

## ■ 血清学的検査

### 1. 診断学的特徴

ウイルスなどの病原体を培養する場合は、細胞培養など一定の環境や設備を整える必要があり、現実的に一般の検査室でウイルスなどの培養を行うことは困難である。そこで、培養が困難な病原体の感染症を診断するために、血中の抗体価を測定する血清学的診断法が主に利用されてきた。ただし、血清学的診断は抗体価が上昇するまでに一定の期間を要し、感染早期の診断が難しいという欠点がある。つまり、抗体価の上昇によって病原体の診断を行えたとしても、その時点ではすでに感染症そのものが軽快していることも多く、そのような場合には検査結果を治療に反映することは難しい。また、検査法自体の問題や他の抗原との交叉反応性などの理由で、偽陽性が出現する可能性もある。そのため、例えばHIV感染症の診断を目的として、ELISAなどによるスクリーニング検査で陽性と判断された場合は、さらにウエスタンブロット法による確認試験によって最終的な判断が下される。一方、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が投与されている症例では、抗体産生が抑制されて有意な抗体価の上昇がみられず、誤って陰性と判断されることもある。

### 2. 方法

血清抗体価を測定する方法にはさまざまな方法があり(表3)、各検査法によってそれぞれ利点、欠点を有するが、従来、広く用いられてきた方法としてELISAがある。ELISAは、96穴マイクロプレートなどを用いてあらかじめ抗原をコーティングしておき、患者血清を反応させて抗体を結合させ、さらにビオチンなどを結合した抗ヒト抗体と反応させる。その後、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素と結合したアビジンを加えるとビオチンと結合し、基質を加えることで酵素と反応して発色し、その発色の程度を吸光度計で測定する方法などが一般的に用いられている。

### 3. 対象となる主な病原体

ウイルス全般、肺炎マイコプラズマ、肺炎クラミジア、真菌(アスペルギルス)など。

## ■ 抗原の検出

### 1. 診断学的特徴

言うまでもなく迅速に起因病原体の診断を行うことは、感染症の診療を行ううえで非常に重要である。しかし、前述の病原体の分離・同定や血清診断法は、迅速性とい

表3 代表的な血清抗体価測定法

酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay : ELISA)
粒子凝集反応 (particle agglutination : PA)
免疫蛍光法 (immunofluorescence assay : IFA)
補体結合反応 (complement fixation : CF)
放射性免疫測定法 (ラジオイムノアッセイ radio immunoassay : RIA)

う意味では不利な検査法である。その欠点を補うために、最近ではそれぞれの病原体に特異的な抗原を検出する迅速的な診断法が次々に開発されている。すでに、わが国でも広く利用されているものに、インフルエンザウイルスの抗原検出がある。感染早期の検査によってインフルエンザであることが確定できれば、その治療薬を用いて症状を軽減させることができ、治療に直結した診断法として有益な検査となっている。さらに、肺炎球菌ならびにレジオネラを対象として米国Binax社が開発した尿中抗原検出キットは、わが国においてもすでに保険適応が認められ、反応時間も15分程度と迅速性に優れている点から、今後さらに広く利用される可能性が高いと考えられる。

一方、消化管感染の分野では、偽膜性大腸炎を起こす*Clostridium difficile* (クロストリジウムディフィシル) は培養が困難であるため、この菌が出す毒素であるトキシンAを、糞便を検体として検出する方法が広く用いられている。さらに腸管出血性大腸菌(O157など)が産生するベロ毒素を検出する方法や、糞便中のヘリコバクター・ピロリの抗原を検出する検査も行われている。

## 2. 方法

インフルエンザウイルスの抗原検出キットは、筆者が把握しているだけでも8種類の迅速診断キットが販売されており、イムクロマト法を用いたものが主体である。検体中の抗原量が多い場合には反応時間が5分で判定が可能なキットもあるが、通常15～20分程度で判定できる。イムクロマト法の原理としては、病原体の抗原に特異的な抗体をあらかじめ色つきのラテックス粒子と結合させておき、濾紙に染み込ませ乾燥させておく。この濾紙に検体をかけると、検体中の抗原とあらかじめ濾紙に染み込ませてあった抗体とが結合し、抗原抗体複合体を形成する。この抗原抗体複合体は濾紙の毛細管現象によって、濾紙のもう一方の側へと移動していく。あらかじめ濾紙の別の場所には、抗原と結合能を有する他の抗体が濾紙に線状に付着しているため、移動してきた抗原抗体複合体がそこで捕捉されて、ラテックス粒子が集まって肉眼で観察可能なラインが出現し、抗原の存在が確認できる。なお、この方法を用いたキットは特殊な機器を必要とせず、操作も容易であるため、外来あるいはベッドサイドでも可能な検査として評価されている。

## 3. 対象となる主な病原体

ウイルス (インフルエンザウイルス, アデノウイルス, RSウイルス, ロタウイルス), 細菌 (A群β溶連菌, 肺炎球菌, レジオネラ, クロストリジウムディフィシル, ヘリコバクター・ピロリ), その他 (マラリアなど)。

## 3 遺伝子学的検査

### 1. 診断学的特徴

感染症における遺伝子学的検査法は、ターゲットとなる遺伝子を測定可能な量まで増幅して、検体中にその遺伝子が存在していたかどうかを明らかにすることにより、病原体の有無を確認することを目的としている。細かく分類すると、多くの種類の検査

法があるが、現在、もっともポピュラーな方法はPCRであり、臨床の場においても確固たる位置を占めている。ただし最近ではLAMP法など新たな検査法が注目を集めている。

最近では遺伝子学的検査によって感染の有無を判断するだけでなく、治療の適応や治療効果の判定にも応用されている。例えば血漿中HIV RNA量を測定することで、治療開始時期の決定や、抗HIV薬による効果を判定するうえで有用な指標となっている。またHCVのウイルス量や遺伝子型を検査することで、インターフェロンの治療前からその効果の予測が可能となっている。

## 2. 方法

### 1) PCR

PCR法はそれぞれの病原体に特異的な遺伝子配列をターゲットとして、プライマーを用いて遺伝子を増幅させ検出する方法である(図2)。PCR法の原理としては、まず病原体に特異的なプライマーを作成しておく。94℃まで検体の温度を上げて検体中の遺伝子を2本鎖から1本鎖にし(変性)、その後温度を55℃前後に下げるとプライマーは遺伝子の特定の部位に結合し(アニーリング)、さらに72℃前後に温度を上げることによって、DNAポリメラーゼによってプライマー部分からDNAが合成されていく。このサイクルを繰り返していくと、目的とする遺伝子領域を次々に増幅させることができる。

このように遺伝子の増幅効率は非常に高いため、従来の他の検査法に比べて非常に感度を高めることが可能となったが、その一方で、操作中の汚染によって偽陽性が生じやすい、という欠点を有している。

もともとPCRは、ターゲットとする遺伝子が存在するか否かを判断する定性検査であり、検体中にどれだけの病原体(DNA)の量が存在していたのかを推定することは不可能である。そのため陽性、あるいは陰性どちらかの結果しか得られないために、临床上、結果の解釈が時に問題となることがある。

