

*Haemophilus influenzae* 感染症治療における

## ペニシリン系抗生物質の意義について (第4編)

Ampicillin により誘導された *Haemophilus influenzae* のスフェロプラストからの再増殖について

生方 公子・高橋 洋子・紺野 昌俊

帝京大学医学部小児科学教室

(昭和53年6月2日受付)

## 緒言

*Haemophilus influenzae* (以下 *H. influenzae* と略) 感染症には、抗菌力および副作用の点から、専ら Ampicillin (ABPC) が使用されてきている。しかし本菌の場合、ABPC を始めとするペニシリン系抗菌薬に対する感受性測定に際し、ABPC 耐性菌でなくても、 $10^8$ /ml 程度の菌液の1白金耳を接種すると、かなり高濃度の薬剤を含有する寒天培地の上にまで薄い菌膜の形成がみられ、最小発育阻止濃度 (MIC) の判定が難しい場合をしばしば経験する。このような MIC 判定の困難さは、液体培地を用いる感受性測定でも認められる現象で、 $10^6$ /ml の接種菌量では、菌接種後 24 時間を経過しても、MIC の 100 倍濃度の ABPC を含む培地が混濁しており、判定が難しいといわれる<sup>1)</sup>。BOTTONE 等<sup>2)</sup>によれば、この混濁の原因は、菌が溶菌することなく非常に大きな sphericol form を形成していることによるもので、Chloramphenicol (CP) ではみられない現象であるという。

私達は第1編<sup>3)</sup>で pulmonary cyst に膿胸を合併した難治な小児の感染症に対し、起炎菌が *H. influenzae* であることから、数種のペニシリン系薬剤による治療を試みたが、それらの抗菌薬に対する菌の MIC よりも、はるかに高濃度の薬剤が病巣内に到達していたにもかかわらず、臨床経過が遷延した症例を報告した。そしてその原因を明らかにする手掛りとして、第1編から第3編<sup>3-5)</sup>にわたって基礎的な検討を行ってきた。それらの成績から明らかとなったことは、ペニシリン系抗菌薬の MIC は寒天培地を用いた測定法では非常に優れているにもかかわらず、液体培地では先の BOTTONE 等<sup>2)</sup>の報告と同じく、MIC よりも高濃度の薬剤を含有させた培地でも、培地が時間の経過と共に混濁してくるのが観察された。また、位相差顕微鏡下で経時的に観察すると、菌は溶菌することなく大きなスフェロプラストを形成するだけであった。そしてこの事実は電子顕微鏡下における観察によっても確かめられ、ほとんどの細胞に細胞壁が残存しており、細胞は viability を失っていないと推測さ

れた。

従来ペニシリン系抗菌薬の作用点は、菌の細胞壁合成阻害であり、危弱化した細胞壁部分から菌体内内容物が流出して溶菌に至る殺菌作用にあるとされてきた。しかし、上記のように *H. influenzae* に対するペニシリン系抗菌薬の作用は、必ずしも殺菌力が強いとは言いがたい。このことは臨床上是極めて大切なことであって、つまりこのスフェロプラスト化した細胞が薬剤除去後に再増殖してくるのかどうかということが、臨床反応の鈍さあるいは再発と密接な関係を有していると思われるのである。再増殖可能であるとすれば、第1編<sup>3)</sup>で報告した症例や、欧米での多数の報告<sup>6-11)</sup>にみられる再発例についての解析の上で役立つと考えたのである。

本編では、このようなことを踏まえて、ABPC を作用させることによってスフェロプラスト化した菌からの再増殖の様子を、位相差顕微鏡下ならびに電子顕微鏡下に経時的に観察した成績について報告したい。

## 材料と方法

## 1. 使用菌株

実験に使用した *H. influenzae* TK 167 株は、帝京大学医学部付属病院小児科に入院した化膿性髄膜炎の患児の髄液中から分離されたもので、第3編<sup>3)</sup>で用いた菌株と同一株であり、本菌の血清型は type b である。

## 2. 使用培地

増菌には Bacto Tryptic Soy Broth (Difco) を 121°C、15 分高圧滅菌後 Fildes enrichment (Difco) を 5% の割合に無菌的に加えて使用した (以下 TSBF 培地と略)。再増殖の有無を観察するための培地は、Bacto PLO Broth (Difco) を 121°C、15 分高圧滅菌後、非加熱の馬血清を 20%、Yeast から作製した自家製の 25% Yeast extract を 10%、glucose を 1% Fildes enrichment を 5% 濃度になるように無菌的に加えて用いた。なお、位相差顕微鏡観察に用いた固型培地は、上記の組成に寒天を 1.5% になるように加えたものである。TSBF 培地の浸透圧は 341 mOsm/kg、再増殖用の培地の浸透圧は 375 mOsm/kg である。

### 3. 位相差顕微鏡による再増殖の観察

TSBF 培地 10 ml に 1 夜培養した菌液 0.5 ml を、翌期さらに新しい TSBF 培地 10 ml に接種し、2 時間振盪培養した後、ABPC を 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (13 MIC) または 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (26 MIC) になるように添加し、37°C で 4 時間振盪培養した。その培養液の一部を採取し、検鏡して菌がスフェロプラストになっているのを確認したのち、ABPC を除去するために 3,000 r. p. m. 10 分間遠沈し、上清を捨て去り沈査の菌を新鮮 TSBF 培地 10 ml に再浮遊した。この菌液をあらかじめ再増殖用寒天培地をシートしておいた位相差顕微鏡用チャンパー内に 1 滴接種して、ただちに観察を開始した。位相差顕微鏡は Nikon MD 型を使用し、長時間観察のために保温装置を用いて 37°C に保った。観察は同一視野を一定時間毎に 35 m/m フィルム (Neopan F) に撮影して記録した。

