

緑膿菌に対する T-1220 の抗菌像について

西野武志・山岸純一・渡辺泰雄・中沢昭三
京都薬科大学微生物学教室

T-1220 は富山化学総合研究所で開発された新しい半合成 Penicillin である。本薬剤は、Ampicillin の amino 基に 4-ethyl-2, 3-dioxopiperazinylcarbonyl 基を導入したもので、大腸菌、肺炎桿菌、セラチア菌、緑膿菌などのグラム陰性桿菌に対して Carbenicillin よりもすぐれた抗菌力を有している¹⁾。

Penicillin などの β -lactam 系抗生物質をグラム陰性桿菌に作用させた場合、菌体が伸長化し、spheroplast を形成するという研究はすでに DIENES²⁾, FLEMING et al.³⁾, HAHN and CIAK⁴⁾, LEDERBERG et al.⁵⁾, CHANG and WEINSTEIN⁶⁾ らにより報告されている。しかしこれらの観察は光学顕微鏡および位相差顕微鏡を用いて行なわれたものである。透過型電子顕微鏡による観察については、SUGANUMA⁷⁾, FITZ-JAMES and HANCOCK⁸⁾, BURDASH et al.⁹⁾ らによる報告があり、私どもも^{10)~12)}すでに Cephalexin をブドウ球菌および大腸菌に作用させた時の形態変化について観察を行なっている。

走査電子顕微鏡は1965年以来商品化されてきたが、当初微生物学の領域ではあまり用いられなかった。しかし、近年細菌細胞に抗生物質を作用させた時の形態変化を走査電子顕微鏡により観察を行なった研究がいくつか報告されている^{13)~20)}。そして PERKINS²¹⁾, PRIOR²²⁾ はそれぞれ緑膿菌に Carbenicillin, Ticarcillin を作用させた場合 spheroplast 形成が認められると述べている。

今回私どもは T-1220 を緑膿菌に作用させた時の形態変化を主として走査電子顕微鏡を用いて検討を行なったところ、Carbenicillin とは少し異なった知見が得られたので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株および薬剤

菌株としては臨床分離緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* E-2 を用い、薬剤としては、力価の明らかな T-1220 および Carbenicillin (CBPC) を用いて行なった。なお T-1220 および CBPC の *Ps. aeruginosa* E-2 に対する MIC はそれぞれ 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と 50 $\mu\text{g/ml}$ であった。

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3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、これを寒天にかぶせ、余分の寒天を切りとった後、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(日本光学)により観察した。

3. 走査電子顕微鏡による観察

Tryptosoya Broth (日水) を用いて前培養を行ない、この前培養液を約1%の割合で、Heart Infusion Broth (HIB: 日水) に接種し、37°Cで振とう培養を行なった。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1% glutaraldehyde 溶液にて前固定を行ない、KELLENBERGERらの方法²³⁾に従って、1% OsO₄ で本固定後、アルコール系列で脱水を行なった。これを酢酸イソアミールに置換し、臨界点乾燥法により乾燥を行なった。その後カーボン、金にて蒸着し走査電子顕微鏡 JSM-35 (日本電子) で菌体の表面構造を観察した。

4. Spheroplast 形成に及ぼす影響

Stabilizer として20% sucrose と0.2% MgCl₂ を含んだ HIB を用い、その対数期途上に薬剤を作用させ、一定時間後 stabilizer を含んだ培地 (stabilized) と含まない培地 (shocked) で希釈を行ない、20% sucrose と0.2% MgCl₂ を加えた Heart Infusion Agar (日水) を使用して菌数計算を行なった。

