

培養細胞に対する肺炎桿菌の吸着と抗生物質の影響

高橋昌巳・一幡良利・吉田英一

佐々木千鶴子*・与那覇朝英*

聖マリアンナ医科大学微生物学教室, 同 中央電子顕微鏡室*

(昭和 63 年 5 月 28 日受付)

HeLa 細胞の形成した monolayer に肺炎桿菌を含む培養液を重層し, 菌の細胞吸着条件を求めた。その結果, 10^6 CFU/ml 以下の菌を含む培養液では 3 時間後の細胞吸着菌数が $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml に達した。肺炎桿菌を 10^6 CFU/ml 含むこの条件下で, AMK の *in vitro* の MIC 濃度の 10 倍から 100 倍濃度を作用させ, 菌の HI 寒天培地に発育できなくなる作用時間は 10 MIC で 18 時間, 100 MIC で 6 時間後であった。しかしながら, L-ブロス中では 100 MIC 18 時間作用後もなお 48 時間後に菌の発育が認められた。

5 種類の抗生物質の *in vitro* での MIC の 100 倍濃度を 6 時間作用させた結果では, DOXY が AMK と同様の結果を示したが, β -lactam 系抗生物質では HI 寒天培地で $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml 発育し, L-ブロス中では $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 希釈管まで菌の発育が認められた。

形態像は AMK 100 MIC 作用後の光学顕微鏡的变化は認められなかったが, 走査電子顕微鏡的には HeLa 細胞と菌の両方が障害を受け, AMK 除去後では細胞と菌の両方の回復してきた像が認められた。 β -lactam 系抗生物質では菌の伸長と内容物の吐出が光学顕微鏡下で認められた。

Key words: 肺炎桿菌, 培養細胞吸着, 抗生物質の影響

Compromised host などの重症感染症の患者に対して, より殺菌的に作用する抗生物質が要望され, β -lactam 系抗生物質の大量投与^{1,2)}, β -lactam 系抗生物質と aminoglycoside 系抗生物質^{3,4)}, β -lactam 系抗生物質とニューキノロン系抗生物質との併用⁵⁾などが研究あるいは試みられている。しかしながら, 重症感染症の場合大量投与しても薬剤濃度が感染局所に充分量到達しえないことがある。

先に, 肺炎桿菌を感染させた実験重症感染マウスに対して AMK を大量投与し, 生物学的ならびに病理学的に検討したところ, 血管内の菌は消失したにもかかわらず臓器内に多数の菌が認められ, マウスを助けられなかった⁶⁾ことから培養細胞を用いて, 肺炎桿菌の吸着細胞と抗生物質との関係を調べたところ興味ある結果が得られたので報告する。

I. 材料と方法

供試菌: 臨床材料より分離した肺炎桿菌 K-9 株の 18 時間培養菌を島津分光光度計 430 nm で 0.5 OD に調整した菌液の希釈菌液を接種菌液とした。

供試培地: 細胞培養には RPM-10 (日本製薬) に calf serum を 10% の割合に加えて使用し, 抗生物質の

測定にはさらに所定濃度の抗生物質を加えた培養液で処置した。

菌吸着細胞の生菌数測定にはハートインフュージョン寒天培地 (以下 HI 寒天培地と略す), トリプトソイブロス (以下 TS ブロスと略す) および L-form 用のブロス (以下 L-ブロスと略す) を用いた。

供試細胞: RPM-10 培養液に浮遊させた HeLa 細胞を 4.5 cm シャーレに 3 ml を分注し, 37°C に 5~7 日培養して monolayer を形成した細胞に供試菌を接種した。

供試薬剤: アミカシン (AMK), ピペラシリン (PIP C), セファビリン (CEPR), セフォチアム (CTM) およびドキシサイクリン (DOXY) など 5 薬剤を使用した。

生菌数の測定: 菌接種後の培養上清をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で $10^{-1} \sim 10^{-5}$ に連続 10 段階希釈した液をミスラー法で HI 寒天培地上に滴下し, 37°C で培養した。細胞吸着菌については培養上清を除去した細胞を PBS で 3 回洗浄した後, 1 ml の PBS に浮遊させて凍結融解を 2 回繰り返し, 細胞を破壊した液中の菌をミスラー法および TS ブロス, L-ブロス中の発育の有無で判定した。