### 4. 電子顕微鏡による観察

位相差顕微鏡観察の項で述べた方法と全く同じようにして、TK 167 株に 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の ABPC を 4 時間作用させた。次いで菌を 3) と同様にして洗浄し、新鮮な再増殖用液体培地に移し、37°C に保ちながら 1 時間毎に菌液を採取して、電子顕微鏡用試料を作製した。菌の固定は集菌時における菌体の損傷を防ぐため、培地に直接 1% になるように glutaraldehyde を加えて 4°C に 30 分静置した後、遠沈し集菌した。菌はさらに 2% glutaraldehyde 液 (0.1 M phosphate buffer で pH 6.1 に調整) で 4°C、3 時間固定し、その後 phosphate buffer で 3 回遠沈洗浄した。次いで 1% osmium tetroxide (veronal acetate buffer で pH 6.1 に調整) で 4°C、1 夜固定した。翌朝エチルアルコール・アセトン系列により脱水し、Epon 812 に包埋した。Portor Blum MT-1 型ミクロトームで超薄切片を作製し、uranyl acetate と lead citrate の 2 重染色を施した後、日立 11E 型電子顕微鏡で観察した。

## 結果

### 1. 位相差顕微鏡下での再増殖の観察

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の ABPC を 4 時間作用させ、スフェロプラスト化した *H. influenzae* から薬剤を除去し、その後の菌の経時的な形態変化を位相差顕微鏡下に観察した成績を Fig. 1-A から Fig. 1-J までに示した。Fig. 1-A は観察開始直後のものであり、全ての菌が ABPC の作用によって大きなスフェロプラストを形成している。菌体内には写真では黒くみえるいくつかの空胞像も認められる。薬剤除去後 1 時間では Fig. 1-B に示したように、細胞質が密になってくる部分がコントラストの強い白い部分として認められ始め、また空胞と思われる像もその数を増減しながら比較的活発に動いているのが観察され

た。2 時間後になると、菌体の辺縁に小さな不規則な凹凸が生じ (Fig. 1-C)、3 時間後ではさらにその変化が著しくなって、菌は不正円を呈するようになった (Fig. 1-D)。また、細胞は徐々にその体積を増しており、中にはその途中で Fig. 1-D の中心の細胞のように溶菌してしまいうものも認められる。このように再増殖の途中で体積が増加する際に溶菌に至る菌は比較的多くみられ、この 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の ABPC 処理の条件の時には、約半数の菌で認められた。おそらく ABPC の作用によって生じた細胞壁の脆弱部分が修復される速度と、細胞体積の増加に伴うギャップから、その内圧に耐えきれずに溶菌するものと考えられた。さらに注意深く観察していると、矢印で示した部分に極めて小さな球状の粒子が溶菌しなかった上と下の菌から 1~2 コ分離してくるのがみられた。4 時間後になると、Fig. 1-E に示したように、Fig. 1-D に矢印で示した部分はさらに分裂し、その他の部分でもこの巨大なスフェロプラストの周囲に小さな菌が分離してくるのがみられた。Fig. 1-F に示した 5 時間後では、さらに分裂個所が多くなっているのが明らかで、その後の時間の経過と共に Fig. 1-G, H, I, J のように桿菌様に戻った菌も徐々にではあるが正常に分裂し始めてくるのがわかる。そして元のスフェロプラストはなおも体積が増してはいるものの、大きな空胞がいくつも形成されて著しく変形している。

このようなスフェロプラスト化した菌からの再増殖の開始時間は、個々の細胞によってかなりの差が認められ、再増殖が早い場合には薬剤除去後 2 時間目位からすぐに再増殖が始まり、Fig. 1-J の右端のように 7 時間目には既に colony を形成し始めるものもあるが、中には損傷の強いいためか、薬剤除去後 5~6 時間目から再増殖の開始されたスフェロプラストも認められた。

### 2. 電子顕微鏡での再増殖の観察

Fig. 2 には 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の ABPC を 4 時間作用させた際の *H. influenzae* の超薄切片像を示す。スフェロプラスト化した菌は、4~6  $\mu\text{m}$  の大きさとなり、細胞質内には大小の空胞を生じてはいるものの、リボゾームを含む細胞質実質部分にはほとんど変化はみられず、染色も均一である。一方、ABPC の作用点である細胞壁を詳細に観察すると、細胞の周囲全体にわたって細胞壁が認められ、明らかな壁の欠落箇所はこの時点ではほとんどみだされなかった。しかし矢印で示したような bleb 様構造がところどころにみられることから、細胞壁はある程度の損傷を受けているものと推測された。

ABPC 除去後、再増殖用の培地で 2~3 時間経過した菌の切片像は Fig. 3~5 に示した。最も多いのは Fig. 3 のようなスフェロプラストで、矢印で示した部分のよう

に細胞壁の一部は剥離し、また細胞質内には著しい細胞質膜構造の出現がみられる。このような像を呈する細胞では、リボゾームを含む細胞質は細胞の中心部に集まっていることが多く、一定の電子密度を保っている。視野全体に占めるこの細胞の割合は約半数である。Fig. 4 は Fig. 3 とは逆に、細胞壁の変化はむしろ少なく、それに比して細胞質の変化が強く、実質は粗になって電子密度の低いことが特徴である。さらに同時間の試料で、Fig. 5 a に示したような細胞の周辺部にリボゾームを含む細胞質が一定の密度を保っている細胞が2割程度認められる。このような変化を示した菌は大きさも7~10  $\mu\text{m}$  前後と大きくなっており、そして何よりも特徴的なのは、矢印で示したように辺縁がわずかに隆起している部分がみられることである。Fig. 5b には細胞の一部の拡大写真を示したが、リボゾーム粒子は明瞭で、またその外側には細胞質膜および細胞壁が確認される。なお、細胞質の実質を含まない部分には細胞質膜の伸長が著しい。

