

Pseudomonas aeruginosa と *Candida albicans* における相互作用 ～発育・外毒素産生量に対する抑制効果～

石川 修平¹, 鈴木 暁², 眞野 容子², 古谷 信彦^{1,2}

¹ 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

² 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

要旨

Pseudomonas aeruginosa と *Candida albicans* は混合感染することがあり同時に検出されることが多い。また、近年これら2菌種が相互作用を引き起こすことが報告されている。本研究では、*P. aeruginosa* による *C. albicans* の発育抑制効果について検討するとともに、*C. albicans* による *P. aeruginosa* が産生する色素・外毒素量の抑制効果について検討を行った。*P. aeruginosa* による *C. albicans* 発育抑制効果の検討では、*P. aeruginosa* 培養上清1mL添加で抑制効果は認められなかったが、同上清2mL添加で全使用菌株に対しての抑制効果が認められた。*C. albicans* による *P. aeruginosa* が産生する色素・外毒素量の抑制効果についての検討では、pyocyanin, elastase, に対して一定の抑制効果が認められたが、protease に対してはその抑制効果が低いことが分かった。また、*C. albicans* の産生物質の一種である farnesol による *P. aeruginosa* への発育抑制効果は認められなかった。今回の検討から、*P. aeruginosa* と *C. albicans* の2菌種はそれぞれが他方の菌種に対して一定の抑制効果示すことが示唆された。

キーワード

Pseudomonas aeruginosa, *Candida albicans*, Farnesol, 相互作用

1. 序論

Pseudomonas aeruginosa は好気性のグラム陰性桿菌であり、土壌や水中などあらゆる自然環境下に常在している。通常その病原性は弱く、健康者が感染症を起こすことはほとんどない。しかし、身体の免疫力の低下している人に対して容易に感染症を引き起こすことから日和見病原細菌として知られており、これらの菌によって引き起こされる感染症を日和見感染症という。特に高齢者や病人に対して容易に感染症を引き起こすため院内感染の病原菌として知られる。また、*Candida albicans* は人の体表や消化管、そして女性の膣などに常在する細菌であるが、*P. aeruginosa* と同様に日和見感染症を引き起こす病原細菌として知られており、これらの病原細菌は臨床検体から同時に検出されることが多いと報告されている¹⁾。何れの病原細菌による感染症も慢性化すると治療が困難であるため临床上重要視される。特に *P. aeruginosa* は複数の薬剤に対して耐性を獲得している Multi-drug resistant *P. aeruginosa* (MDRP; 多剤耐性緑膿菌) の存在が問題となっている。近年、これらの2種の菌は菌種間で相互作用を引き起こし病原性を抑制し合っ

ていると報告されている。このことから、両菌種間に引き起こされる可能性のある相互作用について検討することで、それぞれの病原細菌によって引き起こされる日和見感染症の発症を未然に防ぐことや、感染症が引き起こされた場合における迅速かつ効果的な治療の実施が可能になると考える。しかし *P. aeruginosa* による *C. albicans* への影響についての検討は定性的な方法が多く行われており量的検討をしている報告が少ない²⁾。そこで今回我々は *P. aeruginosa* による *C. albicans* への影響について量的な検討を行った。また、Carlaらの報告によって、*C. albicans* が産生する分子である farnesol が *P. aeruginosa* の色素産生を抑制する効果を有しているということが明らかにされている³⁾。そこで、*C. albicans* 産生分子の farnesol による *P. aeruginosa* への影響についても先の検討同様、2菌種間に起こる抑制作用について量的検討を行った。

2. 材料と方法

2.1 使用菌株

C. albicans の発育抑制効果の検討に臨床分離された膿由

来の *P. aeruginosa* 5株 (No. 1~No. 5) を使用した。これら5株に加えて、発育および色素・外毒素の抑制効果の検討に *P. aeruginosa* PAO1 1株、臨床分離された尿由来の *P. aeruginosa* 5株 (No. 6~No. 10) の合計11株を用いた、*C. albicans* は標準株である ATCC90028 株1株、臨床分離株2株の計3株を対象とした。