* 川崎市宮前区菅生 2-16-1

〔形態的観察〕

光学的顕微鏡による観察：先に記載した方法に準じ⁷⁾、パイロット製図用インクを用いた陰性染色により観察した。

走査電子顕微鏡による形態的観察：培養上清液を除去した後、菌吸着細胞を RPM-10 培地で静かに洗浄した後、2.5% グルタルアルデヒド加 PBS を重層し、2 時間放置後さらに同じ濃度のグルタルアルデヒド加 PBS に取り替え、20 時間放置した後 1% オスミウム酸で 2 時間放置してから先に記載した方法に準じ⁸⁾、エタノール系列で脱水、臨界点乾燥を行ない、走査型電子顕微鏡（日本電子 JSM U-3）で観察した。

II. 成績

1. 細胞吸着菌量と経時の変化

10⁶ CFU/ml を含む培養液を HeLa 細胞に重層した後、細胞に吸着した菌の経時の変化を観察し、Fig. 1 にその変動を示した。

培養上清液では接種菌量が 30 分で減少したが、90 分から上昇し、6 時間後には 10⁸CFU/ml に達した。しかしながら、菌吸着細胞では菌接種後 30 分後から経時的に増加が認められ、3 時間後では 10⁶ CFU/ml に達した。

2. 接種菌量と菌の細胞吸着

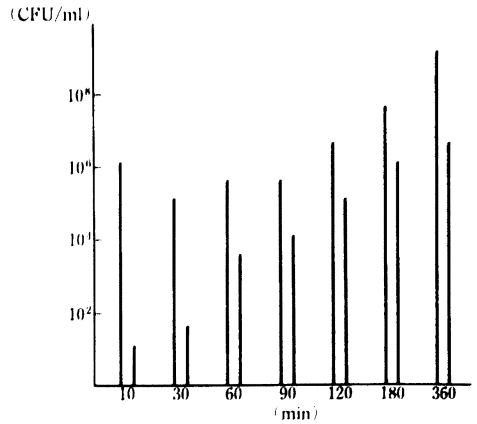


Fig. 1. Viable cell count of *K. pneumoniae* strain in supernatant of the medium and adherence to HeLa cells

本菌の *in vitro* における AMK の MIC は 3.12 μ g/ml, MBC は 6.25 μ g/ml を示した。この AMK を最終濃度が 1/3 MIC, 1 MIC, 3 MIC, 10 MIC, 30 MIC, 100 MIC 含まれるように作製した培養液を菌接種後 90 分後の菌吸着細胞上清に重層し、2 時間後の生残菌数を測定した。

Table 1. Adherence of *K. pneumoniae* to HeLa cells in the presence of various amikacin concentrations (incubation period 90 min)

	No. of organisms						
	with AMK (MIC μ g/ml)						medium alone
	0.3	1	3	10	30	100	
Supernatant	5.7 × 10 ³ *	9.3 × 10 ²	3.5 × 10	0	0	0	1.4 × 10 ⁶
HeLa cells	2.6 × 10 ⁴	1.2 × 10 ³	5.3 × 10 ²	2.5 × 10 ²	8.1 × 10	1.2 × 10	4.1 × 10 ⁴

* CFU/ml

Table 2. Relation between amount of *K. pneumoniae* inoculated and adherence to HeLa cells in amikacin containing medium (incubation period 180 min)

Inoculum size	No. of organisms and medium				
	with AMK (μ g/ml)			without antibiotics	
	1 MIC	10 MIC	100 MIC	supernatant	adherence to HeLa cells
1.5 × 10 ⁷	7.6 × 10 ⁵	5.4 × 10 ⁴	4.1 × 10 ⁴	7.8 × 10 ⁸	4.6 × 10 ⁶ *
2.3 × 10 ⁶	3.2 × 10 ⁴	1.8 × 10 ³	1.2 × 10 ²	5.4 × 10 ⁶	2.9 × 10 ⁵
2.4 × 10 ⁵	1.2 × 10 ³	2.5 × 10 ²	7.9 × 10	3.8 × 10 ⁵	1.1 × 10 ⁵
1.9 × 10 ⁴	1.8 × 10 ³	2.5 × 10 ²	3.1 × 10	4.6 × 10 ⁴	7.1 × 10 ⁴
1.4 × 10 ³	1.6 × 10 ³	2.4 × 10 ²	3.0 × 10	4.4 × 10 ⁴	5.8 × 10 ⁴
2.7 × 10 ²	1.6 × 10 ³	2.4 × 10 ²	3.0 × 10	2.4 × 10 ²	5.0 × 10 ⁴