ABPC 除去後4~5時間経過すると、Fig. 5 でみられたのと同様な、リボゾームが周辺にあるスフェロプラストに、細胞実質のつまった突起部が形成されるのが明らかにわかる。Fig. 6a は4時間後、Fig. 7 は5時間後の像である。この突起部を拡大してみると、Fig. 6b, Fig. 8 にそれぞれ示したように、ほとんど完全な形で細胞壁が認められ、また細胞実質も薬剤無処理の菌とはほぼ同じような一定の電子密度を保っている。

Fig. 9 はスフェロプラストの突起部から分裂して離れたと思われる部分の切片像である。菌の形状は元の菌よりも大きい、細胞質膜や細胞壁は明瞭に区別可能である。

位相差顕微鏡ならびに電子顕微鏡下での結果を総合すると、薬剤除去後細胞壁の残っている細胞のうち一部は、細胞壁を有する突起部が徐々に形成され始めて分裂し、正常の桿菌へと戻り得ることが明らかにされた。

#### 考 察

*H. influenzae* は小児科領域では乳児期および幼児期の化膿性髄膜炎の起炎菌として重要視され、それらの治療にはペニシリン系抗菌薬、とくにABPCが第1選択の抗菌薬として使用されてきている。本邦ではこのような化膿性髄膜炎例での再発に関する報告はほとんど見当たらないが、欧米ではしばしば問題として取り上げられ、種の考察がなされてきている<sup>8-11)</sup>。私たちが第1編で報告したpulmonary cystに膿胸を合併した症例等も、起炎菌の*H. influenzae* に対して、実際に臨床で使用したペニシリン系抗菌薬の薬剤感受性が優れていたのにもかかわらず、その治療経過ははかばかしくないものであった。このようなことを踏まえ、欧米では*H. influenzae*

に対するABPCの作用について、臨床に関連したいくつかの基礎研究がなされており、これらの報告をまとめると、*H. influenzae* にABPCを作用させると容易にスフェロプラストが形成され<sup>1,2)</sup>、LAPINSKI等<sup>12)</sup>のように臨床材料からもL-formを証明したというものもあり、それらのL-formは正常な桿菌に戻り得ると報告しているものもある。さらに*H. influenzae* のスフェロプラストは、*E. coli* のスフェロプラストに較べ<sup>13)</sup>、低浸透圧の状態でも溶菌を起しにくいという成績もある<sup>1)</sup>。しかしこのような*H. influenzae* とABPCとの間にみられる特徴が、薬剤の臨床効果の面では果して長所であるのか短所であるのかということを明快に関連ずけて論じている研究は残念ながら見当たらない。私たちはその点を解明するため、様々の角度から検討を重ね、その結果を第1編から第3編<sup>3-5)</sup>にわたって報告してきた。それぞれの詳細は各編に譲るとし、要約だけを述べると、ペニシリン系の抗菌薬の*H. influenzae* に対する抗菌力を通常の寒天平板法で調べると、その感受性は優れているにもかかわらず、殺菌効果の点ではCPやKanamycin (KM) に較べ劣っていた。また薬剤作用時の形態変化でも、確かにスフェロプラストは形成しているものの、ほとんどの細胞が溶菌に至っておらず、電子顕微鏡による観察によっても細胞壁の損傷は想像していたよりも弱いことが推察された。

上記のような事実から、私たちはABPC処理によって形成された*H. influenzae* スフェロプラストは、*E. coli* のそれとは異なって、比較的容易に正常な桿菌に戻るのではないかと推測し、それが実証されるならば、臨床での*H. influenzae* 感染症の再発、再燃を考える上で、ひとつの手掛りとなるのではないかと考えた。

位相差顕微鏡および電子顕微鏡によって経時的に追跡した成績は結果の項に示したとおり、スフェロプラストとなった菌は、薬剤除去後溶菌を起さない環境でありさえすれば、非常にゆっくりではあるが正常な桿菌に再び戻り得ることが明らかとなった。従来私たちが観察している*E. coli* やその他の腸内細菌では、ペニシリンやセファロスポリン系抗菌薬処理によって生じたスフェロプラストが、空胞を形成した状態ではほとんど再増殖が不可能であったことから考えると、*H. influenzae* の場合空胞が形成されていても薬剤除去後再び増殖可能であった事実は驚異ですらあった。それに対しては、再増殖用の培地の浸透圧が比較的高いという理由も考えられるが、単にそれだけではなく、薬剤の作用によってもなお残存している細胞壁が溶菌を起しにくくし、再増殖を助けていると考えられた。事実、電子顕微鏡下で観察すると、薬剤の作用により細胞壁が剥離したような状態の細

Fig.1 Phase-contrast micrographs : Regrowth from spheroplasts of *Haemophilus influenzae* induced by ampicillin.