なお、リアルタイムPCR法は遺伝子の定量が可能であり、通常のPCRに比べてより短時間で結果を知ることができるが、まだ一般的に商業ベースで感染症の診断法として普及する段階には至っていない。

PCRによる診断が用いられている例としては、抗酸菌(結核菌, *Mycobacterium avium-intracellulare*)、ウイルス(HIV, HBV, HCV, その他)などがあげられる。

### 2) DNAプローブ法

DNAプローブ法は、相補性を有する1本鎖の遺伝子同士が2本鎖遺伝子を形成する性質(ハイブリダイゼーション)を利用して、目的とする遺伝子の存在を化学発光などを用いて検出する方法である。PCR法に比べると感度は低いとされている。DNAプローブ法による診断が実用化されている病原体としては、結核菌、淋菌、およびクラミジア・トラコーマチスなどがあげられる。

### 3) LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法

LAMP法は、PCR法に代わる遺伝子増幅技術として開発された新しい遺伝子増幅法

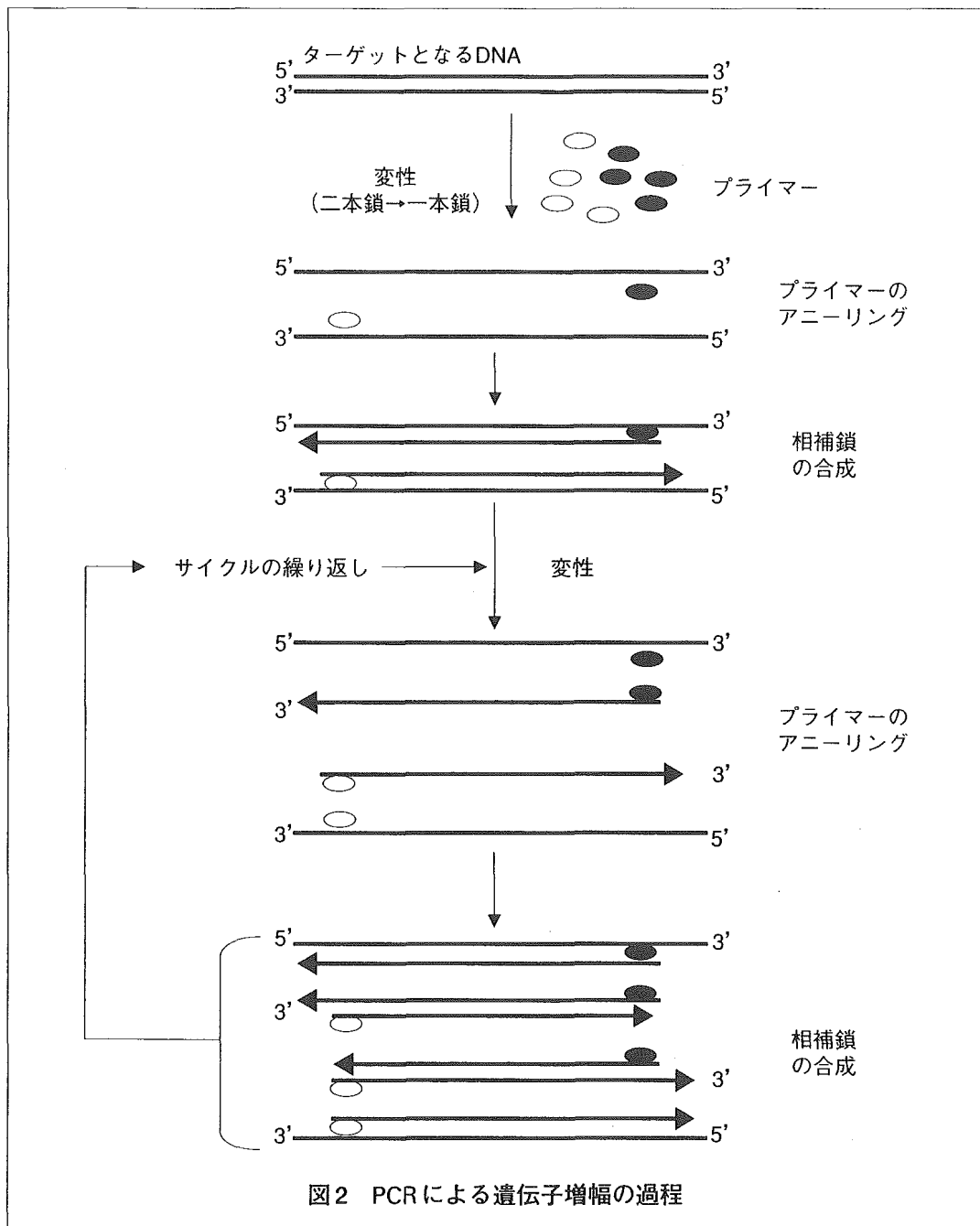


図2 PCRによる遺伝子増幅の過程

である。本法は一定温度で高効率に遺伝子を増幅させることができるため、PCRのように温度を繰り返して変更する必要がない。また、PCRが2つの領域を認識するのに対して、LAMP法では6つの領域を認識するために特異性がきわめて高いとされている。なお、LAMP法を用いた感染症の診断法として、SARSウイルスの検出が最初に保険適応が認められており、他の病原体の診断を目的とした開発が続けられている。

### 3. 対象となる主な病原体

遺伝子学的検査法の対象となる病原体を表4に示した。

表4 遺伝子学的検査の対象病原体の一例

・ウイルス	・マイコプラズマ
HIV	マイコプラズマ・ニューモニエ
肝炎ウイルス (HCV, HBV)	・STD起因病原体
サイトメガロウイルス	クラミジア・トラコーマチス
Epstein-Barr (EB) ウイルス	淋菌
・抗酸菌	ヒト・パピローマウイルス (HPV)
結核菌	・薬剤耐性菌
非結核性抗酸菌 (MAC) <sup>1)</sup>	MRSA ( <i>mecA</i> 遺伝子)
・真菌	VRE <sup>3)</sup> ( <i>van</i> 遺伝子)
ニューモシスチス・カリニ <sup>2)</sup>	・その他病原体
アスペルギルス	EHEC <sup>4)</sup> (ベロ毒素; <i>vt</i> 遺伝子)

<sup>1)</sup> *Mycobacterium avium-intracellulare*

<sup>2)</sup> 現在は PCP と呼ばれている

<sup>3)</sup> VRE = バンコマイシン耐性腸球菌

<sup>4)</sup> EHEC = 腸管出血性大腸菌

#### 4 その他の検査法

##### ■免疫学的検査

これまで病原体の診断を行う目的で生体側の反応を調べる方法として、抗体価を測定することによる血清診断が中心であった。ただし、細胞性免疫が主として働く病原体、例えば結核菌感染などにおいては、Tリンパ球を主体とする細胞性免疫反応を調べるほうが理にかなっている。そこで患者から採取された血液に、結核菌特有の刺激抗原を添加して培養を行い、培養上清中のインターフェロン- $\gamma$  を測定する方法 (QuantiFERON-TB, Cellestis 社) が新たに開発され実用化に至っている。これは結核菌抗原を認識するTリンパ球が血液中に存在していれば、抗原に対する免疫応答によってTリンパ球が活性化され、インターフェロン- $\gamma$  が産生されることを利用したものである。従来まで結核菌感染の重要な指標となっていたツベルクリン反応は、BCGワクチン接種の影響などによりその判定が困難であったが、この方法によってより信頼性の高い診断が可能となっている。