2.2 farnesol の抽出

Yeast Mold-broth (自家調製) を用いて *C. albicans* ATCC90028 株を McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) になるように調整し、35°C、24時間振盪培養した。菌液を滅菌1.5mLチューブに1.2mLずつ分注し、15300G、20分、24°Cで遠心し上清を分離後、0.22 μ pore フィルターを用いて濾過滅菌した。*C. albicans* 上清を濾過滅菌後、4.0mLを試験管に分取し、酢酸エチル1.0mLを加えボルテックスで10秒間混和し、室温にて5分間静置した。静置後、酢酸エチル層(上層)のみを分離し、湯煎様に加温、パスツールピペットを用いて蒸発乾固させることにより酢酸エチルを揮発させた。その後ヘキサン200 μ Lを加えて管壁に付着している farnesol を溶出させ試料とした⁴⁾。

2.3 発育抑制効果の検討

2.3.1 *P. aeruginosa* による *C. albicans* の発育抑制効果

Mueller Hinton Agar (MHA; 日本ベクトンディッキンソン、東京) に分離培養した *P. aeruginosa* (No.1~No.5) 各株を McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) になるよう調整し、滅菌生理食塩水で 1.5×10^4 CFU/mL に希釈後、10 μ L を Mueller Hinton Broth (MHB; 日本ベクトンディッキンソン、東京) に接種、35°C、24時間振盪培養を行った。菌液を3000rpm、15分、室温で遠心し上清を0.22 μ pore フィルターで濾過滅菌し、*P. aeruginosa* 培養上清を得た。分離培養した *C. albicans* 各株を McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調製した菌液を、滅菌生理食塩水で 1.5×10^6 CFU/mL に希釈後、10 μ L を MHB に接種、その後 *P. aeruginosa* 培養上清を各培養液に1mLまたは2mL添加し35°C、24時間振盪培養した。菌液を十分に混和後106倍まで希釈、MHAを用いて生菌数の算定を行い、3株の生菌数の平均値を求めた。

2.3.2 Farnesol による *P. aeruginosa* の発育抑制効果

終濃度1mMになるように調整した Farnesol (東京化成、東京) 含有 MHB 5mL に 1.5×10^4 CFU/mL になるように調整した *P. aeruginosa* 菌液を10 μ L接種、35°C、24時間振盪培養を行った。菌液を十分に混和後106倍まで希釈、

MHAを用いて生菌数の算定を行った。

2.4 Pyocyanin 測定

P. aeruginosa 各株を McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) になるよう調整し、滅菌生理食塩水で 1.5×10^4 CFU/mL に希釈後、10 μ L を、2.2の方法にて抽出した farnesol を添加した MHB 5mL に接種、35°C、24時間振盪培養を行った。菌液を3000rpm、15分、室温で遠心し上清を4mL分離、クロロホルムを2.4mL加え混和後、遮光して3時間室温で静置した。上層を取り除いた後、0.2NのHCl 0.8mLを加え再び遮光し一晩室温で静置した。その後上清を分離し、Uvmini-1240 (島津製作所; 京都) を用いて波長520nmで吸光度を測定した⁵⁾。また、同様の測定を市販の Farnesol を用いて行った。

2.5 外毒素の測定

2.5.1 Elastase 測定

Farnesol を添加後の培養液を用いて、方法2.4と同様の操作にて作製した *P. aeruginosa* 菌液を滅菌1.5mLチューブに1.2mLずつ分注し、15300G、20分、24°Cで遠心し上清を分離。分離後の上清0.5mLにElastin Congo Red (ECR; Sigma-Aldrich Corporation, USA) 10mg、100mM Trise HCl buffer (pH7.5) 0.5mLを加え37°Cで6時間インキュベートした。インキュベート後、マイクロプレートリーダー (Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific Inc, MA) を用いて波長495nmで吸光度を測定した⁶⁾。

2.5.2 Protease 測定

方法2.5.1と同様の操作により Farnesol 含有培地にて培養した *P. aeruginosa* 菌液から上清を分離。分離後の上清2mLにRemazol Brilliant Blue R-Hide (Sigma-Aldrich Corporation, UK) 3mg、10mM Trise HCl buffer (pH7.5) 1mLを加え37°Cで1時間インキュベートした。インキュベート後、Multiskan FCを用いて波長595nmで吸光度を測定した⁷⁾。