II. 実験結果

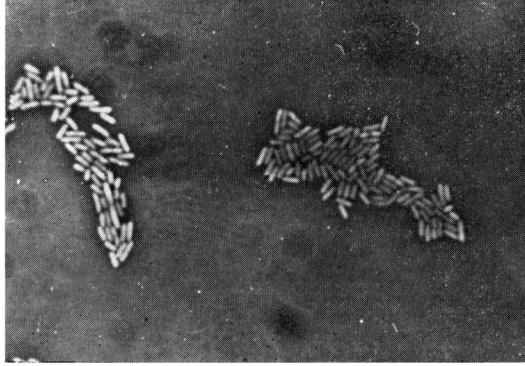
1. 位相差顕微鏡による観察

Fig. 1a は正常な *Ps. aeruginosa* E-2 の分裂している様子を観察したもので、培養4時間後の像である。

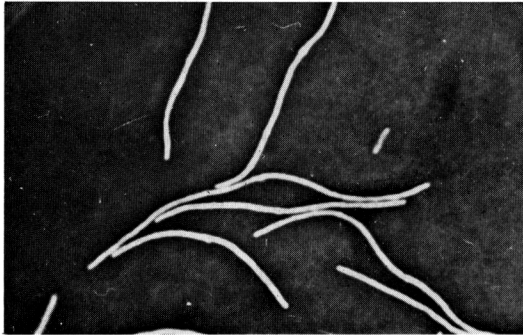
Fig. 1b, c は T-1220 を作用させた時の抗菌像で、b は 50 $\mu\text{g/ml}$, c は 2,500 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた場合であり、いずれも4時間後の像である。2,500 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度を作用させた場合でも菌体は著しく elongation し、filament 化するのみで spheroplast 様構造を観察することはできなかった。

Fig. 1d, e は CBPC を作用させた時の抗菌像で、d は 50 $\mu\text{g/ml}$, e は 500 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた場合でありいずれも4時間後の像である。50 $\mu\text{g/ml}$ 作用では菌体が著しく filament 化している様子を観察することができた。しか

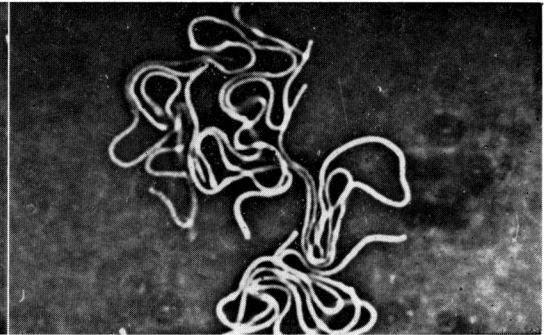
Fig. 1 Phase contrast micrographs of *Ps. aeruginosa* E-2. (a) Untreated *Ps. aeruginosa* E-2 cells observed after 4 hours of incubation. (b) Cells after 4 hours of exposure to T-1220 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (c) Cells after 4 hours of exposure to T-1220 (2,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Filamentous cells are observed. (d) Exposure to CBPC (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 hours showing marked filamentation. (e) Cells after 4 hours of exposure to CBPC (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Spheroplast-like structures are observed.



(a)



(b)



(c)

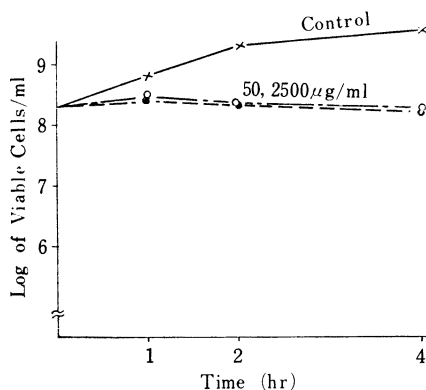


(d)



(e)

Fig. 2 Effect of T-1220 on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2



し 500 µg/ml 作用では T-1220 の場合とは異なり, spheroplast 様構造を数多く認めた。このような抗菌像の差をさらに詳細に観察するために次に走査電子顕微鏡を用いて検討を行なった。

2. 走査電子顕微鏡による観察

Fig. 2, 3 は走査電子顕微鏡試料作製時の生菌数の変化を示したものである。すなわち, 10^8 cells/ml の高菌量に T-1220 を作用させた場合, Fig. 2 に示すごとく 2, 500 µg/ml でも静菌的な作用しか認められなかった。

CBPC を作用させた場合, Fig. 3 に示すごとく 50 µg/ml で静菌作用, 500, 2, 500 µg/ml の濃度において殺菌作用がみられた。このような菌数変化時の形態学的変化を Fig. 4~16 に示した。

Fig. 4 は正常な *Ps. aeruginosa* E-2 の走査電顕像で, 表面構造は smooth な桿状形態を示しており, ちょうど分裂時にある細胞も立体的に捉えることができた。

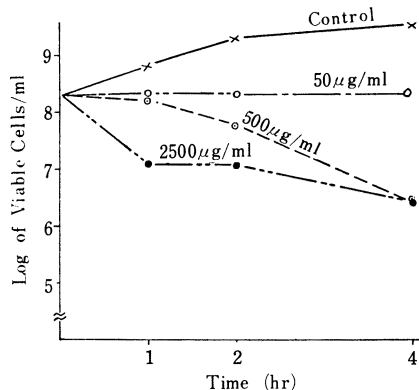
Fig. 5, 6, 7 は T-1220 の 50 µg/ml をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の抗菌像で, 菌体は細胞分裂の形跡もなく elongation し, 作用時間の経過とともに非常に長くなった filament 状の形態を観察することができた。

