

PC-904 による緑膿菌の形態変化について

西野武志・山岸純一・平井芳美・中沢昭三
京都薬科大学微生物学教室

PC-904 は住友化学工業株式会社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-hydroxy-1,5-naphthyridine-3-carbonyl 基を導入したもので、グラム陽性菌群、陰性菌群に対し幅広く抗菌力を有する。とくに *Pseudomonas aeruginosa* に対する感受性は Carbenicillin に比べ非常に優れており、Gentamicin と同様な抗菌力を示す¹⁾⁻³⁾。近年 *Ps. aeruginosa* などのグラム陰性菌に対し Carbenicillin や Sulbenicillin よりも優れた感受性を示す Ampicillin 誘導体が次々に発見され、数種類の化合物が開発途上にある⁴⁾⁻⁸⁾。

私どもはすでに Carbenicillin, Ticarcillin などの薬剤を *Ps. aeruginosa* に作用させたときの形態変化を走査電子顕微鏡により観察し⁹⁾、Carbenicillin や Ticarcillin を作用させた場合、2,500 μ g/ml の高濃度作用時において典型的な spheroplast 様構造が認められることを報告した。また PERKINS¹⁰⁾、PRIOR¹¹⁾ らも Carbenicillin や Ticarcillin をそれぞれ *Ps. aeruginosa* に作用させたとき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。

今回私どもは PC-904 を *Ps. aeruginosa* に作用させたときの形態変化を位相差顕微鏡や走査電子顕微鏡を用いて観察したところ、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. 使用菌株および使用薬剤

臨床分離緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* E-2 を用い、薬剤としては PC-904, Carbenicillin (CBPC) のいずれも力価の明らかなものを用いて行なった。なお PC-904 および CBPC の *Ps. aeruginosa* E-2 に対する MIC はそれぞれ 3.13 μ g/ml と 50 μ 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、一方、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、パラフィンで封入した。この標本を 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 (ニッスイ) を用いて前培養を行ない、これを約1%の割合で heart infusion broth (HIB

:ニッスイ) 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¹²⁾ 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^{13), 14)} 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、経時的に 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 寒天培地 (ニッスイ) 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. 1 (a) は正常な *Ps. aeruginosa* E-2 の分裂増殖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。

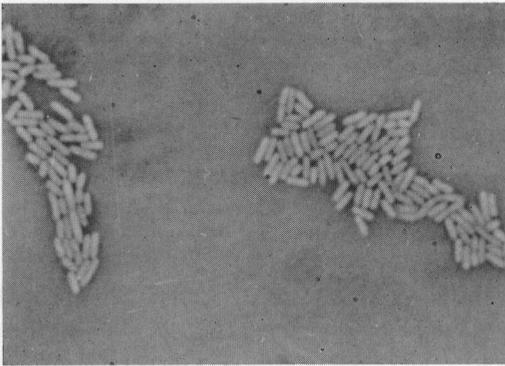
Fig. 1 (b), (c) は PC-904 を作用させた時の像で、(b) は 3.13 μ g/ml, (c) は 50 μ g/ml を作用させた場合であり、いずれも5時間後の像である。50 μ g/ml を作用させた場合でも菌体は著しく elongation し、filament 化するだけで spheroplast 様構造を観察することができなかった。

Fig. 1 (d), (e) は CBPC を作用させたときの像で、(d) は 100 μ g/ml, (e) は 500 μ 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。100 μ g/ml 作用では菌体は著しく elongation し、filament 状の形態を示した。しかし 500 μ g/ml 作用では PC-904 の場合と異なり、多くの spheroplast 様構造を観察することができた。

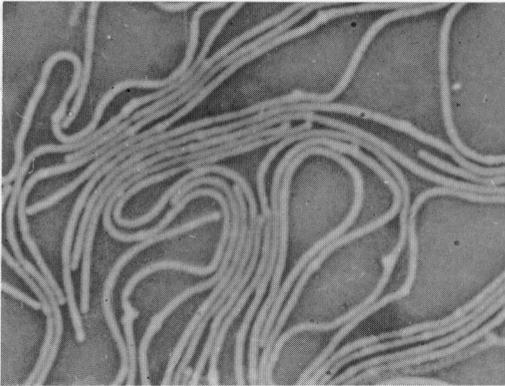
このような形態変化をさらに詳細に観察するために、次に走査電子顕微鏡を用いて検討を行なった。

2. 走査電子顕微鏡による観察

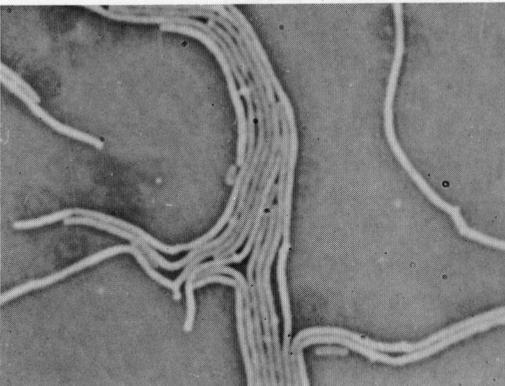
Fig. 2, 3 は走査電子顕微鏡試料作製時の生菌数の変化を示したものである。すなわち、Fig. 2 は PC-904 の *Ps. aeruginosa* E-2 に対する作用をみたもので、10⁸



(a)



(b)



(c)

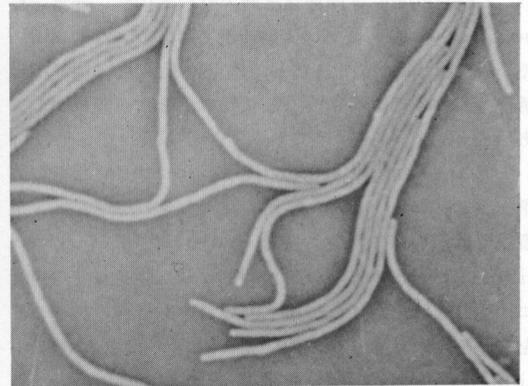
cells/ml の対数後期に作用させた場合、 $31.3\mu\text{g/ml}$ でも静菌的な作用しか認められなかった。CBPC を作用させた場合、Fig. 3 に示すように $50\mu\text{g/ml}$ では静菌的な作用が見られ、 $500, 2,500\mu\text{g/ml}$ 作用で殺菌的な作用が認められた。

このような菌数変化時の形態変化を Fig. 4~18 に示した。

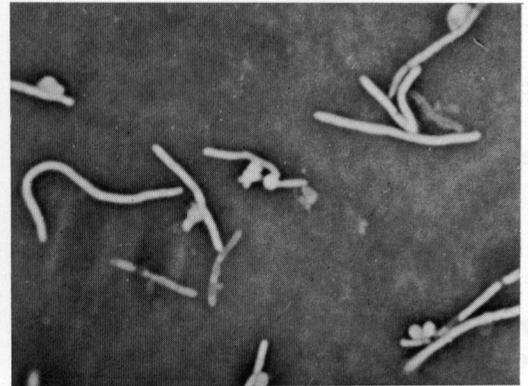
Fig. 4 は正常な *Ps. aeruginosa* E-2 の走査電顕像

Fig. 1 Phase contrast micrographs of *Ps. aeruginosa* E-2.

