Bacterial Biofilms and Infectious Diseases

バイオフィームと感染症

Yasuda, Hiroshi

Biological Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan

FAX : 81-3-5436-8565

Key Words: alginate, bacteria, biofilm, infectious disease, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

In this review, the following items will be generally stated : what is a biofilm formed by bacteria, how is the biofilm concerned in our environmental conditions, and what kinds of materials do form bacterial biofilms. Formation of bacterial biofilm is originally one of the ways of constructing bacterial colonies. Bacterial biofilm consists of sticky polysaccharides excreted by bacteria and bacterial cells. Many bacterial biofilms that exist in nature have no connection with human beings. However, sometimes, bacterial biofilms are formed in or on the surfaces of structures constructed by humans, and then result in functional disorders of these structures. Biofilms that are formed in the human body by infected bacteria cause delays of the cure of diseases, because bacterial biofilms act as a protection for the bacteria from antibiotics and defence mechanisms. The most important bacteria that cause biofilm infections in human are *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *P. aeruginosa* often cause serious and chronic air tract and urinary tract infections by forming biofilms. *S. epidermidis* causes foreign body infections by forming biofilms on the surfaces of catheters and cannulas which are sometimes inserted into the human body to treat various diseases. The exopolysaccharide produced by *P. aeruginosa* is alginic acid has been well investigated. The exopolysaccharide produced by *S. epidermidis* is not well investigated yet. Some ways of dealing with biofilm infections are also discussed.

要 約

本総説は、細菌によって形成されるバイオフィームとは何か、それが我々とう関係しているのか、物質的にはいかなるものなのか、等について概説するものである。細菌バイオフィームは、本来、細菌が環境に順応して生き延びて行くために形成する細菌集落のありかたの一つであって、細菌自らが分泌する粘性の多糖類と菌体とからなる構造体である。自然界に存在するほとんどの細菌バイオフィームは人間とは無関係であるが、時々それらは人間が構築した構造物の中に、あるいは、それらの表面に形成され、構造物の機能をそこなう場合がある。また、人間の体内で、感染という形で侵入した病原菌によって形成されるバイオフィームは結果的に抗菌剤や生体の防禦機構から病原菌を護るよう作用し、感染症からの回復を妨げる。種々の細菌によってバイオフィームは形成されるが、人体での「感染症」を考える時、特に問題となるのは緑膿菌と表皮ブドウ球菌である。緑膿菌はバイオフィームを形成することにより、しばしば難治性の呼吸器感染症や尿路感染症の原因となる。また、表皮ブドウ球菌は、種々の病気の治療目的でしばしば人体に挿入されるカテーテルやカニューレといった異物体の表面にバイオフィームを形成し、異物体周辺感染症の原因となる。緑膿菌が産生する多糖類はアルギン酸であり、構造や合成経路、産生の制御機構などについて非常に良く研究されている。表皮ブドウ球菌については良く分かってはいない。最後に、バイオフィーム感染症に対するいくつかの対処策についても触れる。

A. Bacterial Biofilms

Studies on bacteria, especially on pathogenic bacteria, have made remarkable progress from the time of Pasteur to the present day. Progress in the culture technique of bacteria made it possible to obtain a large quantity of objective bacteria in a short period of time in a well-fed culture medium, and resulted in progress on separation, identification of bacteria, and genetic analysis. These kinds of well-fed media give bacteria an excellent living environment that is without stress and without active effort being required. Therefore, *in vitro*, intra-test-tube bacteriology has been studying "spoiled" bacteria. However, in natural environments, bacteria would have to exert great efforts

A. バイオフィームとは

細菌、特に病原性細菌の研究は、Pasteur 以来急速に進歩して来た。この進歩の裏には細菌の培養技術の進歩がある。栄養分に富んだ培地の中で、所定の菌株を大量に、しかもすばやく増殖させることが可能になったおかげで、菌の分離、培養、同定、遺伝的解析等が容易になり、細菌学は進歩したのである。このような培地の中は細菌にとっては極めて住み心地の良い場所であり、生き続けるための工夫や努力を忘れさせてくれる場所である。それゆえ、いわゆる試験管内細菌学は、「箱入り娘」ならぬ「箱入り」細菌を相手にして来たわけである。しかし、自然界では細菌は生きて行くために種々の努力をしなければなら

to continue to live, and they would also adapt themselves to the environment. In fact, many differences in nature between *in-vitro*-growing bacteria and those grown in natural environments (5, 10, 36).

In nature, many bacteria live in ill-fed streams and the sea. When living things exist in such an ill-fed aquatic environment, generally they are found in two conditions: one is the planktonic condition, being separate each other; and the other is adherence and colony formation on the surface of something. Which condition is best depends on the organism's size and way of feeding. In the case of bacteria, they readily form a colony on the surface of something (43, 71), though they can live even in a planktonic condition. In order to form a colony, bacteria must first adhere to the surface of something. Adhesion starts from a reversible association by static-electrical power, and then it shifts to an irreversible condition by adhesins, which are peculiar to respective bacteria (4, 44). Adherent bacteria repeat division and form microcolonies while secreting polysaccharides (exopolysaccharides, glycocalyx; the word "slime" is preferably used for a mixture of polysaccharides, nucleic acids, and/or proteins secreted by bacteria). Specifically, bacteria form microcolonies by being embedded in polysaccharide layers, just as tiles are embedded in mortar. These microcolonies grow and combine with each other to form a matrix, a bacterial living-region. The matrix is generally called biofilm.

