

Serratia marcescens に関する実験的化学療法 第3報

抗 菌 像

中沢昭三・西野武志・山岸純一

京都薬科大学微生物学教室

(昭和51年7月19日受付)

緒 言

近年 *Serratia* による感染症が臨床的に問題となつてきており¹⁻⁴⁾, これらの治療にアミノ配糖体抗生物質などが使用されている。これらアミノ配糖体抗生物質の作用機作については生化学的から 30S リボソームと結合して蛋白合成を阻害することが知られている⁵⁻⁹⁾。さらに DAVIS らは streptomycin の *Escherichia coli* の細胞質膜障害について報告¹⁰⁻¹³⁾ しており, その中で膜に damage を与える結果, 早期に potassium の efflux や nucleotide の excretion が見られると述べている。私どもはすでに 2, 3 のアミノ配糖体抗生物質の *E. coli* や *Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌像を報告^{14, 15)} してきたが, その中で *E. coli* では cell wall に bleb 形成が見られ, *P. aeruginosa* では mucopeptide より外側の outer layer に切断像を認めた。いっぽう, 九大の小池¹⁶⁾ らはアミノ配糖体抗生物質を *E. coli* や *P. aeruginosa* に作用させた時に多くの bleb が細胞壁表層にできると報告している。このように菌種により異なった抗菌像が観察されたので, 今回さらに *Serratia* を使用し, これらアミノ配糖体抗生物質を作用させた場合に細胞表層にどのような変化が見られるかを明らかにする目的で位相差顕微鏡, 走査電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて形態学的面から検討を行なった。

実験材料および実験方法

1. 使用菌株および使用薬剤

臨床分離セラチア菌 *Serratia marcescens* T-55 (筑波大 清水喜八郎助教授分与株) を用い薬剤としては Gentamicin (GM, Shionogi Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka), Dibekacin (DKB, Meiji Seika Co., Ltd., Tokyo) を用いて行なった。

2. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上で薬剤を含ませたフィルム寒天を作製し, いっぽう約4時間振とう培養を行なった対数期途上の菌液をカバーガラスに塗抹し, 寒天にかぶせ, パラフィンで封入した。これを 37°C 恒温装置付の位相差顕微鏡 (Nikon, Tokyo) により観察した。

3. 電子顕微鏡の実験法

Tryptosoya broth (Nissui Seiyaku, Tokyo) で前培養をおこない, これを 2% の割合で Heart infusion broth (Nissui Seiyaku, Tokyo) に接種した。培養約3時間後の対数期途上に薬剤を作用させ, 1, 2, 4 時間後に生菌数を測定すると同時に菌体を集菌し, 電子顕微鏡の試料とした。すなわち KELLENBERGER¹⁷⁾ らの方法に従って 1% OsO₄ で固定後, アルコール系列で脱水をおこなった。走査電子顕微鏡試料作製の場合はその後, 酢酸イソアミールに置換し, 臨界点乾燥法^{18, 19)} により乾燥を行なった。そして, カーボン, 金にて蒸着し走査電子顕微鏡 JSM-35 (JEOL, Tokyo) で菌体の表面構造を観察した。いっぽう, 超薄切片による電子顕微鏡試料作製の場合, 脱水後 LUFT の方法²⁰⁾ により Epoxy 樹脂に包埋し, LKB ultramicrotome 4801 A (Sweden) を用いて, 切片を作製した。これを酢酸ウラニール, クエン酸鉛で二重染色²¹⁾ をおこなった後, 電子顕微鏡 Akashi S-500 (Tokyo) を用いて観察した。

実験結果

1. 位相差顕微鏡による観察

Fig. 1 a, b は正常な *S. marcescens* T-55 の分裂増殖像で, a は培養直後, b は培養2時間30分後の像であるが, 時間の経過と共に増殖している様子を観察することができた。なお, この実験条件下では *S. marcescens* の generation time は約19分位であり, *E. coli* や *P. aeruginosa* よりも早いことが判った。

GM の 0.09, 0.19 μg/ml, DKB の 1.56, 3.12 μg/ml 作用では control とほとんど同様に増殖した。GM の 0.39 μg/ml, DKB の 6.25 μg/ml 作用ではやや薬剤の影響を受け, 分裂速度は control と比べて遅くなるが, 増殖していく様子を観察することができた。そして GM の 0.78 μg/ml, DKB の 12.5 μg/ml を作用させたところ増殖は停止したが, 著明な形態変化は認められなかった。Fig. 1 c, d は GM の 1.56 μg/ml 作用させた抗菌像で, c は作用直後 d は作用4時間後で菌体内部に空胞様構造 (矢印) がみられる。また Fig. 1 e, f は GM の 15.6 μg/ml を作用させた像で, f は作用4時間後であるが顆粒様構造 (矢印) が認められた。Fig. 1 g, h

Fig. 2 Effect of gentamicin on the viability of *Serratia marcescens* T-55.