T-1220 の 2, 500 µg/ml を作用させた時の抗菌像は, Fig. 8, 9, 10 に示すごとくである。すなわち Fig. 8 は作用 1 時間後の像で, 菌体中央部に丸く突出した構造がみられる。

Fig. 9, 10 はそれぞれ作用 2 時間および 4 時間後の像で, 菌体は長い filament 状の形態を示し, 一部の細胞に突起様構造が認められた。しかし CBPC 作用時にみられるような spheroplast 様構造を観察することはできなかった。

Fig. 11, 12, 13 は CBPC の 50 µg/ml をそれぞれ 1,

Fig. 3 Effect of CBPC on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2



2, 4 時間作用させた時の抗菌像で, filament 構造を観察することができた。

Fig. 14, 15, 16 は CBPC の 2, 500 µg/ml をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の抗菌像で, 数多くの spheroplast 様構造や溶菌像を観察することができた。

以上述べたごとく, T-1220 を 10^8 cells/ml の高菌量に作用させた場合, 静菌的な作用しかみられず, spheroplast 様構造を観察することができなかった。そこで次に T-1220 の殺菌作用がみられる時期にどのような形態変化がみられるかについて検討を行なった。Fig. 17 は試料作製時の生菌数の変化を示したもので, 10^6 cells/ml の菌量に, T-1220 を作用させた場合, 25 µg/ml ではほぼ静菌的な作用がみられ, 50, 250, 500 µg/ml で殺菌的な作用が認められた。

Fig. 18 は T-1220, 50 µg/ml 作用 1 時間後の抗菌像で, 菌体内容物が溶出しているような像を捉えることができた。

Fig. 19 は 50 µg/ml 作用 2 時間後の像で, 菌は filament 化し, 作用 1 時間後の場合と同様な抗菌像を認めた。

殺菌作用が現われる 4 時間後においては, Fig. 20 に示すような溶菌像を観察することができた。

250, 500 µg/ml 作用時についても検討を行なったが, 50 µg/ml を作用させた場合と同様な抗菌像であり, CBPC 作用時にみられた典型的な spheroplast 様構造を観察することができなかった。

3. Spheroplast 形成に及ぼす影響

走査電子顕微鏡による形態観察により, T-1220 を作用させた場合, spheroplast 様構造を認めることができなかったため, これを定量化するために, stabilizer を用

Fig. 4 Untreated *Ps. aeruginosa* E-2 cells observed by scanning electron microscope. $\times 8,700$

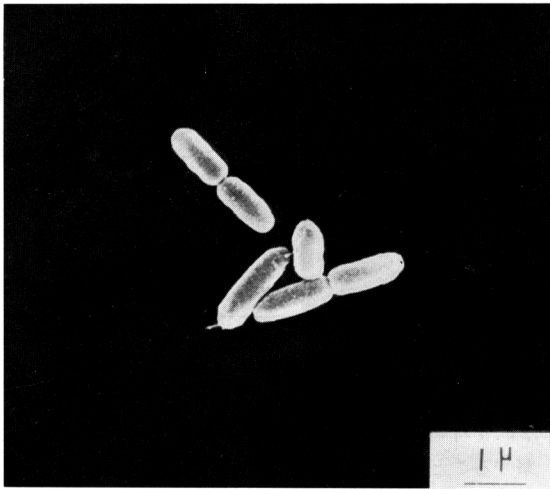


Fig. 5 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to $50\mu\text{g/ml}$ of T-1220 for 1 hour. $\times 5,200$

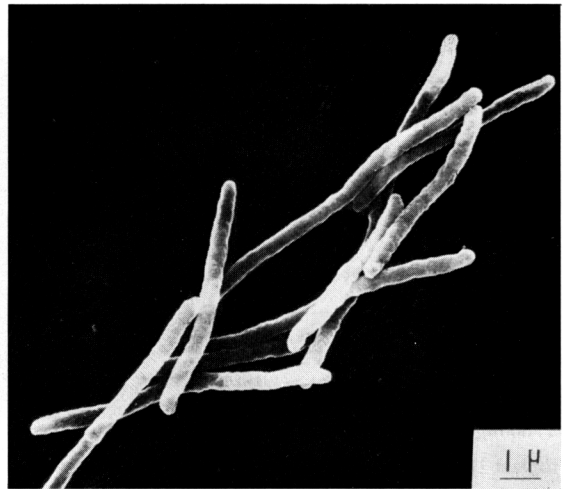


Fig. 6 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to $50\mu\text{g/ml}$ of T-1220 for 2 hours. $\times 5,200$