\*

感染症の検査法は、これまで述べてきたように、全体として迅速かつ、より高感度な検査法へとシフトしていく方向性がある。これまで起因菌の診断が困難であった感染症でも、容易に診断が行える状況になっており、特に抗原検出法や遺伝子検査を応用した新しい検査法の発展はめざましく、次々に実用化に至っている。ただし、検査法が進歩する一方で、何も高度な検査法を用いずとも、例えば検体のグラム染色を行って観察するだけでも、起因菌の診断に有用な示唆を与えてくれるのも事実である。さらに、検査のコストを考慮すると、感染症が疑われるからといって、さまざまな検査をやみくもに行える状況ではなくなってきている。そこで、これからの感染症の診療においては、主治医は患者の臨床症状や所見にもとづいて、どの検査をどの時点で行うかを、よりきめ細かく判断して効率的な感染症診療を行っていく必要があると考えら

れる。また、新しい検査法については、それぞれの特徴をよく理解して、特に感度や特異度について把握したうえで適切に結果を解釈し、診療に役立てることが重要であると思われる。



#### ■参考文献

- 1) 稲田敏樹, 多屋馨子, 新井 智他 : 培養, 同定, 感染症の診断・治療. ガイドライン2004. 日本医師会 132 : 324-326, 2004.
- 2) 舘田一博 : 非定型病原体の検査法の進展. 感染と抗菌薬 7 : 274-280, 2004.
- 3) 川上小夜子 : 尿路感染症. Medical Technology 32 : 1025-1030, 2004.
- 4) 朝野和典 : 細菌学的診断, イラストレイテッド微生物学, 山口恵三, 松本哲哉編. 丸善, 2004, p 25-39.
- 5) Gill VJ, Fedorko P, Witebsky FG : The clinician and the Microbiology Laboratory, *Principles and practice of infectious diseases* (6th ed.). Mandel GL, edited. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005, p 203-241.
- 6) Struthers JK, Westran RP : *Infections of the blood. Bacteraemia and endocarditis*. ASM Press, Washington, DC, 2003, p 66-79.
- 7) 満田年宏 : 感染対策のための分子疫学入門. メディカ出版, 2002.

(松本 哲哉)

## 2 敗血症

### 疾患概念 .....

- 敗血症とは、菌血症の状態から重篤な全身症状を伴う状態へと移行した経過の中の1つの病態を表す。
- 最近では全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) に明らかな感染症が存在する場合を広義の敗血症と定義し、従来の敗血症を含む広い疾患概念として考えられている。
- 全身性炎症反応症候群 (SIRS) とは、以下の2項目以上該当するものをいう。
  - ①体温  $> 38^{\circ}\text{C}$  または  $< 36^{\circ}\text{C}$
  - ②心拍数  $> 90/\text{min}$
  - ③呼吸数  $> 20/\text{min}$
  - ④白血球数  $> 12,000/\mu\text{l}$  または桿状核球  $> 10\%$
- 重症敗血症とは、敗血症に臓器障害や血圧低下 (収縮期血圧  $< 90\text{mmHg}$ )、循環障害 (乳酸アシドーシス、乏尿、意識レベルの低下など) を伴う場合をいう。
- 敗血症ショックは、敗血症によって引き起こされる血圧低下が、適切な輸液負荷に対して反応しない場合をいう。

### 症 状 .....

- 悪寒・戦慄を伴う発熱、頻脈、頻呼吸、呼吸困難、意識障害、乏尿、血圧低下などを呈する。

### 診断の進め方 .....

- ①体温  $38.5^{\circ}\text{C}$  以上あるいは悪寒、戦慄を伴う発熱時には、必ず血液培養を施行する。血液培養が陽性で、原因菌が同定されれば診断が確定する。
- ②原発感染巣の検索をすると同時に合併症 (播種性血管内凝固症候群: DIC, 急性呼吸促迫症候群: ARDS など) の有無を確認する。血液検査 (表5), 胸・腹部 X線検査および必要に応じて各種検査 (画像や超音波検査など), 抗菌薬投与前に、喀痰, 尿, 髄液や穿刺液など疑わしい場所の検体を採取し, グラム染色, 培養および抗原検査を施行する。  
(一過性菌血症の原因としては, 細菌性髄膜炎, 細菌性肺炎, 化膿性胆管炎の頻度が高く, 持続性菌血症の原因としては亜急性心内膜炎の頻度が高い。)

表5

検査項目	確認事項
末梢血液検査	白血球数 > 12,000/mm <sup>3</sup> または桿状核球 > 10%
血液生化学検査	CRP 値の上昇, 肝機能障害や腎機能障害などの有無
凝固系検査	血清 FDP 値の上昇, 血小板数の減少, 血漿フィブリノーゲン濃度の低下, プロトロンビン時間の延長 (播種性血管内凝固症候群合併時)
抗原検査	エンドトキシン値の上昇 (グラム陰性桿菌感染症時), β-グルカン値の上昇 (真菌血症時)
動脈血血液ガス分析	酸素分圧および二酸化炭素分圧の低下 (肺炎あるいは急性呼吸促迫症候群合併時)

- その他, 必要に応じて血液検査の項目追加, 心臓超音波検査, 腹部超音波検査, CT, MRI など画像検査を施行する。

#### <検査での注意事項>

- 抗菌薬投与前に速やかに血液培養を施行することが重要である。
- 血液培養は, 好気性および嫌気性ボトルをセットにして, 無菌操作にて施行する。また, 血液培養は, 異なる場所 (2~3カ所) で施行すれば原因菌なのか汚染菌なのかを判定するのに役立つ。

#### 治療にあたっての患者への説明のポイント .....

- 菌血症, 敗血症, 敗血症性ショックと段階が進むにつれて, 予後が悪くなるため, 敗血症と診断がついたら感染源が不明であってもできる限り早い段階で抗菌薬投与などの治療を開始する必要があることを説明する。

#### 治療のグローバルスタンダード .....

- 呼吸, 循環不全に対しては, Swan-Ganz カテーテルを挿入するなどし, 呼吸・循環状態を注意深くモニターする。状態に応じて十分な酸素投与, 輸液や昇圧剤の投与を行う。目標の血圧は収縮時血圧 90mmHg 以上とする。
- 感染巣が不明な場合は, グラム染色, 部位, 年齢などから原因菌を推定し, 早期に抗菌薬投与を開始する。また, 生命に危険のあるときは, 広域スペクトル抗菌薬を速やかに投与する。原因菌が同定された時点で不適切であれば感受性のある抗菌薬に変更する。
- 血管カテーテル, 尿道カテーテルなどが留置されている場合で, これが感染源と疑われるときは抜去または入れ換えを施行すると同時にカテ先の培養をする。

#### <処方例>

感染巣が不明の成人〔1) または 2)〕



- 1) メロペネム（メロペン） 1gを12時間ごとに点滴静注
- 2) セフェピム（マキシピーム） 2gを12時間ごとに点滴静注

### ■外科的治療への時期，準備■

- 原発感染巣において，明らかな膿瘍や壊死巣などの存在が判明した場合，外科的に除去しなければ改善が期待できないときは積極的に外科的治療を検討する。

# Effects of antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and quorum-sensing system

Kazuhiro Tateda<sup>1</sup>, Theodore J. Standiford<sup>2</sup> and Keizo Yamaguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Infectious Disease, Toho University School of Medicine, 5-21-16 Ohmorinishi, Ohtaku, Tokyo 143-8540, Japan

<sup>2</sup>Pulmonary and Critical Care Medicine, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, USA

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes a wide range of acute and chronic infections, including sepsis, wound and pulmonary infections [1]. In particular, this organism is a major cause of pulmonary damage and mortality in patients with cystic fibrosis (CF), diffuse panbronchiolitis (DPB) and other forms of bronchiectasis [2, 3].