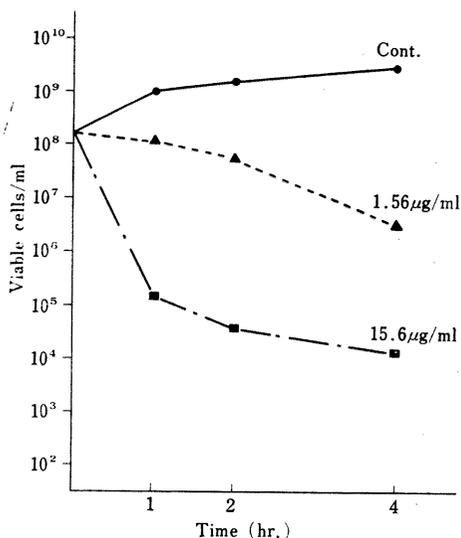
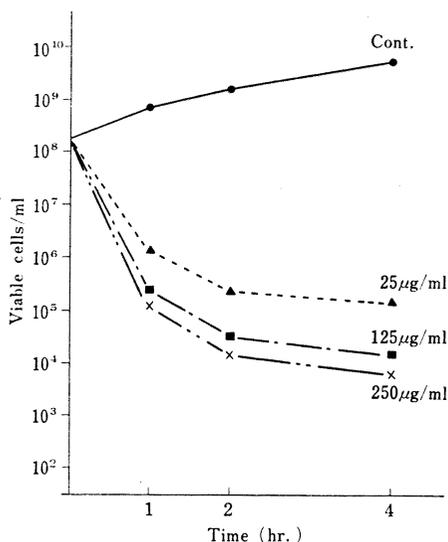


Fig. 3 Effect of dibekacin on the viability of *Serratia marcescens* T-55.



は DKB 25 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた抗菌像で, GM 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 作用の場合と同様, 菌体内部に空胞様構造が認められた。DKB の 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 作用についても検討をおこなったが, 空胞および顆粒様構造を観察することができた。

2. 電子顕微鏡による観察

薬剤作用 1, 2, 4 時間後に, 電顕の試料作製をおこなったが, 試料作製時の菌数の変化は Fig. 2, 3 に示すとおりである。すなわち, Fig. 2 は GM の *S. marcescens* T-55 に対する作用をみたもので, 1.56 $\mu\text{g/ml}$

作用では 2 時間目まで静菌的な作用が見られ, 15.6 $\mu\text{g/ml}$ では著しい殺菌作用が認められた。

また Fig. 3 は DKB の作用をみたもので, 25, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 作用のいずれの濃度においても著明な殺菌作用が見られた。

a) 走査電子顕微鏡による観察

Fig. 4 は正常な *S. marcescens* T-55 の走査電顕像で, 表面構造は smooth な形状を示しており, ちょうど分裂時にある像を立体的に捉えることができた。

Fig. 5 は GM の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ を 1 時間作用させた時の抗菌像で, 細胞表面の凹凸が目立つ菌も見られる。

GM の 15.6 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた時の抗菌像は Fig. 6, 7 に示すとおりである。すなわち, Fig. 6 は作用 1 時間後で, Fig. 7 は 4 時間後の像であるが, 作用時間の経過と共に細胞内部に球状に陥没する像 (矢印) や細胞表面の凹凸が目立つ菌を観察することができた。

また Fig. 8 は DKB の 25 $\mu\text{g/ml}$ を 4 時間作用させた時の抗菌像で GM の場合と同様, 細胞内部に球状に陥没する像を捉えることができた。

DKB の 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 作用についても検討をおこなったが, ほぼ同様な抗菌像が認められた。

b) 透過型電子顕微鏡による観察

Fig. 9 は正常な *S. marcescens* T-55 の超薄切片像で細胞壁 (CW), 細胞質膜 (CM), リボゾーム (R), 核 (N) などを明瞭に観察することができ, さらに細胞壁の外側に荚膜様構造が存在することが判った。