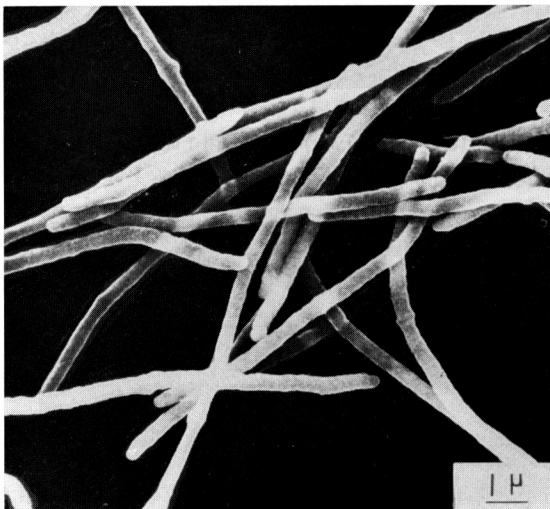


Fig. 7 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to $50\mu\text{g/ml}$ of T-1220 for 4 hours. $\times 5,200$

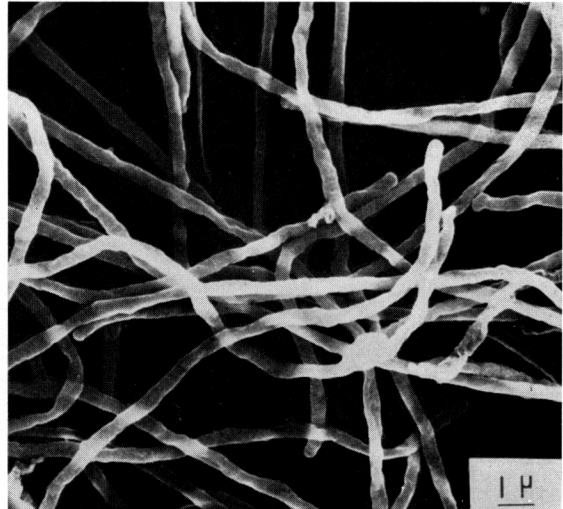


Fig. 8 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of T-1220 for 1 hour. $\times 5,200$

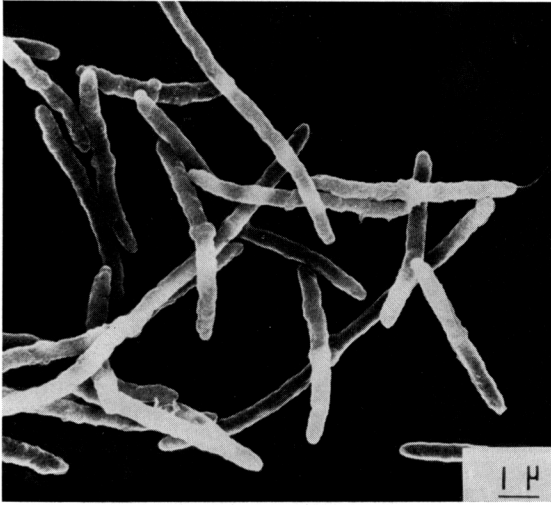


Fig. 9 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of T-1220 for 2 hours. $\times 5,200$

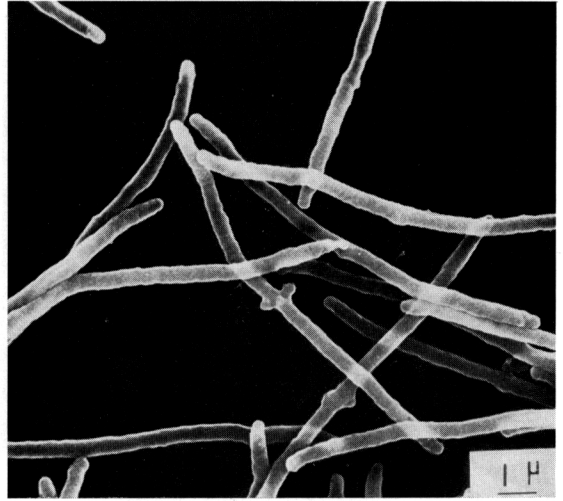


Fig. 10 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of T-1220 for 4 hours. $\times 5,200$