*P. aeruginosa* is known to produce a variety of virulence factors, such as pigment and exotoxins. The synthesis and expression of these factors is regulated by a cell-to-cell signaling mechanism referred to as quorum sensing [4, 5]. Two major quorum-sensing components in *P. aeruginosa*, *Las* and *Rhl*, enables bacteria to coordinately turn on and off genes in a density-dependent manner by the production of small diffusible molecules called autoinducers [6, 7]. The expression of these autoinducer-regulated virulence factors directly contributes to the course and outcome of individuals infected with *P. aeruginosa*.

A breakthrough in chemotherapy for patients with chronic *P. aeruginosa* pulmonary infection was realized when a patient with DPB was treated with erythromycin for a prolonged period. This resulted in a dramatic improvement in clinical symptoms, respiratory function and radiographic findings [8]. This astute observation, made by Dr. Shoji Kudoh, lead to a subsequent open trial study which established the clinical effectiveness of long-term erythromycin therapy in DPB patients [9]. Clinical experience in DPB has lead to the use of long-term macrolide therapy in patients with chronic sinusitis, bronchiectasis and CF. While there is mounting evidence of clinical efficacy, the mechanisms of action are still unknown. Currently, investigators are working on two major research directions; 1) macrolide effects on host inflammatory and immune systems, and 2) specific effects of macrolides on the bacteria themselves, including the expression of bacterial virulence factors.

In this chapter, we will review the effects of sub-MIC of macrolides on *P. aeruginosa*, particularly activity of these antibiotics on the bacterial quorum-sensing sys-

tem; a system that may be crucial in the pathogenesis of chronic *P. aeruginosa* infection. Immunomodulatory properties on host responses and clinical efficacy of macrolides will be more comprehensively addressed in other chapters.

## An overview of macrolide antibiotics

The macrolide class of antimicrobials is characterized by a multi-membered lactone ring with one or more amino sugars attached. Macrolides are grouped according to the number of atoms comprising the lactone ring, such as 12-, 14-, 15- and 16-membered rings. The 14-membered ring group includes erythromycin, clarithromycin, roxithromycin and oleandomycin, whereas the 16-membered group contains josamycin, kitasamycin and rokitamycin. The only 15-membered ring is azithromycin, which is characterized by a higher degree of intracellular accumulation within leukocytes and more potent antibacterial activity against gram-negative organisms [10].

Macrolides inhibit bacterial protein synthesis by binding to the 50S ribosomal subunit causing an inhibition of translocation of peptidyl-tRNA and the initial steps of 50S subunit assembly. The spectrum of activity of macrolides includes aerobic gram-positive bacteria, especially *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. A few gram-negative bacteria (e.g., *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp., and *Legionella* spp.), and other atypical pathogens including *Mycoplasma* spp. and *Chlamydia* spp., are also susceptible to this class of antibiotics. In contrast, *P. aeruginosa*, as well as other enteric microorganisms, are intrinsically resistant owing to the exclusion of the macrolide from the cytoplasm by the outer membrane architecture.

Generally, the mode of therapeutic efficacy of antibiotics is attributed to the inhibition of bacterial growth *in vivo* when antibiotic concentrations (usually in serum) exceed the minimum inhibitory concentration (MIC), measured on a short exposure time (generally 24 h) to planktonic forms of the bacteria. However, concentrations below the MIC can still attenuate growth and the expression of a variety of bacterial virulence factors, compromising the ability of the pathogen to cause disease. This activity of antibiotics is referred to as sub-MIC effects. The MIC of macrolides for most *P. aeruginosa* strains is in the range of 128–512 µg/ml (our laboratory data). Peak serum concentrations of erythromycin after a 250 mg oral dose are, however, only 1.0–1.5 µg/ml and the mean sputum concentration after an intravenous dose of 1 g every 12 h was 2–3 µg/ml [11, 12]. Thus, judged by conventional criteria, *P. aeruginosa* is fully resistant to macrolide antibiotics. However, there is increasing evidence of a role of sub-MIC macrolides in suppressing virulence factors of this organism.

A characteristic of macrolides that augment their efficacy is that they can concentrate within leukocytes and can enhance the function of aspects of the cellular immune system [13, 14]. For example, intracellular macrolides may be transported

to the site of an infection, where they are partially released [15]. These data may explain, in part, how relatively higher concentrations of macrolides can occur at the site of infection, as compared to lower levels observed in serum. Furthermore, macrolide accumulation has been demonstrated to occur not only in host cells, but also within bacteria, especially after a prolonged incubation period [16], which may account for sub-MIC effects on pathogens and perhaps clinical efficacy. These data suggests that macrolide antibiotics have the potential for antibacterial activity, not only through direct bactericidal and bacteriostatic effects, but also through suppression of virulence factors.

## Macrolide effects on bacteria

The cellular and molecular mechanisms accounting for the dramatic effect of macrolides in DPB patients has been the subject of intensive research. To summarize a large body of work, the clinical efficacy of macrolides in DPB and CF patients is likely attributable to modulation of host inflammatory and immunological pathways and modulation of bacterial virulence factors, such as suppression of exoproducts (e.g., toxins, pigments, alginate) and bacterial cell components (e.g., flagella, pili, lipopolysaccharide [LPS]). In the discussion to follow, we focus on macrolides effects on bacteria, especially sub-MIC macrolide effects on virulence factors of *P. aeruginosa* and its “quorum-sensing” regulatory system.

### Sub-MIC effect of macrolides on bacteria and its virulence factors

#### *Suppression of bacterial exoproducts*

*P. aeruginosa* produces a variety of extracellular products, such as pigment, toxins and exopolysaccharide, which contribute to the pathogenesis through cell/tissue destruction, inflammation and other local and systemic effects [17]. Molinari and associates demonstrated that erythromycin, clarithromycin, and azithromycin differed in their ability to inhibit various *P. aeruginosa* virulence factors. Specifically, azithromycin reduced the synthesis of elastase, protease, lecithinase, and DNase to a greater degree than the other macrolides tested, and was the only agent to suppress pyocyanin production [18, 19]. Sato et al. have reported that erythromycin suppresses the production of pyocyanin dose-dependently *in vitro* [20]. Kita and collaborators have reported that erythromycin over a concentration range of 0.1–10 µg/ml suppressed production of elastase, protease and leucocidin in *P. aeruginosa*; although growth of bacteria was not affected significantly during 24 h culture [21]. Sakata and associates have reported that elastase production was inhibited completely by erythromycin in 27 (79.4%) of 34 strains at concentrations between 0.125 and 64 µg/ml [22]. Likewise, Hirakata and colleagues reported that ery-

thromycin suppressed the *in vitro* production of exotoxin A, total protease, elastase, and phospholipase C by *P. aeruginosa* D4 in a dose-dependent manner [23]. A similar investigation confirmed the greater sub-MIC inhibitory activity of azithromycin, as compared to erythromycin, roxithromycin, and rokitamycin against *P. aeruginosa* exoenzymes and exotoxin A [24].