Fig. 10, 11, 12 は GM の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ を 1 時間作用させた時の抗菌像である。すなわち, Fig. 10 においては outer layer に bleb 様構造が認められるが, このような構造はごく少数の細胞にしか認められなかった。

Fig. 11 においては plasmolysis や細胞質内部に density の高い構造を観察することができるが, これはおそらく位相差顕微鏡で見られた顆粒状構造に相当するものと思われる。

また Fig. 12 においては細胞質内部に空胞様構造が認められた。

Fig. 13 は GM の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ を 2 時間作用させた時の像で細胞質内部に空胞様構造や顆粒状構造を観察することができる。

S. marcescens T-55 に DKB を作用させた時の抗菌像は Fig. 14, 15, 16, 17, 18 に示すとおりである。すなわち Fig. 14 は DKB の 25 $\mu\text{g/ml}$ 作用 1 時間後の像で細胞質内部に膜様構造物 (矢印) が認められる。

Fig. 15, 16 は DKB の 25 $\mu\text{g/ml}$ 作用 2 時間後に観察された像で, Fig. 15 では細胞質内部に, unit membrane で囲まれた空胞様構造 (矢印) を認める。

Fig. 16 では著しい plasmolysis を観察することができる。

Fig. 17 は DKB 125 $\mu\text{g/ml}$ 作用 1 時間後の抗菌像で plasmolysis および outer layer に, bleb 様構造が認められる。

さらに抗菌作用が進むと Fig. 18 に示すとおり菌体内内容物が溶出し, 菌は死滅するものと考えられるが, 細胞壁はほとんど影響を受けず, 細胞質膜に damage が認められる。

考 察

今回, 私共が使用した *Serratia marcescens* T-55 は超薄切片を用いた透過型電子顕微鏡による観察により細胞壁の外側に莢膜様構造を有していることが判った。BERGY の分類を見ると *Serratia* のある種の菌株では莢膜を有すると述べられており, この菌株はそれに属するものと思われる。私共はこの菌株を用いてマウスに対する病原性の検討もおこなったが, 強い毒性を有しており²⁾, 莢膜が病原性の 1 因であると思われる。

私共¹⁴⁾はすでに Gentamicin や Dibekacin を *P. aeruginosa* に作用させた時に mucopeptide より外側の outer layer に切断像を認め, 九大の小池らは¹⁶⁾ *E. coli* や *P. aeruginosa* において bleb 形成を認めている。今回, 私共がおこなった *Serratia marcescens* T-55 を用いた実験では Gentamicin や Dibekacin を作用させた場合, ごく一部の細胞に bleb 形成が認められた。これを *E. coli* の場合と比較してみると, *E. coli* では観察できるほとんどすべての細胞が多くの bleb を有しており, 明らかに *Serratia marcescens* の場合と異なっていた。

また *P. aeruginosa* で認めた outer layer の切断像は *S. marcescens* T-55 では見られなかった。このようにアミノ配糖体抗生物質の作用については菌種により異なった作用を用いているように思われるが, 今回使用した *Serratia* は, 莢膜様構造を有しており, 莢膜をもたない *Serratia* に対する抗菌像にも興味もたれる。DAVIS¹⁰⁻¹³⁾らはアミノ配糖体抗生物質の膜に対する作用を報告しており, 今回, 私共が *S. marcescens* T-55 で認めた著明な plasmolysis はこれを裏付けているように思われる。今後さらに菌種, 菌株を変えてこれらアミノ配糖体抗生物質の形態学的変化および生化学的な裏付けをおこないたいと考えている。

要 約

Gentamicin, Dibekacin のようなアミノ配糖体抗生物質を *Serratia marcescens* T-55 に作用させた場合の抗菌像について位相差顕微鏡, 走査型および透過型電子顕微鏡を用いて形態学的面から検討をおこなった。

1. 位相差顕微鏡による観察では, Gentamicin (GM) の 1.56, 15.6 $\mu\text{g/ml}$, Dibekacin (DKB) の 25, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 作用で増殖は完全に停止し 1 時間後から菌体内部に穴のあいたような構造を観察することができた。

