. nucleatum*に誘導される粘液産生亢進を抑制し、CLDMやMNZとは異なる機序で、治療効果をもつ可能性が示唆された。今後、酪酸など、*F. nucleatum*上清中の個々の成分に注目し詳細な病態機序を解明し、さらに臨床検体中に含まれる*F. nucleatum*や生成物の頻度な

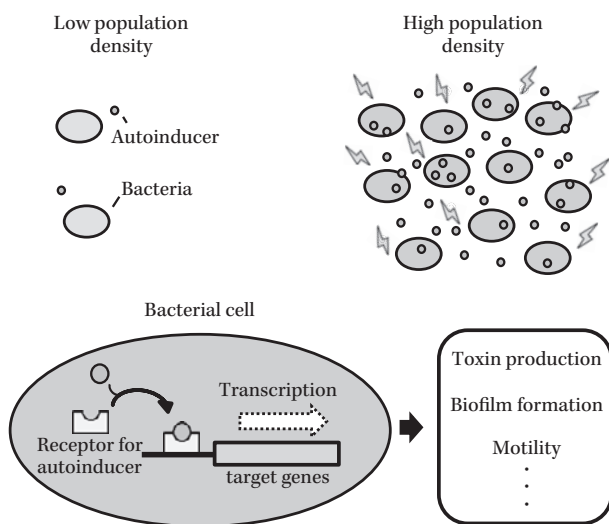


Fig. 8. A simple diagram of Quorum Sensing.

Many types of bacteria produce and release signal molecules called autoinducers into their surrounding environment. These autoinducers accumulate as the bacterial cell density increases. When autoinducers reach a threshold concentration, they are detected by their cognate receptors present in the cytoplasm or in the membrane, leading to changes in gene expression.

どに注目した研究を展開していくことが望まれる。

### III. 病原因子の制御

近年、薬剤耐性菌の増加が現代の医療システムを脅かす深刻な問題となっている。2013年9月の米国疾病管理予防センターの報告によると、米国では年間200万人以上が薬剤耐性菌による重篤な感染症に罹患し、少なくとも2万3,000人の直接的な死亡原因となっていた。また、欧州連合においても年間2万5,000人以上が薬剤耐性菌によって死亡しており、世界各国の共通の課題として対応する必要に迫られている。現在、多剤耐性菌の治療に使用できる薬剤はごくわずかしかなく、新規抗菌薬の開発が耐性菌克服のための戦略として重要な位置を占めている。しかし、抗菌薬開発のパイプラインは枯渇してきており、1987年以降新規クラスの抗菌薬が開発されていない<sup>37)</sup>。その理由の一つとして、新しい抗菌薬に対しても細菌がすぐに耐性を獲得してしまうという問題があり、殺菌や増殖抑制を目標とした従来の抗菌薬治療はいずれ限界が来るおそれがある。

このような問題を解決するため、細菌を殺さずにその病原因子を制御することで、過度な炎症反応や感染症の発症を予防する治療法が期待されている<sup>38)</sup>。われわれは、細菌の病原因子の発現に重要な役割を果たすクオラムセンシング (Quorum Sensing) に注目し、特に緑膿菌感染症に対するその制御法の研究を行っている。クオラムセンシングは、細菌同士が情報伝達シグナルを介して周囲