* CFU/ml

Table 1 に示したように培養上清液では 3 MIC まで生残菌が認められたが、10 MIC 以上では認められなかった。しかしながら、菌細胞吸着 100 MIC 濃度でも生残菌が認められた。

3. AMK と接種菌量

AMK の濃度と接種菌量との関係は Table 2 に示したように、 $2.7 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^7$ CFU/ml 接種し 3 時間後の菌吸着細胞の上層に 1 MIC、10 MIC、100 MIC を含む培養液を重層した。また、対照として抗生物質を含まない培地を重層し、2 時間後の生残菌数を求めた。

対照の培養上清液の菌量は 1.5×10^7 CFU/ml 接種以外は接種菌量とほぼ同じ菌量を示したが、菌吸着細胞では接種菌量が少ないほど菌量が増加し、ほぼ 10^5 CFU/ml に達した。 1.5×10^7 CFU/ml 菌量では上清中の菌量が増加したのに対し、細胞吸着では 10^6 CFU/ml に留まった。

AMK 作用では接種菌量が 10^6 CFU/ml 以下では 1 MIC 群が 1 log、10 MIC 群が 2 log、100 MIC 群が 3 log 以下の減少をみせた。しかしながら、 1.5×10^7 CFU/ml 菌接種量では対照に比較して 1 MIC では 0.5 log、10 MIC、100 MIC とともに 2 log の減少が認められた。

4. AMK の作用時間と生残菌

接種菌量を 10^6 CFU/ml とした以外は前述と同様の条件で菌吸着細胞に AMK 含有培地を重層した後、90 分から 18 時間まで作用させ、経時的にその生残菌を測定し、併せて TS プロス、L-プロスに培養し、48 時間後に混濁してきた試験管を陽性とした。

Table 3 に示したように、3 時間後までは各濃度とも HI 寒天培地上に集落の形成が認められ、6 時間後では 100 MIC、18 時間後では 10 MIC 以上の濃度で HI 寒天培地上に菌の発育を認めることができなかつた。また、

TS プロス中でも同様の傾向を示した。しかしながら、L-プロス培養では各濃度とも 18 時間作用後においてもなお菌の発育が認められ、また、抗生物質との接触時間が短く、濃度が低ければ対照に比較して、菌の減少率が低い傾向を示した。

5. 供試抗生物質の 100 MIC 濃度と菌

前述のように、100 MIC 作用後でも菌が発育してくることから 5 種類の抗生物質の *in vitro* における MIC を求め、その 3 時間菌吸着細胞の上清に 100 MIC 濃度を含む培養液を 6 時間作用させてから、前述に記載した方法で洗浄したのち、HI 寒天、TS プロス、L-プロスに培養し、48 時間後の菌の発育状態を比較した。

Table 4 に示したように、AMK、DOXY では HI 寒天および TS プロスでも菌の発育が認められなかった。しかしながら、L-プロスでは 10^{-2} 希釈管まで菌の発育が認められた。それに対し β -lactam 系抗生物質では HI 寒天培地上で $2.4 \times 10^2 \sim 10^8$ CFU/ml の菌の発育が認められ、TS プロスでも同様の結果を得たが、L-プロス中では $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 希釈管まで菌の発育が認められた。

Fig. 2 は AMK 作用 6 時間後の細胞を洗浄したのち、さらに、10 段階希釈した菌の 48 時間後の L-プロス中の発育状態を示した。右の SW-1 は 1 回洗浄後の上清、SW-2 は 2 回洗浄後の上清を培養したものである。SW-1 は AMK が残存したためか菌の発育が抑制されたが、SW-2 では菌の発育が認められた。しかしながら、これらは HI 寒天培地上では集落の形成が認められなかつた。