2. 走査電顕による観察では control は smooth な形態を示し, GM の 0.39 $\mu\text{g/ml}$, DKB の 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用ではほとんど変化は認められなかった。GM の 1.56, 15.6 $\mu\text{g/ml}$, DKB の 25, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 作用において細胞内部に球状に陥没するような構造や, 細胞表層の凹凸が目立つ菌が認められた。

3. 透過型電子顕微鏡による観察では control において, cell wall の外側に莢膜様構造が存在することが判った。GM の 1.56, 15.6 $\mu\text{g/ml}$, DKB の 25, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 作用では, 1 時間後において著しい plasmolysis, 菌体内部の希薄化そして unit membrane で囲まれた空胞様構造も観察できた。また一部の細胞では cell wall の outer layer に bleb が認められた。

文 献

- 1) DAVIS, J. T. ; E. FOLTZ & W. S. BIAKEMORE : *Serratia marcescens*. A pathogen of increasing clinical importance. J. A. M. A. 214 : 2190~2192, 1970
- 2) GLAYTON, E. & A. V. GRAEVEENITZ : Non-pigmented *Serratia marcescens*. J. A. M. A. 197 : 1059~1064, 1966
- 3) BODEY, G. P. ; V. RODRIGUEZ & J. P. SMITH : *Serratia* sp. infections in cancer patients. Cancer 25 : 199~205, 1970
- 4) BLACK, W. A. & R. HODGSON : Search for *Serratia*. J. Clin. Path. 24 : 444~448, 1971
- 5) NOMURA, M. : Bacterial ribosome. Bacterial. Rev. 34 : 228~277, 1970
- 6) TRAUB, P. ; K. HOSOKAWA & M. NOMURA : Streptomycin sensitivity and the structural components of the 30 S ribosomes of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 19 : 211~214, 1966
- 7) STAHELIN, T. & M. MESELSON : Determination of streptomycin sensitivity by a subunit of the 30 S ribosome of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 19 : 207~210, 1966
- 8) KAJI, H. & Y. TANAKA : Binding of dihydrostreptomycin to ribosomal subunits. J. Mol. Biol. 32 : 221~230, 1968
- 9) OZAKI, M. ; S. MIZUSHIMA & M. NOMURA : Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *E. coli*. Nature (London) 222 : 333~339, 1969
- 10) DUBIN, D. T. & B. D. DAVIS : The effect of streptomycin on potassium flux in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 52 : 400~402, 1961

Fig. 1 Phase contrast micrographs of *Serratia marcescens* T-55.

a, b; Normal cells of *S. marcescens*. Immediately (a) and 2.5 hours (b) after incubation. c to f; *S. marcescens* exposed to gentamicin. Immediately (c) and 4 hours (d) after the addition of gentamicin ($1.56 \mu\text{g/ml}$). Immediately (e) and 4 hours (f) after the addition of gentamicin ($15.6 \mu\text{g/ml}$). g, h; *S. marcescens* exposed to dibekacin. Immediately (g) and 4 hours (h) after the addition of dibekacin ($25 \mu\text{g/ml}$).