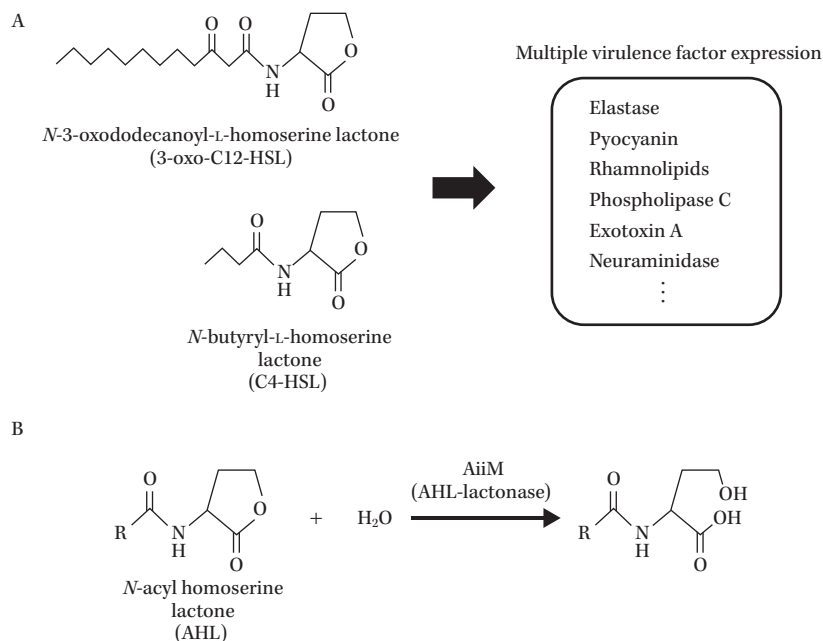


Fig. 9. A schematic illustration of inactivation of homoserine lactone by AiiM.

A) Chemical structures of two major AHL molecules (C4-HSL and 3-oxo-C12-HSL) produced by *P. aeruginosa*. These signals regulate the production of various virulence factors, such as elastase, pyocyanin and rhamnolipid, which play important roles in promoting the infection. B) AHL-inactivating enzyme. AiiM is an AHL-lactonase that inactivates AHL by hydrolysing the lactone bond of AHL.

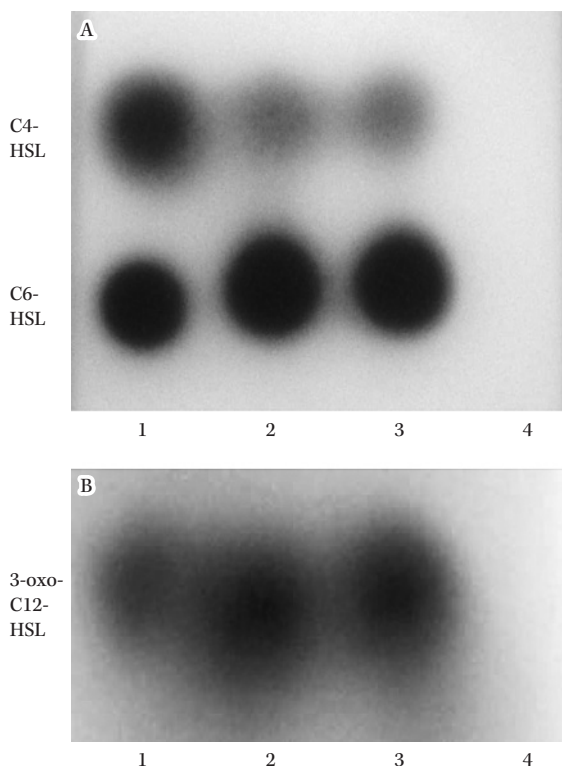


Fig. 10. Thin layer chromatography analysis of AHL produced by *P. aeruginosa* strains<sup>44)</sup>. Lane 1, AHL standards (C4-HSL, C6-HSL, and 3-oxo-C12-HSL); Lane 2, PAO1. Lane 3: PAO1/pMJT1; Lane 4, PAO1/pMJT1-aiiM. Spots were visualized with the AHL-reporter strains *Chromobacterium violaceum* CV026 for short-chain AHL (A) or *C. violaceum* VIR07 for long-chain AHL (B). None of the three AHLs were detected from PAO1/pMJT1-aiiM.