Biofilms are found in various places in nature. Small stones are sometimes slippery even in a swift current, owing to the existence of bacterial biofilms (35). Biofilms are also formed in drainage pipes for undersea tunnels, drainpipes, water-cooled sides of metal surfaces in heat exchangers (9), valves for oilpipes, and so on. Bacterial biofilm formation in industrial water lines results in various problems, like drain-stopping, metal corrosion, obstacles to valve-handling, etc. Costerton (9) patented a means of eradicating biofilm formed on the water-cool side of a metal surface in a heat exchanger. His method was to eradicate bacterial biofilm by gentle repetition of freeze-drying.

In the human body, bacteria construct normal flora by forming biofilm, for instance, on the surface of teeth, to maintain coexistence between man and bacteria. However, biofilm formation in the human body by pathogenic bacteria often causes serious problems. Extensive bacterial biofilms are found on inserted catheters and cannulas (48, 53, 60), cardiac pacemakers (40, 41), wound drainage tubes (53), artificial joints (24, 25), and infected tissues, such as the lungs, trachea, and the urinary tract (30, 42, 46). Biofilms in a living body generally take on a more complex structure than those in nature, because a fibronectin that originates from the host, blood cells, and other materials, in company with bacterial exopolysaccharides, participate in the biofilm formation (6, 62, 70).

ないし、環境に応じて自分自身を変えて行く必要すらある。実際、自然界に生息する細菌が、試験管内で増殖した同種の細菌とはいろいろ異なる性質を示すことが少なからず観察されている (5, 10, 36)。

栄養分の少ない清流中や海の中等にも多くの細菌が生息している。一般にこのような低栄養の水性環境の中で生物が生き続けて行くにあたり、お互いがばらばらになった浮遊状態で存在するのが得策なのか、あるいは何かの表面に付着してそこで分裂増殖し、同種の生物の集落 (colony) を形成するのが得策なのかは、その生物の大きさや採餌様式等によって違って来るだろう。細菌の場合は浮遊状態でも生きてはいけるが、何かの表面で集落を形成して生存の場とすることが多い (43, 71)。そのような場合、細菌はまず水中で何かの表面に付着しなければならない。付着 (adhesion) はまず静電的要素による可逆的な吸着 (association) に始まり、次いで細菌によってそれぞれ異なる固有の付着因子 (adhesin) による非可逆的な状態へと移行する (4, 44)。付着した細菌は種々の多糖体 (exopolysaccharide; glycocalyx) ともいう。また slime という場合もあるが、これは、菌が細胞外に分泌した多糖体やタンパク質、あるいは核酸成分の混合体を指すことが多いを菌体外に分泌しながら分裂をくり返し、小集落 (microcolony) を形成して行く (39)。すなわち、小集落は、菌体が多糖体の層の中に埋め込まれた状態で形成される。ちょうど、タイルを漆喰で塗り固めて行くように。このような小集落は成長しながら合体していき、細菌にとっての生活域 (matrix) を形成するが、このような matrix をバイオフィームと総称する。

このようなバイオフィームは実際自然界のいたる所に存在する。川底の小石は、かなり上流の流れの速い清流中のものでも、表面がぬるぬるしているが、バイオフィームが原因であることが多い (44)。海底トンネルの排水パイプの内側、下水道、熱交換機の水曹表面 (9)、送油系のバルブ等々でも形成される。このような工業用水系におけるバイオフィーム形成は水ずまりや金属の腐蝕、バルブの操作障害等、種々の弊害をもたらす。このようなバイオフィームに対しては、例えば、ゆっくりした氷冷を繰り返すことによりバイオフィーム中に小さい氷の結晶を作らせ、これを一気に氷解することによりバイオフィームを剥がし取るといった方法が考案されている (9)。

人体の中でも、細菌は菌の表面などにバイオフィームを作ることにより常在細菌叢を構築するが、このような場合にはヒトと細菌は共棲関係を維持することが出来る。しかし、病原性細菌による人体内でのバイオフィーム形成は重大な問題となる。挿入されたカテーテルやカニューレ (48, 53, 60) の表面、心臓のペースメーカーの表面 (40, 41)、ドレナージチューブの表面 (53)、人工関節 (24, 25)、更には、呼吸器 (肺、気管支) や尿路を始めとした種々の感染組織 (30, 42, 46) においても感染菌によるバイオフィーム形成が認められている。体内でのバイオフィーム形成には細菌が分泌する多糖体以外にも、宿主由来のフィブロネクチン (fibronectin)、血液細胞、その他が関与し、自然界に存在するよりも複雑な構造体を形成する (6, 62, 70)。感染

Biofilm bacteria in infected tissues are buried in the exopolysaccharides and materials that originate from the host, and they also undergo some changes on their membranes (18, 50, 51); as a result they become resistant to antibacterial agents (49, 56, 64).

A living body must always deal with invasion by such foreign bodies as bacteria, by using phagocytic cells such as neutrophils and macrophages, to eliminate them. These functions of phagocytes are important for the prevention of invasion and bacterial establishment. "Infection" is the condition in which bacteria have overcome the defense mechanisms of a living body, especially phagocytes. However, phagocytes continue to fight bacteria even after infection has been established. Antibacterial agents can never completely eliminate bacteria from living bodies without the help of defense mechanisms of a living body. Biofilm bacteria are very troublesome because they become resistant to the bactericidal activities of phagocytes (23, 28, 63, 68). In fact, when infection becomes established on or around catheters and pacemakers, it is said to be very difficult to treat the infections only with antibacterial agents without removing these foreign bodies (8, 17, 26)

B. Exopolysaccharides Secreted by Bacteria

Staphylococcus epidermidis is representative of pathogenic bacteria that form biofilms on the surfaces of foreign bodies inserted into living bodies.