- (a) Untreated *Ps. aeruginosa* E-2 cells observed after 4 hour of incubation.
- (b) Cells after 5 hour of exposure to PC-904 ($3.13\mu\text{g/ml}$).
- (c) Cells after 5 hour of exposure to PC-904 ($50\mu\text{g/ml}$). Filamentous cells are observed.
- (d) Cells after 4 hour of exposure to CBPC ($100\mu\text{g/ml}$).
- (e) Cells after 4 hour of exposure to CBPC ($500\mu\text{g/ml}$). Spheroplast-like structures are observed.



(d)



(e)

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 PC-904 の $3.13\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させたときの走査電顕像で、菌体は 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。

Fig. 8, 9, 10 は PC-904 の $31.3\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させたときの走査電顕像で、菌体は細

Fig. 2 Effect of PC-904 on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2

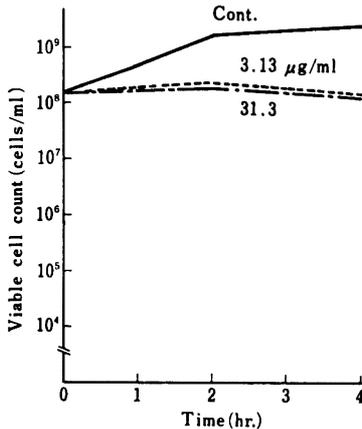
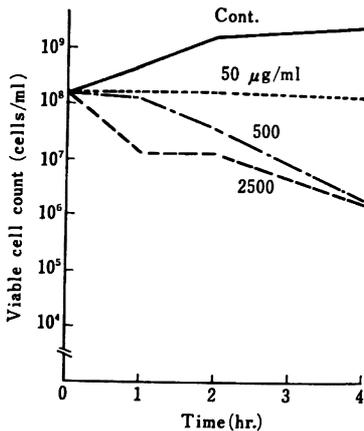


Fig. 3 Effect of CBPC on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2



胞分裂の形跡もなく elongation し, filament 状になるだけで, CBPC 作用時にみられるような spheroplast 様構造を観察することができなかつた。

Fig. 11, 12, 13 は CBPC の 50 μ g/ml をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させたときの走査電顕像で, 時間の経過とともに長くなった filament 構造を観察することができた。

Fig. 14, 15, 16 は CBPC の 500 μ g/ml をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させたときの走査電顕像で, 菌体は filament 状を呈し, spheroplast 様構造や溶菌像も観察することができた。

Fig. 17, 18 は CBPC の 2,500 μ g/ml をそれぞれ 1, 2 時間作用させたときの走査電顕像で, 菌体はあまり elongation せず, 多くの spheroplast 様構造を観察することができた。

以上述べたとおり, 10⁸ cells/ml の対数後期に PC-904

を作用させた場合, 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つた。そこで次に PC-904 の殺菌作用がみられる時期にどのような形態変化が観察できるか検討を行なった。

Fig. 19 は試料作製時の生菌数の変化を示したもので, 10⁶ cells/ml の菌量に PC-904 を作用させた場合, 3.13, 31.3 μ g/ml で殺菌的な作用が認められた。

Fig. 20, 21 は PC-904 3.13 μ g/ml 作用 4 時間後の走査電顕像で, 菌体内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. 22 は PC-904 31.3 μ g/ml 作用 4 時間後の走査電顕像で, 3.13 μ g/ml 作用の場合と同様な抗菌像を認めた。

このように PC-904 の殺菌作用が現われる時点でも, CBPC 作用時にみられたような典型的な spheroplast 様構造を観察することができなかつた。

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, PC-904 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 を用いて spheroplast 形成能について検討を行なった。その結果は Table 1 に示すように, PC-904 の 100 μ g/ml を 3 時間作用させた場合, stabilized と shocked の菌数はそれぞれ 2.1 \times 10⁴, 1.3 \times 10⁴ cells/ml であり, CBPC の 500 μ g/ml 作用では 2.4 \times 10⁵, 2.5 \times 10⁴ cells/ml であった。すなわち PC-904 では stabilized と shocked で菌数の差が見られず, spheroplast が形成されにくいことがわかった。一方, CBPC 作用では約 10 倍の差が見られ, spheroplast が高率に形成されることがわかった。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

走査電子顕微鏡は 1965 年以来製品化されてきたが, 当初微生物学の分野ではあまり用いられなかつた。しかし, 近年細菌細胞に抗生物質を作用させたとき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^{15)~18)}。私どもはすでに T-1220, CBPC, Ticarcillin などの薬剤を *Ps. aeruginosa* に作用させたときの形態変化について検討を行ない, T-1220 を作用させた場合¹⁹⁾, 2,500 μ 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 spheroplast 様構造が観察できないことを報告した。

一方 CBPC や Ticarcillin⁹⁾ では PERKINS¹⁰⁾, PRIOR¹¹⁾ らが報告した結果とほぼ同様で, 高濃度 (2,500 μ g/ml) 作用において典型的な spheroplast 様構造を観察するこ

Fig. 4 Untreated *Ps. aeruginosa* E-2 cells observed by scanning electron microscope

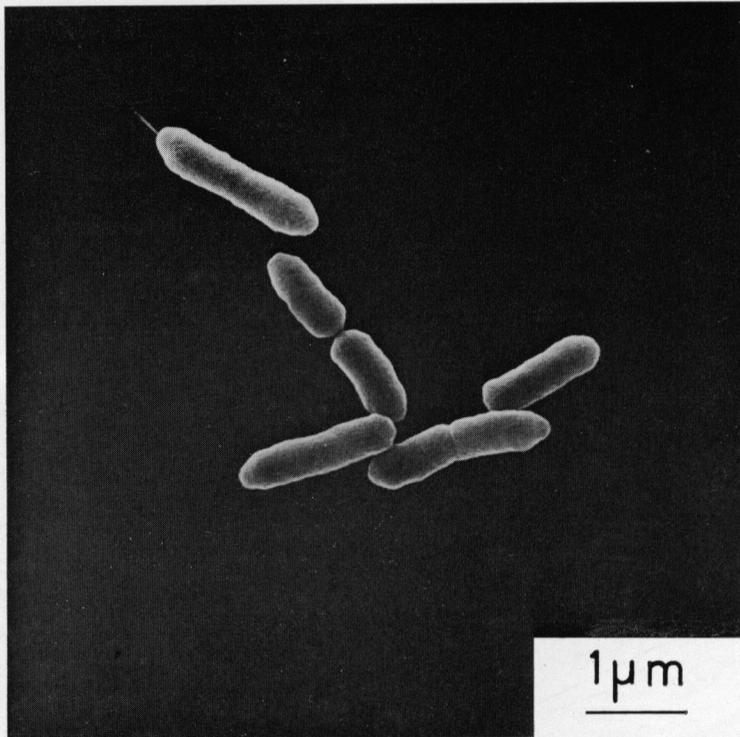


Fig. 5 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 3.13 μg/ml of PC-904 for 1 hour