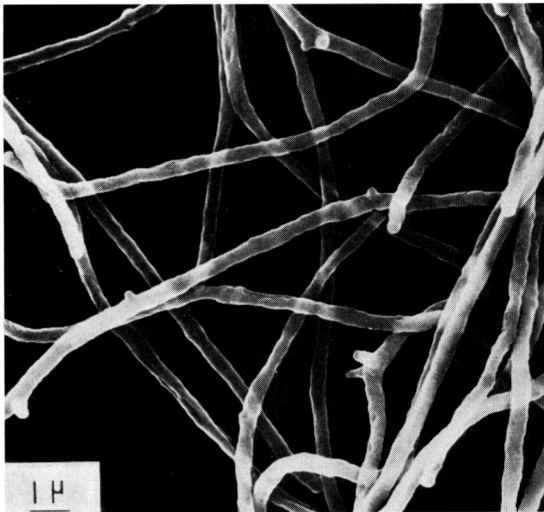


Fig. 11 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 1 hour. $\times 5,200$



Fig. 12 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 2 hours. $\times 5,200$

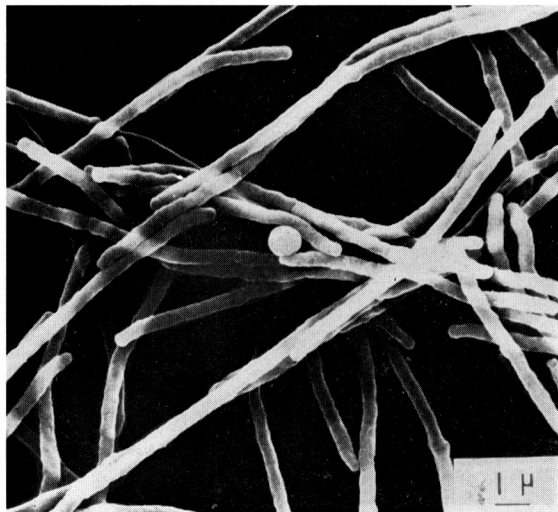


Fig. 13 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 4 hours. $\times 5,300$

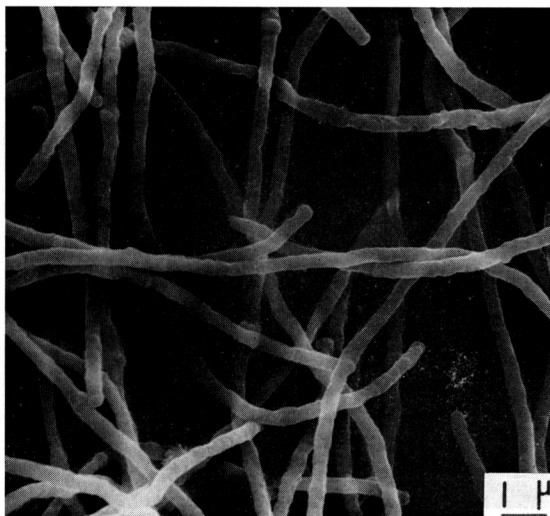


Fig. 14 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 1 hour. $\times 5,200$

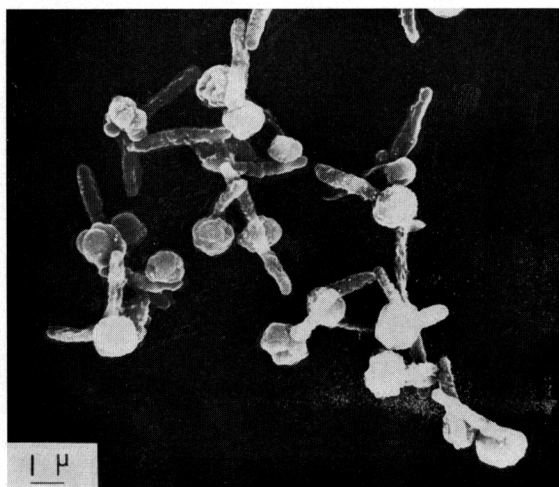


Fig. 15 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 2 hours. $\times 5,200$

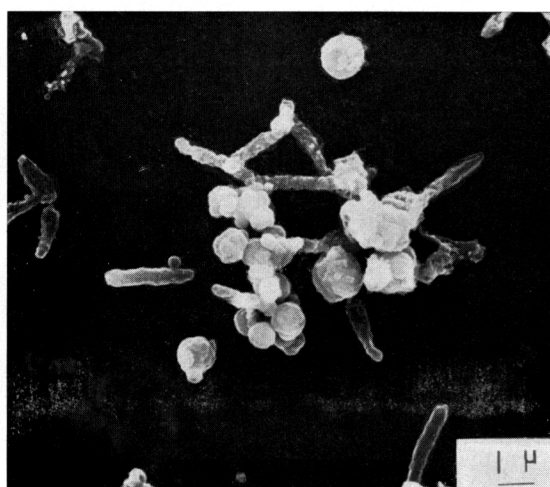


Fig. 16 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 4 hours. $\times 5,200$