6. 形態的観察

供試抗生物質の 100 MIC を作用させてから 2 時間後の菌の形態を陰性染色法で観察し、Fig. 3 に示した。対照の肺炎桿菌像では大きな莢膜が明瞭に認められ (3-1)、AMK 処理では莢膜の不明瞭な形態が認められた

Table 3. Effect of *K. pneumoniae* in amikacin containing medium on adherence to HeLa cells (incubation period 1.5h, 3h, 6h and 18h)

Medium	Incubation period (h)							
	1.5		3		6		18	
	HI	L	HI	L	HI	L	HI	L
with AMK								
100 MIC	1.2×10^2	10^3	5.4×10	10^3	0	10^2	0	10
10 MIC	1.8×10^3	10^4	1.5×10^3	10^4	1.1×10^2	10^3	0	10^2
1 MIC	3.4×10^4	10^5	3.7×10^4	10^5	6.1×10^2	10^4	1.2×10^2	10^3
without antibiotic	2.9×10^5	10^6	7.2×10^5	10^6	5.6×10^6	10^7	ND	

HI : heart infusion agar

L : L-form broth

ND : not done

Table 4. Effect of *K. pneumoniae* in a medium containing one of 5 different antibiotics (100 MIC) on adherence to HeLa cells for 6 h (incubation 48 h)

Medium with antibiotics (100 MIC)	No. of organisms		
	growth on III agar	growth in TS broth	growth in L broth
AMK	0	0	10^2
CEPR	2.4×10^2	10^2	10^4
CTM	$3.6 \cdot 10^2$	10^2	10^5
PIPC	2.4×10^3	10^3	10^6
DOTC	0	0	10^2



Fig. 2. Growth of *K. pneumoniae* strain K-9 in antibiotic-free L-form medium for 48 h, after exposure to 100 MIC of amikacin

(3-2).

β -lactam 系抗生物質のうち、CTM、CEPR では莢膜が認められず、菌の伸張と内容物の吐出が認められた(3-3、3-4)のに対し、PIPC では長く伸張した菌体の周囲が大きな莢膜に包まれた像が認められた(3-5)。

一方、形態的に不明瞭な AMK を走査電子顕微鏡により観察し、Fig. 4 に示した。4-1 は HeLa 細胞に吸着した3時間後の未処理の菌の形態像、4-2 は 100 MIC 作用6時間後の細胞上の菌の形態像であるが、細胞の繊毛も菌も活性を失ったように見える。さらに、AMK 含有培養液を除去した後、抗生物質を含まない培養液で48時間培養し続けた細胞像を4-3 に示した。細胞の繊毛の立ち上がりりと少数の菌の回復像が認められた。

III. 考 察

重症菌感染症に対する抗生物質の大量投与による治療法が行なわれているが、必ずしも殺菌するとは限らない^{5,6,9)}。一部の抗生物質は細菌に対する作用が一定濃度で作用するため、至適投与量が必要であるといわれている¹⁰⁾。

培養細胞に対する抗生物質の試験は sub-MIC 濃度における細菌の細胞吸着阻止に関する研究が中心に行なわれている¹¹⁾。

生体に抗生物質を投与した場合、抗生物質の種類により異なるが、臓器内では比較的早期に消退するため、感染局所の生残菌はかなり存在するものと考えられる。

先に、重症感染マウスに AMK を sub-MIC 濃度から 1000 MIC まで投与したが、大量投与した群に延命効果が認められた⁹⁾。しかし、マウスは致死したので、今回、培養細胞に対して肺炎桿菌を吸着、増殖させた後、抗生物質の抗菌力およびその形態的变化について検討を加えた。

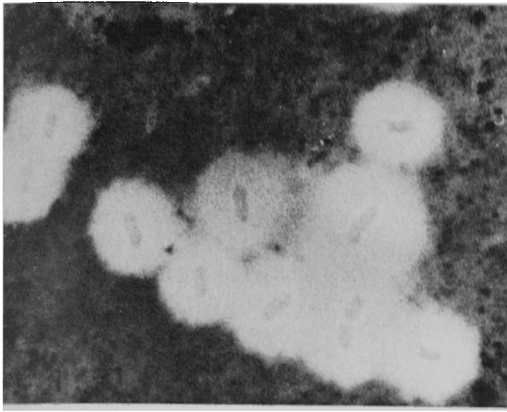
Monolayer を形成した培養細胞は電子顕微鏡的に見ると2~3層からなっている。したがって、菌を含む培養液を重層した場合、この層の間に菌が侵入し、集落を形成するものと考えられる。