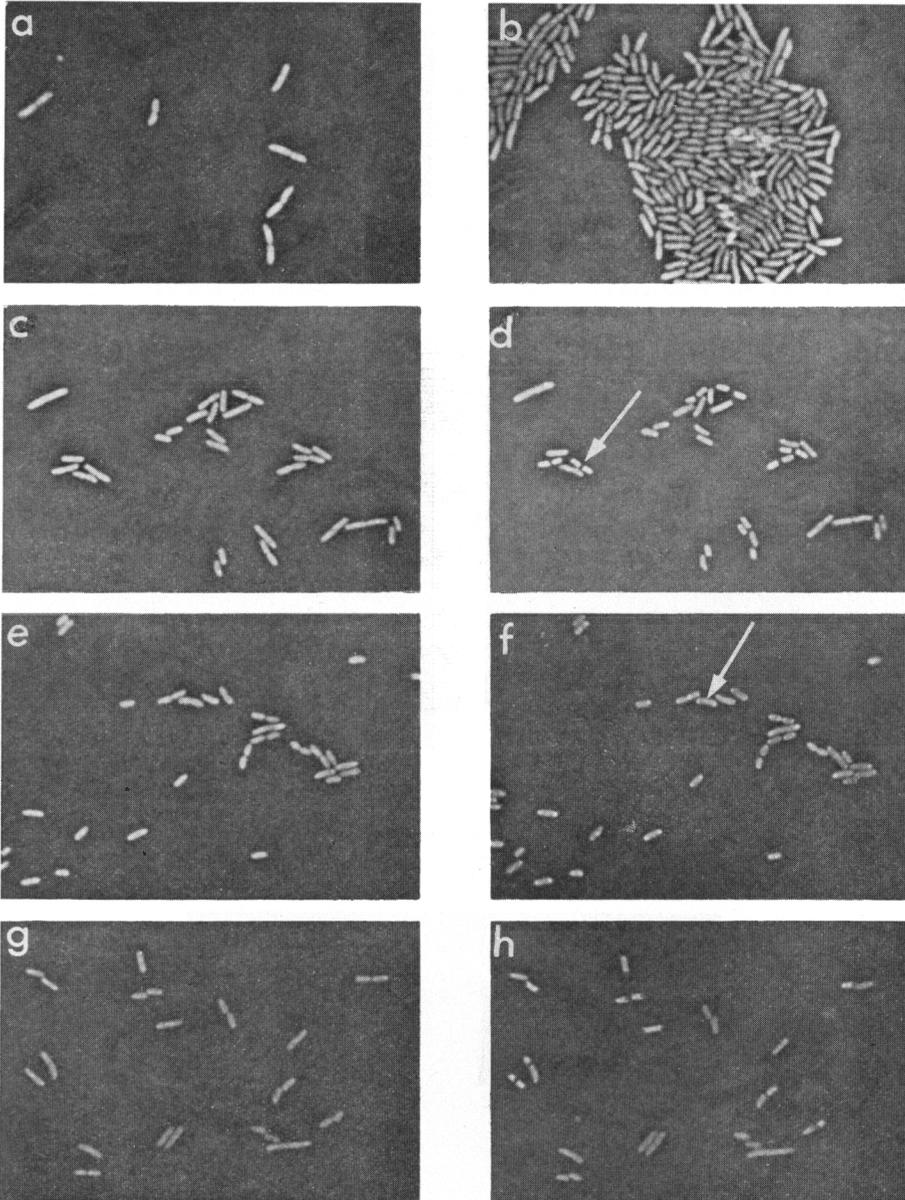


Fig. 4 Scanning electron micrograph of normal *Serratia marcescens* T-55 cells. $\times 20,000$

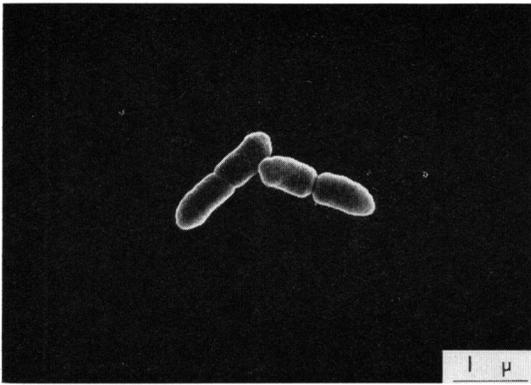


Fig. 5 Scanning electron micrograph of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin for 1 hour. $\times 20,000$

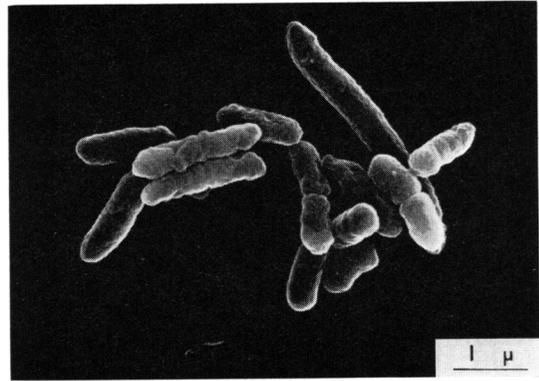


Fig. 6 Scanning electron micrograph of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 15.6 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin for 1 hour. $\times 15,600$

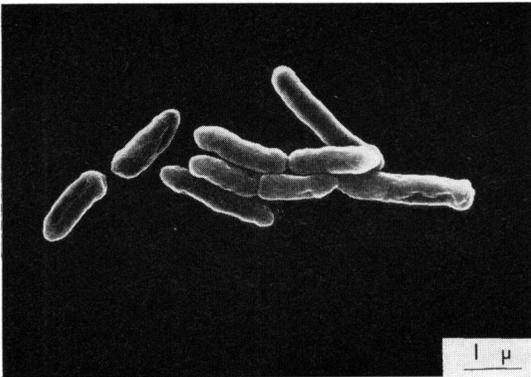


Fig. 7 Scanning electron micrograph of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 15.6 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin for 4 hours. $\times 20,000$