の菌密度を感知し、それに応じて遺伝子発現を制御するシステムである (Fig. 8)。細菌がある一定数を超えると毒素産生やバイオフィーム形成などを一斉に起こすようになり、協調的な集団行動がこの機構によって可能となっている<sup>39)</sup>。細菌が産生するシグナル物質はオートインデューサー (Autoinducer) と呼ばれ、その構造は菌種によってさまざまである。グラム陰性菌の場合、ホモセリンラクトン環を共通の構造として種々のアシル基がつく N-アシルホモセリンラクトン (N-acyl homoserine lactone; AHL) が代表的なオートインデューサーである。緑膿菌のクオラムセンシングについては、特に *Las* 系および *Rhl* 系の 2 系統について研究が進んでいる。*Las* 系と *Rhl* 系の AHL はそれぞれ N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) と N-butyryl-homoserine lactone (C4-HSL) であり、これらの系によってエラストラーゼ、ピオシアニン、ラムノリピッドなど緑膿菌のさまざまな病原因子の発現が制御されている (Fig. 9A)<sup>40)</sup>。AHL (3-oxo-C12-HSL, C4-HSL) はクオラムセンシングを介した緑膿菌の病原性に強く関与してい

るため、これら AHL をターゲットにしてクオラムセンシングを阻害することで、緑膿菌の病原因子を抑制できる可能性がある。

既存の薬剤では、AZM でクオラムセンシングの抑制効果が報告されている<sup>41)</sup>。クオラムセンシングにより特異的な阻害物質として、AHL を分解する新規の酵素 AiiM がバレイショの葉に存在する細菌から発見され、2010 年に報告された<sup>42, 43)</sup>。AiiM は、AHL のラクトン環を加水分解してその活性を失わせる AHL-lactonase として作用する (Fig. 9B)。われわれは、AiiM が緑膿菌の病原性制御に有効であるか検討を行った<sup>44)</sup>。まず、aiiM 遺伝子をプラスミド pMJT1 に組み込み、このプラスミドベクターを用いて緑膿菌標準株 PAO1 の形質転換を行った。作製した aiiM 遺伝子導入株 (PAO1/pMJT1-aiiM) とコントロール株 (PAO1/pMJT1) を用い、*in vitro* における AHL 濃度や病原因子の産生、さらにマウス肺炎モデルにおける病原性の比較を行った。

AHL に反応して紫色の色素を生産するレポーター株 *Chromobacterium violaceum* VIR07 株および CV026 株を使用して、緑膿菌培養上清中の AHL を検出した (Fig. 10)。PAO1 の野生株やコントロール株と比較して、PAO1/pMJT1-aiiM では 3-oxo-C12-HSL と C4-HSL のいずれとも検出されず、aiiM 遺伝子を導入することで緑膿菌自身が AiiM を産生し AHL が分解されたものと考えられた。クオラムセンシングによって制御される緑色色素のピオシアニンやエラストラーゼなどの病原因子の産生も、PAO1/pMJT1-aiiM で有意に低下していた (Fig. 11)。また、気道上皮細胞に緑膿菌を感染させたところ、PAO1/pMJT1-aiiM はコントロール株よりも有意に低い細胞傷害性を示した。次に、ddY 系マウスに緑膿菌を気管内投与して急性肺炎モデルを作製した。コントロール株が感染したマウスは、72 時間以内に 100% が死亡する非常に重篤な肺炎が起こっていた。一方、PAO1/pMJT1-aiiM 感染群は 7 日後の死亡率が 25% 程度であり、生存率は大幅に向上していた (Fig. 12A)。肺内生菌数は両群で差はみられなかったが、気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカインは PAO1/pMJT1-aiiM 感染マウスで減少し、肺傷害も軽度であった。また、脾臓や血液中から検出される菌は PAO1/pMJT1-aiiM 感染群で有意に少なく、クオラムセンシングを阻害することで肺炎から続発する菌血症が抑制される傾向がみられた (Fig. 12B)。

本研究の結果から、たとえ致死的な肺炎を起こす菌量であっても、クオラムセンシングを阻害することで肺傷害を軽減して生存率を大きく改善させることができ、緑膿菌の病原性制御に AHL-lactonase が有用である可能性が示唆された。今後は精製した AiiM 蛋白を用い有効性や安全性のさらなる評価を進めていく必要があるが、感染症の発症予防や劇症化の抑制などさまざまな応用性が考えられる結果であった。高齢社会を迎え、易感染性



