

表 2. わが国における市中肺炎の病原体に関する報告

病原体	Ishida (n=552)	Miyashita (n=200)	Matsushima (n=232)	自験集計 (n=218)
肺炎球菌	140(25.4%)	41(20.5%)	57(24.6%)	53(24.3%)
インフルエンザ菌	38(6.9%)	22(11.0%)	43(18.5%)	24(11.0%)
肺炎マイコプラズマ	37(6.7%)	19(9.5%)	12(5.2%)	24(11.0%)
肺炎クラミジア	34(6.2%)	15(7.5%)	15(6.5%)	—
ミレリー・グループ	20(3.6%)	4(2.0%)	5(2.2%)	6(2.8%)
嫌気性菌	17(3.1%)	8(4.0%)	9(3.9%)	18(8.3%)
肺炎桿菌	16(2.9%)	5(2.5%)	3(1.3%)	10(4.6%)
黄色ブドウ球菌	15(2.7%)	10(5.0%)	8(3.4%)	12(5.5%)
緑膿菌	14(2.5%)	4(2.0%)	1(0.4%)	6(2.8%)
モラクセラ・カタラーリス	11(2.0%)	6(3.0%)	5(2.2%)	13(6.0%)
オウム柄クラミジア	11(2.0%)	2(1.0%)	5(2.2%)	3(1.4%)
結核菌	7(1.3%)	—	—	12(5.5%)
レジオネラ	4(0.7%)	2(1.0%)	9(3.9%)	—
ウイルス	11(2.0%)	6(3.0%)	37(15.9%)	13(6.0%)
不明	199(36.1%)	83(41.5%)	62(26.7%)	63(28.9%)

ら、患者状況の把握は重要である。患者状況を評価するためには詳細な病歴聴取や基礎疾患の確実な把握が欠かせない。

[2] 重要な病原体

わが国における市中肺炎の病原体に関する報告とわれわれの経気管吸引法(TTA)の集計とを表2に示す⁴⁾。傾向は類似しており、頻度の高い病原体は、肺炎球菌(20~25%)、インフルエンザ菌(7~20%)、肺炎マイコプラズマ(5~10%)、肺炎クラミジア(6~7%)である。市中肺炎の原因はこの4病原体で約半分を占めているので、まずはこの4病原体を想定した対応をすることになる。わが国で分離される肺炎球菌の約80%はマクロライド系薬に耐性があり、しかもその半数はすべてのマクロライド系薬に高度耐性を示すリボゾーム変異(erm-B遺伝子由来)である。またはマクロライド系薬はアジスロマイシン(AZM:ジスロマック[®])を除き、インフルエンザ菌への感受性は低い。そのため日本呼吸器学会ガイドラインでは、細菌性肺炎と非定型肺炎を鑑別し抗菌薬を選択するようになっている。

[3] 治療の実際

市中肺炎の治療も基本は、原因の病原体に感受性をもつ薬剤を十分量、必要な最短期間投与することである。日本呼吸器学会ガイドラインでは、重症度を分類した後に原因微生物検索を行い、治療薬を決定する。原因菌不明時には細菌性肺炎と非定型肺炎を鑑別し(前述)、治療薬を決める。原因菌が推定できたときにはその原因菌に最適な抗菌薬を選択する。また、超重症でICU治療が必要な症例にはエンピリックに開始すべき薬剤が推奨されている⁵⁾。表3にはガイドラインでの推奨薬剤の一部を示すが、詳細な使い分けはガイドラインを参照して頂きたい。

抗菌薬を投与する場合は、漫然と投与するのではなく、体内における抗菌薬の薬物動態(pharmacokinetics; PK)と薬力学(pharmacodynamics; PD)を意識した投与方法を選択すべきであ

C. 臓器別感染症

表 3. 市中肺炎での抗菌薬選択

	外来治療	入院治療
細菌性肺炎疑い	β -ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン系薬経口剤 レスピラトリーキノロン経口剤	β -ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン系薬注射剤 第三・四世代セフェム系注射剤 ニューキノロン系注射剤
非定型肺炎疑い	マクロライド系経口剤 テトラサイクリン系経口剤 レスピラトリーキノロン経口剤 ケトライド	テトラサイクリン系薬注射剤 マクロライド系注射剤 ニューキノロン系注射剤
肺炎球菌性肺炎	アモキシシリン(高用量) ペネム系経口剤 レスピラトリーキノロン経口剤 ケトライド	ペニシリン系薬注射剤(高用量) セフトリアキソン 第四世代セフェム系注射剤 カルバペネム系注射剤
インフルエンザ菌性肺炎	β -ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン系薬経口剤 第二・三世代セフェム系経口剤 ニューキノロン経口剤	ペニシリン系薬注射剤 第二・三・四世代セフェム系注射剤 ニューキノロン系注射剤
レンサ球菌性肺炎	ペニシリン系薬経口剤 マクロライド経口剤	ペニシリン系薬注射剤
レジオネラ肺炎	ニューキノロン経口剤 マクロライド系経口剤 リファンピシン ケトライド	ニューキノロン系注射剤 マクロライド系注射剤+リファンピシン
ICU治療肺炎	1群 カルバペネム系注射剤 第三・四世代セフェム系注射剤+クリンダマイシン モノバクタム+クリンダマイシン	2群 ニューキノロン系注射剤 テトラサイクリン系注射剤 マクロライド系注射剤

(文献5)より一部抜粋)

る。抗菌薬の効果と関連するPK/PDパラメーターは、ニューキノロン系薬・アミノ配糖体系薬ではAUC/MICであり、 β -ラクタム薬・マクロライド系薬ではtime above MICである。したがって、ニューキノロン系薬・アミノ配糖体系薬では1日投与量を1日1回で投与とし、 β -ラクタム薬では投与回数を1日3~6回とする方がよい⁷⁾。

治療効果判定は、3日後・7日後に行い、体温が重要な指標となる。ガイドラインでは、白血球数、CRP値、胸部画像所見も効果判定指標としている⁶⁾。抗菌薬の投与期間は長くても14日までとする。治療終了後も1週間ぐらいいは経過を観察し、再増悪することがないかを確認する必要がある。

3. 院内肺炎

[1] 定義と診断

院内肺炎とは、入院後48時間以上を経てから発症した肺炎と定義されている。但し、レジオネラ肺炎では潜伏期間が2~10日と比較的長いので、慎重に判断する必要がある。

院内肺炎も症状・身体所見・血液検査などから肺炎を疑い、胸部X線写真で新たな浸潤影を確認することで診断する。しかし院内肺炎の場合は、基礎疾患やその医療処置などで、肺炎の発見が遅れたり、診断が難しくなったりする傾向があるので、注意が必要である。

胸部 X 線写真で肺炎と診断した場合には、その原因となった病原体を確定するための検査を行う。検査法には、喀痰などの塗抹鏡検、分離培養、抗原検査、遺伝子学的診断法、血清抗体価測定、組織学的診断法などがある。どの診断法をどの検体を用いて行うかは、患者の病状や想定される感染症などを勘案して選択することになる。しかし細菌学的検査は可能ならば、抗菌薬治療前に実施するように努めるべきである。

[2] 重要な病原体

院内肺炎の発症には多くの要因がかかわるので、その原因となる病原体も多彩であり、医療機関や患者背景ごとに異なる。そのため院内肺炎の病原体は、市中肺炎のように一般論化することが大変に難しい。

Ramphal[®]による院内肺炎の原因菌に関するレビューとわれわれの TTA による集計を表 4 に示す。入院後抗菌薬の投与歴がない症例では、院内肺炎であっても肺炎球菌が原因菌になることを知っておく必要がある。また、緑膿菌などのグラム陰性菌の分離頻度が高いことは院内肺炎の特徴であるが、われわれの集計では大腸菌の分離頻度は低く、一般にいわれているほど大腸菌による肺炎は多くないと考える。