Cystic fibrosis, the most prevalent lethal genetic disease among Caucasians, is inherited as an autosomal recessive trait at a rate of 1 in 2,000 live births (12, 57, 66). Patients with cystic fibrosis usually have a long history of purulent bronchitis, leading to progressive destruction of small bronchioles, followed by involvement of the large airways (52). The pathogens most frequently associated with these respiratory tract infections are *Staphylococcus aureus* or mucoid-type *Pseudomonas aeruginosa*. Mucoid-type *P. aeruginosa* excrete many more exopolysaccharides than the non-mucoid type. Diffuse pan-bronchiolitis is another chronic respiratory disease, which is sometimes seen even in Japan. The causative bacteria of this disease is also *P. aeruginosa*. These infectious diseases are well known as very serious diseases, because of the exopolysaccharides secreted by the bacteria involved. Therefore, studies on the nature, the pathways of biosynthesis, and the genetics of these exopolysaccharides are performed mainly using *P. aeruginosa* and *Staphylococci*. In particular, *P. aeruginosa* has been studied extensively.

The exopolysaccharide secreted by *P. aeruginosa* is alginic acid (alginate) (33, 34). Alginates are also produced by other bacteria (20, 55), as well as by various marine algae (31, 32). Alginate is a linear copolymer of β -1,4-linked D-mannuronic acid and variable amounts of C-5 epimer L-guluronic acid. Bacterial alginates differ from the algal poly-

場で菌がバイオフィームを形成すると、菌は多糖体やその他の宿主由来の成分の中に埋め込まれた状態になるが、このような菌は本来感受性を有する抗生物質やその他の抗菌剤から物理的に保護されることになり、また、膜構造にも何等かの変化をおこし(55、56、57)、これら抗菌剤に抵抗性になる(49、56、64)。

生体は侵入する細菌などの異物に対して、常に好中球やマクロファージ (macrophage) と言った、いわゆる貪食細胞で対抗し、これら異物を貪食、消化、排除している。このような貪食細胞の働きは生体の防禦機構の極一部を担うにすぎないものではあるが、細菌の侵入と組織への定着を阻止するという意味で極めて重要である。「感染」とは、生体の防禦機構、特に貪食細胞による排除機構が細菌の侵入、増殖を防ぎきれなくなった状態であるが、「感染」後においても貪食細胞は感染菌に対して果敢な戦闘を続けることになる。抗生物質を始めとした抗菌剤を投与することにより、感染菌の大部分は殺すことが出来るが、生体の防禦機構の援護なしで完治に導くことはほとんど不可能と考えられている。バイオフィーム菌は、このような貪食細胞による貪食、殺菌作用にも抵抗性になるという点でさらにやっかいなものとなる(23、28、63、68)。実際、生体に挿入されたカテーテルやペースメーカーなどの周辺で感染が成立した場合には、いくら抗菌剤を投与しても、それら挿入物を抜去しないかぎり感染は治癒しないと言われている (8、17、26)。

B. 細菌が分泌する多糖体とは

一概に細菌感染症と言ってもその原因となる菌(起炎菌)は多岐にわたる。前章で述べたように、治療のために生体に挿入された異物 (foreign body) 周辺での感染症は、バイオフィームが関与する感染症の代表的なものの一つである。起炎菌の代表的なものは表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) である。濾胞性肺腺維症 (cystic fibrosis) という病気がある。この病気は、特にコーカサス地方の人々の間で高頻度にみられる(約 2,000 人に 1 人) 遺伝病であり、致死的なものである (12、57、66)。患者では、一般に、化膿性の気管支炎が長期間持続し、広範な細気管支の壊死から気管の壊死に至る(52)。この病気にかかった人々の多くはムコイド型の緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) による肺の感染症で死亡する。ムコイド型緑膿菌は非ムコイド(mucoid) 型のもものと比較して、より多くの多糖体を菌体外に分泌する。我が国でも見られる呼吸器病に慢性汎細気管支炎 (diffuse pan-bronchiolitis) というものがあるが、この感染症の主たる起炎菌もまた緑膿菌である。これらの感染症は極めて難治性であるが、その原因として細菌が分泌する多糖体の存在が考えられている。それゆえ、これら多糖体の性質や生合成経路、遺伝子学に関する研究は緑膿菌と表皮ブドウ球菌でなされているが、特に緑膿菌の産生する多糖体については詳細に研究されている。

緑膿菌、特にムコイド型緑膿菌、が産生する多糖体はアルギン酸 (alginic acid, alginate) である (33、34)。アルギン酸は緑膿菌以外のある種の細菌によっても産生されるが (20、55)、他に海の種々の藻類によっても産生される (31、32)。D-マンヌロン酸 (D-mannuronic acid, D-mannuronate) とこのものの C-5 epimer である L-グルロン酸 (L-guluronic acid, L-guluronate) と