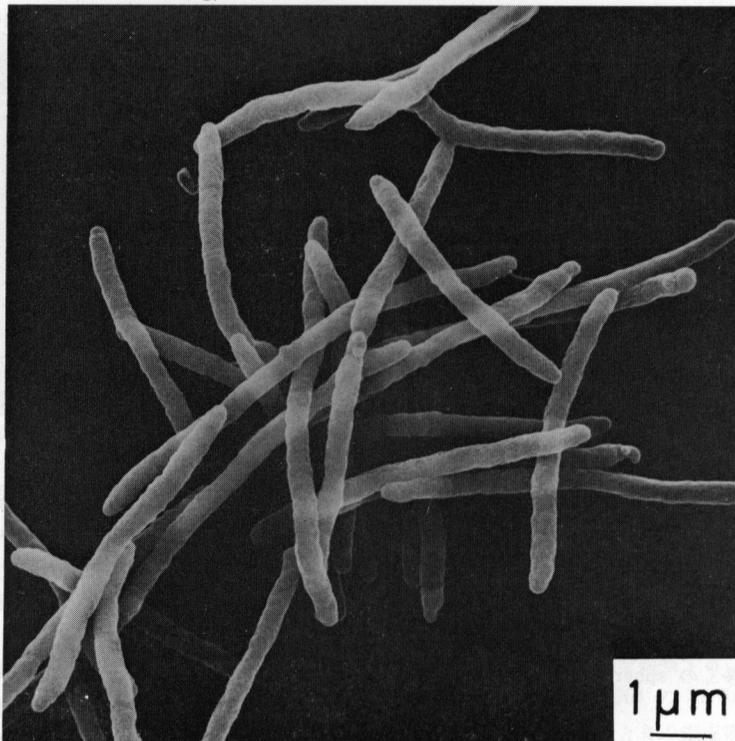


Fig. 6 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 3.13 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 2 hours

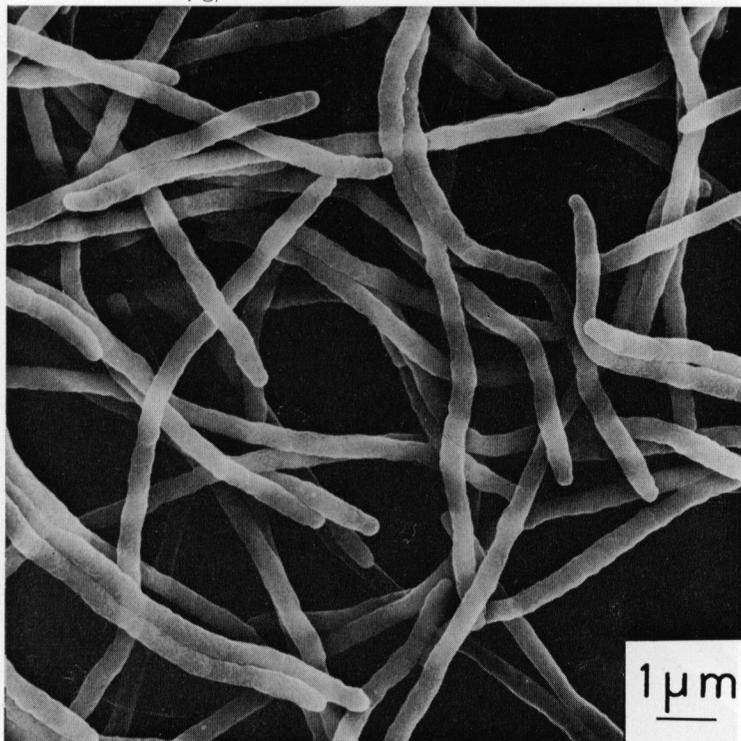


Fig. 7 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 3.13 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 4 hours

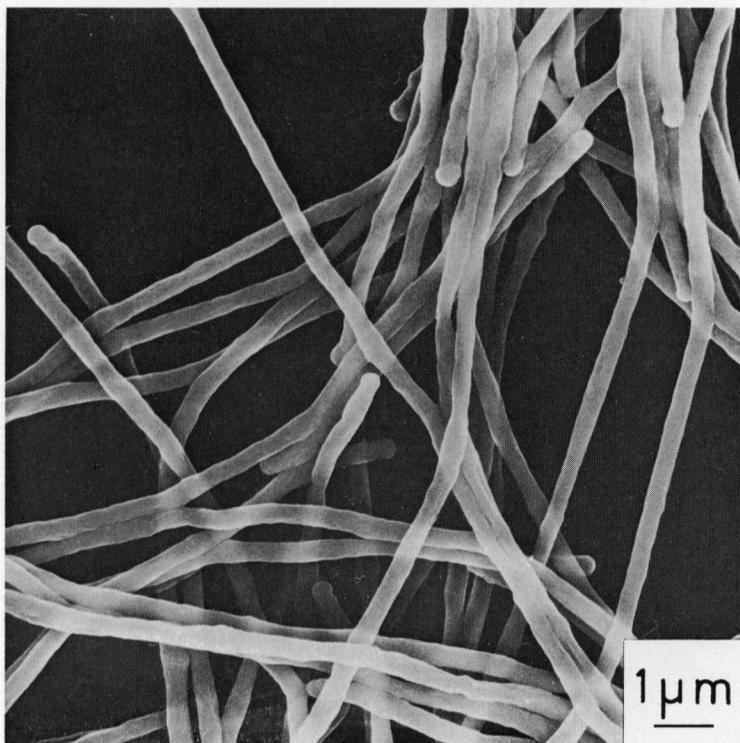


Fig. 8 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 31.3 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 1 hour