メモ

われわれの経験²⁾では、TTA で病原体を分離できなかった理由が約 20%の症例で抗菌薬の前投与であると考えられた。

[3] 治療の実際

院内肺炎は死亡率が高いので、その治療は、当初から広域で強力な抗菌薬を十分量、短期間投与することが推奨されている。

日本呼吸器学会院内肺炎ガイドライン⁹⁾では、抗菌薬選択の判断基準として肺炎の重症度、肺炎発症の危険因子の有無、特殊病態をもつ患者かどうかの 3 項目を用いている。重症度は胸部 X 線写真の陰影の拡がり・体温・脈拍数・呼吸数・脱水の有無・白血球数・CRP・PaO₂で判定する。危険因子には、誤嚥をきたしやすい状態、慢性呼吸器疾患、心不全・肺水腫、糖尿病・腎不全・慢性肝疾患、H₂ブロッカー・制酸薬の投与、長期の抗菌薬投与、65 歳以上の高齢者、悪性腫瘍が挙げられて

表 4. 院内肺炎の病原体の分離頻度

病原体	Ramphal [®] の レビュー	自験集計
グラム陽性菌		
肺炎球菌	5~20%	8.6%
黄色ブドウ球菌	20~40%	9.8%
α ストレプトコッカス属	—	13.1%
グラム陰性菌		
インフルエンザ菌	5~15%	5.7%
モラクセラ・カタラーリス	—	6.5%
緑膿菌	25~50%	10.6%
肺炎桿菌		4.9%
セラチア属		2.0%
その他		12.2%
嫌気性菌	0~30%	11.8%
レジオネラ属	0~5%	—
抗酸菌	1%	2.0%

C. 臓器別感染症

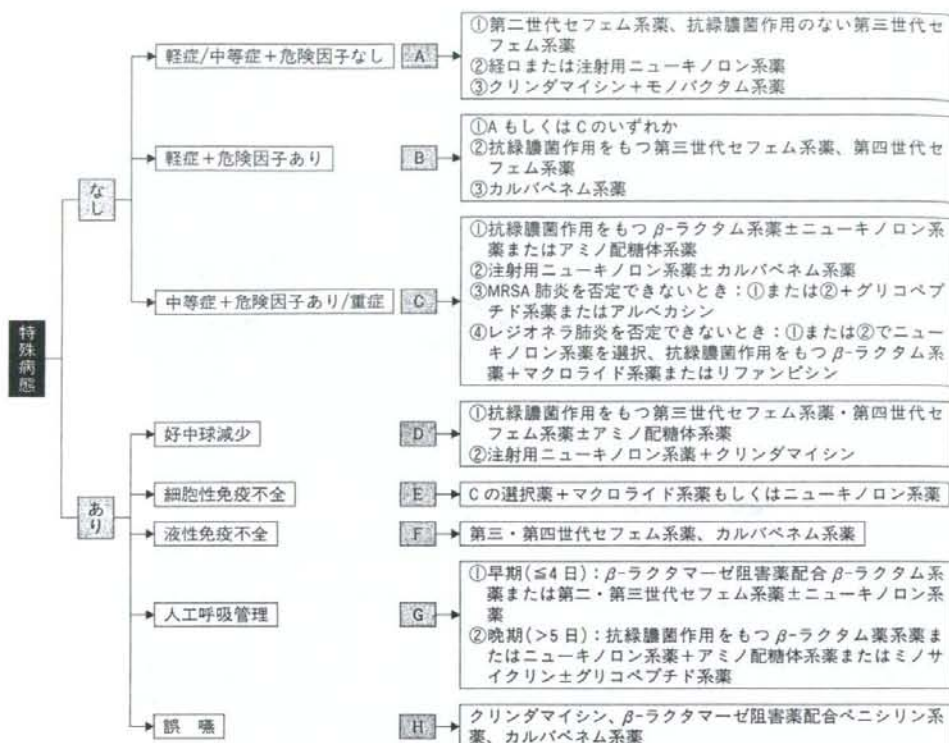


図 3. 院内肺炎での抗菌薬選択の考え方

(日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会：成人院内肺炎診療の基本的考え方, p6, 日本呼吸器学会, 東京, 2002より一部改変)

いる。また、特殊病態として免疫不全状態、人工呼吸管理、誤嚥をした状態が設定されている。以上の情報をもとに A~H の群に分け、抗菌薬を推奨している (図 3)。

●メモ

人工呼吸器関連肺炎 (VAP) は気管挿管により人工呼吸開始 48 時間以降に発症した肺炎である。気管挿管 4 日以内に発症したものを早期 VAP, 5 日以降に発症したものを晩期 VAP と分類する。晩期 VAP では耐性菌が原因となることが多くなる。

4. 誤嚥性肺炎

[1] 定義と診断

誤嚥とは、水分や食物など外来性のものや、口腔・咽頭分泌物、胃内容物など内因性のものが下

表 5. 誤嚥を生じる危険要因

1. 寝たきり状態(原因疾患を問わない)	5. 中毒・代謝障害 薬物中毒 アルコール中毒 代謝性脳症(肝硬変、糖尿病、腎不全、電解質異常)
2. 神経・筋疾患 脳血管疾患(急性期、慢性期) 中枢性交代性疾患 パーキンソン症候群 認知障害(脳血管性、アルツハイマー型) 筋萎縮性側索硬化症 重症筋無力症 多発性筋炎	6. 医原性 全身麻酔 頸頭部食道手術 鎮静薬、鎮痛薬 抗コリン薬など口腔内乾燥をきたす薬剤 テオフィリンなどの食道括約筋機能低下をきたす薬剤 経管栄養 気管挿管
3. 口腔内の異常 歯の噛み合わせ障害(義歯不適合など) 口腔内乾燥 口腔・咽頭・喉頭癌	7. その他 妊娠 腹水
4. 胃・食道疾患 食道憩室 食道運動異常(アカラシア、強皮症) 胃・食道悪性腫瘍 胃食道逆流(食道裂孔ヘルニアを含む) 胃切除(全摘、亜全摘)	

(文献9)より一部改変)

気道内に侵入することと定義されている。誤嚥には、急速に多量の胃内容物などを誤嚥する場合と気づかぬうちに少量の口腔・咽頭分泌物や胃内容物を繰り返して気道内に吸引する不顕性誤嚥とがある。

誤嚥性肺炎は、さまざまな程度の嚥下障害を背景にし、多くは高齢者に発症する。高齢者では咳反射や嚥下反射の低下を認めやすく、特に基底核領域の脳血管障害では昼間より就寝中に嚥下反射が低下し、誤嚥を起こしやすくなる。ほかにも、基礎疾患の影響や薬剤などの医原性要因などが複合的に関与して誤嚥性肺炎を発症すると考えられている(表5)⁹⁾。

誤嚥の存在を疑わないと誤嚥性肺炎の診断はできないので、誤嚥を起こしやすい病態があり、肺炎を繰り返す場合には積極的に誤嚥性肺炎を疑うようにする。誤嚥性肺炎の診断は、臨床経過と胸部X線写真や胸部CTから行う。陰影は下葉、背側に多いが、繰り返している場合はびまん性に存在し、斑状影、スリガラス影、粒状影など多彩な性状を呈する。嚥下障害の診断には、嚥下造影検査(VF)や嚥下反射試験(2段階簡易嚥下誘発テスト:東大法)などがある。

[2] 重要な病原体と治療の実際

誤嚥性肺炎の病原体は発症機序からみて、口腔内細菌が関与すると考えられている。しかし基本的には市中発症例では市中肺炎の原因菌、院内発症例では院内肺炎の原因菌と大差はなく、嫌気性

●メモ

Mendelsonは1946年に全身麻酔による無痛分娩後に重篤な誤嚥性肺炎が高率に起こることを報告し、これは分娩の際で生じる化学性肺炎(メンデルソン症候群)とされている。突然発症し数時間で重症化するが、60%以上が自然治癒する。しかし12%は副症化し死に至り、26%はいったん回復しても細菌による二次感染を引き起こす。

C. 臓器別感染症

菌の重要性がより強調されている。また嘔吐に伴う誤嚥のときには細菌感染を生じていないこともあるが、鑑別は難しく、二次感染の可能性もあるので、抗菌薬を投与して経過をみる。