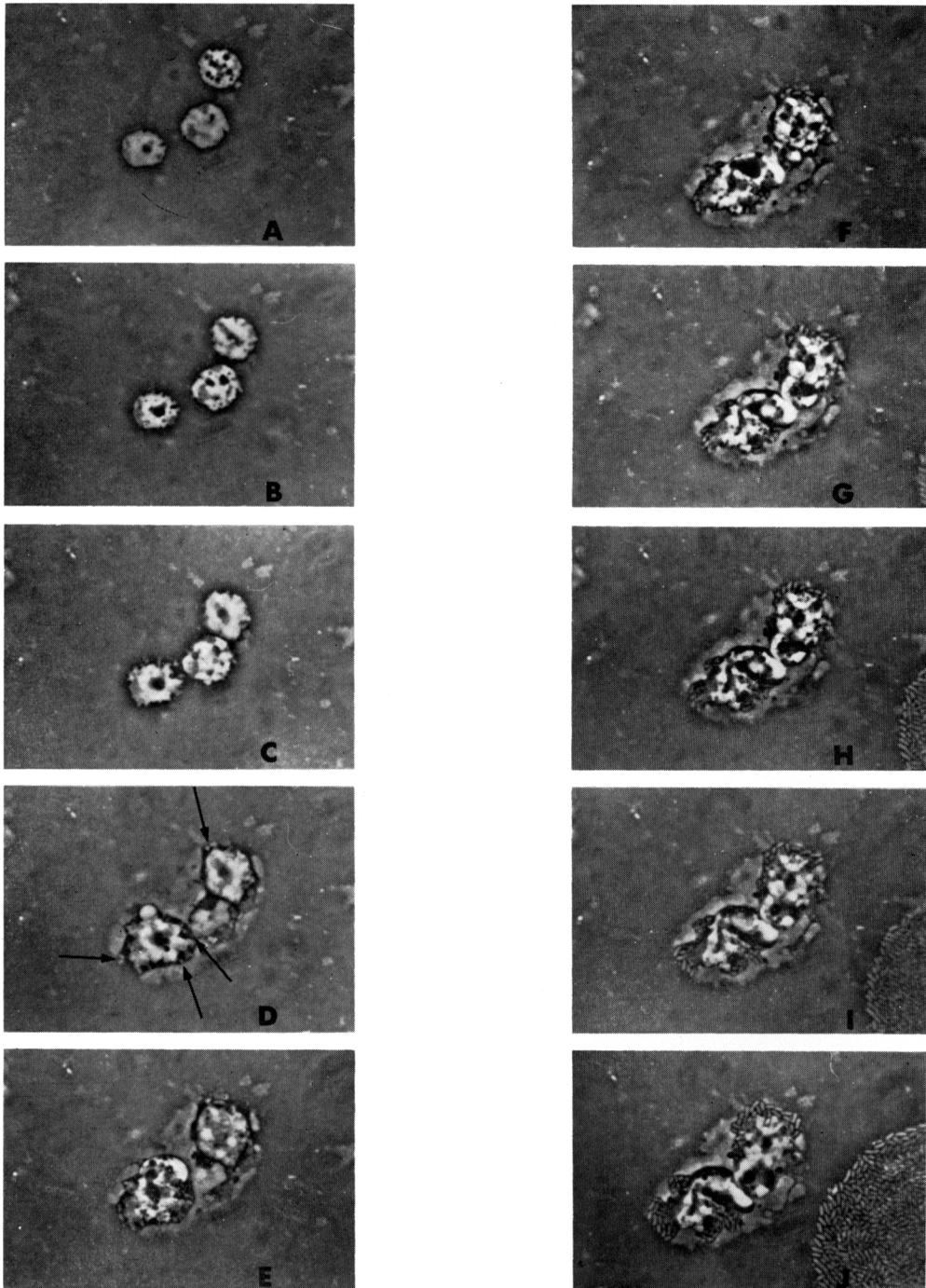


Fig.2 Electron micrograph : *Haemophilus influenzae* after 4 hours of incubation with 10  $\mu\text{g/ml}$  (26 MIC) of ampicillin. Large spheroplasts are observed. Bar represents 1  $\mu\text{m}$ . ( $\times 26,730$ )

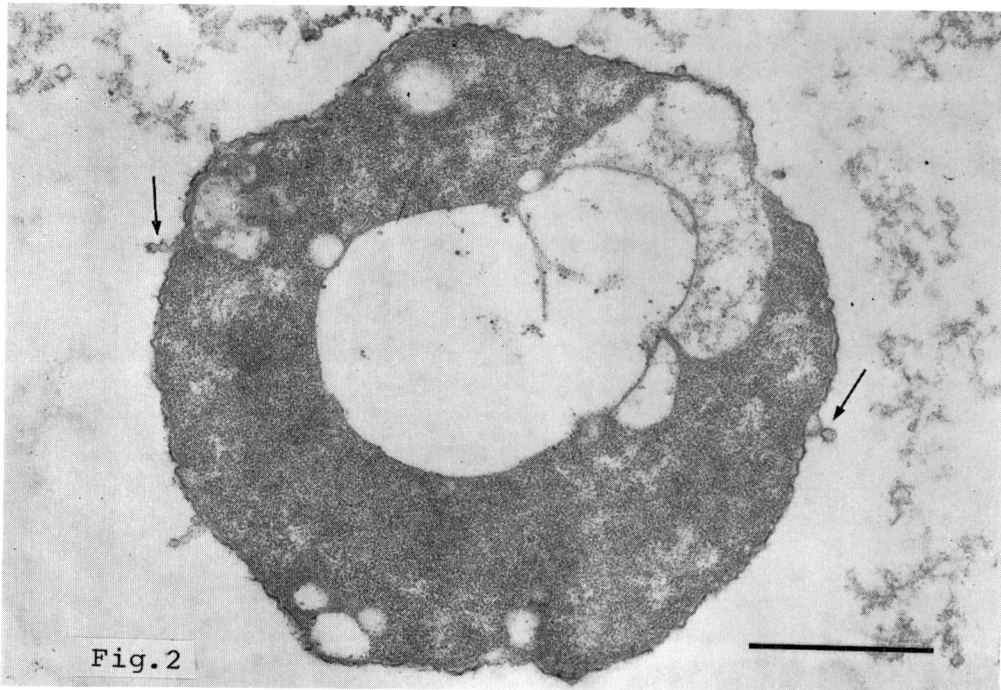


Fig.3 Spheroplast 3 hours after removal of ampicillin. ( $\times 20,790$ )