一方、肺炎桿菌の凍結融解に対する菌の安定性は2~3回の繰り返しでは生菌数に影響を与えない¹²⁾ことから菌吸着細胞を凍結融解して生菌数を求めた。

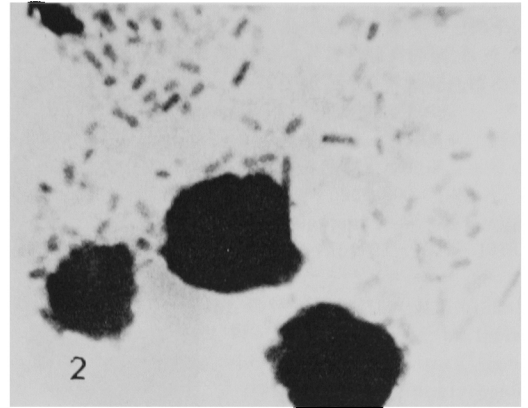
HeLa 細胞に吸着する肺炎桿菌の関係は接種菌量と時間が影響し、 10^6 CFU/ml 以下では吸着した菌量が3時間には $10^4 \sim 10^5$ 個に達した。抗生物質の感受性試験は $10^6 \cdot 10^8$ 個で行なわれており、 10^6 CFU/ml にほぼ匹敵する条件として 10^6 CFU/ml 菌を含む培養液を重層し、3時間後を用いた。

菌吸着細胞に対する AMK の作用は *in vitro* で測定した MIC の 10 倍あるいは 100 倍量を6時間以上作用させなければ菌の発育を阻止することができない。しかも、L-ブロスを用いると 18 時間連続作用させても菌が発育してくることが証明され、 β -lactam 系抗生物質においては2~3log 多く増殖することが認められている。このことは生体内においてもこのような現象が現われ、抗生物質の投与後、菌が L-form 化し、菌が生残することと考えられる。

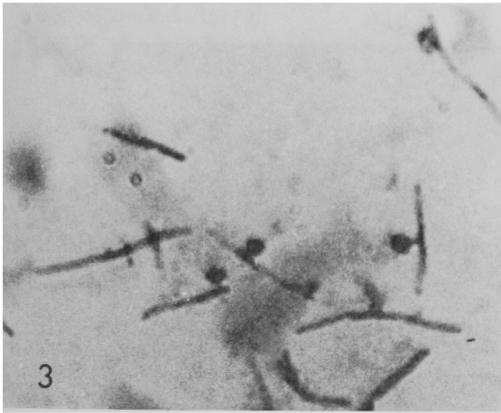
抗生物質作用後の細菌の形態的变化は抗生物質の種類により異なることが知られている。これらの形態的变化は多くの場合、位相差顕微鏡下で行なわれているが、莢膜保有株では陰性染色で光学顕微鏡下で十分に観察できる¹³⁾。