誤嚥性肺炎は高齢者や基礎疾患を有する症例に発症するので、抗菌薬の選択は肺炎の重症度を中等症以上として対処する必要がある。 β -ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン系薬、カルバペネム系薬、クリンダマイシン (CLDM: グラシン S[®] 注、600~2,400 mg/日・1日 2~4回) などを使用する (図 3)。

[3] 誤嚥性肺炎の予防

誤嚥の危険があれば、食物形態の選択や適切な食事の体位を決定し、誤嚥を起こしにくい食べ方や介助法を患者・家族に指導する。また口腔ケア (歯磨き、清拭、含嗽など) を実施し、口腔衛生を保つように努める。

咽頭から喉頭のサブスタンス P が枯渇すると嚥下反射が著しく低下することが動物実験で証明されている。降圧薬のアンギオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE 阻害薬) にはサブスタンス P の分解を抑制する作用があるので、嚥下反射を改善させ、誤嚥性肺炎の予防が期待できる。

嚥下障害が強く自力での食事摂取が不可能な場合や誤嚥を繰り返す場合には、経管栄養が必要となる。この場合、経鼻経管栄養法よりも経皮内視鏡的胃瘻造設術 (PEG) による栄養補給法の方が誤嚥性肺炎の予防に優れている。

(古西 満、三笠桂一)

文 献

- 1) 澤木政好, 三笠桂一, 古西 満: 呼吸器感染症: 肺炎・気管支炎, 繰り返し感染症, 守殿貞夫 (編), pp 43-56, 医薬ジャーナル, 大阪, 1996.
- 2) 古西 満, 高橋 賢, 真島利区, ほか: 経気管吸引法 (TTA) による呼吸器感染症の病態解析: 1,416 例の集計から, 感染症誌 75: 961-969, 2001.
- 3) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会: 成人気道感染症診療の基本的考え方, 日本呼吸器学会, 東京, 2003.
- 4) Janssens JP, Krause KH: Pneumonia in the very old. *Lancet Infect Dis* 4: 112-124, 2004.
- 5) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会: 成人市中肺炎診療ガイドライン, 日本呼吸器学会, 東京, 2005.
- 6) 古西 満, 笠原 敬, 三笠桂一: 肺炎の原因微生物, 診断と治療 90: 2133-2137, 2002.
- 7) 戸塚恭一: 抗菌薬の PK/PD, 高齢者診療のツボ: 肺炎, 斎藤 厚 (編), pp 43-46, 日本医事新報社, 東京, 2005.
- 8) Ramphal R: A position paper on the treatment of hospital acquired pneumonia (HAP); Do we need guideline? *Acta Clinica Belgica* 57: 202-206, 2002.
- 9) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会: 成人院内肺炎診療の基本的考え方, 日本呼吸器学会, 東京, 2002.
- 10) Yamaya M, Yanai M, Ohru T, et al: Interventions to prevent pneumonia among older adults. *J Am Geriatr Soc*: 85-90, 2001.

11

マクロライド系抗菌薬

1 化学構造—基本骨格と各製剤の構造

マクロライド系抗菌薬は巨大なラクトン環を有し、ラクトン環と糖とのグルコシド結合が化学構造の特徴である。市販中のマクロライド系薬は、ラクトン環内の炭素原子数で14員環、15員環、16員環に分類されている。14員環にはエリスロマイシン(EM; エリスロシン)、クラリスロマイシン(CAM; クラリシッド, クラリス), ロキシスロマイシン(RXM; ルリッド)がある。15員環のアジスロマイシン(AZM; ジスロマック)はEMのラクトン部にメチル置換窒素が導入され、アザライド系抗菌薬ともよばれる。16員環にはキタサマイシン(LM; ロイコマイシン), ロキタマイシン(RKM; リカマイシン), アセチルスピラマイシン(AC-SPM; アセチルスピラマイシン), ジョサマイシン(JM; ジョサマイシン), ミデカマイシン(MDM; ミオカマイシン, メデマイシン)がある(図1)。

EMは胃酸で6位水酸基と9位ケト基の間にエノールエーテルが形成され、さらに9位と12位の間にスピロケタールが形成されると、抗菌活性を失うとともに、腸管蠕動作用を示し、胃腸障害をきたす欠点がある。CAMは6位水酸基をメチル化して酸に対する安定性を獲得している。9位カルボニル基を修飾した置換ヒドロキシアミン誘導体であるRXMは、経口吸収が速やかで、血中半減期が長くなる。AZMは9位カルボニル基がなくなったため、酸に極めて安定である¹⁾。

2 臨床的分類

CAM, RXM, AZMは胃酸での不活化を受けにくく、経口吸収が優れ、血中濃度上昇、半減期延長、組織移行性増大などの特性をもち、ニューマクロライドとよばれている²⁾。また16員環マクロライド薬では、RKMが吸収や組織移行性が改良された薬剤である(図2)。

EMとLMには経口薬以外に注射薬もある。LM, AC-SPM, RXMには小児適応がない(図2)。

3 抗菌作用点

DNAからの遺伝情報はメッセンジャーRNA(mRNA)へ転写され、蛋白質が合

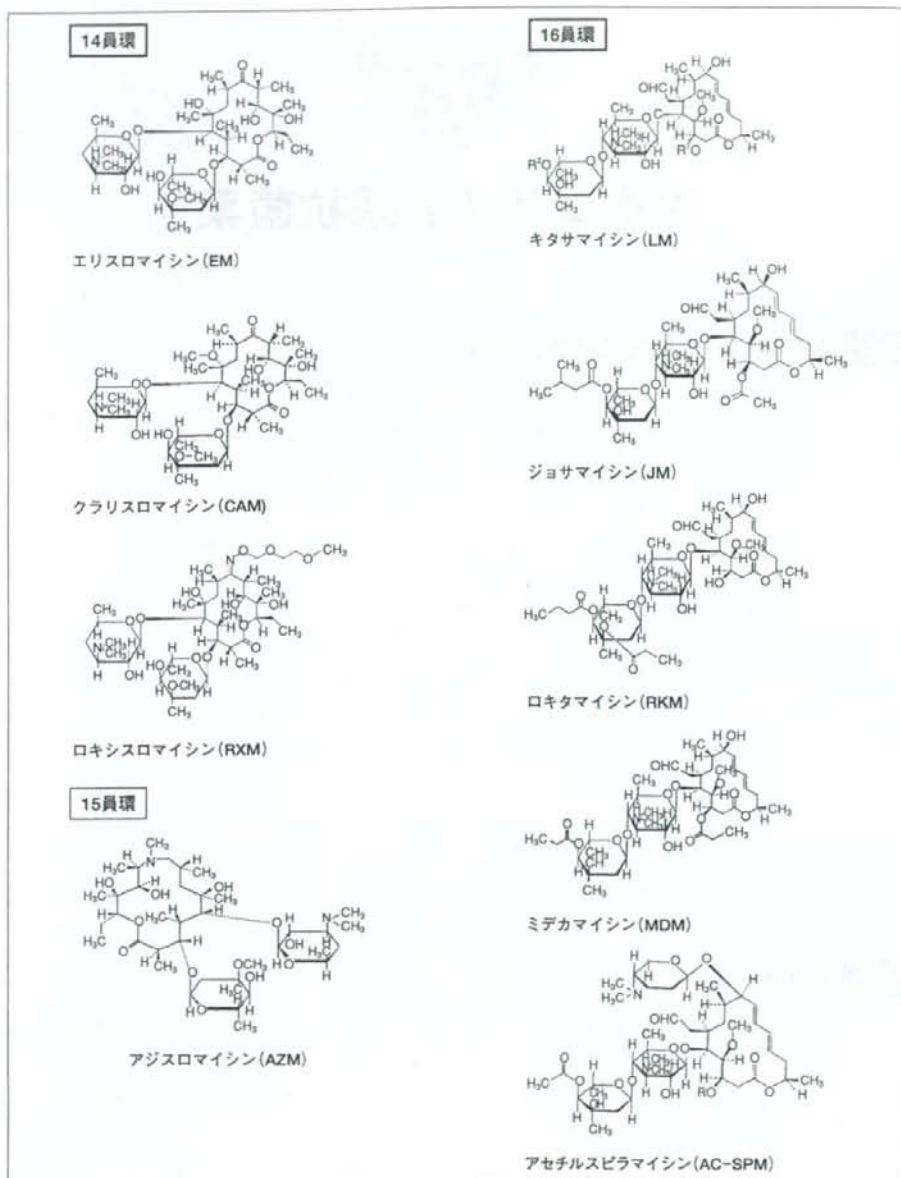


図1 マクロライド系抗菌薬の化学構造

(日本薬局方から抜粋)