Fig. 1. Alginate biosynthesis pathway. Arrows 1, 2, 3, and 4 indicate the undefined steps of polymerization, acetylation, export, and epimerization. The gene encoding each enzyme is indicated above the enzyme name. Equilibria for the alginate reactions are known for PMI, GMP, and are indicated by the relative sizes of the arrows for each direction of the reaction. F6P, fructose 6-phosphate; M6P, mannose 6-phosphate; M1P, mannose 1-phosphate; GDPM, GDP-mannose; GDPMA, GDP-mannuronic acid.

mer, in that mannuronate residues may be modified with O-acetyl groups (58). Alginate from *P. aeruginosa* is expected to be more elastic in nature, as a result of having fewer guluronate residues (21). Moreover, some researchers have suggested (13) that high levels of Ca^{2+} found in cystic fibrosis-affected lungs may play a role in the regulation of the mannuronate/guluronate ratio. Namely, it is thought that *P. aeruginosa* infected in the lungs of these patients, under the influence of a high Ca^{2+} concentration, excretes more elastic alginate with less amount of guluronate, and then becomes more resistant to antibiotics and also to host defence mechanisms. In fact, calcium ions have been observed to stabilize alginate gel and cause mucoid *P. aeruginosa* to have a more compact and gelatinous appearance (21, 22). EDTA, which chelates Ca^{2+} and other metals, has been shown to enhance antibiotic effectiveness *in vivo*, perhaps by reducing the gelling properties of the alginate polymer (67).

The alginate biosynthetic pathway of *P. aeruginosa* was initially proposed based on studies by Lin and Hassid (31, 32), using the brown alga *Fucus gardneri*, and by Pindar and Bucke (55), using the bacterium *Azotobacter vinelandii*. Fig. 1. shows the biosynthetic pathway of alginate of *P. aeruginosa* that is proposed at present. Fructose 6-phosphate (F6P) was identified as the first alginate precursor for the *P. aeruginosa* biosynthetic pathway (3, 7, 38). F6P is converted to mannose 1-phosphate (M1P) via mannose 6-phosphate (M6P) by phosphomannose isomerase (PMI) and phosphomannomutase (PMM). Thereafter, M1P is converted to GDP-mannuronate via GDP-mannose by GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP) and GDP-mannose dehydrogenase (GMD). The remaining steps of the *P. aeruginosa* alginate pathway: polymerization, acetylation, epimerization, and secretion, have not yet been elucidated.

T.M. May *et al.* (45) reported on the biosynthetic pathway of alginate of bacteria and algae, and on the control systems for the pathway, in great detail

Some reports have been presented on the exopolysaccharides secreted by *S. epidermidis* (14, 27, 37, 54, 61), although there have been more reports on *P. aeruginosa*. In this review, the report by A. Arvaniti *et al.* in 1994 is referenced (2). They investigated the composition of the "slime" produced by *S.*

が β -1,4 結合で直線的に繋がった copolymer であるが、緑膿菌のアルギン酸は、マンヌロン酸の O-2 もしくは稀ではあるが O-3 または両方の位置で O-アセチル基によって修飾されている点で、藻類のそれとは異なっている (58)。緑膿菌のアルギン酸は、他由来のアルギン酸とくらべて粘性が高く、これはグルロン酸の量比がより少ないことに起因していると考えられている (21)。さらに、濾胞性肺腺癌の患者の肺内で特に高レベルで存在する Ca^{2+} が緑膿菌の産生するアルギン酸のマンヌロン酸/グルロン酸比を制御している、すなわちグルロン酸比を減少させているのではないかと考えている研究者もいる (13)。つまり、これらの患者の肺内で病巣を形成する緑膿菌は、高濃度の Ca^{2+} の影響でグルロン酸比の少ない極めて粘性の高いアルギン酸を産生し、それゆえ抗菌剤や生体防禦機構の影響をさらに受け難くなるというのである。事実、カルシウムイオンはアルギン酸ゲルを安定化し、ムコイド型緑膿菌集落をより固いものにすることが知られている (21, 22)、また、金属イオンのキレート剤である EDTA が *in vivo* で緑膿菌感染に対する抗生剤の効果を高めることも報告されている (67)。

緑膿菌のアルギン酸生合成経路については、Lin and Hassid (31, 32) による褐藻、*Fucus gardneri*、のアルギン酸生合成経路の研究と、Pindar and Bucke (39) による細菌、*Azotobacter vinelandii*、での研究の成果から明らかになってきた。現在提唱されている合成経路を図 1) に示した (45)。緑膿菌のアルギン酸合成の最初のプリカーサーはフラクトース 6-リン酸(fructose 6-phosphate (F6P)) である (3, 7, 38)。F6P はリン酸マンノース異性化酵素 (phosphomannose isomerase (PMI)) とリン酸マンノース転移酵素 (phosphomannomutase (PMM)) によってマンノース 6-リン酸 (mannose 6-phosphate (M6P)) を経てマンノース 1-リン酸 (mannose 1-phosphate (M1P)) に導かれる。M1P は、次に GDP-マンノースピロ加リン酸分解酵素(GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP)) と GDP-マンノース脱水素酵素 (GDP-mannose dehydrogenase (GMD)) の作用を受けて GDP-マンノースから GDP-マンヌロン酸へと移行する。GDP-マンヌロン酸は、さらに重合 (polymerization)、アセチル化、エピメリ化を受けた (順序は不明) 後分泌されるが、これらの過程についてはよく分かっていない。

緑膿菌を始めとする菌類や藻類のアルギン酸生合成経路と制御系の詳細については文献 (45) を参照されたい。

表皮ブドウ球菌の産生する多糖体については緑膿菌のアルギン酸ほど研究は進んでいないがいくつかの報告はある(14, 27、

Table I. Chemical composition of extracellular slime layer from four *S. epidermidis* strains.