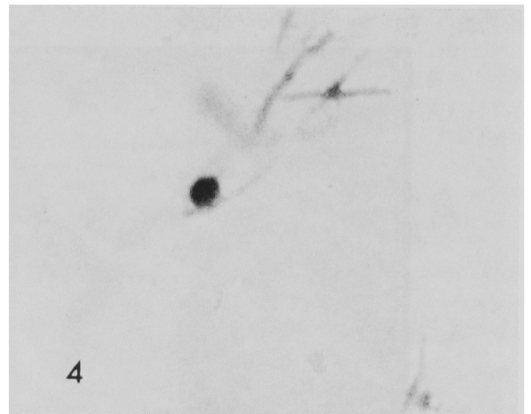
3-1 untreated



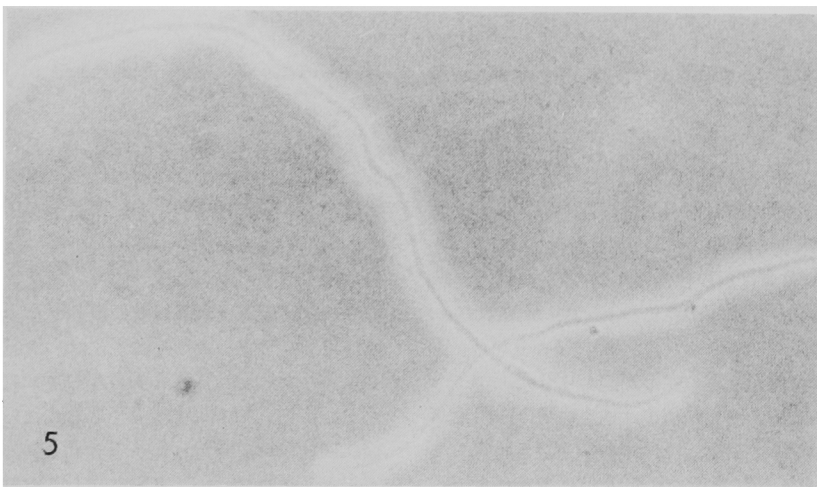
3-2 exposed to 100 MIC of amikacin for 2 h



3-3 exposed to 100 MIC of cefotiam for 2 h

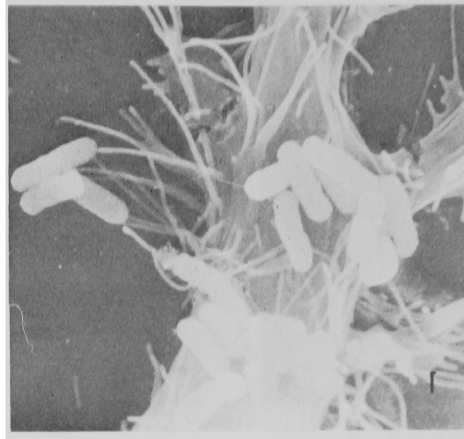


3-4 exposed to 100 MIC of cephalpirin for 2 h



3-5 exposed to 100 MIC of piperacillin for 2 h

Fig. 3. Light microscopic photograph of *K. pneumoniae* strain K-9



4-1 untreated

4-2 exposed to 100 MIC of amikacin
for 18 h4-3 in antibiotic-free medium for 48 h after
exposure to 100 MIC of amikacin for 18 h

Fig. 4. Scanning electron micrographs of *K. pneumoniae* strain K-9 adsorbed to HeLa cells

AMK 作用後の菌の形態的变化は陰性染色では莢膜の形成が抑制され、形態像が不規則にみられ、グラム染色では染色されにくい状態を示した。それに対して、 β -lactam 系抗生物質では菌の伸張ならびに septum の膨化あるいは内容物の吐出像が認められ、100 MIC では一部の菌に莢膜の消失が認められた。しかし、10 MIC では明らかな莢膜保有像と菌の変形が認められた。

これらの菌の形態的变化の相違は抗生物質の作用点が異なるためである。特に、 β -lactam 系抗生物質では PBP に作用点があり、形態的に変化に影響を与えている¹⁴⁾。

Aminoglycoside 系抗生物質では菌の蛋白質の合成阻

害と細胞膜に作用するといわれ¹⁵⁾。超薄切片による電子顕微鏡的に観察されている。著者らも AMK で試みたが、膜の断裂は一部の菌株にしか認められず、多くの菌株では不明であった⁴⁾。

今回は走査電子顕微鏡的に観察した。AMK を高濃度で作用させた場合の形態的变化は、対照と比較して活性を失ったと思われる菌と HeLa 細胞に変化が生じた。しかしながら、AMK を除去するとこれらの細胞や一部の菌に回復像が認められた。