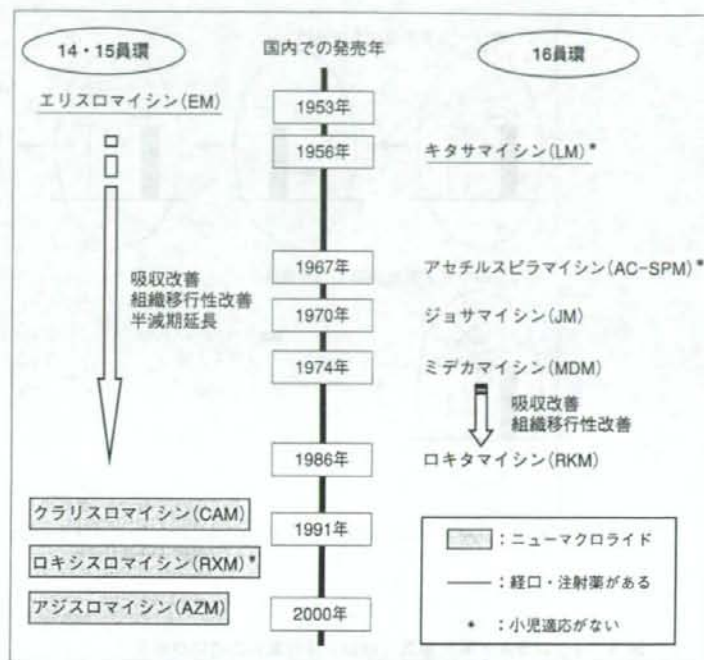


図 2 マクロライド系抗菌薬の開発経緯と臨床特性

成される。リボソームはアミノ酸を運搬するトランスファーRNA (アミノアシル tRNA) が mRNA の対応するコドンに結合する場を提供する。リボソームの小さなサブユニットは mRNA と結合し、大きいサブユニットは合成中のポリペプチドを運んでいる。リボソームは 5' 末端から 3' 末端まで動き、コドンに対応したアミノアシル tRNA から 1 つのアミノ酸が結合し、ポリペプチド鎖が伸長して、蛋白質が合成される³⁾ (図 3)。

マクロライド系薬は、細菌の 70 S リボソームの 50 S サブユニットでペプチジル部位とアミノアシル部位の間に結合、ペプチド転移反応を阻害し、細菌の増殖を抑制する³⁾ (図 3)。その作用は主に静菌的であるが、高濃度では殺菌的にも作用する。

4 実際に有効な疾患・菌種

マクロライド系抗菌薬、特に EM は、皮膚科領域感染症や呼吸器感染症を中心に幅広い適応疾患の承認を受けている。さらに、EM は破傷風、LM はつつが虫病、CAM はエイズの播種性マイコバクテリウム・アビウム・コンプレックス (*Mycobacterium avium* complex; MAC) 症、胃潰瘍・十二指腸潰瘍におけるヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 感染症に適応をもっている (表 1)。

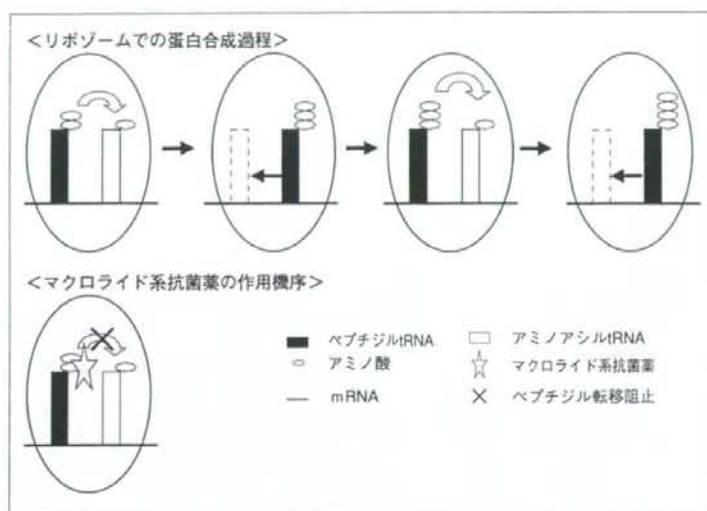


図3 リボソームでの蛋白合成過程の模式図とマクロライド系抗菌薬の作用機序 (文献3より)

表1 マクロライド系抗菌薬（経口・注射薬）の適応症概要

適応症	敗血症	感染性心内膜炎	皮膚科領域感染症	外科・整形外科領域感染症	呼吸器感染症	尿路感染症	性感染症	胆嚢炎	感染性腸炎	産婦人科領域感染症	眼科領域感染症	耳鼻科領域感染症	歯科・口腔外科領域感染症	猩紅熱	ジフテリア	百日咳	破傷風	つつが虫病	エイズの播種性MAC症	ヘリコバクター・ピロリ感染症
薬 剤																				
EM			○	○	○	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○			
CAM			○	○	○		○			○			○	○						○
RXM			○		○								○	○						
AZM			○		○		○						○	○						
LM	●	●	○		○		○	●					○	○	○	○		○		
RKM			○		○					○			○	○						
AC-SPM			○	○	○		○				○	○	○		○					
JM			○	○	○	○				○	○	○	○		○					
MDM			○	○	○	○						○	○							

●：注射薬のみの適応

(インタビューフォームより抜粋)

表 2 マクロライド系抗菌薬の臨床分離菌に対する抗菌力；MIC₉₀

	EM	CAM	RXM	AZM	JM
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	>100	1.56	1.56	3.13	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.1	0.05	0.39	0.1	0.39
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	>100	12.5	>100	>100	3.13
<i>Enterococcus faecalis</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Haemophilus influenzae</i>	6.25	6.25	25	1.56	50
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0.39	0.2	0.78	0.1	1.56
<i>Escherichia coli</i>	—	>128	—	16	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	>128	—	64	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1	1	—	0.125	—
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	6.25	3.13	25	>100	3.13
<i>Legionella pneumophila</i>	2	0.125	—	2	—
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0.0156	0.0078	—	0.00024	0.03125
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	0.125	—	—	0.125	0.015
<i>Helicobacter pylori</i>	128	2	—	>128	—

(文献4-6より)

マクロライド系薬はβ-ラクタム系抗菌薬が無効であるマイコプラズマ、クラミジア、レジオネラなどに有効である。一般細菌では黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、A群溶血性レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) などのグラム陽性菌、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) などのグラム陰性菌、ペプトストレプトコッカスなどの嫌気性菌が適応菌種とされている⁴⁻⁶⁾ (表2)。

5 耐性動向

マクロライド系薬の抗菌力は、本来一般細菌では主としてグラム陽性球菌で良好であった。しかし黄色ブドウ球菌の耐性率はメチシリン感受性株 (MSSA) で10%前後、メチシリン耐性株 (MRSA) では90%以上に達している。肺炎球菌は、重大な耐性の問題をもつ菌種の一つである。肺炎球菌のマクロライド耐性機序には、リボソーム変異 (*ermB* 遺伝子由来) と薬剤排出促進 (*mefA* 遺伝子由来) とがある。前者は全てのマクロライド系薬に高度耐性を示し、後者は14, 15員環マクロライド系薬に軽・中等度耐性を示す。わが国の肺炎球菌のマクロライド耐性率は70-80%