	ATCC		Clinical isolates	
	35983	35984	P _A	P _B
Hexosamines	19.0	11.0	10.3	8.0
Total hexoses	12.2	13.7	1.3	14.0
Fuc ^b	2.3	1.1	0.44	0.53
Xyl ^b	1.1	0.55	0.03	0.33
Man ^b	0.8	Trace	0.5	0.27
Gal ^b	1.2	0.37	0.13	0.53
Glc ^b	1.0	1.0	1.0	1.0
Uronic acids	1.0	3.8	3.1	13.0
Sulfates	0.5	1.8	3.0	1.0
N-sulfates	3.1	2.4	1.8	6.0
Phosphates	4.1	4.0	9.5	8.2
Protein	11.0	13.5	20.5	17.5
Sialic acids	nd	nd	nd	nd

Note. nd, not detected. ^aResults are expressed as percentage of the slimes dry weight. ^bNeural monosaccharides have been normalized to glucose. Fuc, fucose; Xyl, xylose; Man, mannose; Gal, galactose; Glc, glucose.

epidermidis, and of the polysaccharide fraction in the "slime," using two standard strains and two clinically isolated strains. Bacteria were grown for 24 h at 37°C in humidified chambers. Extracellular material was removed from cells by gentle shaking with glass beads in 0.15 M NaCl. The extracts were precipitated with a mixture of ethanol, sodium acetate, and acetic acid, in final concentrations of 80%, 0.26 M, and 0.05 M, respectively. The precipitate was dissolved in distilled water; the insoluble material was removed by centrifugation at 27,000 g for 30 min; and the supernatant was dialyzed three times against 100 vol of distilled water. The composition of the crude slime fraction thus obtained is shown in Table I. They also obtained pure polysaccharide fraction by chromatographing the crude slime fraction on DEAE-Sephadex twice. The composition of the pure polysaccharide fraction is shown in Table II.

C. Ways to Combat Biofilm Infections

The control of biofilm bacteria has been a very important subject for medical researchers, especially those who are involved in the treatment of foreign body infections and cystic fibrosis. As described above, biofilm bacteria are immune to attack by antimicrobial agents and host defense mechanisms, owing to the protection given by exopolysaccharides. The slow-growing condition of bacteria in biofilms is another reason for the resistance of biofilm bacteria to antibiotics, especially β -lactams (8, 15, 65). Therefore, new quinolones, which are known to be active even against slow-growing bacteria are reported to be effective against biofilm bacteria (16). The combination of tobramycin and piperacillin (1), and the combination of antibiotics and dextranase (11), have been reported to be

Table II. Chemical composition of polysaccharides fraction A1b from ATCC35984 and clinical isolates P_A.

	Polysaccharides fraction A1b	
	ATCC35984	Clinical isolates P _A
Hexosamines	48.0	46.5
GlcN ^b	46.9	46.2
GalN ^b	nd	nd
N-sulfated hexosamines	4.9	4.3
Total hexoses	30.0	34.0
Neural monosaccharides	Glc,Fuc,Xyl	Glc,Fuc,Xyl
Uronic acids	2.9	3.4
IdoU ^b	nd	nd
GlcU ^b	2.7	3.2
Sulfates	6.5	5.7
Phosphates	nd	nd
Protein	nd	nd

Note. nd, not detected. ^aResults are expressed as percentage of fraction A1b dry weight. ^bGlcN, glucosamine; GalN, galactosamine; IdoU, iduronic acid; GlcU, glucuronic acid.

37, 54, 61)。ここでは1994年のA. Arvaniti等による報告を紹介する(2)。彼等は、標準株2株と臨床分離株2株を用いて表皮ブドウ球菌の産生する"slime"の組成と、その中の多糖体部分の組成について検討している。粗"slime"は、菌体を0.15MのNaCl中でガラス球と撹拌することにより菌体と分離した。"Slime"相にエタノール(80%)、酢酸ナトリウム(sodium acetate)(0.26M)、酢酸(acetic acid)(0.05M)を加えて沈殿させ、水に溶解した後不溶物を取り除いて粗"slime"画分とした。この粗"slime"画分の組成を表Iに示す。さらに彼等は、粗"slime"画分をDEAE-セファデックスカラムに二度かけることにより、純粋な多糖体画分を得た。この画分(A1b画分)の組成を表IIに示した。

C. バイオフィーム感染症攻略法

バイオフィーム形成を伴う感染症にいかに対処するかは抗感染剤、特に挿入異物体周囲での感染症や濾胞性肺腺維症を指向する医者や研究者にとって重要な課題である。前述したようにバイオフィーム菌はexopolysaccharidesによって保護されたような状況にあるために抗菌剤や貪食細胞の攻撃から免れているが、そのほかに増殖速度が遅いために、特に β -ラクタム系の抗生物質がその抗菌活性を発揮し難いという側面もある(8, 15, 65)。それゆえ、 β -ラクタム剤以外の抗菌剤、特に増殖速度の遅い菌に対しても良好な殺菌力を示すニューキノロン剤(new quinolones)などがバイオフィーム菌に有用であるとする報告がある(16)。さらに、トブラマイシン(tobramycin)とピペラシリン(piperacillin)との併用(1)や、抗生剤とデキストラナーゼ(dextranase)との

effective in the eradication of biofilm bacteria. However, the clinical usefulness of these experimentally effective strategies has not yet been established.