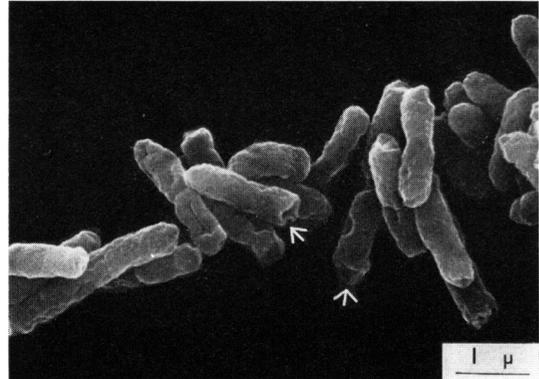


Fig. 8 Scanning electron micrograph of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 25 $\mu\text{g/ml}$ of dibekacin for 4 hours. $\times 20,000$

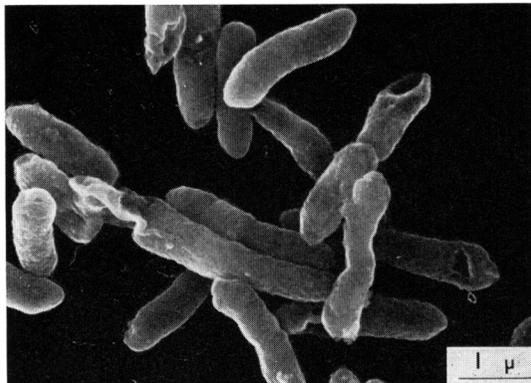


Fig. 9 Electron micrograph of ultrathin section of normal *Serratia marcescens* T-55 cell. The capsule-like structures on the cell wall are observed. $\times 80,000$

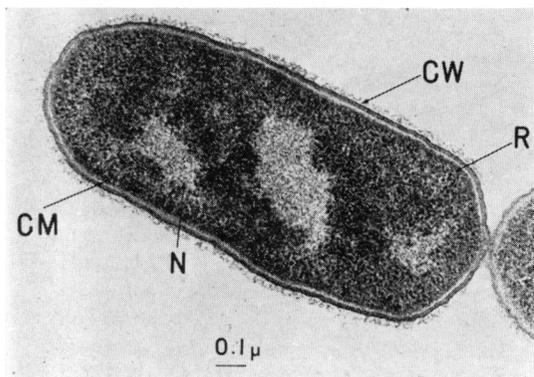


Fig. 10 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to $1.56 \mu\text{g/ml}$ of gentamicin for 1 hour. $\times 80,000$

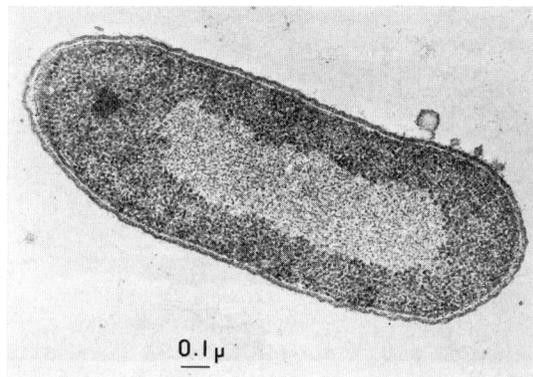


Fig. 11 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to $1.56 \mu\text{g/ml}$ of gentamicin for 1 hour. $\times 80,000$

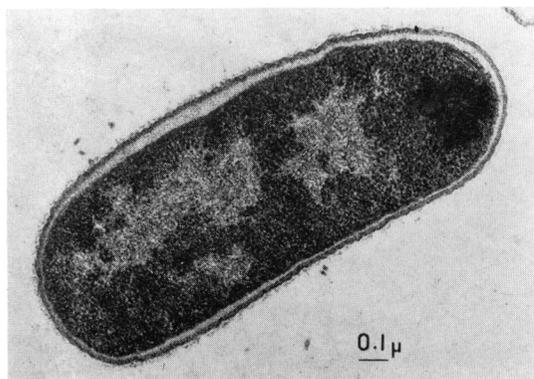


Fig. 12 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to $1.56 \mu\text{g/ml}$ of gentamicin for 1 hour. $\times 60,000$