に及び、その半数は高度耐性である。A群溶血性レンサ球菌もマクロライド耐性率は増加傾向にある⁷⁾。また、近年臨床的に耐性を疑う *Mycoplasma pneumoniae* による肺炎症例が経験され、その動向が注目されている。

6 常用量と極量

マクロライド系薬はβ-ラクタム系薬と同様に、時間依存性に抗菌活性を発揮する薬剤である。すなわち効果は抗菌薬の血中（組織内）濃度が有効濃度で保たれる時間が影響するため、1回投与量を増やすよりも投与回数を増やすことが有用である。そのため、EMなどは1日4-6回の投与回数が必要である。しかしニューマクロライド（CAM, RXM, AZM）は消化管吸収が優れ、血中半減期や組織移行性も改善されたので、投与量、投与回数とも減らすことが可能となっている（表3）。

7 体内動態の特徴

1. 血中濃度

EM, CAM, RXM, AZM, MDMの薬動学的パラメーターを表4に示す。最高血中濃度（Cmax）はRXMが最も高く、AZMが最も低い値である。曲線下面積（AUC）もRXMが最も大きく、EMとCAM, AZMとMDMがほぼ同等である⁸⁾。

2. 組織移行性

マクロライド系薬、特にニューマクロライドは、臓器移行性や好中球移行性が良好で、主な組織内濃度は血漿中濃度を上回る。EM, RXM, AZMは同様の臓器分布パターンを示し、肝>腎=脾>肺>心の順に高い濃度を示す。一方、CAMは肺>脾>肝>腎>心の順に高濃度であり、良好な肺組織への移行が特徴である⁹⁾。ニューマクロライドは好中球内への移行も良好であり、特にAZMはEMの約10倍の移行性を示す（表4）。

3. 代謝と排泄

マクロライド系薬は、肝臓のチトクロームP-450による脱メチル化を中心とした代謝を受け、主に胆汁中に排泄される。しかしCAMは、尿中回収率が36.9%と高い。また、血中半減期（ $T_{1/2}$ ）はEMの1.78時間に対して、ニューマクロライドは各薬剤とも延長している（表4）。特に、AZMの $T_{1/2}$ は投与後9時間までが2.8時間、48時間までが17.2時間、168時間までが68.1時間と時間経過とともに延長する⁸⁾ため、1日1回、3日間投与に使用方法が限定されている。

8 臨床で使える領域

現在臨床で使うマクロライド系薬は、吸収や組織分布などを考慮すると、ニューマクロライドを選択することが多い。

マクロライド系薬が第一選択薬となるのは、マイコプラズマ、クラミジア、レジオネラによる呼吸器感染症、百日咳、カンピロバクター腸炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、クラミジアによる性感染症などである。また、エイズの播種性MAC症

表 3 わが国で認められているマクロライド系抗菌薬の用量・用法

薬 剤	成人 投与量 (mg/日)	用 法 (回/日)	その他	小児 投与量 (mg/kg/日)	用 法 (回/日)	注射薬 投与量 (mg/日)	用 法 (回/日)
EM	800—1200	4—6	マクロライド長期療法 400 mg 分 2/600 mg 分 3	25—50	4—6	600—1500	2—3 (2時間以上かけて 点滴)
CAM	400	2	エイズ播種性 MAC 症 800 mg 分 2 <i>H.pylori</i> 感染症 400—800 mg 分 2×7 日	10—15	2—3	—	—
RXM	300	2	—	—	—	—	—
AZM	500	1 (3日間)	尿道炎・子宮頸管炎 1000 mg×1 回	10	1 (3日間)	—	—
LM	600—1600	3—4	—	—	—	400	2
AS-SPM	800—1200	4—6	—	—	—	—	—
JM	800—1200	3—4	—	30	3—4	—	—
MDM (酢酸ミデカマイシン)	800—1200 600	3—4 3	—	30 20—40	3—4 3—4	—	—
RKM	600	3	—	20—30	3	—	—

表 4 マクロライド系抗菌薬の薬動学的パラメーター

薬 剤	投与量 (mg)	Tmax (h)	Cmax (μ g/ml)	AUC (μ g·h/ml)	T _{1/2} (h)	好中球への移行比 (細胞内/外)	尿中回収率 (%)
EM	400	2.2	1.88	6.05 (0-12 h)	1.78 (0-12 h)	6.5	3.6 (0-12 h)
CAM	200	1.7	1.11	6.87 (0-12 h)	3.53 (0-12 h)	12.6	36.9 (0-12 h)
RXM	150	1.34	5.35	58.8 (0-8 h)	6.83 (0-8 h)	21.9	5.1 (0-10 h)
AZM	500	2.5	0.58	3.32 (0-48 h)	2.8 (Peak-9 h)	65.0	9.0 (0-168 h)
MDM	600	0.59	1.64	2.45 (0-8 h)	0.69 (0-8 h)	—	2.1 (0-10 h)

(文献 8 より一部改変)

表 5 マクロライド系抗菌薬による治療を考慮すべき感染症

呼吸器感染症	1) マイコプラズマ, クラミジア, レジオネラ感染症 2) 百日咳 3) 難治性慢性下気道感染症 (長期療法) 4) A群溶血性レンサ球菌感染症 (β -ラクタム薬が使用できない場合)
腸管感染症	1) カンピロバクター腸炎 2) ヘリコバクター・ピロリ感染症
性感染症	1) クラミジア感染症 2) 軟性下疳
耳鼻科領域感染症	1) ジフテリア 2) 慢性副鼻腔炎 (長期療法) 3) 滲出性中耳炎 (長期療法)
その他	1) エイズの播種性 MAC 症 2) Q 熱

や Q 熱にも使用する。さらに、マクロライドの新作用を期待した使い方として、難治性慢性下気道感染症、慢性副鼻腔炎、滲出性中耳炎には長期療法で用いる⁴⁾(表 5)。

A 群溶血性レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌などの一般細菌に対しては、 β -ラクタム系薬が無効あるいは使用できない場合の二次選択薬とはなるが、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌では耐性菌が多い点、インフルエンザ菌では AZM 以外は抗菌力が弱い点に注意する必要がある⁴⁾。

9 小児・高齢者・妊婦への投与の注意点

RXM, LM, AC-SPM には小児適応がない。EM では新生児・乳児で肥厚性幽門狭窄の報告があり、他の薬剤では低出生体重児・新生児に対する安全性が確立していない。

高齢者では一般に生理機能が低下しているので、血中・組織内濃度が高くなることがある。使用する際には、用量に留意するなど慎重に投与する必要がある。

動物実験で CAM, RXM の高用量投与時に胎児毒性を認め、RKM では生児数の減少を認めている。他の薬剤でも妊娠中の投与に関する安全性は確立していない。そのため、治療上の有益性が危険性を上回ると判断される場合にのみ使用する。また、ヒト母乳中へ移行することが全ての薬剤で報告されており、薬剤投与中は授乳を避ける必要がある。

10 副作用・相互作用

マクロライド系薬の副作用では下痢や胃部不快などの消化器症状が最も頻度が高い。ほかには薬疹、肝機能障害、好酸球増多が比較的多くみられる副作用である。

表 6 クラリスロマイシン (CAM) での薬物相互作用の概要

薬剤名	臨床症状など	機序
併用禁忌		
ビモジド	QT 延長, 心室性不整脈	CYP 3 A 4 阻害により当該薬の血中濃度上昇
エルゴタミン含有製剤	血管攣縮	同上
シサプリド	QT 延長, 心室性不整脈	同上
(国内承認整理済)		
併用注意		
ジゴキシン	嘔気, 嘔吐, 不整脈等	腸内細菌叢への影響で当該薬の不活化抑制 P-糖蛋白質を介した当該薬の輸送阻害
テオフィリン等	中毒症状(痙攣, 横紋筋融解症等)	CYP 阻害により当該薬の血中濃度上昇
ジソピラミド	QT 延長, 低血糖等	CYP 3 A 阻害により当該薬の血中濃度上昇
トリアゾラム	傾眠等	同上
カルバマゼピン	嗜眠, 眩暈, 眼振, 運動失調等	同上
シクロスポリン	腎障害等	同上
タクロリムス	クレアチニン上昇等	同上
クマリン系抗凝固薬	プロトロンビン時間延長等	同上
ミダゾラム	中枢神経系抑制作用の増強	同上
カルシウム拮抗薬	血圧低下, 頻脈, 徐脈	同上
シンバスタチン等	横紋筋融解症	同上
スルホニル尿素系 血糖降下薬	低血糖	機序不明だが, 当該薬の血中濃度上昇
コルヒチン	中毒症状(汎血球減少, 肝障害, 筋痛等)	肝臓での代謝阻害で当該薬の血中濃度上昇
リトナビル	当該薬の血中濃度上昇	CYP 3 A 阻害により当該薬の血中濃度上昇
イトラコナゾール	当該薬の血中濃度上昇	同上
リファンピシン	CAM の血中濃度低下	当該薬の CYP 3 A 誘導で CAM 血中濃度低下