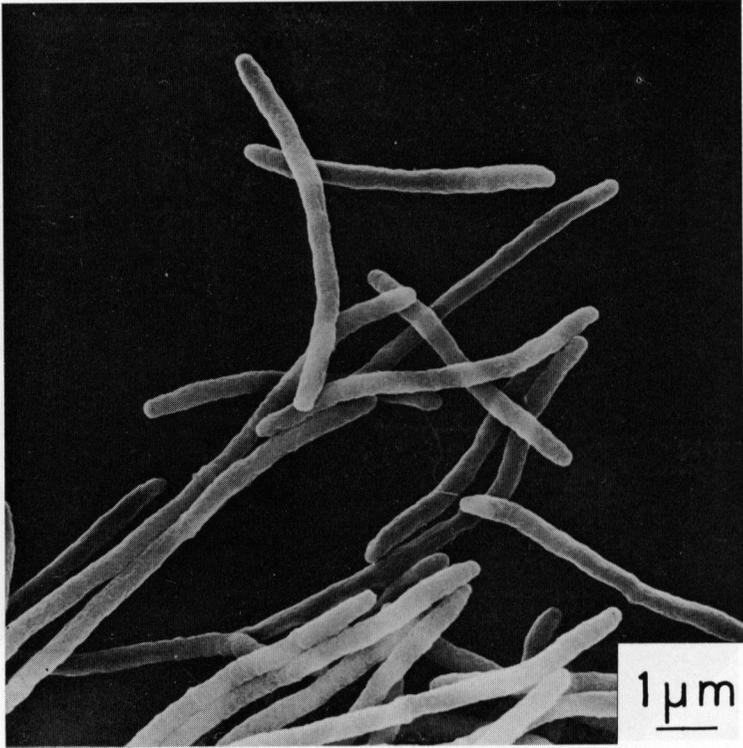


Fig. 9 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 31.3 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 2 hours

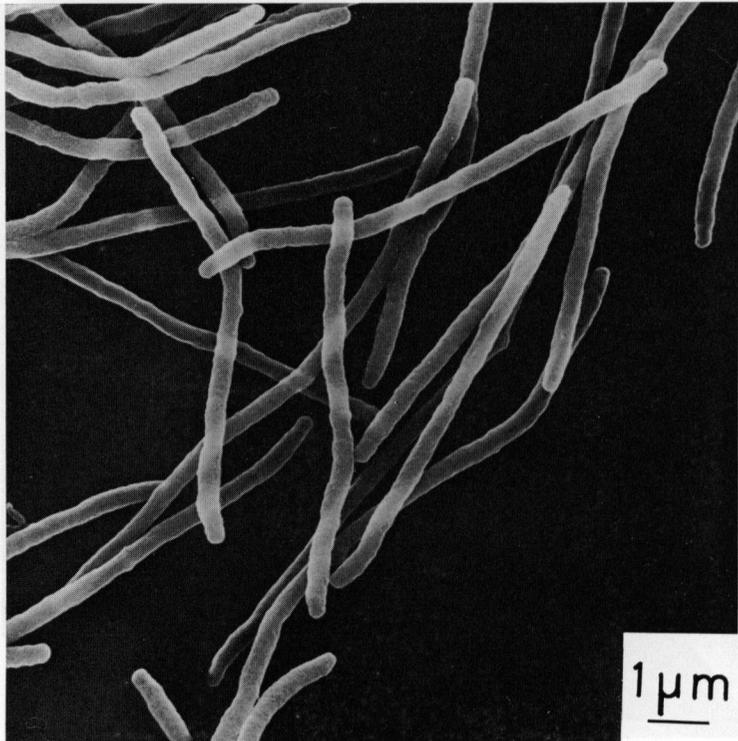


Fig. 10 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 31.3 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 4 hours