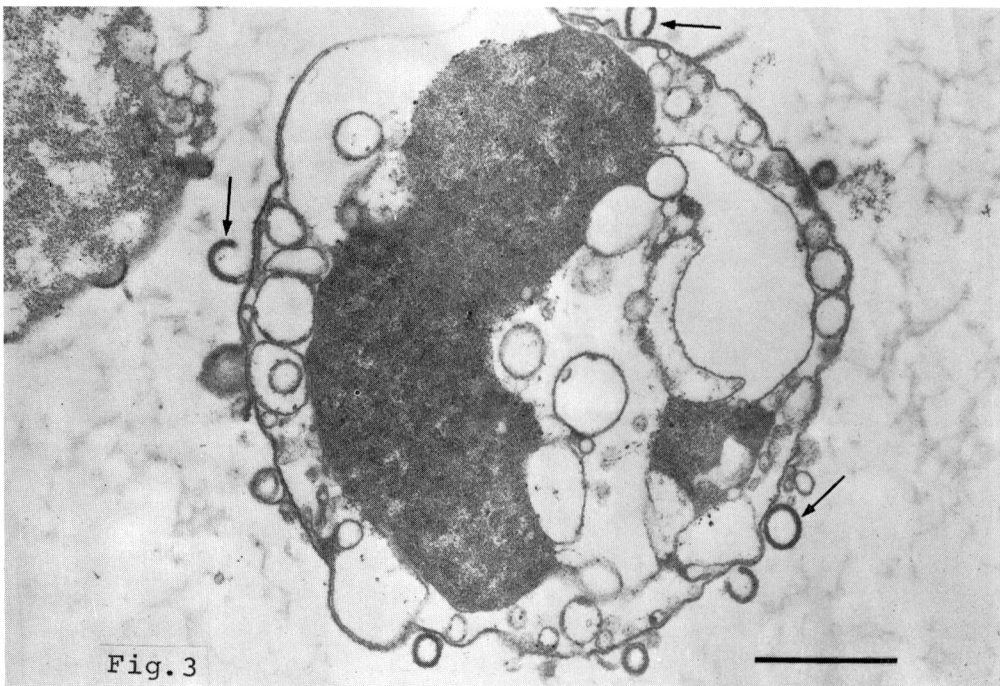


Fig.4 Spheroplast 3 hours after removal of ampicillin. ( $\times 18,630$ )

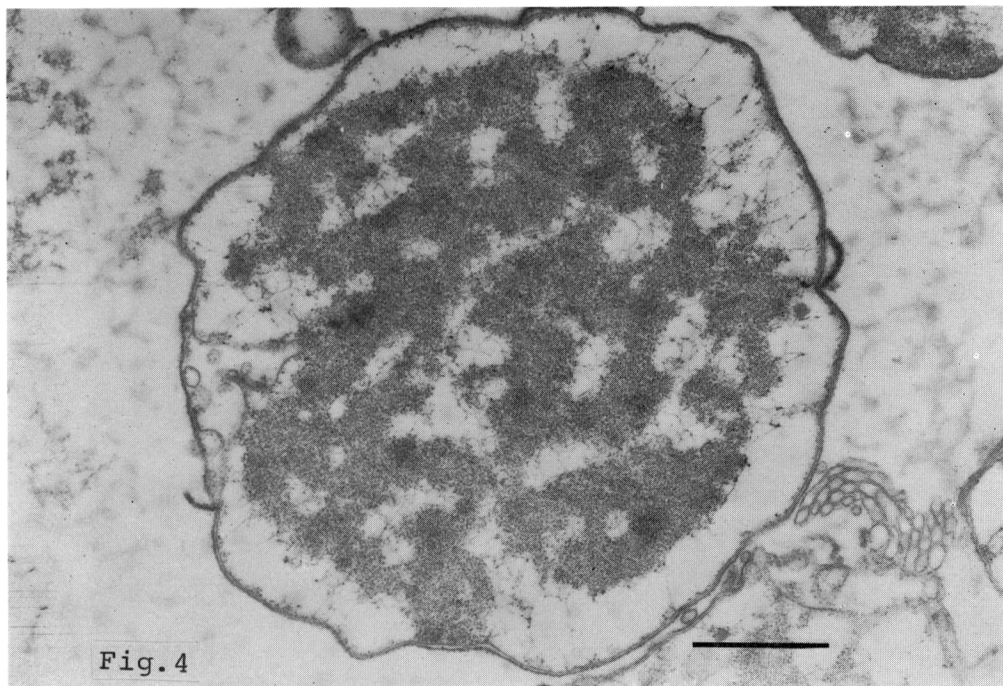
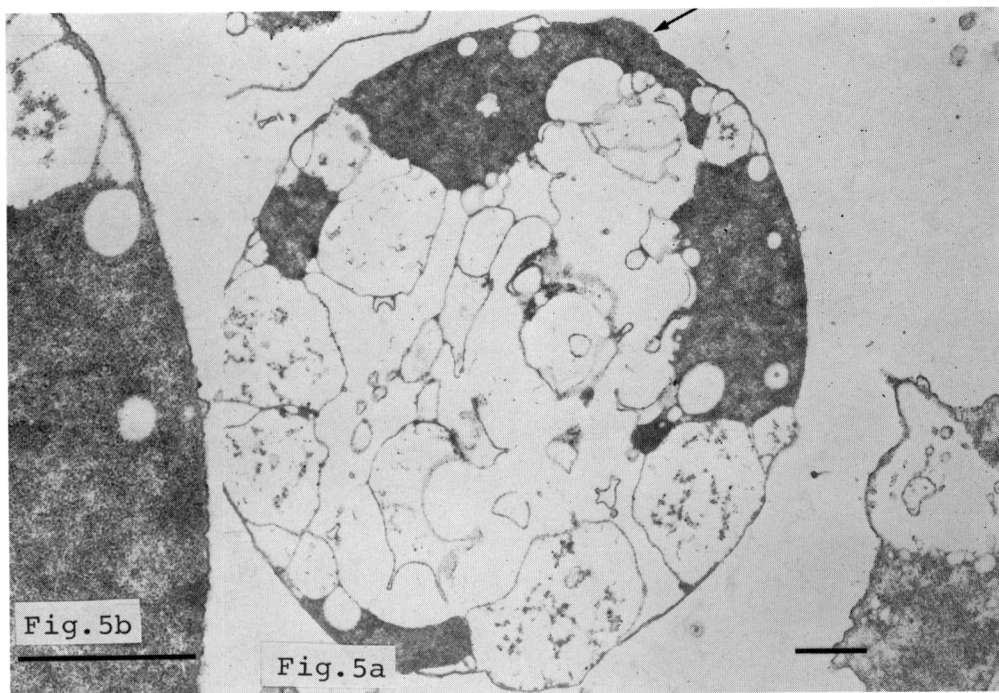