Nagai *et al.* (47), in 1991, and Takeda *et al.* (59), in 1992, showed that long-term low-dose administration of macrolides, erythromycin and clarithromycin, was very effective against diffuse pan-bronchiolitis caused by *P. aeruginosa*,

併用 (11) など、試みとしての報告はいくつかあるが、その臨床における有用性に関しては不明である。

1991年にNagai 等が (47)、また1992年にTakeda 等が (59) それぞれエリスロマイシン (erythromycin)、クラリスロマイシン (clarithromycin) といったマクロライド (macrolide) 系の抗生物質の長期少量投与が、緑膿菌による慢性凡細気管支炎に効果を

Fig. 2. Biofilm mode of growth of *P. aeruginosa* on subcutaneous tissues of rats 1 day (a and a') and 2 days (b and b') after infection. ➤, erythrocyte; ➤, another type of cell; ➤, fibrous structure.

Fig. 3. Changes in structure of bacterial biofilms after treatment with clarithromycin.
(a) Control (without clarithromycin); (b) 5 mg of clarithromycin per ml; (c) 10 mg of clarithromycin per ml.

although the maximum serum and sputum levels of those macrolides were below the MICs (minimum inhibitory concentrations) for clinically pathogenic *P. aeruginosa*. Takeda *et al.* (59) also showed that clarithromycin was effective in the eradication of bacterial biofilms formed *in vitro*. Fujimaki *et al.* (19) showed that the combination of tosylflaxacin and erythromycin or clarithromycin was remarkably effective for eradicating sessile biofilm bacteria. Kobayashi *et al.* reported (29) that the activities of macrolides in eradicating biofilm bacteria originated in the activity of suppressing the production of alginate by *P. aeruginosa*, by inhibiting the activity of the enzyme GDP-mannose dehydrogenase, which catalyzes the conversion of GDP-mannose to GDP-mannuronate. However, the details have not yet been fully elucidated.

The author and coworkers (69, 70) showed that the production of exopolysaccharides by *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* was suppressed by clarithromycin, and that combination therapy with clarithromycin and ofloxacin, a new quinolone, was effective on an experimental infection model of *P. aeruginosa* in a carboxymethylcellulose (CMC) pouch formed on the back of rats, in which the biofilm mode of growth of bacteria is characteristic. Figure 2 shows the biofilm formed by *P. aeruginosa* in the CMC pouch in the rat. It can be seen that many erythrocytes and some other cells, complicated fibrous structures, and bacteria, in one body, make the colonies of bacteria progressively larger and thicker. Figure 3 shows *S. epidermidis* forming a colony on the membrane filter by secreting exopolysaccharides.

No anti-biofilm drug yet exists in the world. However, studies to find and develop anti-biofilm drugs are being performed extensively by medical researchers and pharmaceutical companies. In the near future, some excellent anti-biofilm drugs are expected to appear on the market.

發揮することを見出した。エリスロマイシンやクラリスロマイシンの血中、あるいは喀痰内濃度は、これら薬剤の緑膿菌に対する MIC (最小阻止濃度) には達しない。そして、Takeda 等はクラリスロマイシンのこうした効果が、このもののバイオフィルム除去作用に由来することを *in vitro* 実験によって示唆した (59)。また、Fujimaki 等はニューキノロン剤の一つであるトスフロキサシン (tosylflaxacin) とエリスロマイシンやクラリスロマイシンの併用がバイオフィルム菌の除去に有用であったと報告した (19)。Kobayashi 等 (29) はマクロライド系抗生物質のこのような作用が、緑膿菌によるアルギン酸産生の抑制活性に起因し、その機作はアルギン酸生成過程の GDP-マンノース → GDP-マンヌロン酸を触媒する GDP-マンノース脱水素酵素の阻害であるとしているが、詳細は不明である。

筆者等 (69, 70) は緑膿菌と表皮ブドウ球菌による exopolysaccharides の産生をクラリスロマイシンが抑制することと、緑膿菌のバイオフィルム形成が認められるラットでの CMC (carboxymethyl cellulose) - ポーチ (pouch) 内感染系で、クラリスロマイシンとニューキノロン系抗菌剤であるオフロキサシン (ofloxacin) との併用効果が認められることを報告した。図2はラット背部皮下に作製された CMC-ポーチ内に形成された緑膿菌によるバイオフィルムである。生体成分と菌とが exopolysaccharides を介して複雑に絡み合い、感染の場を形成している。また、図3はメンブランフィルター (membrane filter) 上で増殖している表皮ブドウ球菌が exopolysaccharides を分泌して菌集塊を作っている像である。