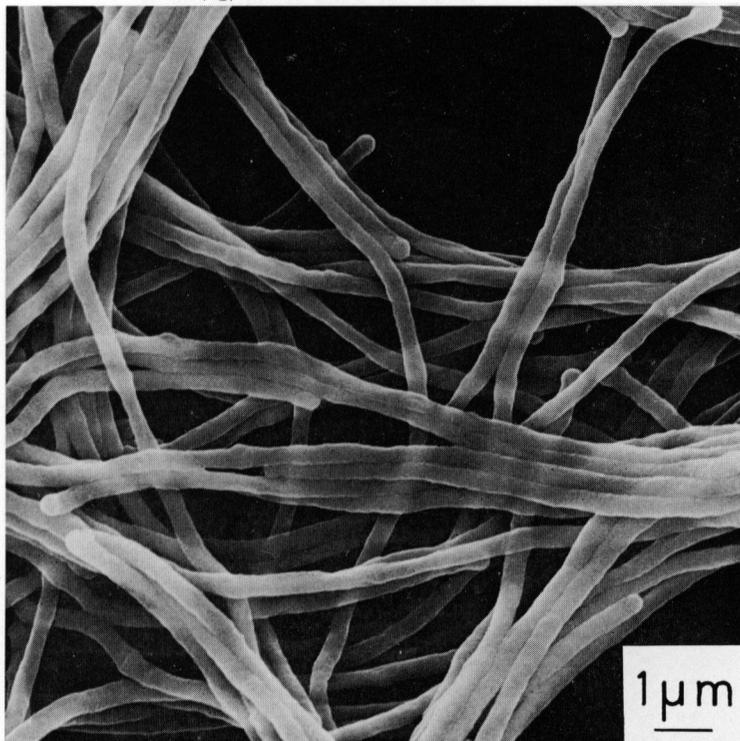


Fig. 11 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 1 hour

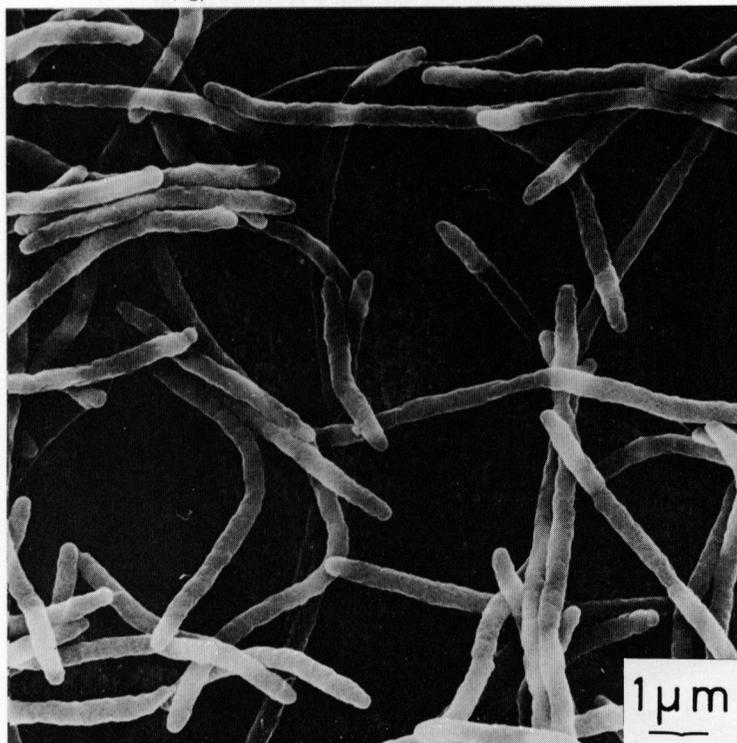


Fig. 12 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 2 hours

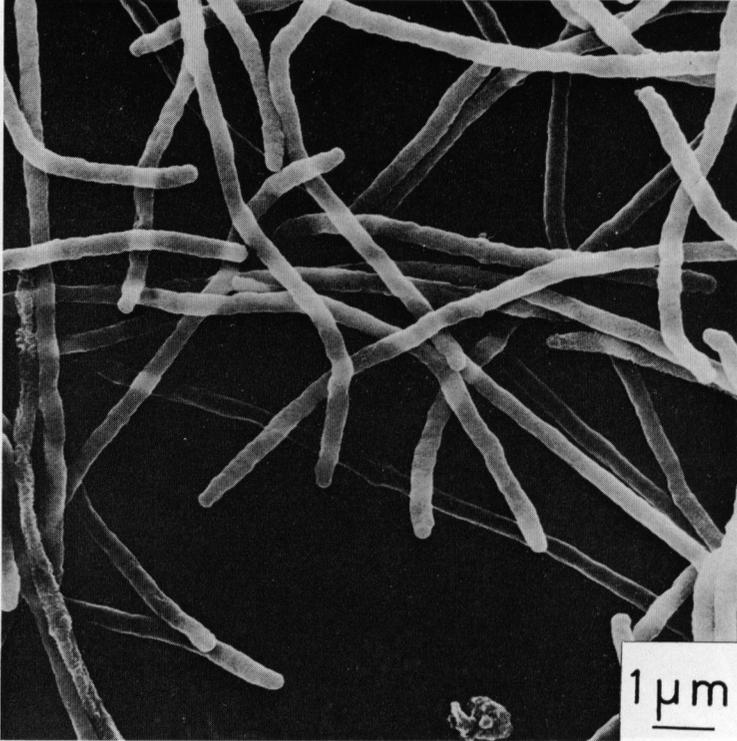


Fig. 13 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 4 hours

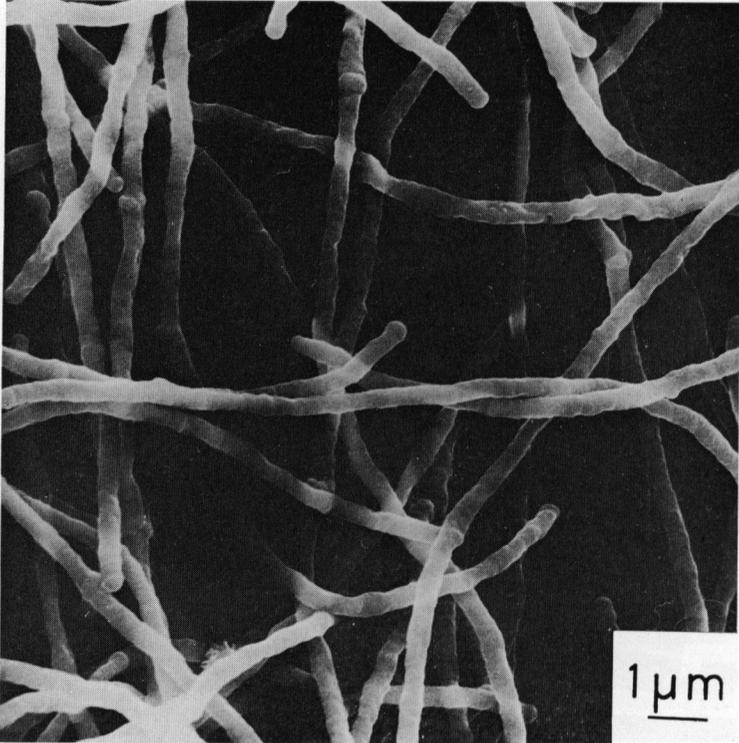


Fig. 14 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 1 hour

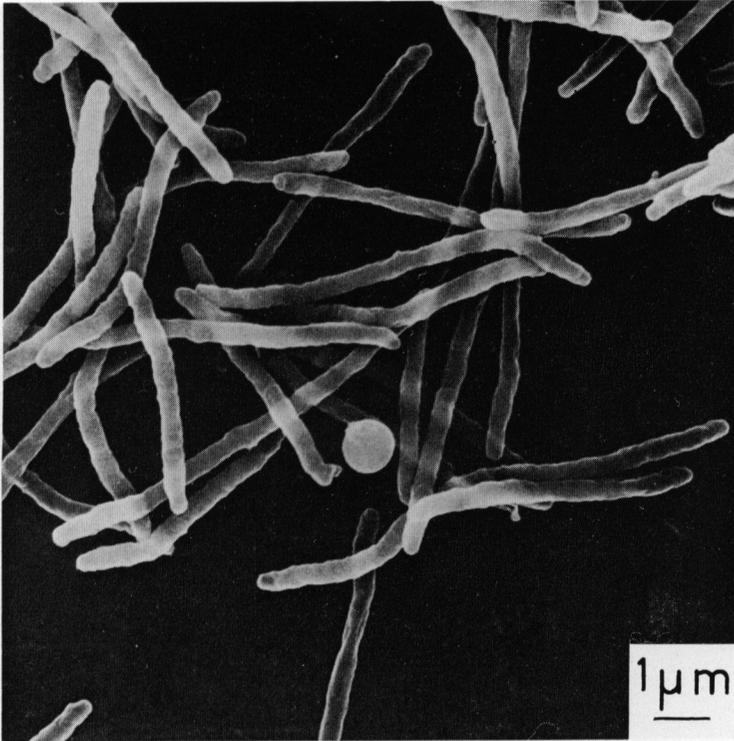


Fig. 15 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 2 hours