Fig.5a, Fig.5b Spheroplast 3 hours after removal of ampicillin. A slight projection appears. ( $\times 11,500$   
 $\times 25,300$ )



- Fig. 6a. Spheroplast 4 hours after removal of ampicillin. 2 projections are shown at cell wall. ( $\times 11,500$ )  
Fig. 6b. Enlargement of a part of Fig. 6a. ( $\times 25,500$ )

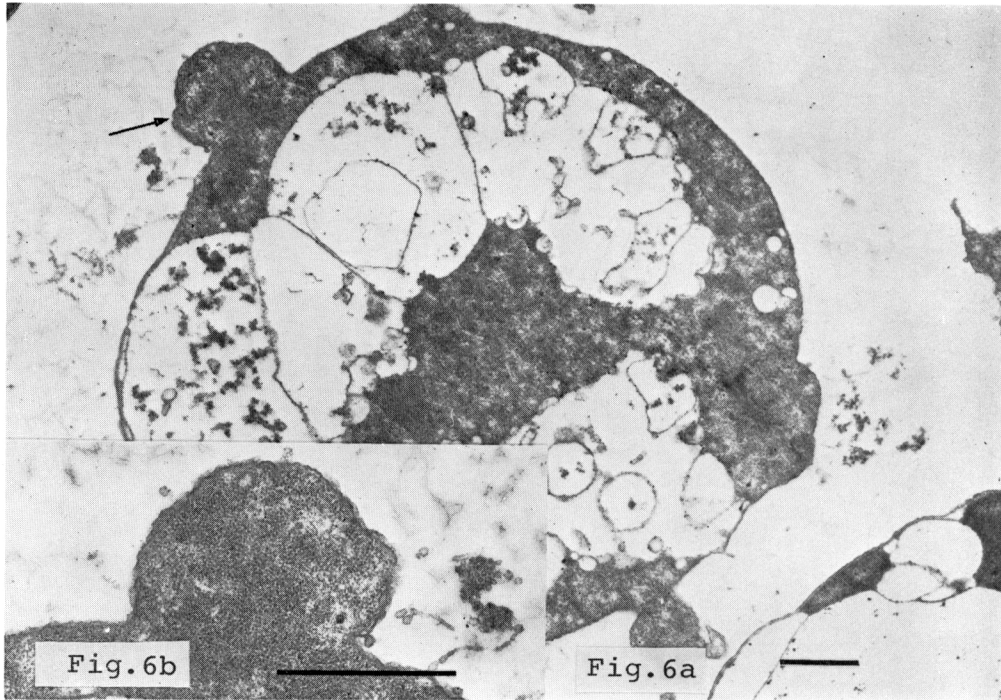


Fig. 7 Spheroplast 5 hours after removal of ampicillin. ( $\times 23,490$ )

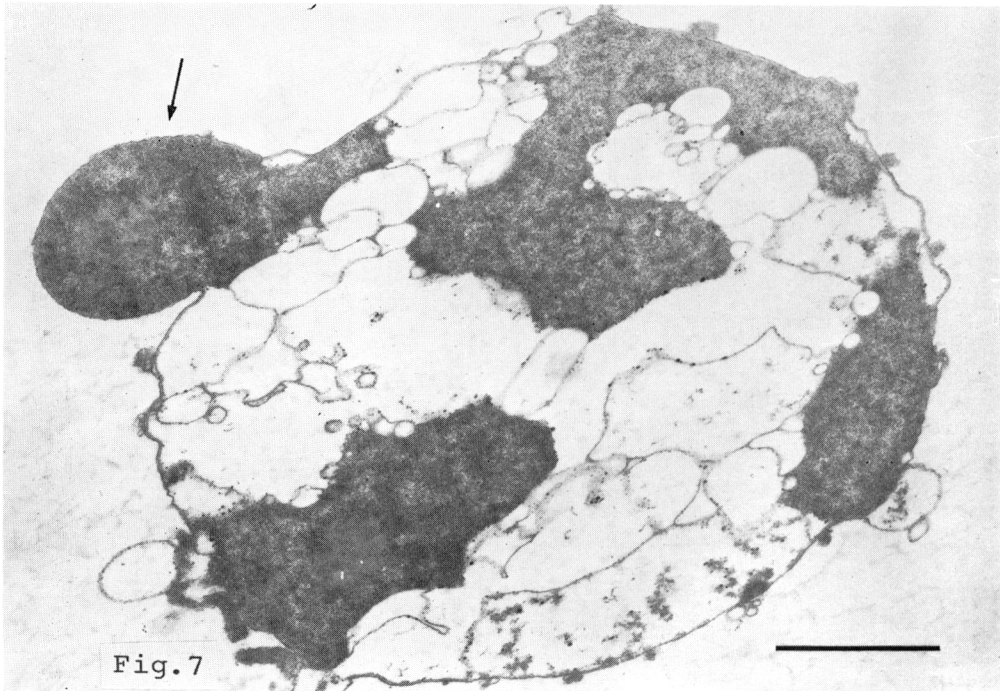


Fig.8 Enlargement of a part of Fig.7. ( $\times 40,800$ )