3. 結果

3.1 *C. albicans* の発育抑制効果

C. albicans の培養液に *P. aeruginosa* 培養上清1mL添加時では *C. albicans* の発育に対して抑制効果は見られなかった。しかし、上清2mL添加時では全ての株で菌のコロニー形成数の減少が認められた。特にNo.1, 3の2株においては102倍以上の発育抑制効果が認められた(図.1)。

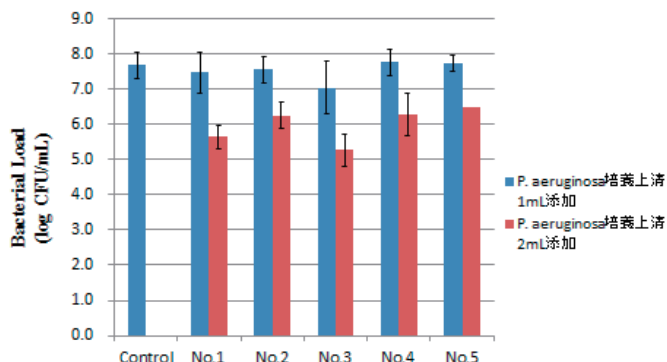


図1 *C. albicans*の発育抑制効果
Control値と比較したときに1.0 log CFU/mL以上差が生じた場合を発育が抑制されたと判断した。

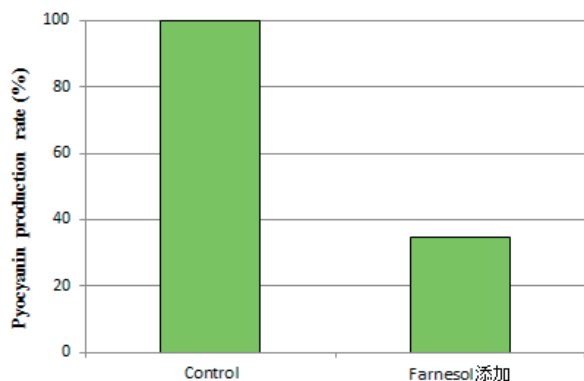


図3 抽出FarnesolによるPyocyanin産生抑制効果

3.2 *P. aeruginosa* の発育抑制効果

P. aeruginosa の培養液にFarnesolを終濃度1mMになる様に添加した結果発育に対する影響は見られなかった。(図. 2).

3.3 抽出 farnesol による pyocyanin 産生抑制効果

C. albicans 培養上清から抽出したfarnesolを添加した結果pyocyanin産生量が60%以上減少した(図. 3).

3.4 Farnesol による pyocyanin 及び外毒素の産生抑制効果

P. aeruginosa 培養時にFarnesolを添加した結果、全体の90.9%の株でpyocyanin産生量の減少が認められた。また、菌株の由来別に比較すると尿由来の株の全てで20%以上の減少が見られるのに対して、膿由来の株では尿由来株と同等の効果が見られた株は5株中2株だけであり、特にNo. 5の株においては抑制効果がないことが判明した(図. 4).

外毒素の産生抑制効果について、elastaseの産生量はNo. 3を除く全ての株で減少が見られた。また菌株の由来別での比較では、pyocyanin産生量の検討結果と同様に、尿由来株で顕著にelastaseの産生量の減少が認められた。proteaseの産生量は使用菌株11株中7株でコントロール値を下回る結果となったが、No.3の株を除く6株においては産