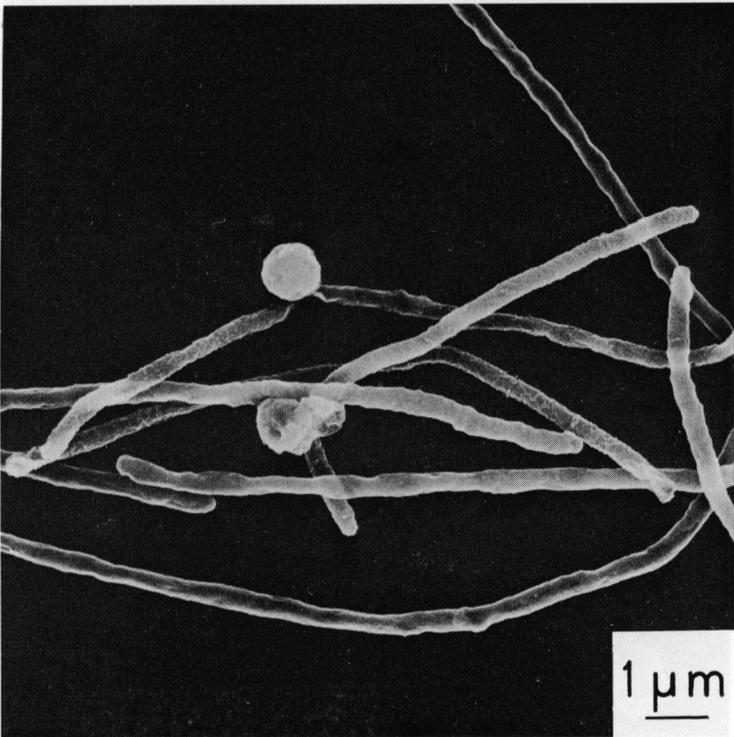


Fig. 16 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 4 hours

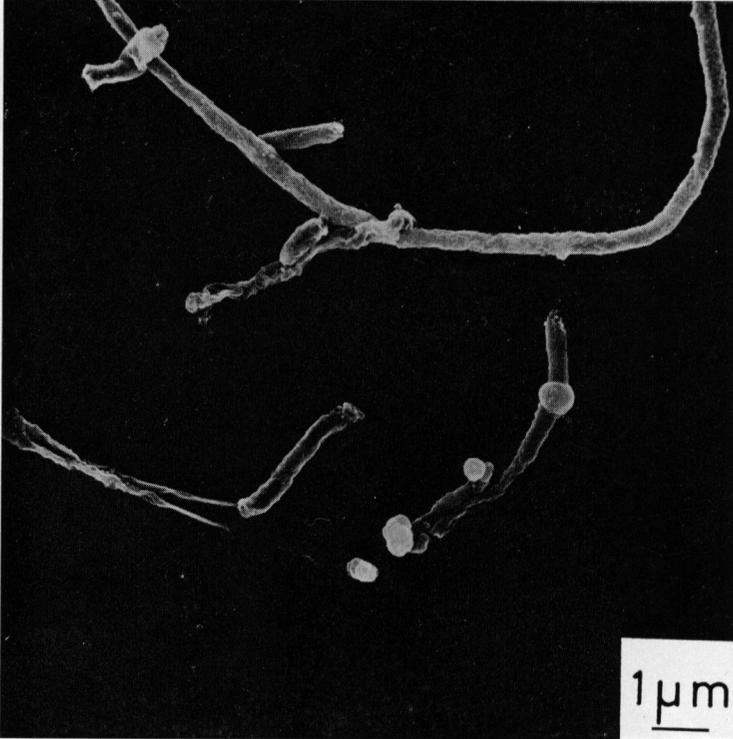


Fig. 17 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 1 hour

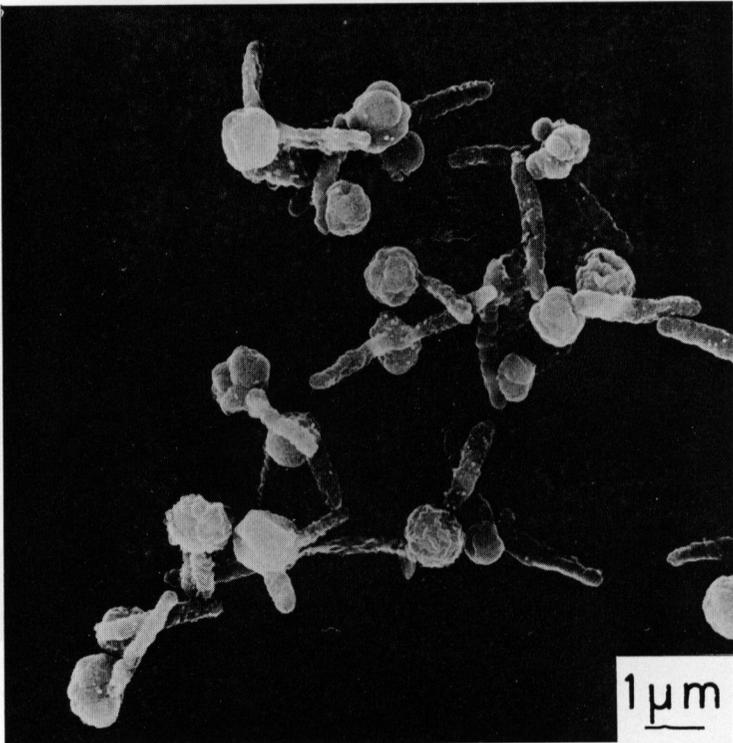


Fig. 18 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 2,500 $\mu\text{g/ml}$ of CBPC for 2 hours

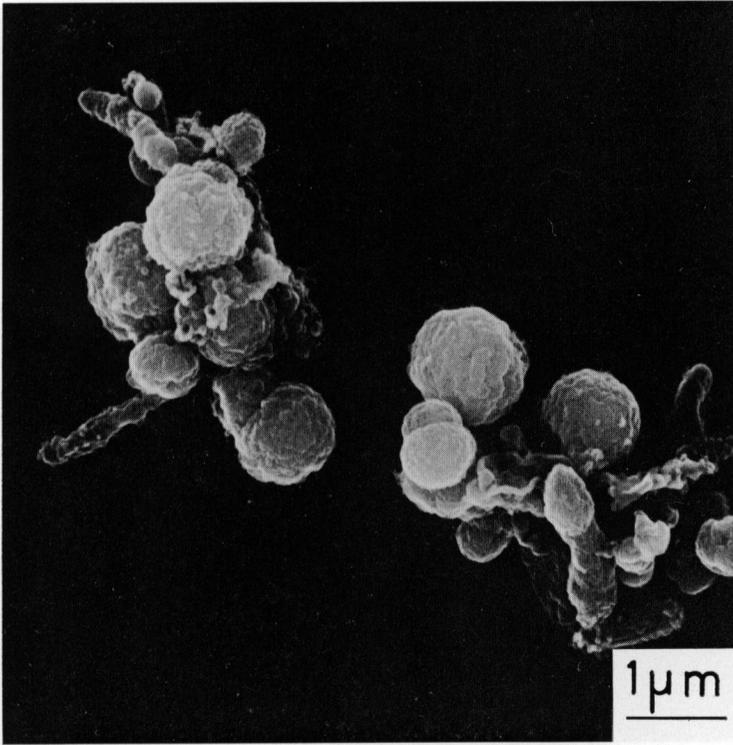


Fig. 19 Effect of PC-904 on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2