Strains of *P. aeruginosa* involved in chronic lung infection in DPB and CF develop a mucoid phenotype which is attributable to hyperproduction of alginate. These strains transform into a biofilm coating airway surfaces [25]. Within biofilms, bacteria are protected from antibiotics and the host immune system. Sub-MIC of macrolides have been shown to inhibit both the production of alginate and the formation and stability of biofilms [26–28].

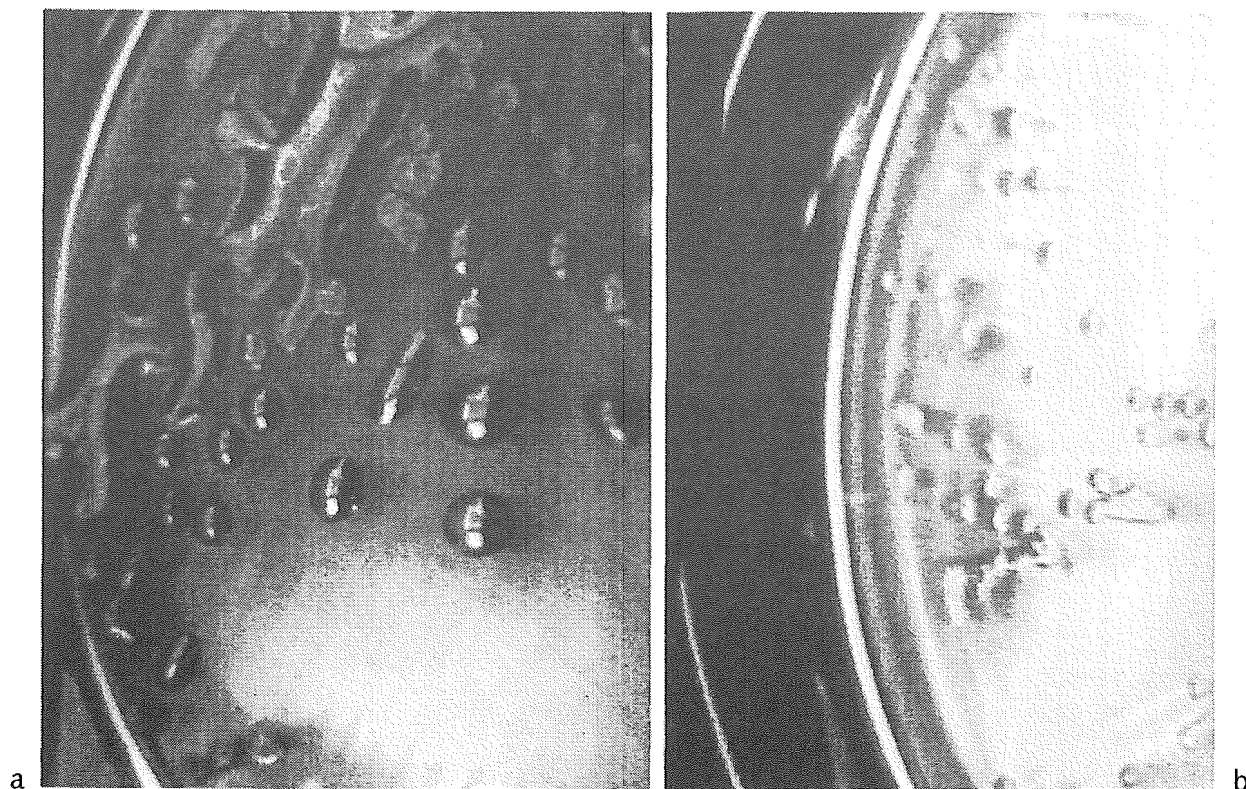
Kobayashi has reported that 14- and 15-membered macrolides specifically inhibited the enzyme guanosine diphosphomannose dehydrogenase (GMD), which is involved in the biosynthesis of alginate, but that the 16-membered macrolide midecamycin was ineffective [29]. It is also notable that macrolides can inhibit  $\alpha$ -dornase (recombinant human DNase I) with azithromycin displaying greater activity than erythromycin [30].

Several explanations have been proposed for the sub-MIC effects of macrolides on the expression of *P. aeruginosa* exoproducts. This effect may be due to direct inhibition of translation at the ribosomal level, although it is difficult to imagine how the inhibition of enzymes to as low as 30% of normal function would not substantially impact bacterial growth. It has also been suggested that short peptide chains are preferentially more susceptible to macrolides and this would allow for differential inhibition of enzymes [31]. Regardless of mechanisms involved, it does appear that certain macrolides, but not all family members, are active in suppressing virulence factors of *P. aeruginosa*, and this effect is closely linked with those macrolides that demonstrate clinical efficacy, including erythromycin, clarithromycin, roxithromycin and azithromycin.

### *Bacterial cell surface components and adherence to host cells*

The bacterial cell surface components of LPS and outer membrane proteins of *P. aeruginosa* were disrupted when bacteria were grown at sub-MIC of erythromycin or clarithromycin, but not kitasamycin, josamycin, rokitamycin or oleandomycin [32] (Figure 2).

Erythromycin treatment induced reduction of LPS amounts, as determined by the amount of 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid, which is a conserved portion of the LPS molecule. Additionally, a reduction of amount of a 38 kDa protein and a concomitant increase of a 41 kDa protein, which are considered to be *Pseudomonas* outer membrane proteins, were demonstrated. Sub-MIC of erythromycin and clarithromycin also rendered *P. aeruginosa* more susceptible to serum bactericidal activity [33]. These alterations of cell surface structures, such as LPS and outer mem-

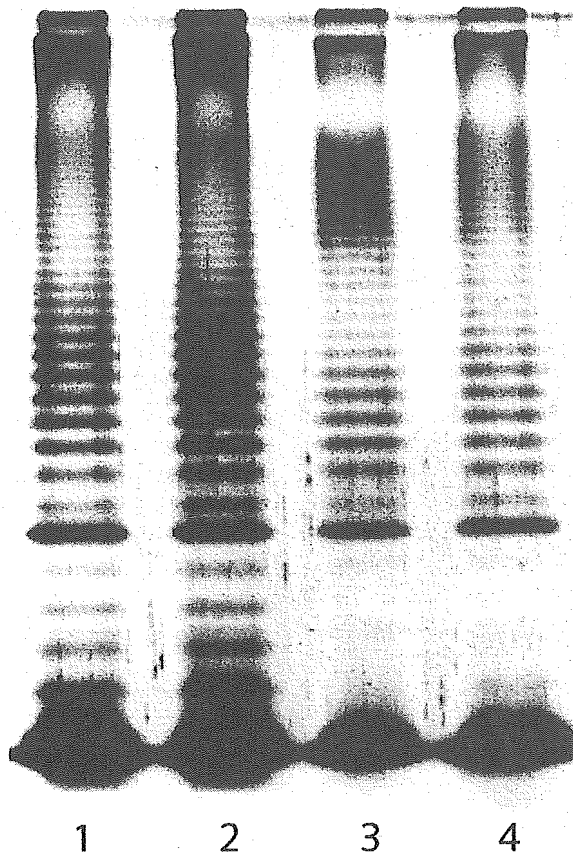


**Figure 1**

Colony of mucoid-type *P. aeruginosa* grown in agar with (b) or without (a) sub-MIC of erythromycin ( $10 \mu\text{g/ml}$ ). Smooth colony has changed to rough in the presence of erythromycin, that suggests suppression of exopolysaccharide alginate.

brane proteins, may facilitate the access of complement to the outer surface, thus increasing bacterial susceptibility.