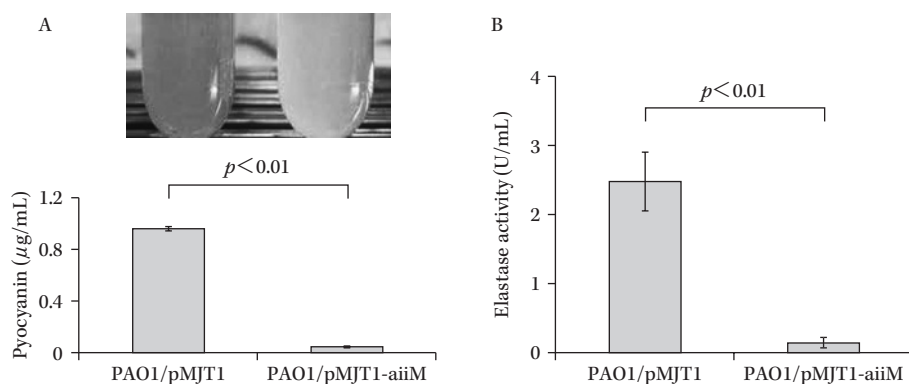


Fig. 11. The amount of pyocyanin (A) and elastase (B) activity in the culture supernatant of PAO1/pMJT1 or PAO1/pMJT1-aiiM<sup>44</sup>.

Each bar represents the means of triplicates of the samples, and the error bars indicate the standard error of the means. PAO1/pMJT1-aiiM produced very low levels of both pyocyanin and elastase.

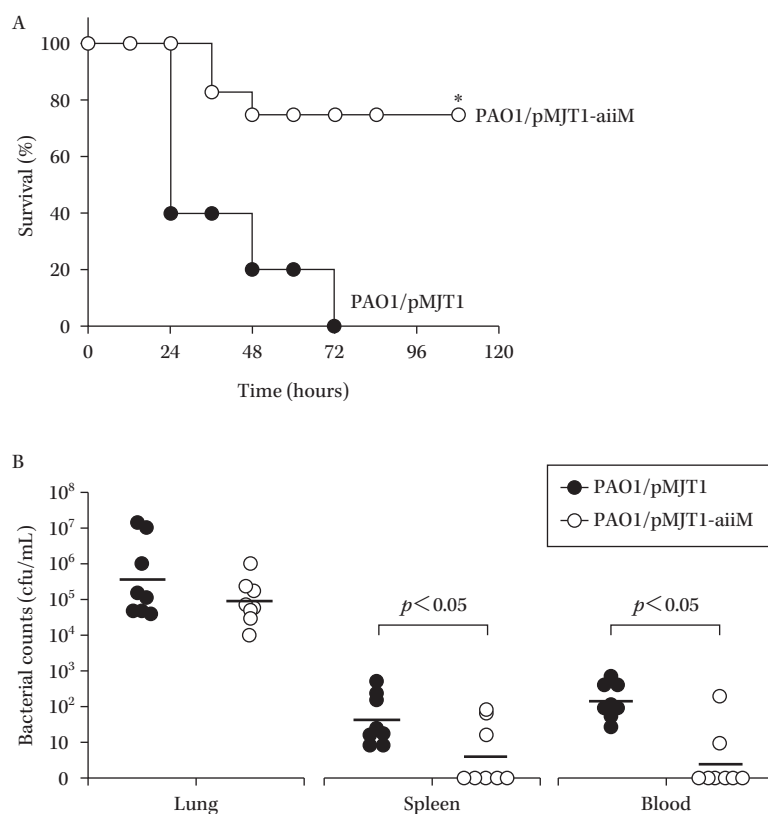


Fig. 12. Analysis of survival data and bacterial loads<sup>44</sup>.