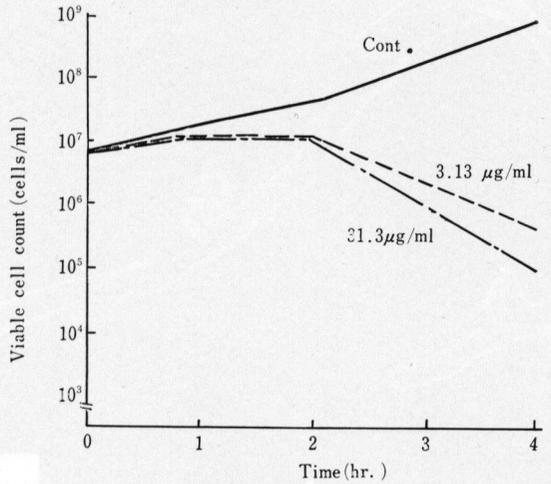


Fig. 20 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 3.13 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 4 hours

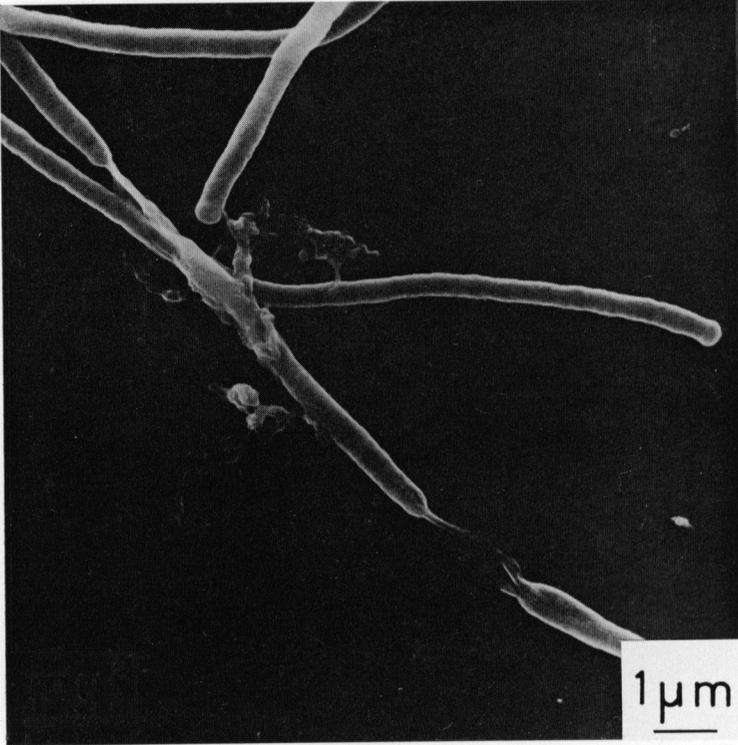


Fig. 21 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 3.13 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 4 hours

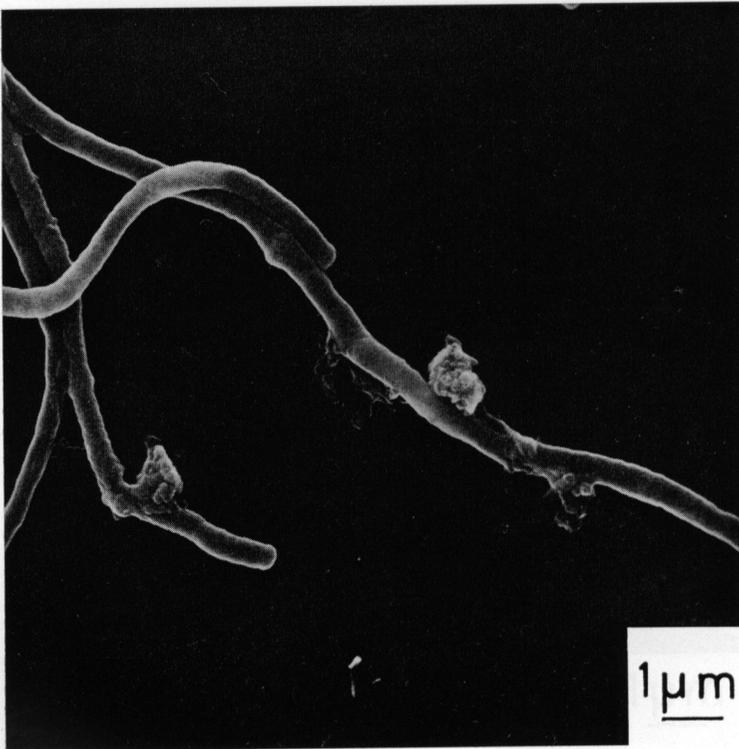


Fig. 22 Scanning electron micrograph of *Ps. aeruginosa* E-2 exposed to 31.3 $\mu\text{g/ml}$ of PC-904 for 4 hours

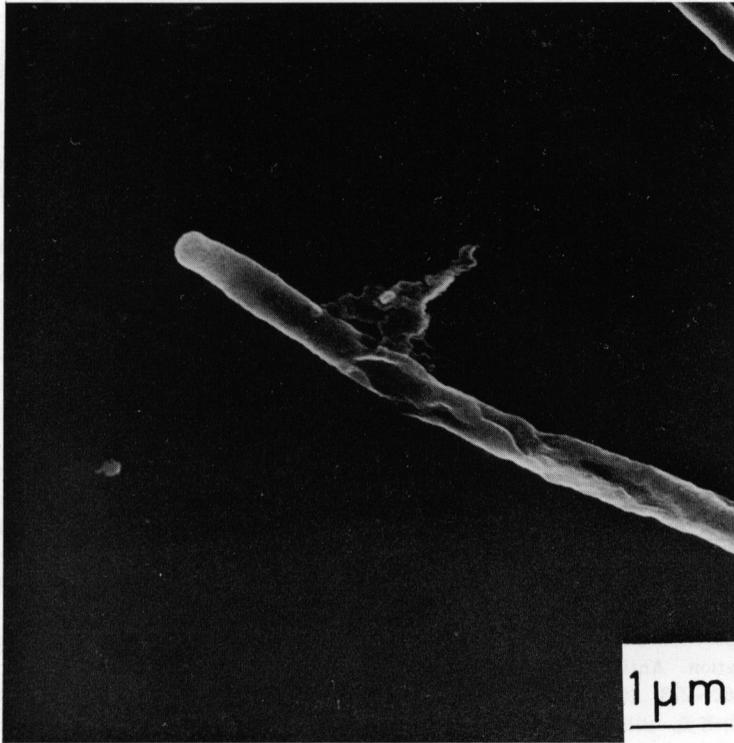


Table 1 Comparison of the viable counts of stabilized and osmotically shocked cultures (*Ps. aeruginosa* E-2)