Tissue invasion requires the attachment of the microorganism to the host cell. Depending on the host site, the microbe will encounter mucosal or epithelial cells to which it must adhere or be eliminated. Gram-negative bacteria attach primarily by means of proteinaceous appendages known as fimbriae and pili, which extend through the mucus layer to bind to the appropriate host receptor. A number of antibiotics have been shown to impair bacterial adherence [34]. Yamasaki and collaborators have provided compelling evidence that exposure of *P. aeruginosa* to erythromycin at 1/4 MIC for only 4 h significantly reduced the number of pili and hence adherence [35]. Another important cell surface structure is flagella, which facilitates bacterial motility and adherence, and enables bacteria to establish a colony in a more hospitable environment. Molinari and associates have reported that erythromycin, clarithromycin and azithromycin inhibited *P. aeruginosa* motility at sub-MIC [18, 19]. Moreover, Kawamura-Sato and collaborators have report-



**Figure 2**

*Changes of LPS of *P. aeruginosa* grown in agar with sub-MICs of macrolide antibiotics.*

*Lane 1: no antibiotic. Lane 2: josamycin 16 µg/ml. Lane 3: erythromycin 16 µg/ml. Lane 4: azithromycin 4 µg/ml. Change of LPS pattern, especially reduction of lower molecular weight LPS bands, was observed in bacteria grown in the presence of sub-MICs of erythromycin, azithromycin, but not josamycin [32].*

ed that azithromycin can inhibit flagellin expression more effectively than either erythromycin or clarithromycin at concentrations as low as 1/8 MIC [36]. This activity may disrupt biofilm formation in *P. aeruginosa* through inhibition of flagellin expression even at concentrations below the MIC.

#### *Direct killing effects of macrolides with longer incubation*

The macrolides do not exhibit intrinsic activity against *P. aeruginosa* based on conventional antimicrobial testing procedures, although appreciable additive and synergistic activities have been observed when macrolides were paired with other antibiotics [37–39]. However, we have reported reduction of viability of *P. aerugi-*

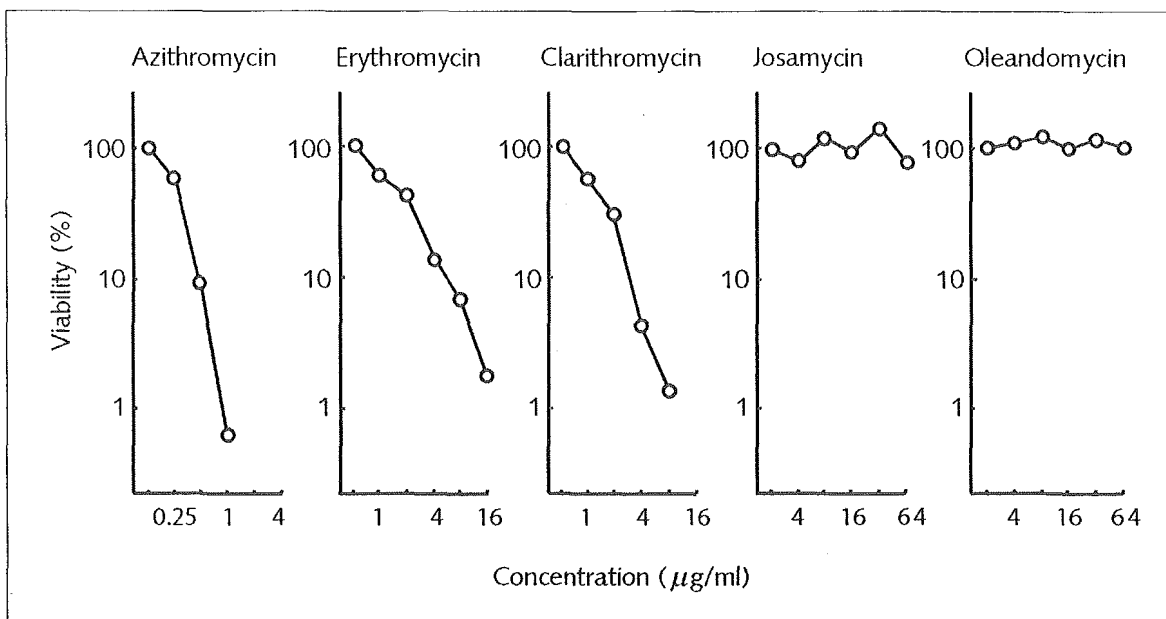


Figure 3

Bactericidal activity of macrolides against *P. aeruginosa* after longer incubation

*P. aeruginosa* was incubated on agar with various concentrations of macrolides for 48 hours, and then bacterial viability was compared to that of control bacteria [16].

*nosa* when the bacteria were incubated with macrolides for a prolonged time [16]. Exposure to azithromycin for 48 h or more significantly decreased viability of *P. aeruginosa* PAO1 in a concentration-dependent manner, whereas no effect on viability was observed with 24 h or less of incubation. As shown in Figure 3, this time-dependent bactericidal activity was observed with erythromycin, clarithromycin, and azithromycin, but not with josamycin, oleandomycin or other classes of antibiotics (ceftazidime, tobramycin, minocycline, ofloxacin). This reduction in organism viability correlated with a decline in bacterial protein synthesis, which was associated with time-dependent intracellular accumulation of the antibiotic (Fig. 4). Moreover, it is likely that the macrolides may sensitize bacteria to stresses, as these antibiotics induced alterations in a major stress protein, Gro-EL, in both resting and inducible states [40]. These data suggest that conventional antimicrobial susceptibility testing, which is done against planktonic organisms, may not reflect antimicrobial effects of macrolides on *P. aeruginosa* at the site of infection, which may account for discrepancies between clinical efficacy and MIC values.