(インタビューフォームより抜粋)

重篤な副作用には、ショック、アナフィラキシー様症状、QT 延長、心室性頻拍、皮膚粘膜眼症候群、中毒性表皮壊死症、剥脱性皮膚炎、劇症肝炎、横紋筋融解症、急性間質性腎炎などがある（いずれも頻度不明）。

薬物相互作用は薬物吸収、分布、代謝、排泄の過程で生じる。マクロライド系抗菌薬が関係する薬物相互作用の多くは、代謝酵素阻害を介するものである。マクロライド系薬は主に肝臓で代謝される。ラクトン環に結合したアミノ糖の3級アミン部位でのN-脱メチル化反応で生じたニトロソ体マクロライドは、チトクロームP-450 (CYP) のヘム鉄と共有結合するため、CYP分子種は不活化される。マクロライド系薬の代謝に関わるCYP分子種は、CYP3A4分子種であるので、これによって代謝される多くの薬物と相互作用を生じる可能性がある¹⁰⁾。表6には、マクロライド系薬の中でもCYP阻害活性の高いCAMの薬物相互作用を示す。

(古西 満)

文献

- 1) 八木澤守正：マクロライド系抗生物質の新しい展開 開発の歴史。臨床と微生物 27：783-792, 2000
- 2) 渡辺 彰：II, 多剤耐性菌時代の各種抗菌薬のポジショニングとその適切な使い方 5. マクロライド薬・ケトライド薬。日内会誌 92：2129-2135, 2003
- 3) 宮崎修一：マクロライド系抗生物質の新しい展開 抗菌力：一般細菌。臨床と微生物 27：793-799, 2000
- 4) 岩田 敏：マクロライド系抗菌薬。JIM 12：1032-1035, 2002
- 5) 新井 進, 岡本博樹, 野口恵子 他：Telithromycin の *in vitro* 抗菌力—嫌気性菌を含む標準菌株, 臨床分離株に対する *in vitro* 抗菌力。日化療会誌 51 (S-1)：7-18, 2003
- 6) 斎藤 厚, 小出道夫, 新垣紀子：Telithromycin の *Legionella* 菌種に対する *in vitro* 抗菌力—*Legionella* 菌種標準株, 臨床分離株に対する抗菌力—。日化療会誌 51 (S-1)：66-70, 2003
- 7) 砂川慶介：小児呼吸器疾患。臨床医 28：578-582, 2002
- 8) 柴 孝也：マクロライド系抗生物質の新しい展開 ヒトにおける体内動態。臨床と微生物 27：805-814, 2000
- 9) 吉田英生, 古田隆久：マクロライド系抗生物質の体内動態の特徴比較—ラットにおける Clarithromycin, Roxithromycin, Azithromycin 及び Erythromycin-stearate の組織内濃度—。Jap J Antibiot 52：497-503, 1999
- 10) Westphal JF：Macrolide-induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450 (CYP) 3A4：an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin. Br J Clin Pharmacol 50：285-295, 2000

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dilip Patel, Lia Danelishvili, Yoshitaka Yamazaki, Marta Alonso, Michael L. Paustian, John P. Bannantine, Lisbeth Meunier- Goddik, and Luiz E. Bermudez	The Ability of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis To Enter Bovine Epithelial Cells Is Influenced by Preexposure to a Hyperosmolar Environment and Intracellular Passage in Bovine Mammary Epithelial Cells	INFECTION AND IMMUNITY	74	2849-2855	2006
Yoshitaka Yamazaki, Lia Danelishvili, Martin Wu, Eiko Hidaka, Tutomu Katsuyama, Bernadette Stang, Mary Petrofsky, Robert Bildfell and Luiz E. Bermudez	The ability to form biofilm influences Mycobacterium avium invasion and translocation of bronchial epithelial cells	Cellular Microbiology	8	806-814	2006
Yoshitaka Yamazaki, Lia Danelishvili, Martin Wu, Molly MacNab, and Luiz E. Bermudez	Mycobacterium avium Genes Associated with the Ability To Form a Biofilm	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY	72	819-825	2006

The Ability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* To Enter Bovine Epithelial Cells Is Influenced by Preexposure to a Hyperosmolar Environment and Intracellular Passage in Bovine Mammary Epithelial Cells

Dilip Patel,¹ Lia Danelishvili,⁵ Yoshitaka Yamazaki,^{3,5} Marta Alonso,⁵ Michael L. Paustian,⁴ John P. Bannantine,⁴ Lisbeth Meunier-Goddik,¹ and Luiz E. Bermudez^{2,5*}

Department of Food Science, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331¹; Department of Microbiology, College of Science, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331²; Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan³; National Animal Disease Center, Ames, Iowa 50010⁴; and Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331⁵

Received 6 September 2005/Returned for modification 16 October 2005/Accepted 13 February 2006

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the cause of Johne's disease in cattle and other ruminants. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infection of the bovine host is not well understood; however, it is assumed that crossing the bovine intestinal mucosa is important in order for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* to establish infection. To examine the ability of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* to infect bovine epithelial cells in vitro, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) epithelial cells were exposed to *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. It was observed that bacteria can establish infection and replicate within MDBK cells. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* also has been reported to infect mammary tissue and milk, and we showed that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infects bovine mammary epithelial cells (MAC-T cell line). Using polarized MAC-T cell monolayers, it was also determined that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* crosses apical and basolateral surfaces with approximately the same degree of efficiency. Because *M. avium* subsp. *paratuberculosis* can be delivered to the naive host by milk, it was investigated whether incubation of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* with milk has an effect on invasion of MDBK cells. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* exposed to milk entered epithelial cells with greater efficiency than *M. avium* subsp. *paratuberculosis* exposed to broth medium or water ($P < 0.01$). Growth of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* within MAC-T cells also resulted in augmented ability to subsequently infect bovine MDBK cells ($P < 0.001$). Microarray analysis of intracellular *M. avium* subsp. *paratuberculosis* RNA indicates the increased transcription of genes which might be associated with an invasive phenotype.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the etiologic agent of Johne's disease in cattle and other ruminants. It is assumed that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infects the young calf by crossing the intestinal barrier. Previous work (3, 26) has indicated that the interaction of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine epithelial cells is a complex process which might involve participation of several bacterial and host factors. For example, it has been reported that both in calves and in mice, challenge by the gastrointestinal route results in *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infecting M cells in the Peyer's patches (23, 26). Recently, Secott and colleagues have suggested that the invasion of the intestinal mucosa by *M. avium* subsp. *paratuberculosis* is secondary to the binding to fibronectin (26). In addition, Bannantine and colleagues demonstrated a role for a 35-kDa *M. avium* subsp. *paratuberculosis* protein in the invasion of cultured bovine epithelial cells (5). The 35-kDa protein is exposed in the outer layer of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and has also been associated with *Mycobacterium avium* invasion of human intestinal cells (22).