抗バイオフィルム剤というものは未だ存在しないが、それを目指した研究は製薬企業や医学研究者によって行われており、近い将来世に出ることが期待される。

References

1. Anwar, H., and Costerton, J.W. (1990) Antimicrob. Agents Chemother. **34**, 1666–1671
2. Arvaniti, A., Karamanos, N.K., Dimitracopoulos, G., and Anastassiou, E.D. (1994) Archiv. Biochem. Biophys. **308**, 432–438
3. Baltimore, R.S., and Mitchell, M. (1980) J. Infect. Dis. **141**, 238–247
4. Beveridge, T.J. (1981) Int. Rev. Cytol. **72**, 229–317
5. Brown, M.R.W., and Williams, P. (1985) Ann. Rev. Microbiol. **39**, 527–556
6. Buret, A., Ward, K.H., Olson, M.E., and Costerton, J.W. (1991) J. Biomed. Mater. Res. **25**, 865–874
7. Carlson, D.M., and Matthews, L.W. (1964) Biochemistry **5**, 2817–2828
8. Chuard, C., Lucet, J.C., Rohner, P., Herrmann, M., Auckenthaler, R., Waldvogel, F.A., and Lew, D.P. (1991) J. Infect. Dis. **163**, 1369–1373
9. Costerton, J.W. (1983) US Patent No. 4,419,248
10. Costerton, J.W., Irvin, R.T., and Cheng, K.-J. (1981) Ann. Rev. Microbiol. **35**, 299–324
11. Dall, L., Barnes, W.G., Lane, J.W., and Mills, J. (1987) J. Infect. Dis. **156**, 736–740
12. diSant'Agnese, P.A., and Davis, P.B. (1979) Am. J. Med. **66**, 121–132.
13. Doggett, R.G., Harrison, G.M., and Carter, R.E. (1971) Lancet **i**, 236–237
14. Drewry, D.T., Galbraith, L., Wilkinson, B.J., and Wilkinson, S.G. (1990) J. Clin. Microbiol. **28**, 1292–1296
15. Evans, D.J., Brown, M.R.W., Allison, D.G., and Gilbert, P. (1990) J. Antimicrob. Chemother. **25**, 585–591
16. Eng, R.H.K., Padberg, F.T., Smith, S.M., Tan, E.N., and Cherubin, C.E. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 1824–1828
17. Farber, B.F., Kaplan, M.H., and Clogston, A.G. (1990) J. Infect. Dis. **161**, 37–40
18. Finn, T.M., Arbuthnott, J.P., and Dougan, G. (1982) **128**, 3083–3091
19. Fujimaki, K., Ikeda, Y., Takahata, M., and Yasuda, T. (1992) Chemotherapy (Tokyo) **40**, 886–893
20. Gorin, P.A.J., and Spencer, J.F.T. (1966) Can. J. Chem. **44**, 993–998
21. Govan, J.R.W. (1988) in Bacterial Infections of Respiratory and Gastrointestinal Mucosae (Griffiths, E., Donachie, W.E., and Stephen, J. eds.) pp. 67–96, Oxford, IRL Press
22. Govan, J.R.W., and Harris, G.S. (1986) Microbiol. Sci. **3**, 302–308
23. Gray, E.D., Peters, G., Verstegen, M., and Regelman, W.E. (1984) Lancet **i**, 365–367
24. Gristina, A.G., and Costerton, J.W. (1984) Infect. Surg. **3**, 655–662
25. Gristina, A.G., and Costerton, J.W. (1985) J. Bone Jt. Surg. **67-A**, 264–273
26. Gristina, A.G., Hobgood, C.D., Webb, L.X., and Myrvik, Q.N. (1987) Biomaterials **8**, 423–426
27. Hussain, M., Hastings, J.G.M., and White, P.J. (1991) J. Infect. Dis. **163**, 534–541
28. Johnson, G.M., Lee, D.A., Regelman, W.E., Gray, E.D., Peters, G., and Quie, P.G. (1986) Infect. Immun. **54**, 13–20
29. Kobayashi, H. (1995) J. Infect. Chemother. **1**, 1–15
30. Lam, J.S., Chan, R., Lam, K., and Costerton, J.W. (1980) Infect. Immun. **28**, 546–556
31. Lin, T.-Y., and Hassid, W.Z. (1966) J. Biol. Chem. **241**, 3283–3293
32. Lin, T.-Y., and Hassid, W.Z. (1966) J. Biol. Chem. **241**, 5284–5297
33. Linker, A., and Jones, S. (1964) Nature (London) **204**, 187–188
34. Linker, A., and Jones, S. (1966) J. Biol. Chem. **241**, 3845–3851
35. Lock, M.A., Wallace, R.R., Costerton, J.W., Ventullo, R.M., and Charlton, S.E. (1984) Oikos **44**, 10–22
36. Lorian, V., Zak, O., Suter, J., and Bruecher, C. (1985) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **3**, 433–444
37. Ludwicka, A., Uhlenbruck, G., Peters, G., Seng, P.N., Gray, E.D., Talaszewicz, J., and Pulverer, G. (1984) Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene **258(A)**, 256–267
38. Lynn, A.R., and Sokatch, J.R. (1984) J. Bacteriol. **158**, 1161–1162
39. Malone, J.S., and Caldwell, D.E. (1983) Microb. Ecol. **9**, 299–306
40. Marrie, T.J., and Costerton, J.W. (1982) Circulation **66**, 1339–1343
41. Marrie, T.J., and Costerton, J.W. (1984) J. Clin. Microbiol. **19**, 911–914
42. Marrie, T.J., and Costerton, J.W. (1985) J. Clin. Microbiol. **22**, 924–933
43. Marshall, K.C. (1985) in Bacterial Adhesion, Mechanisms and Physiological Significance (Savege, D.C., and Fletcher, M. eds.) pp. 133–161. New York, Plenum
44. Marshall, K.C., Stout, R., and Mitchell, R. (1971) J. Gen. Microbiol. **68**, 337–348
45. May, T.B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J.D., Roychoudhury, S., Zielinski, N.A., Berry, A., Rothmel, R.K., Misra, T.K., and Chakrabarty, A.M. (1991) Clin. Microbiol. Rev. **4**, 191–206
46. Mayberry-Carson, K.J., Tober-Meyer, B., Smith, J.K., and Lambe, D.W. (1984) Infect. Immun. **43**, 825–833
47. Nagai, H., Shishido, H., Yoneda, R., Yamaguchi, E., Tamura, A., and Kurashima, A. (1991) Respiration **58**, 145–149
48. Nickel, J.C., Gristina, A.G., and Costerton, J.W. (1985) Can. J. Surg. **28**, 50–54
49. Nickel, J.C., Ruseska, I., and Costerton, J.W. (1985) Antimicrob. Agents Chemother. **27**, 619–624
50. Penn, C.W., Sen, D., Veale, D.R., Witt, K., and Parsons, N.J. (1976) J. Gen. Microbiol. **97**, 35–43
51. Penn, C.W., Veale, D.R., and Smith, H. (1977) J. Gen. Microbiol. **100**, 147–158
52. Pennington, J.E., Wolff, S.M., and Puziss, M. (1979) J. Infect. Dis. **140**, 252–256
53. Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G. (1981) Zentralbl. Bakteriell. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. **B 173**, 293–299
54. Peters, G., Schmacher-Perdreau, F., Jansen, B., Bey, M., and Pulverer, G. (1987) in Pathogenicity and Clinical Significance of Coagulase-negative Staphylococci (Pulverer, G., and Quie, P.G. eds.) pp. 15–31, Stuttgart, Fischer-Verlag
55. Pinder, D.F., and Bucke, C. (1975) Biochem. J. **152**, 617–622
56. Prosser, B.T., Taylor, D., Cix, B.A., and Cleeland, R. (1987) Antimicrob. Agents Chemother. **31**, 1502–1506
57. Reynold, H.Y., Levine, A.S., Wood, R.E., Zierdt, C.H., Dale, D.C., and Pennington, J.E. (1975) Ann. Intern. Med. **82**, 819–832
58. Skjak-Braek, G., Grasdalen, H., and Larsen, B. (1986) Carbohydr. Res. **154**, 239–250
59. Takeda, H., Oogaki, N., Kikuchi, N., Kobayashi, H., and Akashi, T. (1992) J. Jpn. Assoc. Infect. Dis. **66**, 1454–1461