Figure 5 shows a schematic representing potential effect of macrolides on *P. aeruginosa*. In the respiratory tract or alveolar spaces of patients with persistent *P. aeruginosa* infections, bacteria live on the surface of respiratory cells, where they exist within secreted mucus and host-cell debris in the form of microcolonies or biofilm [41, 42]. As the bacterium multiply, they express virulence factors that may



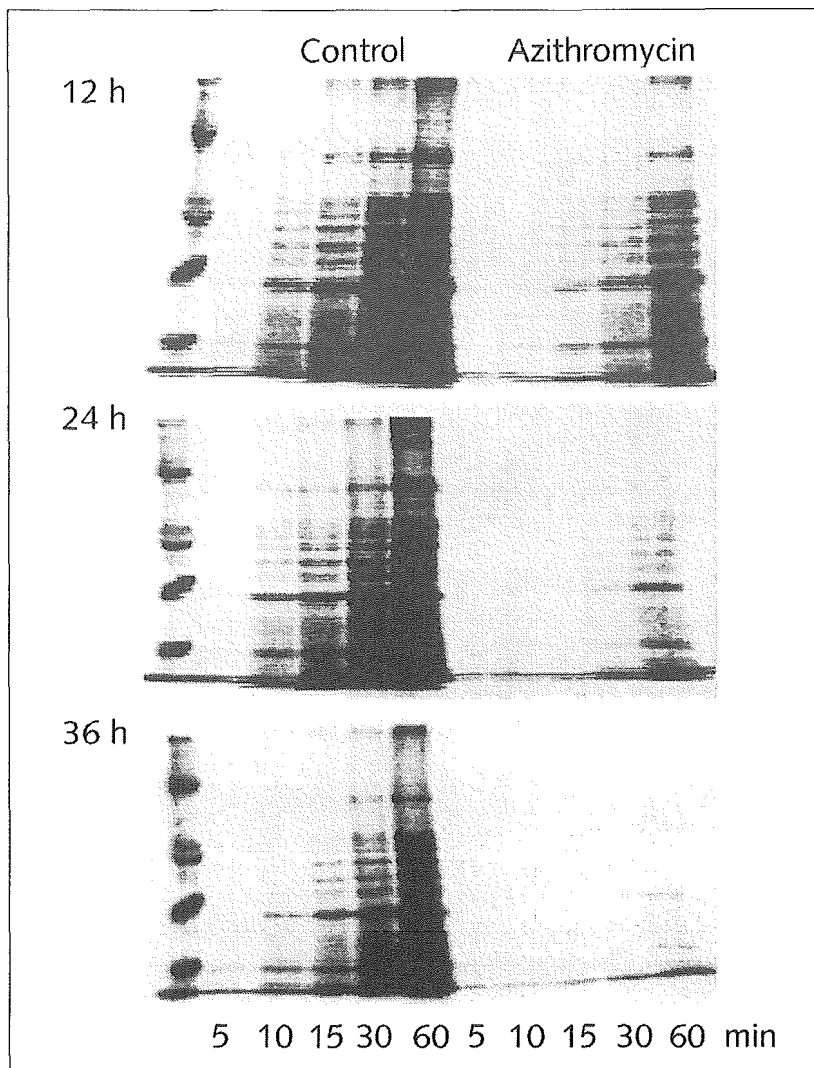


Figure 4

Effects of sub-MIC of azithromycin on protein synthesis of *P. aeruginosa*

Bacteria was grown on agar with or without azithromycin (4  $\mu\text{g/ml}$ ) for 12, 24 or 36 h, and then protein synthesis was examined in a pulse-chase method using  $^{35}\text{S}$ -methionine. Significant suppression of protein synthesis was observed in the presence of azithromycin in a time-dependent manner [16].

injure host cells and induce local host responses, including the production of inflammatory mediators, increases in vascular permeability, and leukocyte accumulation. Bacterial populations directly adhering to epithelial cells may be exposed to high macrolide concentrations due to the generation of antibiotic concentration gradients. Under these conditions, sub-MICs of the drug may suppress the virulence of *P. aeruginosa*. Moreover, in patients undergoing macrolide therapy for prolonged periods, bacteria continuously exposed to the antibiotic may be sensitized to the