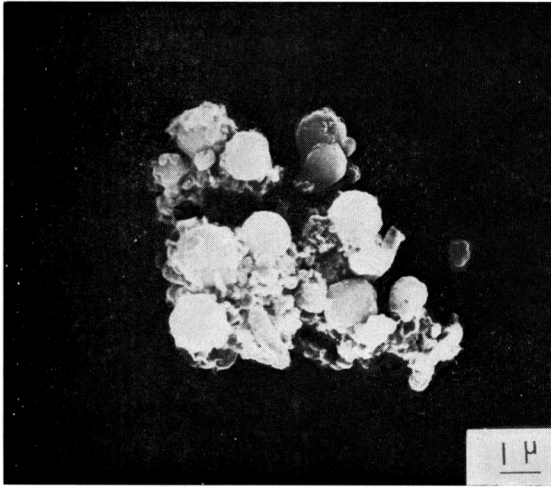


Fig. 18 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of T-1220 for 1 hour. $\times 6,800$

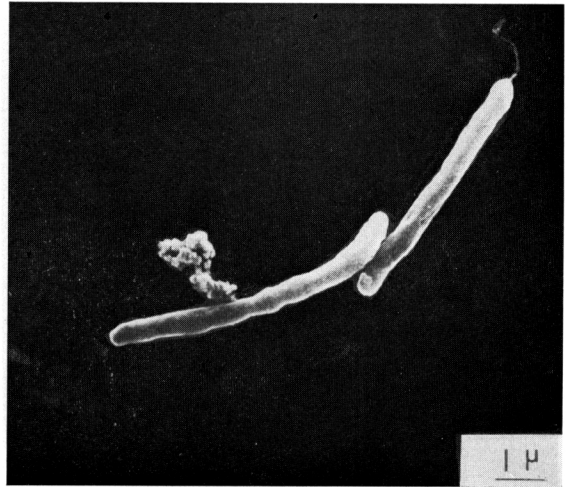
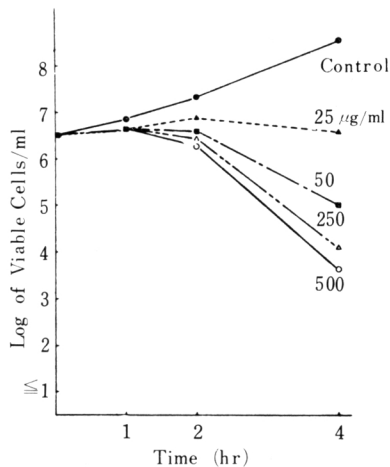


Fig. 17 Effect of T-1220 on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2



いて本薬剤の spheroplast 形成能について検討を行なった。その結果は Table 1 に示すごとく、T-1220 の 500 $\mu\text{g/ml}$ を 3 時間作用させた場合、stabilized と shocked の菌数はそれぞれ 3.8×10^4 , 1.5×10^4 cells/ml であり、CBPC の 500 $\mu\text{g/ml}$ 作用では 2.4×10^5 , 2.5×10^4 cells/ml であった。

従って T-1220 では CBPC に比べ spheroplast が形成されにくいことがわかった。この spheroplast 形成能に及ぼす結果は位相差顕微鏡、走査電子顕微鏡による形態観察の結果とよく一致していた。

III. 考 察

PERKINS ら²¹⁾ は CBPC を *Ps. aeruginosa* に作用させた時の形態変化を走査電子顕微鏡により観察し、spheroplast 様構造が認められると報告している。また PRIOR ら²²⁾ も Ticarcillin を *Ps. aeruginosa* に作用させた時の抗菌像を観察しており、CBPC 作用時と同様の spheroplast 様構造を認めている。今回私どもは新しく富山化学で開発された T-1220 と既知薬剤として CBPC を用い、*Ps. aeruginosa* に対する抗菌像を位相差顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて検討を行なったところ、CBPC 作用では PERKINS, PRIOR らが報告した結果とほぼ同様で、高濃度 (2,500 $\mu\text{g/ml}$) 作用において典型的な spheroplast 様構造を観察することができた。しかし T-1220 を作用させた場合、2,500 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度あるいは殺菌作用が発現する時期においても CBPC 作用時のような spheroplast 様構造を観察することはできなかった。また、stabilizer を用いて行なった spheroplast 形成能の結果からも本薬剤は CBPC に比べ浸透圧に脆い細胞 (spheroplast?) を形成しにくいことがわかった。従って T-1220 を *Ps. aeruginosa* に作用させた場合、その溶菌過程において、spheroplast があまり形成されずに溶菌するものと思われる。以上述べたごとく T-1220 および CBPC を *Ps. aeruginosa* に作用させた場合、その抗菌像に差がみられたので、現在さらに透過型電子顕微鏡を用いて検討を行なっている。その中で殺菌作用が現われる菌量で、T-1220 を作用すると cell wall の outer layer が切断されるとい