A) Kaplan-Meier survival curve of the mice infected with *P. aeruginosa* PAO1/pMJT1 (closed circle) or PAO1/pMJT1-aiiM (open circle). Survival was followed for 7 days.  $n = 10-12$  mice per group. *P. aeruginosa* PAO1/pMJT1-aiiM exhibited significantly lower mortality than wild-type control strain. \*,  $P < 0.01$  compared with PAO1/pMJT1. B) Bacterial loads in the lungs, spleen, and blood at 24 h after infection with *P. aeruginosa* PAO1/pMJT1 (closed circle) or PAO1/pMJT1-aiiM (open circle). Each horizontal line represents the mean of the bacterial counts.  $n = 8$  mice per group. *P. aeruginosa* PAO1/pMJT1-aiiM had a decreased ability to disseminate in the infected mouse.

宿主の増加とともに薬剤耐性菌への対策はますます重要性を増してきている。細菌の増殖に対する影響が少ないクオラムセンシング阻害剤は、薬剤耐性化を誘導しにくい新しい治療法となる可能性を秘めており、今後のさらなる研究開発が期待される。

利益相反自己申告：柳原克紀、河野茂はファイザー株式会社、大正富山医薬品株式会社から講演料、寄附金を受けている。その他の著者は申告すべきものなし。

#### 文 献

- Munoz-Price L S, Weinstein R A: *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 2008; 358: 1271-81
- Reddy T, Chopra T, Marchaim D, Pogue J M, Alangaden G, Salimnia H, et al: Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates from a metropolitan Detroit health system. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2235-8
- Rello J, Ulldemolins M, Lisboa T, Koulenti D, Manez R, Martin-Loeches I, et al: Determinants of prescription and choice of empirical therapy for hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2011; 37: 1332-9
- Arnold F W, Summersgill J T, Lajoie A S, Peyrani P, Marrie T J, Rossi P, et al: A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1086-93
- Giamarellos-Bourboulis E J, Pechere J C, Routsis C, Plachouras D, Kollias S, Raftogiannis M, et al: Effect of clarithromycin in patients with sepsis and ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1157-64
- Yamada K, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Miyama Y, Nagaoka K, et al: Azithromycin attenuates lung inflammation in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 3883-8
- Kaneko Y, Yanagihara K, Kuroki M, Ohi H, Kakeya H, Miyazaki Y, et al: Effects of parenterally administered ciprofloxacin in a murine model of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection mimicking ventilator-associated pneumonia. *Chemotherapy* 2001; 47: 421-9
- McConnell M J, Actis L, Pachon J: *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 130-55
- Yamada K, Yanagihara K, Araki N, Harada Y, Morinaga Y, Akamatsu N, et al: Clinical characteristics of tertiary hospital patients from whom *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex strains were isolated. *Intern Med* 2012; 51: 51-7
- Eveillard M, Soltner C, Kempf M, Saint-Andre J P, Lemarie C, Randrianarivelo C, et al: The virulence variability of different *Acinetobacter baumannii* strains in experimental pneumonia. *J Infect* 2010; 60: 154-61
- Yuan Z, Ledesma K R, Singh R, Hou J, Prince R A, Tam V H: Quantitative assessment of combination antimicrobial therapy against multidrug-resistant bacteria in a murine pneumonia model. *J Infect Dis* 2010; 201: 889-97
- Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Pascual A, Perea E J: *In vitro* activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy* 2003; 49: 24-6
- Timurkaynak F, Can F, Azap O K, Demirbilek M, Arslan H, Karaman S O: *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 224-8
- Wareham D W, Bean D C: *In-vitro* activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 10
- Terao H, Asano K, Kanai K, Kyo Y, Watanabe S, Hisamitsu T, et al: Suppressive activity of macrolide antibiotics on nitric oxide production by lipopolysaccharide stimulation in mice. *Mediators Inflamm* 2003; 12: 195-202
- Beigelman A, Mikols C L, Gunsten S P, Cannon C L, Brody S L, Walter M J: Azithromycin attenuates airway inflammation in a mouse model of viral bronchiolitis. *Respir Res* 2010; 11: 90
- Mortensen B L, Skaar E P: Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. *Cell Microbiol* 2012; 14: 1336-44
- Demmer R T, Jacobs D R Jr, Desvarieux M: Periodontal disease and incident type 2 diabetes: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiologic follow-up study. *Diabetes Care* 2008; 31: 1373-9
- Matevosyan N R: Periodontal disease and perinatal outcomes. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283: 675-86
- Adachi M, Ishihara K, Abe S, Okuda K, Ishikawa T: Effect of professional oral health care on the elderly living in nursing homes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 191-5
- Sjögren P, Nilsson E, Forsell M, Johansson O, Hoogstraete J: A systematic review of the preventive effect of oral hygiene on pneumonia and respiratory tract infection in elderly people in hospitals and nursing homes: effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 2124-30
- Imai K, Yamada K, Tamura M, Ochiai K, Okamoto T: Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 2583-92
- Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N: Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 2003; 52: 79-83
- Kostic A D, Gevers D, Pedamallu C S, Michaud M, Duke F, Earl A M, et al: Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 292-8