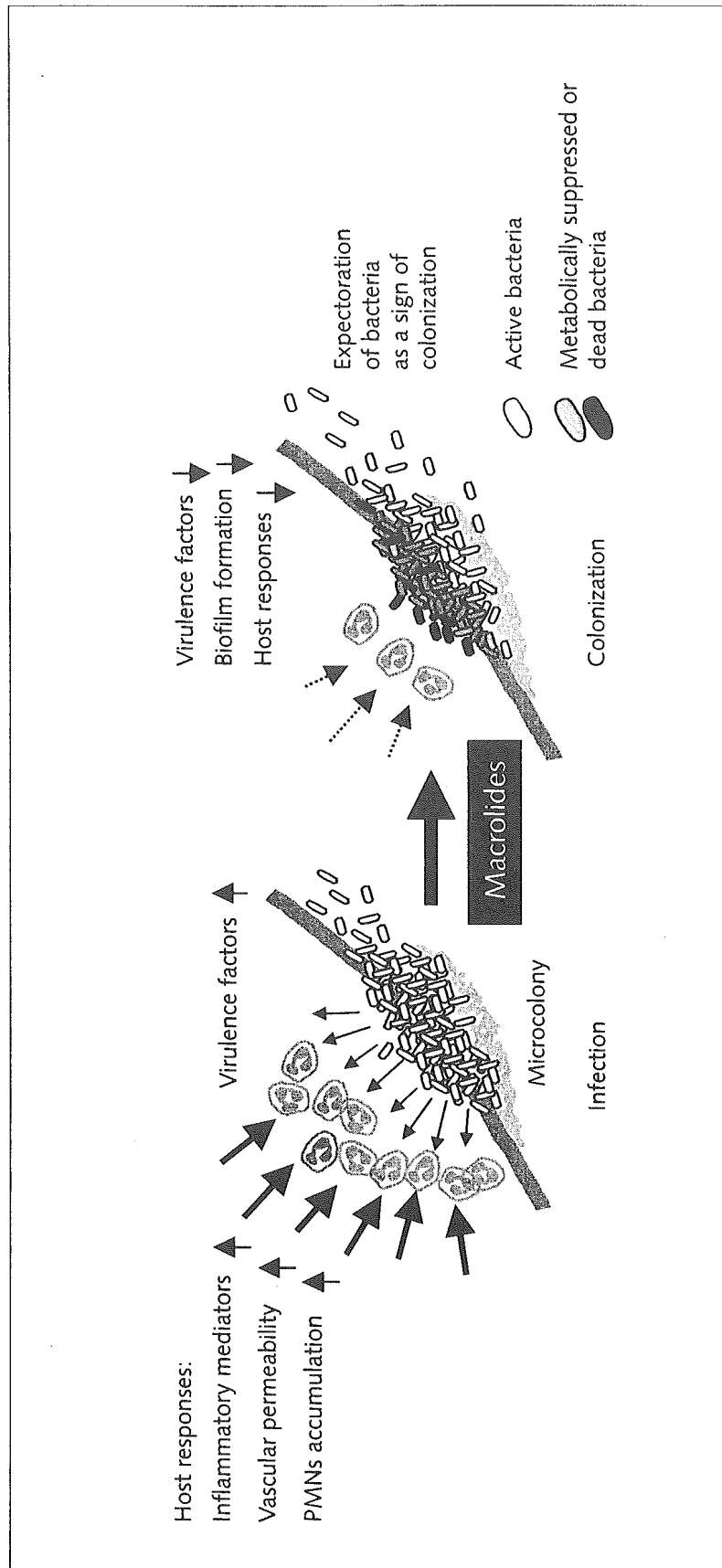


Figure 5: Possible mechanisms of macrolide effects on bacteria

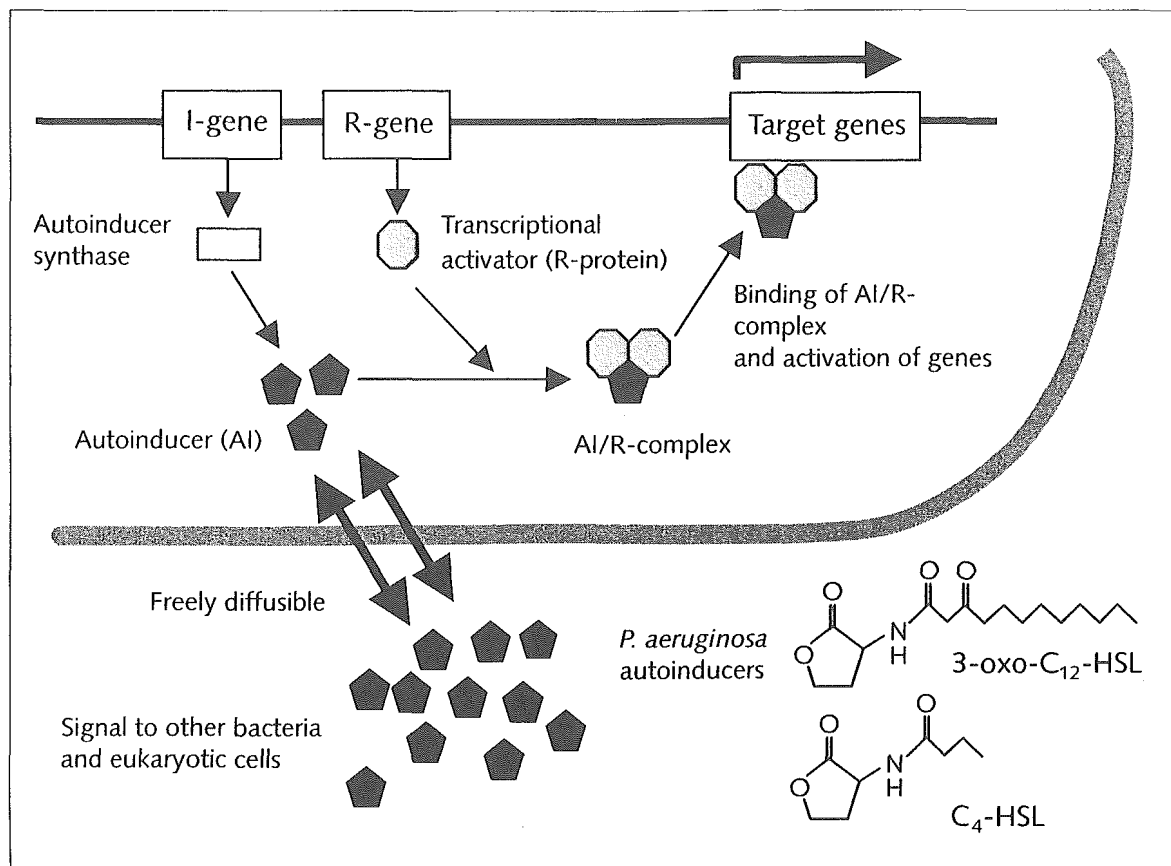


Figure 6  
HSL-mediated quorum-sensing systems in bacteria

serum bactericidal effect. Bacteria closely associated with host cells may gradually lose their viability as a consequence of the direct anti-pseudomonal bactericidal activities of these medications. In addition, macrolides may disrupt biofilm attachment to host epithelium. Thus, we speculate that long-term macrolide therapy may shift the host-pathogen interaction from infection to a relatively benign colonization state and possibly even to eradication in some patients. This hypothesis is consistent with the common clinical observation that long-term macrolide therapy leads to improvements in clinical symptoms and laboratory data before any observable bacteriological response.

### Quorum-sensing systems as new therapeutic targets

#### *Role of quorum-sensing systems in chronic pulmonary P. aeruginosa infection*

*P. aeruginosa* possesses at least two separate but interrelated quorum-sensing systems, *las* and *rhl* [43, 44]. As the bacterial population increases, the autoinducer

signal molecules, 3-oxo-C<sub>12</sub>-homoserine lactone (HSL) and C<sub>4</sub>-HSL, accumulate in the environment. When the concentration of autoinducer reached to a threshold in bacteria, these molecules bind to and activate their cognate transcriptional regulators (Fig. 6). Both systems have been found to regulate multiple virulence factors, such as extracellular toxins (e.g., elastase, alkaline protease, exotoxin A), rhamnolipid and pyocyanin. To investigate the effects of quorum-sensing systems during infections, strains of *P. aeruginosa* that contain deletions in one or more of the quorum-sensing genes were tested in various infection models, including a burn injury mouse model, a murine model of acute pneumonia and a rat model of chronic lung infection [45–48]. A general observation obtained from these models indicates that strains containing a mutation in quorum-sensing genes were less virulent as compared with wild-type *P. aeruginosa*. Another interesting aspect in quorum-sensing research is the contribution and association of this system in biofilm formation. Accumulating data demonstrated that quorum-sensing systems are essential for differentiation and maturation within biofilm in *P. aeruginosa* infection [49–53].

Quorum-sensing is functionally active during *P. aeruginosa* infections in humans. Sputum samples obtained from CF patients chronically infected with *P. aeruginosa* contain mRNA transcripts for the quorum-sensing genes [54]. Sputum from *P. aeruginosa*-infected CF patients also contains the autoinducer molecules 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL and C<sub>4</sub>-HSL [49]. These autoinducer molecules were directly extracted and measured in CF sputum [55]. These samples contained approximately 20 nM 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL and 5 nM C<sub>4</sub>-HSL. In contrast, when bacteria were grown in a biofilm, considerably higher concentrations (300–600 µM) of 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL were measured [56]. Although it is difficult to define exact concentrations of autoinducer molecules at the site of infection, particularly in biofilm, these results demonstrate that quorum-sensing systems may be active during *P. aeruginosa* infection and potentially regulate the expression of various genes *in vivo*.

Accumulating evidence suggests that the quorum sensing signal molecule 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL is also a potent stimulator of multiple eukaryotic cells and thus may modulate the host inflammatory response during *P. aeruginosa* infection. *In vitro* experiments have shown that 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL stimulates the production of the inflammatory chemokine IL-8 from human lung bronchial epithelial cells [57, 58]. In addition, Smith et al. have reported that 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL could stimulate a complex response *in vivo* by inducing several inflammatory cytokines and chemokines [47]. More recently, we have reported that 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL from a concentration of 12 µM induces apoptosis in certain types of cells, such as macrophages and neutrophils, but not in epithelial cells [59] (Fig. 7). Taken together, these data suggest that the quorum-sensing molecules have a critical role in the pathogenesis of *P. aeruginosa* infection, not only in the induction of bacterial virulence factors but also in the modulation of host responses. The role of bacterial quorum-sensing systems and their regulation in infection have been reviewed elsewhere [60–63].