Fig. 19 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of T-1220 for 2 hours. $\times 4,700$

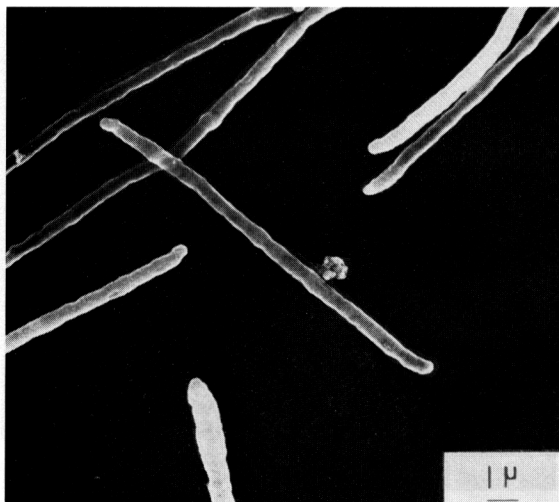


Fig. 20 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of T-1220 for 4 hours. $\times 5,200$

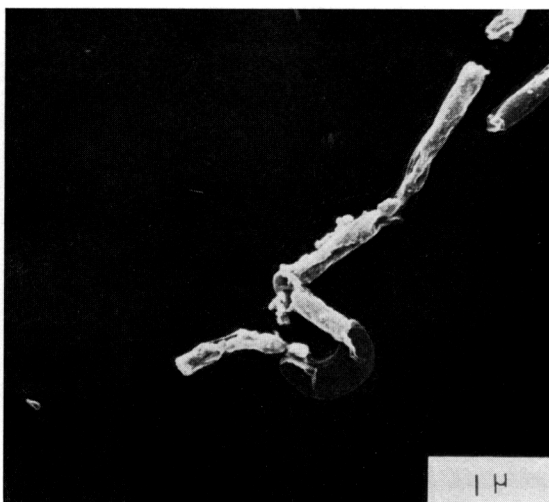


Table 1 Comparison of the viable counts of stabilized and osmotically shocked cultures (*Ps. aeruginosa* E-2)

Exposure	Controls		Treated			
	Stabilized	Shocked	T-1220 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		CBPC (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	
			Stabilized	Shocked	Stabilized	Shocked
0 hr	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6
3 hr	9.0×10^7	9.0×10^7	3.8×10^4	1.5×10^4	2.4×10^5	2.5×10^4

う現象を捉えることができ、次回に報告したいと考えている。本薬剤の作用機作がCBPCなどと本当に異なるのかどうか興味を持たれるところであり、さらに種々の角度より検討を行なっている。

要 約

新しく富山化学で開発された T-1220 の *Pseudomonas aeruginosa* E-2 に対する抗菌像について、比較薬剤として Carbenicillin を用い、位相差顕微鏡、走査電子顕微鏡により検討を行なった。

1) 位相差顕微鏡による観察では、T-1220 を作用させたところ、菌は filament を形成するのみで、Carbenicillin 作用時にみられた spheroplast 様構造を観察することができなかった。

2) 走査電子顕微鏡による観察でも同様で、T-1220 の高濃度を作用させた場合あるいは殺菌作用が認められる時期においても spheroplast 様構造を観察することができなかった。

3) Stabilizer を用いた spheroplast 形成能に及ぼす影

響でも、T-1220 は CBPC に比べ、spheroplast が形成されにくいことがわかった。

文 献

- 1) 西野武志, 大槻雅子, 渡辺泰雄, 戸田正人, 中沢昭三: T-1220に関する細菌学的研究。Chemotherapy 25 (5): 731~746, 1977
- 2) DIENES, L.: The development of *Proteus* cultures in the presence of penicillin. J. Bacteriol. 57: 529~546, 1949
- 3) FLEMING, A.; A. VOUREKA, I. R. H. KRAMER & W. H. HUGHES: The morphology and motility of *Proteus vulgaris* and other organisms cultured in the presence of penicillin. J. Gen. Microbiol. 4: 257~269, 1950
- 4) HAHN, F. E. & J. CIAK: Penicillin induced lysis of *Escherichia coli*. Science 125: 119~120, 1975
- 5) LEDERBERG, J.: Bacterial protoplasts induced by penicillin. Proc. N. A. S. 42: 574~577, 1956
- 6) CHANGE, T. W. & L. WEINSTEIN: Morphological changes in gram-negative bacilli exposed to Cephalothin. J. Bacteriol. 88: 1790~1797, 1964