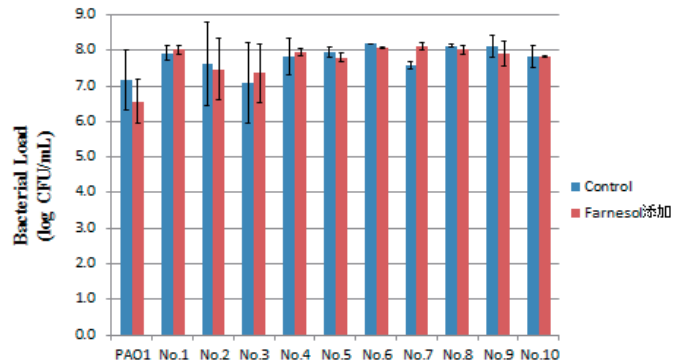


図2 *P. aeruginosa*の発育抑制効果
Control値と比較したときに1.0 log CFU/mL以上差が生じた場合を発育が抑制されたと判断した。

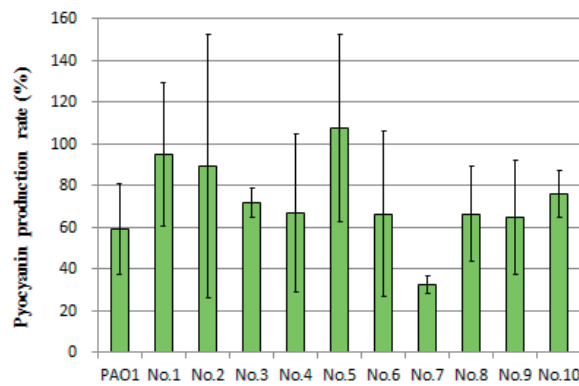


図4 Pyocyanin産生抑制効果
コントロールを100%とした時の、各菌株が産生したPyocyanin産生量の割合を示す。

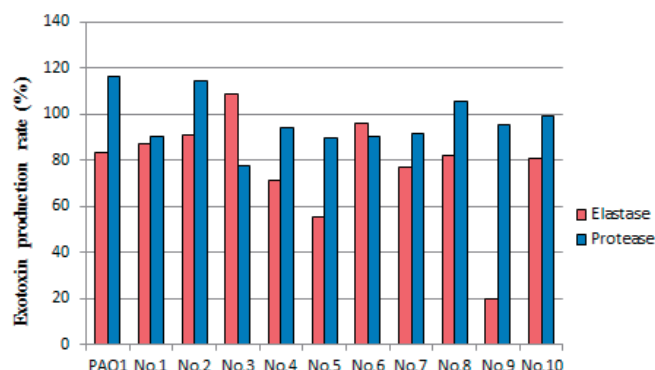


図5 外毒素の産生抑制効果
コントロールを100%とした時の、各菌株が産生したElastaseおよびProtease産生量の割合を示す。

生量の抑制率が10%以下であった。また、菌株間に多少の差が見られるが由来別での比較では顕著な差は認められなかった(図. 5).

4. 考察

今回の検討より、*C. albicans* 培養液に、*P. aeruginosa* 培養上清を添加することによって *C. albicans* の発育が抑制されることが確認された。しかし添加する上清の量によって抑制効果に差が生じることから、その効果には量的関係が

存在することが考えられる。更には5株中2株で102倍以上の抑制効果が認められたにもかかわらず、残り3株ではその10分の1程度の抑制効果しか見られなかった、このことから菌株間にも差の生じる要因が存在することが示唆された。そのため今後、*P. aeruginosa*の培養上清中に含まれる成分の量と*C. albicans*の発育抑制効果を同時に検討することにより*P. aeruginosa*の産生物質と*C. albicans*の発育抑制効果との量的関係について調べる必要があると考える。これに付随して、*P. aeruginosa*産生物質の中で*C. albicans*の発育抑制に大きく影響を与えている物質について追求していく必要がある。

*C. albicans*培養上清から抽出したfarnesolを*P. aeruginosa*培養液に添加することにより、既知の報告と同様pyocyaninの抑制効果が認められた³⁾。これにより*P. aeruginosa*の外毒素産生抑制作用を引き起こす原因物質の一つとしてfarnesolの存在があるという事が考えられる。しかし抽出したfarnesolの濃度の測定が現時点では不十分であった。そこで、精製された市販のFarnesol 1mMによる*P. aeruginosa*に対する影響を検討した。外毒素産生に対する影響についての検討ではelastaseの産生は抑制されたのに対して、proteaseの産生量は減少しなかった。この結果からfarnesolは*P. aeruginosa*が産生する色素または外毒素全てに対して有効な効果を発揮するわけではなく、一部の産生物質のみを抑制する効果を有していることが示唆された。一方で発育抑制効果に関しての検討では、菌の発育には影響を与えないことが明らかとなった。このことからfarnesolは菌自体の発育を抑制しているのではなく、色素あるいは外毒素を産生するための産生機構に直接影響を及ぼしているのではないかと考えられる。*P. aeruginosa*が産生する外毒素はelastase, protease以外にも多く存在する。そのため今後farnesolの効果を検討するにあたり、それらの外毒素に対する影響についても検討する必要がある。そのほか①farnesolが色素あるいは外毒素を産生する際どの段階で影響を与えているのか、②*C. albicans*が産生し*P. aeruginosa*に影響を与える物質はfarnesolのみなのか、あるいはtyrosolなど他の物質でも影響が見られるのかfarnesol以外の産生物質による*P. aeruginosa*への影響についても検討していく必要があると考えられる。