After *M. avium* subsp. *paratuberculosis* crosses the intestinal mucosa, the infection spreads to other organs, leading to the advanced stages of disease. Several studies have reported the presence of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in the mammary glands and in milk of symptomatic or asymptomatic animals (6, 28–30). This observation raises the possibility that the mammary gland could be a reservoir for *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. The environment inside the mammary gland is believed to be hyperosmolar (milk) and hypoxic (28). In addition, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* organisms infecting mammary epithelial cells might suffer the influence of the intracellular environment. In fact, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* may remain in contact with either the intracellular or milk environment for periods of up to 24 h before being excreted. Previous studies using *Mycobacterium avium* subsp. *avium* have shown that the environment to which the bacterium is exposed in the host can influence the expression of genes associated with its ability to enter epithelial cells. Incubation of *M. avium* subsp. *avium* in low oxygen tension or increased osmolarity conditions significantly enhances its ability to enter intestinal epithelial cells (8). A previous study on interactions between *M. avium* subsp. *avium* and environmental amoebae has shown that infection of amoebae results in enhanced virulence (14). Similar findings were reported regarding the *M. avium* subsp.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Oregon State University, 105 Dryden Hall, Corvallis, OR 97331-8797. Phone: (541) 737-6538. Fax: (541) 737-2730. E-mail: Luiz.Bermudez@oregonstate.edu.

paratuberculosis 35-kDa protein (5), which was shown to be expressed under anaerobic and hyperosmolar conditions (5).

It is reasonable to hypothesize that bacterial exposure to the complex conditions in the mammary gland or mammary gland epithelial cells may have an effect on virulence gene expression and, therefore, on the efficacy of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* invasion of the intestinal mucosa.

The objectives of this work were to determine whether *M. avium* subsp. *paratuberculosis* has the ability to enter cultured bovine epithelial cells *in vitro* and whether this characteristic can be influenced by exposure to milk or the intracellular environment of mammary epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. A bovine epithelial cell line (Madin-Darby bovine kidney [MDBK]) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained on Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. A bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) was kindly provided by Lewis Sheffield (Department of Dairy Science, University of Wisconsin). MAC-T cells were maintained on Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 5 μ g/ml insulin, and 1 μ g/ml hydrocortisone.

Bacteria. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ATCC 19698, a bovine clinical isolate from an animal with Johne's disease, was purchased from ATCC. It was grown at 37°C on modified Middlebrook 7H11 agar supplemented with Mycobactin J (2 mg/liter) and oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) (10%, vol/vol) or in 7H9 broth with Mycobactin J (2 mg/liter) and OADC (10%, vol/vol). For the invasion assay, individual colonies were selected, and a bacterial suspension was prepared using Hanks' balanced salt solution (HBSS) to give turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard. The *M. avium* subsp. *paratuberculosis* suspension (5 ml) was then passed through a 30-gauge needle 10 times, and clumps in the final suspension were allowed to settle. The top 1 ml out of the 5-ml suspension containing dispersed bacteria was used for the invasion assay.

Invasion assay. The invasion assays were carried out using the methods described by Bermudez and Young and by Sangari et al. (10, 24). Briefly, 24-well tissue culture plates (Corning Costar, New York) were seeded with 10⁴ MDBK or MAC-T cells, and monolayers were grown in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C until confluence. Before infection, the medium was replaced with fresh culture medium. Monolayers were then infected with approximately 2 × 10⁶ bacteria (depending ratio, 10 bacteria:1 cell) and incubated at 37°C in 5% CO₂ for up to 4 h, depending upon the experimental design. After incubation, monolayers were washed three times with HBSS and then treated with 200 μ g/ml of amikacin for 2 h at 37°C to kill extracellular bacteria, as shown in the *M. avium* system (8, 10) and confirmed using *M. paratuberculosis* (data not shown). Following incubation, the supernatant was removed and cell monolayers were washed three times with HBSS. To lyse the cells, wells were treated with 0.5 ml Triton X-100 (0.1%) for 10 min. Subsequently, 0.5 ml 7H9 broth containing Mycobactin J (2 mg/liter) and OADC (10%, vol/vol) was added to each well, and cells were disrupted by vigorous pipetting. Lysates were collected, serially diluted, and plated onto 7H11 agar for colony count. The percentage of invasion was calculated as the fraction of the inoculated bacteria that was recovered from the cell lysate.

***M. avium* subsp. *paratuberculosis* survival in MDBK and MAC-T cells.** Confluent monolayers of bovine epithelial cells were incubated with approximately 10⁶ *M. avium* subsp. *paratuberculosis* organisms for 2 h. After the incubation period, extracellular bacteria were killed by amikacin treatment (as described above), the supernatant was removed, and fresh culture medium was added to the monolayers. Infected cells were incubated for up to 4 days. At the end of the incubation period, monolayers were lysed, the lysate was diluted, and the number of intracellular bacteria was determined by plating cell lysates onto 7H11 agar.

Translocation assay. The translocation assay was performed using the Transwell 2-chamber culture system (Corning Costar, New York). Monolayers were established either on the top or bottom sides of the membrane by seeding it with 1 × 10⁶ MAC-T cells. Some monolayers had their apical surface exposed to the medium in the bottom chamber, whereas others had their basolateral side exposed to the medium in the top chamber. The culture medium was changed daily, and the integrity of the monolayers was determined by the following methods: (i) microscopic observation, (ii) measuring the transepithelial resistance, and (iii) the trypan blue (0.25%) permeability assay (optical density at 580 nm), as

previously described (9, 24). Trypan blue (0.25%) was added to the monolayer, and 3 h later the supernatant of the lower chamber was obtained for spectrometer reading. Controls included medium only (baseline). The top chamber was infected with 3 × 10⁷ bacteria as described above. After 1, 2, 3, and 4 days infection, 600 μ l of filtrate was collected from the bottom chamber, and fresh culture medium (600 μ l) was replenished. The ability to translocate was calculated as the cumulative percentage of the initial inoculum recovered in the bottom chamber at each time point.

Passage of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in MAC-T cells. Confluent monolayers of MAC-T cells in cell culture flasks (Corning Costar, New York) were inoculated with approximately 10⁷ *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria. After 2 h of contact time, extracellular bacteria were removed, followed by amikacin treatment as described previously, and new medium was added to the monolayer. Internalized bacteria were allowed to grow at 37°C for a total of 1 or 4 days. At the end of the incubation period, MAC-T cells were lysed by adding 0.5 ml Triton X-100 (0.1%) for 10 min. Lysates were then submitted to differential centrifugation as reported previously (8). The *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cells were collected into 7H9 broth containing Mycobactin J (2 mg/liter) and OADC (10%, vol/vol). The bacteria were recovered by centrifugation at 3,500 × g for 30 min at 4°C to maintain their phenotype and then used in the invasion assays.

Preexposure of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* to milk and milk components. Approximately 10⁷ *M. avium* subsp. *paratuberculosis* organisms were inoculated into 5 ml of raw milk (from a pool of several cows) containing polymyxin B (5.5 mg/liter), amphotericin (11 mg/liter), carbenicillin (25 mg/liter), and trimethoprim (2.5 mg/liter). Incubation was carried out at 37°C. After 24 h, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* was recovered by centrifugation at 3,500 × g for 30 min at 5°C. Subsequently, bacteria were resuspended in HBSS, quantified by both McFarland turbidity standard and colony count, and used for infection of MDBK cells. Sterile water and 7H9 broth treated in the same manner as milk were used as controls. To determine the role of milk components, casein and serum protein fractions were separated by centrifuging milk at 90,000 × g for 2 h at 5°C (16). The casein fraction formed the pellet, while serum protein and the lactose fraction remained in the supernatant. The volumes of the casein fraction and serum-protein-plus-lactose fractions were brought to the level of the original volume of milk by adding water. The casein fraction with 0.9% NaCl was prepared by addition of NaCl to the casein fraction. The 4.8% lactose sample was prepared by dissolving lactose in water.