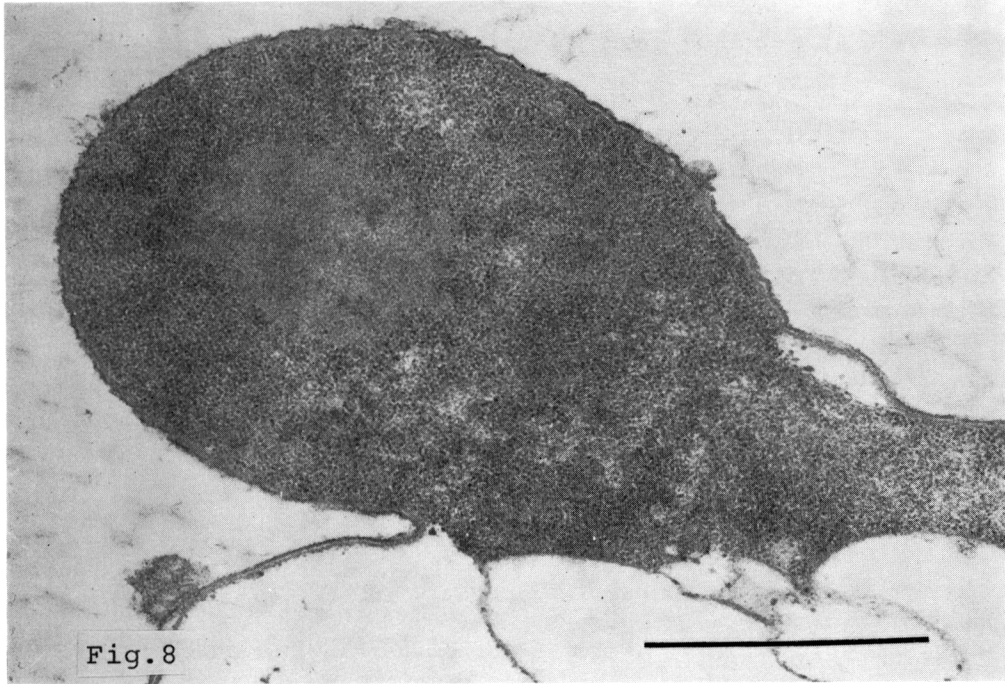
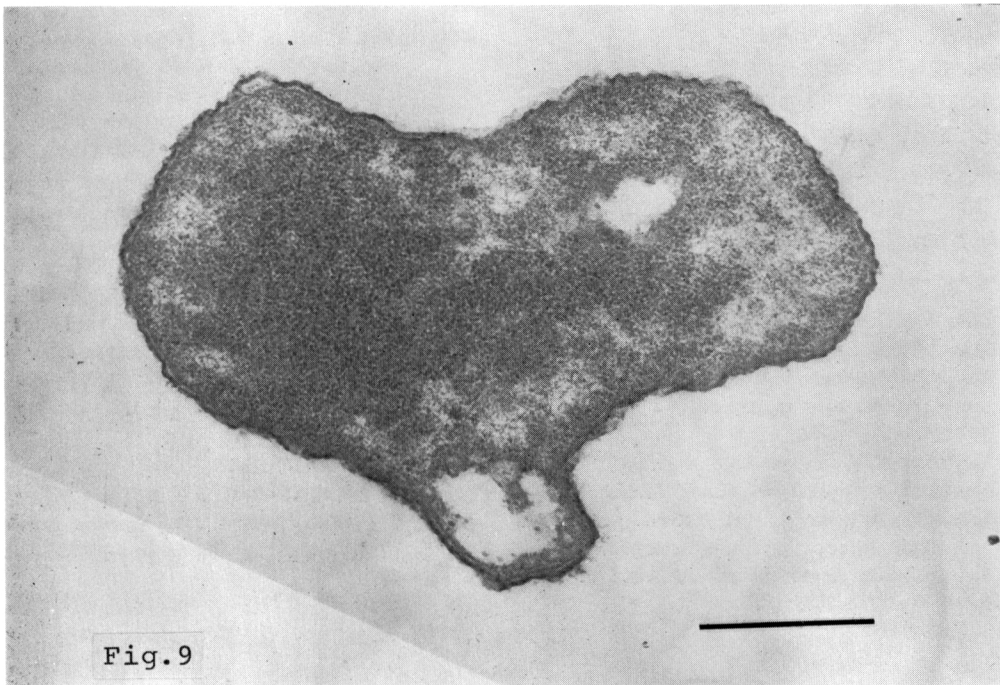


Fig.9 Cell 5 hours after removal of ampicillin. Complete cell wall and cell membrane are shown. ( $\times 25,300$ )





胞では、再増殖と思われる突起部はみい出されないのに対し、細胞壁の残存が認められた細胞では、損傷は次第に修復されて突起部が形成され、分裂する像がみられた。

上記のことから、*H. influenzae* 感染症へのペニシリン系抗菌薬の使用に際しては、抗菌力の良さだけを過信することなく、病巣局所への十分な薬剤濃度の移行確認と、中途半端な投与中止は慎むべきであろう。また先の論文で報告<sup>14)</sup>した ABPC 耐性の *H. influenzae* の出現を考えると、将来病巣の部位によっては CP や KM の選択も考慮されなければならないことを痛感した。