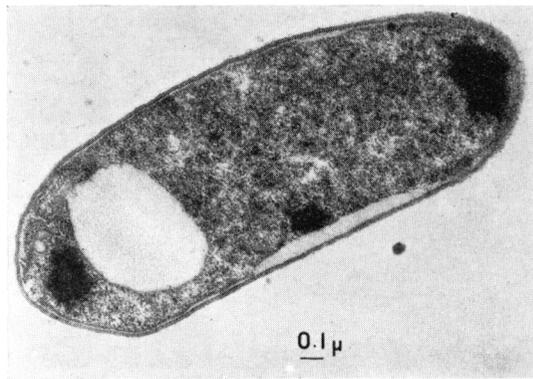


Fig. 13 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to $1.56 \mu\text{g/ml}$ of gentamicin for 2 hours. $\times 70,000$

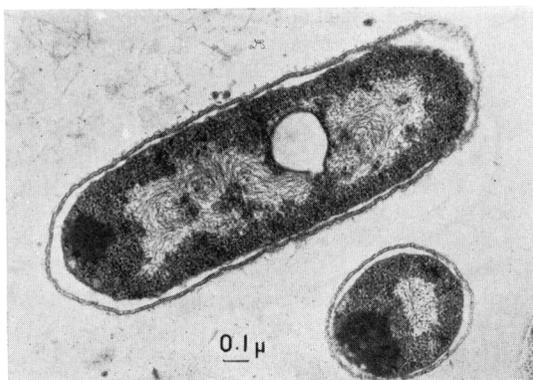


Fig. 14 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of dibekacin for 1 hour. $\times 90,000$

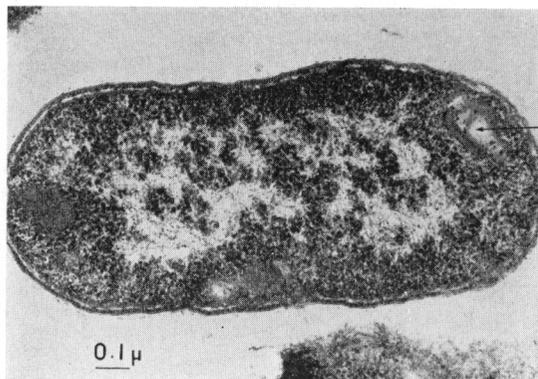


Fig. 15 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of dibekacin for 2 hours. $\times 46,000$

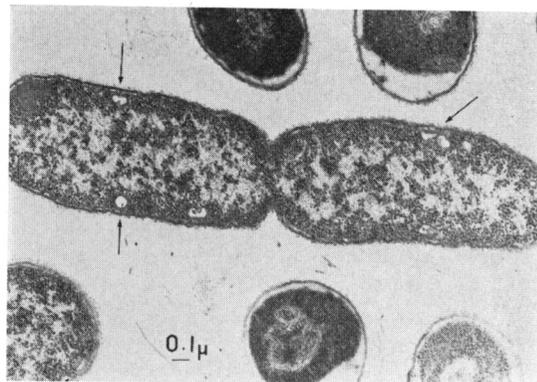


Fig. 16 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of dibekacin for 2 hours. $\times 60,000$

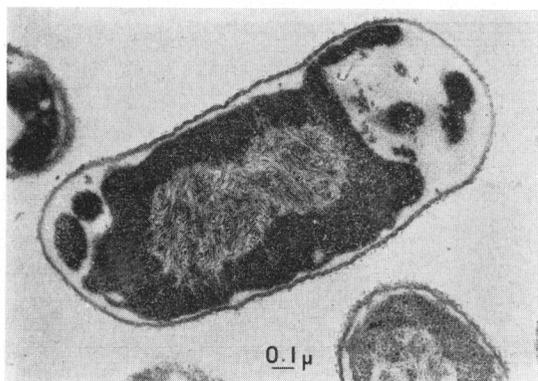


Fig. 17 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of dibekacin for 1 hour. $\times 70,000$