- 7) SUGANUMA, A.: Some observations on the fine structure of *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 111: 8~16, 1962
- 8) FITZ-JAMES, P. & R. HANCOCK: The initial structural lesion of penicillin action in *Bacillus megaterium*. J. Cell Biol. 26: 657~667, 1965
- 9) BURDASH, N. M.; M. A. EHRLICH, H. G. EHRLICH & J. T. PARISI: Electron microscopy of *Proteus vulgaris* exposed to Cephalothin. J. Bacteriol. 95: 1956~1960, 1968
- 10) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA: Morphological changes in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* exposed to Cephalexin. Jap. J. Microbiol. 16: 83~94, 1972
- 11) NISHINO, T.: An electron microscopic study of antagonism between Cephalexin and Erythromycin in *Staphylococcus aureus*. Jap. J. Microbiol. 19: 53~63, 1975
- 12) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA: Bacteriological study on effects of β -lactam group antibiotics in high concentrations. Antimicrob. Agents & Chemother. 9: 1033~1042, 1976
- 13) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: Antibiotic-induced surface changes in microorganisms demonstrated by scanning electron microscopy. Science 163: 1076~1077, 1969
- 14) KLAINER, A. S. & R. L. PERKINS: Antibiotic-induced alterations in the surface morphology of bacterial cells: A scanning-beam electron microscope study. J. Infect. Dis. 122: 323~328, 1970
- 15) KLAINER, A. S. & R. L. PERKINS: Surface manifestations of antibiotic-induced alterations in protein synthesis in bacterial cells. Antimicrob. Agents & Chemother. 1: 164~170, 1972
- 16) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA: Cephalexin-induced morphological alterations in the surface structure of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: Demonstrated by scanning electron microscopy. Jap. J. Microbiol. 17: 383~392, 1973
- 17) TAKAYAMA, K.; L. WANG & R. S. MERKAL: Scanning electron microscopy of the H37Ra strain of *Mycobacterium tuberculosis* exposed to isoniazid. Antimicrob. Agents & Chemother. 4: 62~65, 1973
- 18) KLAINER, A. S. & R. R. B. RUSSELL: Effect of the inhibition of protein synthesis on the *Escherichia coli* cell envelope. Antimicrob. Agents & Chemother. 6: 216~224, 1974
- 19) ZIMMERMAN, S. B. & E. O. STAPLEY: Relative morphological effects induced by Cefoxitin and other β -lactam antibiotics *in vitro*. Antimicrob. Agents & Chemother. 9: 318~326, 1976
- 20) ELLIS, L. F.; D. K. HERRON, D. A. PRESTON, L. K. SIMMONS & R. A. SCHLEGEL: Evaluation of antibiotic efficacy using electron microscopy: Morphological effects of guanylureido cephalosporin, chlorobenzoylureido cephalosporin, BL-P 1654, and carbenicillin on *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents & Chemother. 9: 334~342, 1976
- 21) PERKINS, R. L. & A. S. KLAINER: Carbenicillin induced alterations in the surface morphology of bacteria: A scanning beam electron microscope study. Antimicrob. Agents & Chemother. 100~104, 1970
- 22) PRIOR, R. B. & J. F. WARNER: Morphological alterations of *Pseudomonas aeruginosa* by Ticarcillin: A scanning electron microscope study. Antimicrob. Agents & Chemother. 6: 853~855, 1974
- 23) 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

MORPHOLOGICAL ALTERATION OF *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA E-2 BY T-1220

TAKESHI NISHINO, JUNICHI YAMAGISHI,
YASUO WATANABE and SHOZO NAKAZAWA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy, Kyoto

The effects of T-1220 and carbenicillin on the morphology of *Pseudomonas aeruginosa* E-2 were examined with the phase contrast microscope and scanning electron microscope.

Exposure to T-1220 resulted in the formation of marked filamentous cells. However, the spheroplast-like structure was not observed by the treatment with T-1220. Exposure to carbenicillin resulted in the formation of spheroplast-like structures. The morphological alterations of *Pseudomonas aeruginosa* E-2 treated with carbenicillin observed in this study are similar to those noted by PERKINS and PRIOR.