#### 要 約

高濃度の Ampicillin (ABPC) を作用させることによって、スフェロプラストを形成した *H. influenzae* から薬剤を除去し、再増殖の有無を検討して、以下の成績を得た。

1. *H. influenzae* (TK 167 株) に 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度の ABPC を 4 時間作用させた後、その薬剤を除去し、薬剤を含まない培地に再接種して、位相差顕微鏡下に再増殖の有無を観察したが、その結果、一部の細胞では再増殖が可能であることが明らかにされた。
2. 菌体内部に空胞が出現した細胞でも再増殖は可能であった。時間の経過と共にスフェロプラストに凹凸が生じ、その一部に突起が形成されて、突起が分裂して増殖する像がみられた。
3. このような再増殖可能なスフェロプラストでは、細胞質内に細胞質膜に囲まれた空胞は形成するものの、それに隣接して正常と思える電子密度を保った原形質構造を有しており、その部分から突起が形成されて分裂する像が電子顕微鏡によって裏づけられた。薬剤の作用によって細胞壁の剥離した損傷の著しい細胞では、再増殖と思われる像は認められなかった。

#### 引 用 文 献

- 1) ROBERTS, D. E. ; A. INGOLD, S. V. WANT & J. R. MAY : Osmotically stable L-forms of *Haemophilus influenzae* and their significance in testing sensitivity to penicillins. J. Clin. Path. 27 : 560~564, 1974
- 2) BOTSTONE, E. J. ; Z. BRANDMAN & S. S. SCHNEIDERSON : Spheroplasts of *Haemophilus influenzae* induced by cell wall-active antibiotics and their effect upon the interpretation of susceptibility tests. Antimicrob. Agents & Chemother. 9 : 327~333, 1976
- 3) 斎藤洪太, 柳瀬義男, 生方公子, 紺野昌俊 : *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について。第 1 編 : Pulmonary cyst を基礎とし、本菌による膿胸を合併した 1 症例のペニシリン系抗生物質による治療経過とその考察。Chemotherapy 26 : 499~507, 1978
- 4) 柳瀬義男, 高橋洋子, 生方公子, 紺野昌俊 : 第 2 編, 最近臨床から分離された *Haemophilus influenzae* に対する各種抗生物質の抗菌作用についての基礎的検討。Chemotherapy 26 : 508~516, 1978
- 5) 生方公子, 沢井稔, 紺野昌俊 : 第 3 編, *Haemophilus influenzae* に対する Ampicillin, Chloramphenicol ならびに Kanamycin の抗菌作用についての電子顕微鏡学的観察。Chemotherapy 26 : 656~665, 1978
- 6) YOUNG, L. M. ; J. E. HADDOW & J. O. KLEIN : Relapse following ampicillin treatment of acute *Hemophilus influenzae* meningitis. Pediatrics 41 : 516~518, 1968
- 7) CHERRY, J. D. & C. P. SHEENAN : Bacteriologic relapse in *Haemophilus influenzae* meningitis. New Engl. J. Med. 278 : 1001~1003, 1968
- 8) GREENE, H. L. : Failure of ampicillin in meningitis. Lancet 1 : 861, 1968
- 9) GOLD, A. J. ; E. LIEBERMAN & H. T. WRIGHT : Bacteriologic relapse during ampicillin treatment of *Hemophilus influenzae* meningitis. J. Pediatr. 74 : 779~781, 1969
- 10) COLEMAN, S. J. ; E. B. AULD, J. D. CONNOR, S. B. ROSENMAN & G. H. WARREN : Relapse of *Haemophilus influenzae* type b meningitis during intravenous therapy with ampicillin. J. Pediatr. 74 : 781~784, 1969
- 11) SANDERS, D. Y. & H. W. GARBEE : Failure of response to ampicillin in *Hemophilus influenzae* meningitis. Amer. J. Dis. Child. 117 : 331~333, 1969
- 12) LAPINSKI, E. M. & E. D. FLAKAS : Induction of L forms of *Haemophilus influenzae* in culture and their demonstration in human bronchial secretions. J. Bact. 93 : 1438~1445, 1967
- 13) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY : A comparison of the effects of ampicillin on *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. J. Med. Microbiol. 2 : 435~441, 1969
- 14) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊 : 本邦で分離された Ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について。Chemotherapy 26 : 491~498, 1978

THE SIGNIFICANCE OF PENICILLINS IN THE TREATMENT  
OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* INFECTION. PART IV

Regrowth from Spheroplast of *Haemophilus influenzae* induced by Ampicillin

KIMIKO UBUKATA, HIROKO TAKAHASHI and MASATOSHI KONNO  
Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine, Tokyo

An experiment was performed to clarify whether or not spheroplast of *H. influenzae* induced by ampicillin (ABPC) with high concentration could revert to original form when the drug was removed. The results were as follows.

1. *H. influenzae* (TK 167 strain) was treated with ABPC in the concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  for 4 hours and, after the drug was removed, reinoculated into media not containing the drug. From the observation of organisms under phase-contrast microscope, it was revealed that a part of the cells were able to revert to their natural form.

2. Even in the cells which appeared vacuoles in the cytoplasm, was capable of regrowth. First, the surface of the spheroplast became uneven, then projection was formed at a certain place, and it was divided with the resulting regrowth.

3. Also, it was confirmed electron microscopically that, in spheroplasts capable of regrowth, cytoplasm seemingly normal in electron density was present adjacent to the vacuoles surrounded by cytoplasmic membrane, and a projection extended from the said seemingly normal portion, which was divided. Regrowth was not observed in the cells severely injured and deprived of the cell wall by ABPC treatment.