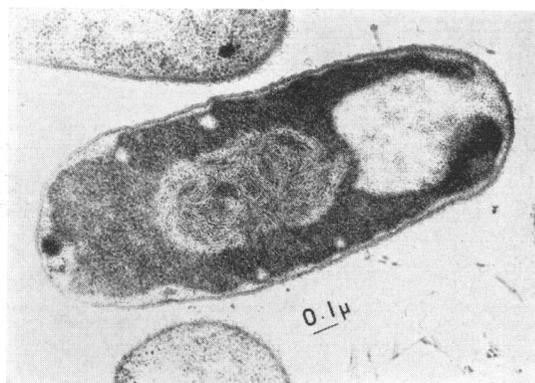


Fig. 18 Thin section of *Serratia marcescens* T-55 exposed to 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of dibekacin for 1 hour. $\times 100,000$



- 11) ROTH, H.; H. AMOS & B. D. DAVIS : Purine nucleotide excretion by *Escherichia coli* in the presence of streptomycin. *Biochim. Biophys. Acta* 37 : 398~405, 1960
- 12) ROSANO, C. L. ; R. A. PEABODY & C. HURWITZ : Studies on the mechanism of action of streptomycin. Effect of streptomycin on the excretion of nucleotides by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 37 : 380~382, 1960
- 13) ANAND, N. & B. D. DAVIS : Effect of streptomycin on *Escherichia coli*. Damage by streptomycin to the cell membrane of *Escherichia coli*. *Nature* (London) 185 : 22~23, 1960
- 14) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA : Morphological alteration of *Pseudomonas aeruginosa* by aminoglycoside antibiotics. *J. Electron Microscopy* 24 : 73~86, 1975
- 15) 西野武志, 他 : D. 生化学. 1. アミノグリコシドによる緑膿菌表面の変化. 第4回細菌の薬剤耐性因子に関するシンポジウム (群馬), 1975
- 16) IIDA, K. & M. KOIKE : Cell wall alterations of gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 5 : 95~97, 1974
- 17) KELLENBERGER, E. ; A. RYTER & J. SECHAUD : Electron microscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 : 671~678, 1958
- 18) ANDERSON, T. F. : Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. S. Y. Acad. Sci.* 13 : 130~134, 1951
- 19) HORIDGE, G. A. & S. L. TAMM : Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science* 163 : 817~818, 1969
- 20) LUFT, J. H. : Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409~414, 1961
- 21) REYNOLDS, E. S. : The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17 : 208~212, 1963
- 22) 中沢昭三, 黒田浩之, 中野一行, 佐藤 清, 河野啓三 : *Serratia marcescens* に関する実験的薬療法, 第2報, 抗菌剤の *in vivo* 効果. *Chemotherapy* 25(2) : 364~371, 1977

EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY AGAINST *SERRATIA MARCESCENS*. III

Antibacterial Picture of Aminoglycoside Antibiotics

SHOZO NAKAZAWA, TAKESHI NISHINO and JUNICHI YAMAGISHI

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy, Kyoto

Employing phase contrast microscope, scanning and transmission electron microscopes, antibacterial picture of aminoglycoside antibiotics such as gentamicin (GM) and dibekacin (DKB) for *Serratia marcescens* T-55 was morphologically studied.

By phase contrast microscope, the growth of bacteria was observed at $1/8$ and $1/4 \times \text{MIC}$ of DKB and GM, almost same as the control. At $1/2 \times \text{MIC}$ of DKB and GM, the growth of bacteria was completely inhibited. At 1, 5 and $10 \times \text{MIC}$, a hole-like structure was observed in the cytoplasm of bacterial cell.

By scanning electron microscope, a markedly collapsed structure was observed on the surface layer of bacterial cell in 1, 5 and $10 \times \text{MIC}$ of DKB and GM, and the finding, which could be considered to correspond to the hole-like structure noted by phase contrast microscope, were also observed. Observation with transmission electron microscope revealed the presence of a layer (capsule-like structure) in the outer layer of cell wall in the control. Marked plasmolysis and a thinning of cytoplasm in bacterial cell were noted one hour after the exposure of $1 \times \text{MIC}$ of DKB and GM, and also almost the same phenomenon was found by the exposure of $5 \times \text{MIC}$ of DKB and GM.

In the study of the antibacterial effect of aminoglycoside antibiotics against *E. coli*, a bleb formation was observed, and against *Ps. aeruginosa*, a cutted face was found in the outer layer of cell wall, but in *Serratia* those changes were not noted. Thus, aminoglycoside antibiotics appear to have a differential antibacterial action against each organism.