RNA isolation and DNA microarray. An *M. avium* subsp. *paratuberculosis* whole genome microarray, containing 70-mer oligonucleotides representing 98% of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* coding sequences identified in the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 genome, was provided by the National Animal Disease Center, Ames, Iowa. For RNA isolation, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria were kept in contact with confluent monolayers of MAC-T cells grown in T75 flasks for 2 h. Extracellular bacteria were removed by washing, followed by amikacin treatment for 2 h. Intracellular bacteria were recovered after 24 h by lysing MAC-T cells with sterile water. Cell debris and nuclear fractions were removed by low-speed centrifugation at 500 rpm for 5 min at 4°C (20). The bacterial pellet was recovered from the supernatant after centrifugation at 3,000 × g for 10 min at 4°C. Pelleted bacteria were stored at -70°C. The RNA extraction procedure used a combination of guanidine-thiocyanate-based buffer (TRIzol; Invitrogen, Carlsbad, CA) and rapid mechanical cell lysis, as described previously (18). Briefly, 1 ml TRIzol reagent was added to the bacterial pellet and gently mixed. The mixture was added to a (2-ml) screw-cap tube containing 0.4 ml glass beads (0.1 mm). Cell disruption was carried out in a bead beater using three beatings for 30 s each. The TRIzol solution was transferred to a heavy phase lock gel (Eppendorf, Hamburg, Germany) after centrifugation at 3,000 rpm for 90 s at 4°C. Subsequently, 300 μ l of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added to the heavy phase lock gel tube. This was followed by rapid mixing for 15 s. Mixing was continued periodically for 2 additional min, followed by centrifugation at 6,000 rpm for 10 min at 4°C. The aqueous layers were precipitated with cold isopropanol. Isopropanol was then carefully removed without disturbing the RNA pellet, and the final washing was done in 80% ethanol. The RNA was stored at -70°C until further use. RNA quality was determined spectrophotometrically (optical density at 260/280 nm). A ratio of ≥ 2.0 was considered significant. RNA was treated with DNase as per the manufacturer's instructions (QIAGEN, Valencia, CA). The RNA-DNA hybridization and microarray analysis were carried out at the Central Service Laboratory, Oregon State University, Corvallis, Oregon. RNA prepared from *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria incubated in 7H9 broth served as a control, whereas *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria incubated in MAC-T cells served as the treatment. For the DNA microarray, the Array 900 MDX (Gemisphere, Hatfield, PA) labeling and detection system was used as per instructions.

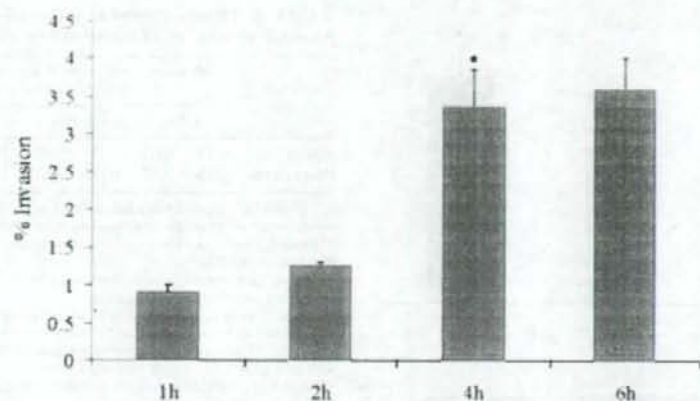


FIG. 1. Invasion of bovine epithelial cells (MDBK) by *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. The percentage of invasion was defined as the fraction of inoculated bacteria that became internalized after the incubation period. Values represent the means of three experiments \pm standard errors of the means (SEM). *, $P < 0.05$ compared with the percent invasion at 2 h.

Microarray analysis was carried out as follows. Briefly, RNA samples were reverse transcribed using deoxyribose triphosphates and a random primer. The cDNA was labeled at the 3' end with a terminal deoxynucleotidyltransferase tailing reaction followed by ligation to the 3DNA capture sequence. The tagged cDNA was purified using a PCR purification kit (QIAGEN, Valencia, CA), and then successive hybridization of cDNA and 3DNA was carried out using the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* genome microarray.

RT-PCR. cDNA amplification for genes that have been shown to be upregulated by DNA array was carried out as previously described (22). We used specific primers for five selected genes: MAP0482, MAP0706, MAP2450c, MAP2751, and MAP3305c. PCR amplification was carried out at 95°C for 3 min (1 cycle); 95°C for 3 s, 62°C for 30 s, and 72°C for 2 min in a linear range (35 cycles); and then 72°C for 10 min (1 cycle). Equivalent amounts of cDNA were used for the reverse transcriptase (RT)-PCR. The products obtained by PCR amplification were quantified using the Kodak EDEAS 290 system and the Kodak ID image analysis software (Eastman Kodak Company, Rochester, NY). The 16S cDNA was used as a control.

Transmission electron microscopy. Approximately 5×10^4 MAC-T cells were grown in T25 tissue culture flasks (Corning Costar, New York) until confluence was established and then inoculated with approximately 10^7 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria. Incubation was carried out for 24 h under 5% CO₂ at 37°C. After the incubation period, MAC-T cells were treated with trypsin (0.5%) for 10 min and subsequently fixed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) containing 3% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. After fixing, cells were pelleted and surrounded by 1% agarose, cut into quarters, and processed as per the following schedule: 0.1 M cacodylate buffer (2 \times), 30 min at room temperature (RT); 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, 1 h at RT; 0.1 M cacodylate buffer (2 \times), 30 min at RT; acetone (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 95%, and 100%), all 10 min at RT; 3:1 acetone:resin, 30 min at RT; 1:1 acetone:resin, 30 min at RT; 1:3 acetone:resin, 30 min at RT; 100% resin, 1 h at 30°C; and 100% resin, 20 h at RT. Fresh resin was placed in polymerization capsules for 24 h at 60°C. The blocks were sectioned on an MT-5000 ultramicrotome (Sorvall, Newton, CO) using a diamond knife, and sections were placed on 300-mesh copper grids. Grids were stained with saturated uranyl acetate and lead citrate and viewed using a Zeiss 10A transmission electron microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

Statistical analysis. Each experiment was repeated at least three times, and significant differences were determined using Student's *t* test (unpaired) and analysis of variance. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

***M. avium* subsp. *paratuberculosis* invasion and survival in MDBK cells.** Invasion assays were carried out to examine the ability of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells using MDBK cells as a model of intestinal

mucosa. The results shown in Fig. 1 indicate that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* can invade MDBK cells. The efficiencies of invasion at 1-h and 2-h time points were comparable; however, a significant increase ($P < 0.05$) in invasion was observed after 6 h of contact time.

The ability of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* to survive inside MDBK cells was evaluated by incubating intracellular bacteria for 24 h or 96 h after invasion. The number of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria increased at 96 h of infection compared with the inoculum taken at 2 h (Table 1), suggesting that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* is able to survive inside MDBK cells.

Mammary gland as a reservoir for *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. The results of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* invasion of the MAC-T cell line are shown in Fig. 2A. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* entered MAC-T cells, although the efficiency of invasion did not change during the first 2 h of incubation. However, invasion was greater at 4 h ($P < 0.05$) than at 2 h. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* could be observed within vacuoles by using transmission electron microscopy (Fig. 2B). The survival experiments whose results are shown in Table 2 indicate that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* is able to persist over time within MAC-T cells.

In the mammary gland, the apical surface of epithelial cells faces the alveolar lumen, whereas the basolateral side faces the

TABLE 1. Intracellular survival of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine epithelial cells (MDBK)

Time (h) ^a	Mean no. of intracellular bacteria \pm SEM (CFU/ml) ^b
2	$2.36 \times 10^3 \pm 0.44 \times 10^3$
24	$2.81 \times 10^3 \pm 0.39 \times 10^3$
96	$3.26 \times 10^3 \pm 0.43 \times 10^3$

^a Values represent means of three experiments \pm SEM. A *P* value of >0.05 resulted for the comparison between the values for 24 h and 96 h and the value for 2 h.

^b MDBK cells were exposed to *M. avium* subsp. *paratuberculosis* for 2 h. Extracellular bacteria were removed in all experiments after 2 h. Internalized bacteria were allowed to grow for 24 h or 96 h.