*P. aeruginosa*及び*C. albicans*は、いずれも日和見病原細菌であるがこれらによる感染症は慢性化することによって治療が困難になることが知られる。特に*P. aeruginosa*は多くの薬剤に対して耐性を獲得しているMulti Drug Resistant *P. aeruginosa* (MDRP)の存在が近年問題視されている。今回の検討により*P. aeruginosa*と*C. albicans*の両菌種はそれぞれ

が他方に対して作用し、互いの発育または毒性を抑制することが明らかとなった。今後これら2菌種間に起こる抑制作用について更なる追求を続けていくことで、薬剤による治療が困難なMDRPや、慢性化したそれぞれの感染症に有用な物質を見出すことができるのではないかと考える。

5. 引用文献

- Hermann C, Hermann J, Munzel U, Ruchel R. Bacterial flora accompanying *Candida* yeasts in clinical specimens. *Mycoses* 1992; 42:619-627.
- 近藤成美、佐藤尚武、山田俊彦、宮崎彩記子、小栗豊子、猪狩淳。臨床材料より分離される緑膿菌の抗MRSA、抗*Candida*作用について。感染症雑誌 2002; 76:231-237.
- Cugini C, Calfee MW, Farrow JM 3rd, Diana K, Morales DK, Pesci EC, Hogan DA. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2007; 65(4):896-906.
- Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(7):2982-2992.
- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 1990; 172:884-900.
- Kumar L, Chhibber S, Kumar R, Kumar M, Harjai K. Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia* 2015; 102:84-95.
- Ohman DE, Cryz SJ, Iglewski BH. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol* 1980; 142:836-842.
- Aliyu SH, Enoch DA, Abubakar II, Ali R, Carmichael AJ, Farrington M, Lever AM. *Candidaemia* in a large teaching hospital: a clinical audit. *QJM* 2006; 99: 655-663.
- 佐和ていじ。緑膿菌性肺炎・敗血症とⅢ型分泌システム。日集中医誌 2001; 8:305-310.
- 館田一博、石井良和、山口恵三。緑膿菌のQuorum-Sensing機構—新しい感染症治療のターゲットとして—。日本細菌学雑誌 2004; 59: 543-549.

Interaction between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Candida Albicans* -Inhibitory Effect in both Growth and Production of Exotoxin-

Shuhei Ishikawa¹, Satoru Suzuki², Yoko Mano², Nobuhiko Furuya¹

¹ Health Care Science, Graduate School of Bunkyo Gakuin University

² Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology,
Bunkyo Gakuin University

Abstract

Pseudomonas aeruginosa and *Candida albicans* are known to cause concomitant infections, and they are often detected at the same time in the same patient. It was recently reported that these two bacterial species could interact. In this study, we examined the inhibitory effect of *P. aeruginosa* on *C. albicans* growth and also examined the inhibitory effect of *C. albicans* on the growth and amount of pigment and exotoxin produced by *P. aeruginosa*. When 1 mL of *P. aeruginosa* culture supernatant was added, no growth inhibitory effect was observed. In contrast, the addition of 2 mL of the same supernatant showed inhibitory effects on all strains of *C. albicans* used. In regards to the inhibitory effect of *C. albicans* on *P. aeruginosa* pigment and exotoxin production, we found an inhibitory effect for pyocyanin and elastase, but the inhibitory effect on protease production was low. In addition, farnesol, a substance produced by *C. albicans*, did not cause the growth inhibition of *P. aeruginosa*. In this study, it was suggested that each of the two strains of *P. aeruginosa* and *C. albicans* has a certain inhibitory effect on the other bacterial species.

Key words ——— *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, farnesol, interaction

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.10: 13-17