60. Tenney, J.H., Moody, M.R., Newman, K.A., Schimpff, S.C., Wade, J.C., and Costerton, J.W. (1986) Arch. Intern. Med. **146**, 1949–1951
61. Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (1988) J. Infect. Dis. **157**, 713–722
62. Vaudaux, P.E., Suzuki, R., Waldvogel, F.A., Morgenthaler, J.J., and Nydegger, E.E. (1984) J. Infect. Dis. **150**, 546–553
63. Vaudaux, P.E., Zulian, G., Huggler, E., and Waldvogel, F.A. (1985) Infect. Immun. **50**, 472–477
64. Warren, J.W., Mucie, H.L., Berquist, E.J., and Hoppes, J.M. (1981) J. Urol. **125**, 1–8
65. Widmer, A.F., Wiestner, A., Frei, R., and Zimmerli, W. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 741–746
66. Wood, R.E., Boat, T.F., and Doershuk, C.F. (1976) Am. Rev. Respir. Dis. **113**, 833–878
67. Wood, R.E., Klinger, J.D., Thomassen, M.J., and Cash, H.A. (1980) in Perspectives in Cystic Fibrosis (Sturgess, J.M. ed.) pp. 365–369. Tronto, Cystic Fibrosis Foundation
68. Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J., and Yokota, T. (1994) J. Med. Microbiol. **41**, 359–367
69. Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., and Yokota, T. (1994) Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 138–141
70. Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., Kawada, H., and Yokota, T. (1993) Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 1749–1755
71. Zobell, C.E. (1943) J. Bacteriol. **46**, 39–56

Received on May 30, 1996, accepted on August 29, 1996

Profile of the Author

Hiroshi Yasuda

The author received his Ph.D. in Fundamental Medicine from Tohoku University in 1980. The title of his Ph. D. thesis was "Interaction between the Sendai Virus and the Cell Membrane".

Dr. Yasuda started his professional career at Sankyo Co., Ltd. in 1967, and is now a vice director of the Biological Research Laboratories of this company.

Dr. Yasuda has taken part in the development of anti-microbial agents. He has had a part in the development of "Cefpodoxime proxetil", an oral cephem, and "Panipenem betamipron", a parenteral carbapenem, now being widely used clinically. Besides the development of anti-microbial agents, he has been engaged in the development of pH 4-treated immunoglobulin

preparation and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). These investigations were summarized in the articles "Opsonic and Complement-dependent Bacterial Activities of Various Immunoglobulin Preparations for Intravenous use", Vox Sanguinis **51**, 270 (1986) and "Therapeutic Efficacy of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Alone and in Combination with Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice", Infect. Immun. **58**, 2502 (1990). Dr. Yasuda's recent research has focused on the interaction between bacterial biofilms and macrolides. His paper, "Interaction between Biofilms Formed by *Pseudomonas aeruginosa* and Clarithromycin", Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 1749 (1993), is the first article written in English that relates to the activity of macrolides in suppressing the glycocalyx production by bacteria.

Besides his research, Dr. Yasuda loves taking photographs. On his usual New Year's post card (nenngajo), a photograph of "the animal of the year" (eto) is printed.