Exposure	Controls		Treated			
	Stabilized	Shocked	PC-904 (100 $\mu\text{g/ml}$)		CBPC (500 $\mu\text{g/ml}$)	
			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	2.1×10^4	1.3×10^4	2.4×10^5	2.5×10^4

とができた。

今回私どもは新しく住友化学工業株式会社で開発された PC-904 の *Ps. aeruginosa* に対する形態変化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、T-1220 を作用させた場合と同様で、殺菌作用が現われる時期でも CBPC 作用時のような spheroplast 様構造を観察することができなかった。また stabilizer を用いて行なった spheroplast 形成能の結果からも PC-904 は CBPC に比べ spheroplast を形成しにくいことがわかった。従って PC-904 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。

最近、*Ps. aeruginosa* に有効な半合成 penicillin が数

種類開発されており^{4)~8)}、これらの化合物はその抗菌作用形式から比較的菌量の影響を受けにくい、CBPC, Sulbenicillin, Carfecillin, Ticarcillin などのグループと、菌量の影響を受けやすい T-1220, PC-455, PC-904, BAY f 1353 などのグループに大別されるように思われる。

私どもはこれらの化合物の *Ps. aeruginosa* に対する形態変化について検討を行なった結果、後者に属する化合物は spheroplast があまり形成されないことがわかった。これら両グループの抗菌作用機作が本当に異なるのかどうか、また化学構造と抗菌活性の関連性などに興味を持たれる。

IV. 要 約

今回私どもは新しく住友化学工業株式会社で開発された PC-904 の *Pseudomonas aeruginosa* E-2 に対する形態変化について、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った結果、次のような成績がえられた。

1) 位相差顕微鏡による観察では、PC-904 を作用させたところ、菌体は著しく elongation し、filament を形成するだけで、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に、PC-904 の 10 MIC 濃度を作用させた場合、あるいは殺菌作用がみ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、PC-904 は Carbenicillin に比べ、spheroplast が形成されにくいことがわかった。

文 献

- 1) NOGUCHI, H.; Y. EDA, H. TOBIKI, T. NAKAGOME & T. KOMATSU : PC-904, a novel broad-spectrum semisynthetic penicillin with marked antipseudomonal activity : Microbiological evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 9 : 262~273, 1976
- 2) 西野武志, 平井芳美, 山田作夫, 中谷和子, 故中沢昭三 : 新しい β -lactam 系抗生物質 PC-904 に関する細菌学的評価。Chemotherapy 26 S-2 : 58~78 1978
- 3) 第 25 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム II, PC-904 抄録集, 1977
- 4) KLASTERSKY, J. & D. DANEAU : Comparison between carbenicillin and a α -carboxyl-3-thienylmethyl penicillin (BRL 2288), a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Ther. Res.* 14 : 503~509, 1972
- 5) WALD, E. R. ; H. C. STANDIFORD, B. A. TATEM, F. N. CALTA & R. B. HORNICK : BL-P 1654, ticarcillin and carbenicillin : *In vitro* comparison alone and in combination with gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 7 : 336~340, 1975
- 6) RETSEMA, J. A. ; A. R. ENGLISH & J. E. LYNCH : Laboratory studies with a new broad-spectrum penicillin, pirbenicillin. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 9 : 975~982, 1976
- 7) BODEY, E. P. & T. PAN : Mezlocillin : *In vitro* studies of a new broad-spectrum penicillin. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 11 : 74~79, 1977
- 8) 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 : 731~746, 1977
- 9) 西野武志, 尾花芳樹, 後藤直正, 山岸純一, 中沢昭三 : 緑膿菌に対する Ticarcillin の抗菌像について。Chemotherapy 25 : 2428~2436, 1977
- 10) PERKINS, R. L. & A. S. KLAINER : Carbenicillin induced alterations in the surface morphology of bacteria : A scanning-beam electron microscope study. *Antimicrob. Agents & Chemother.* p.100~104, 1970
- 11) 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
- 12) 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
- 13) ANDERSON, T. F. : Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 13 : 130~134, 1951
- 14) HORIDGE, G. A. & S. L. TAMM : Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science* 163 : 817~818, 1969
- 15) GREENWOOD, D. & F. O. GRADY : Antibiotic induced surface changes in microorganisms demonstrated by scanning electron microscopy. *Science* 163 : 1076~1077, 1969
- 16) 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
- 17) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA : Cephalixin-induced morphological alterations in the surface structure of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* : Demonstrated by scanning electron microscopy. *Jpn. J. Microbiol.* 17 : 383~392, 1973
- 18) ZIMMERMAN, S. B. & E. O. STAPLEY : Relative morphological effects induced by cefoxitin & other β -lactam antibiotics *in vitro*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 9 : 318~326, 1976
- 19) 西野武志, 山岸純一, 渡辺泰雄, 中沢昭三 : 緑膿菌に対する T-1220 の抗菌像について。Chemotherapy 25 : 755~764, 1977

MORPHOLOGICAL ALTERATION OF
PSEUDOMONAS AERUGINOSA E-2 BY PC-904

TAKESHI NISHINO, JUNICHI YAMAGISHI, YOSHIMI HIRAI and SHOZO NAKAZAWA
Department of Microbiology, Kyoto Collge of Pharmacy

The effects of PC-904 and carbenicillin on the morphology of *Pseudomonas aeruginosa* E-2 were examined with the phase contrast microscope and scanning electron microscope. The following results were obtained.

1. With a phase contrast microscope, exposure to PC-904 resulted in the fomation of marked filamentous cells. However, the spheroplast-like structures could not be observed by the treatment with PC-904. Exposure to carbenicillin resulted in the formation of spheroplast-like structures.

2. With a scanning electron microscope, typical spheroplast-like structures could not be observed when PC-904 was allowed to act on *Ps. aeruginosa* E-2 cells.

3. Possible influence on the ability to form spheroplasts was studied using stabilizers. As a result, it was found that spheroplasts were not formed when PC-904 was allowed to act on *Ps. aeruginosa* E-2 cells.

The morphological alterations of *Pseudomonas aeruginosa* E-2 treated with carbenicillin observed in this study were similar to those noted by PERKINS and PRIOR