- 25) Rubinstein M R, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han Y W: *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 2013; 14: 195-206
- 26) Nagaoka K, Yanagihara K, Harada Y, Yamada K, Migiyama Y, Morinaga Y, et al: Macrolides inhibit *Fusobacterium nucleatum*-induced MUC5AC production in human airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 1844-9
- 27) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Ando M: Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1829-32
- 28) Dohrman A, Miyata S, Gallup M, Li J D, Chapelin C, Coste A, et al: Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1406: 251-9
- 29) Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza E C, Majima Y: *In vivo* and *in vitro* effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 581-7
- 30) Azarpazhooh A, Leake J L: Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J Periodontol* 2006; 77: 1465-82
- 31) Marik P E, Kaplan D: Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly. *Chest* 2003; 124: 328-36
- 32) Araki N, Yanagihara K, Morinaga Y, Yamada K, Nakamura S, Yamada Y, et al: Azithromycin inhibits nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC5AC expression and secretion via inhibition of activator protein-1 in human airway epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 644: 209-14
- 33) Imamura Y, Yanagihara K, Mizuta Y, Seki M, Ohno H, Higashiyama Y, et al: Azithromycin inhibits MUC5AC production induced by the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone in NCI-H292 Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3457-61
- 34) Nakamura S, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Morinaga Y, Izumikawa K, et al: High-dose tobramycin inhibits lipopolysaccharide-induced MUC5AC production in human lung epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2011 Mar 21 [Epub ahead of print]
- 35) Pichereau S, Moran J J, Hayney M S, Shukla S K, Sakoulas G, Rose W E: Concentration-dependent effects of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* toxin-mediated cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 123-9
- 36) Rizzo A, Paolillo R, Guida L, Annunziata M, Bevilacqua N, Tufano M A: Effect of metronidazole and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 744-50
- 37) Silver L L: Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 71-109
- 38) Spellberg B, Bartlett J G, Gilbert D N: The future of antibiotics and resistance. *N Engl J Med* 2013; 368: 299-302
- 39) Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P: Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; 176: 269-75
- 40) Sifri C D: Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1070-6
- 41) Tateda K, Comte R, Pechere J C, Kohler T, Yamaguchi K, Van Delden C: Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1930-3
- 42) Morohoshi T, Someya N, Ikeda T: Novel N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73: 2124-7
- 43) Wang W Z, Morohoshi T, Ikenoya M, Someya N, Ikeda T: AiiM, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2524-30
- 44) Migiyama Y, Kaneko Y, Yanagihara K, Morohoshi T, Morinaga Y, Nakamura S, et al: Efficacy of AiiM, an N-acylhomoserine lactonase, against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model of acute pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 3653-8