これらの点についてさらに詳しく検討している。

文 献

- 1) 松本慶蔵, 横山秋一, 荒井澄夫, 西岡きよ, 中村隆: PC系抗生物質と Cephalosporin系抗生物質の大量点滴療法, 1) 臨床的研究. 最新医学 25: 1750~1761, 1970
- 2) HOLLOWAYS W J, SCOTT E G: Clinical experience with cephalosporins in treatment of severe infections. Antimicro Agents & Chemoth 1963: 274~253, 1964
- 3) PICKERING L K, GEARHART P: Effect of time and concentration upon interaction between gentamicin, tobramycin, netilmicin or amikacin and carbenicillin or ticarcillin. Antimicro Agents & Chemoth 15: 592~596, 1979
- 4) 高橋昌巳, 一幡良利, 碓井之雄, 成川新一, 吉田耕作: Hetacillin Cephapirin および Amikacin 相互の併用作用に関する研究. Jap J Antibiotics 32: 830~838, 1979
- 5) 高橋 淳, 松本慶蔵, 他: *Haemophilus influenzae* 繰り返し感染に対する Macrolide 系, Tetracycline 系抗生物質, 新 Quinolone 系抗菌剤の繰り返し感染阻止効果. Chemotherapy 34: 1265~1271, 1986
- 6) 高橋昌巳, 一幡良利, 成川新一, 石崎正通: 実験的肺炎桿菌感染症に関する研究. Chemotherapy 31: 44~52, 1983
- 7) TAKAHASHI M, YOSHIDA K, SAN CLEMENTE C L: Relation of colonial morphologies in soft agar to morphological and biological properties of the K-9 strain of *Klebsiella pneumoniae* and its variants. Can J microbiol 23: 448~451, 1977
- 8) 高橋昌巳, 大島赴夫, 碓井之雄, 佐々木千鶴子, 与那覇朝英: 表層構造の異なる肺炎桿菌 K-9 株とその変異株の血球吸着能とマウス致死性について. 日本細菌学雑誌 37: 923~929, 1982
- 9) 松本慶蔵, 西岡きよ, 荒井澄夫, 宇塚良夫, 磯山正玄: 抗生物質の体液内濃度測定の問題点とその意義, 1 肺. 最新医学 28: 395~400, 1982
- 10) 西野武志, 中沢昭二: β -lactam 系抗生物質大量投与の問題点. Chemotherapy 21: 1317~1318, 1973
- 11) OFEK I, BEACHEY E H, EISENSTEIN B I, ALKAN M L, SHARON N: Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentration of β -lactam and aminoglycoside antibiotics. Rev Infect Dis 1: 832~837, 1979
- 12) 高橋昌巳, 大友俊允, 伊藤清治: 肺炎桿菌 K-9 株とその変異株の凍結融解に対する菌の抵抗性とその性状の変化について. 聖マリアンナ医大誌 10: 210~215, 1982
- 13) 高橋昌巳, 碓井之雄, 一幡良利, 吉田耕作, 与那覇朝英: 臨床分離肺炎桿菌 SMK-101 株に対するセファピリンの MAC に関する研究. Jap J Antibiotics 30: 18~26, 1985
- 14) 横田 健: β -lactam 薬剤の抗菌力とくに β -lactamase に対する安定性. Chemotherapy 27: 211~221, 1979
- 15) NAKANO M, NAKAZAWA S: Action mechanism of 3',4'-dideoxy-kanamycin B and gentamicin as observed by electron microscopy. Chemotherapy 22: 1108~1110, 1974

EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON THE ADSORPTION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* TO CULTURED CELLS

MASAMI TAKAHASHI, YOSHITOSHI ICHIMAN, EIICHI YOSHIDA,

CHIZUKO SASAKI* and TOMOHIDE YONAHARA*

Department of Microbiology and *Central Laboratory for
Electron Microscopy, St. Marianna University School
of Medicine

2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 213, Japan

A cell suspension of a *Klebsiella pneumoniae* strain was given on a monolayer of HeLa cells, then adsorption of the strain in the cells was tested. In these experiments, 10^4 - 10^6 CFU were adsorbed within 3 hours if the cell suspension contained less than 10^6 CFU. When AMK was added at concentrations of 10 or 100 MIC, no multiplication of the organisms was noted after 18 and 6 hours, respectively, when tested by solid medium. When tested by a broth medium, however, the organisms were detected even 18 hours later in 100 MIC. Similar results were obtained with DOXY at 6 hours in 100 MIC. With β -lactam antibiotics 10^2 - 10^8 CFU and 10^4 - 10^8 CFU of the organisms were observed using solid and broth media, respectively.

Concerning the morphological features of the organisms, no change was observed at 100 MIC of AMK when viewed under the light microscope. By scanning electron microscopy, cellular damage was observed both in the bacterial and HeLa cells, and recovery of morphological alteration was shown by the removal of AMK. Also, when treated with β -lactam antibiotics, elongation of cells and discharge of intracellular substances were observed by light microscopy.