

Levofloxacinによる*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*および *Bacteroides fragilis*の形態変化について

田中真由美・大槻雅子・西野武志

京都薬科大学微生物学教室*

合成化学療法剤levofloxacin (LVFX)の*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*および*Bacteroides fragilis*に対する抗菌作用を透過型電子顕微鏡を用いて、形態変化の面から検討した。

*S. aureus*にLVFXを作用させると、低濃度では分裂異常が認められ、MIC以上の濃度では細胞壁の肥厚および溶菌がみられた。*B. subtilis*では、菌体の伸長化、球形化、溶菌像が観察され、細胞壁の切断像も認められた。*B. fragilis*では、菌体の伸長化およびブレップ様構造、外膜の切断像、そしてそれに次ぐ溶菌像が認められ、キノロン系抗菌剤の強い殺菌力が形態変化の面からも認められた。

Key words : Levofloxacin (LVFX), *Staphylococcus aureus*の形態変化, *Bacillus subtilis*の形態変化, *Bacteroides fragilis*の形態変化

Levofloxacin (LVFX)は第一製薬株式会社で合成された化学療法剤である。本物質はラセミ体であるofloxacin (OFLX)の光学活性体 [S-(-)-OFLX] であり、その活性の本体とされている¹⁾。すなわち、グラム陽性菌群、グラム陰性菌群に対し、DR-3354 [R-(+)-OFLX] より8~128倍優れた、OFLXのほぼ2倍の抗菌力を示すと報告されている²⁾。本系統抗菌剤はDNA合成阻害によって抗菌作用を示すといわれており、多くの研究者によって様々な菌種からDNAジャイレースが精製され、それに対する阻害活性が明らかに抗菌活性と相関していることが知られている^{1,3-7)}。しかし、いわゆるニューキノロン剤といわれるOFLX, ciprofloxacin (CPFX)等は対数増殖期のみならず定常期の細菌に対しても抗菌活性を有しており、DNA合成阻害作用以外の第二の作用点の存在が示唆されている⁸⁾。今回我々は、*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*および*Bacteroides fragilis*に対する作用を形態変化の面から検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株および薬剤

使用菌株としては、*S. aureus* 209-P JC, *B. subtilis* ATCC 6633および*B. fragilis* ATCC 25285を用い、薬剤としては第一製薬株式会社より分与されたLVFXを用いた。使用菌株に対するLVFXのMICは*S. aureus* 209-P JC, *B. subtilis* ATCC 6633および*B. fragilis* ATCC 25285の順に0.39, 0.05, および0.39 μ g/mlで

あった。

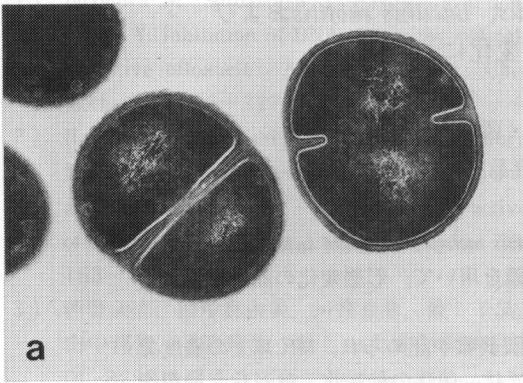
2. 透過型電子顕微鏡による形態観察

Tryptosoya broth (TSB; ニッスイ)で前培養した菌液をHeart infusion broth (HIB; ニッスイ)に移し、対数期中期まで振盪培養した。但し*B. fragilis*についてはGAM broth(ニッスイ)で前培養した菌液を新たなGAM brothに移し、対数期中期まで嫌気培養した。所定の濃度の薬剤を添加し、以後経時的に菌液を採取し、1.5% glutaraldehydeで前固定した。遠心集菌後Kellenberger緩衝液⁹⁾で洗浄し、1% osmium acidにより本固定を行った。遠心集菌し、2%精製寒天中に懸濁・固化後、約1mmのブロックに切りわけた。0.5%酢酸ウラン緩衝液中で2時間ブロック染色を行い、エタノール系列で脱水し、Luftらの方法¹⁰⁾に準じてエポキシ樹脂に包埋・重合した。この試料の超薄切片を作製し、酢酸ウラン飽和溶液およびクエン酸鉛溶液を用いて二重染色¹¹⁾し、透過型電子顕微鏡(JEOL-1200EX)により形態観察および写真撮影を行った。

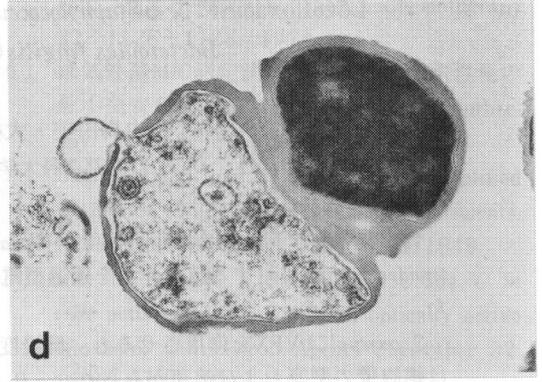
II. 実験結果および考察

S. aureus, *B. subtilis*および*B. fragilis*に対するLVFXの作用を形態変化の面から検討した。Fig. 1aは薬剤未処理の*S. aureus* 209-P JCの透過電顕像であり、中央部に隔壁が形成され、正常に分裂・増殖する像が認められた。LVFX 0.10 μ g/ml(1/4 MIC)作用4時間後にはFig. 1bに示したように、正常な分裂が阻害され、隔壁形成のみ行われ分離不完全のまま、次の隔壁形成

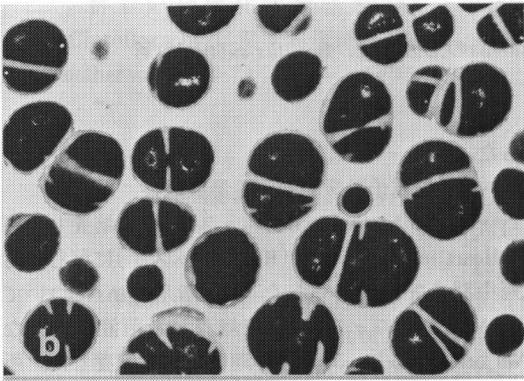
*〒607 京都市山科区御陵中内町5



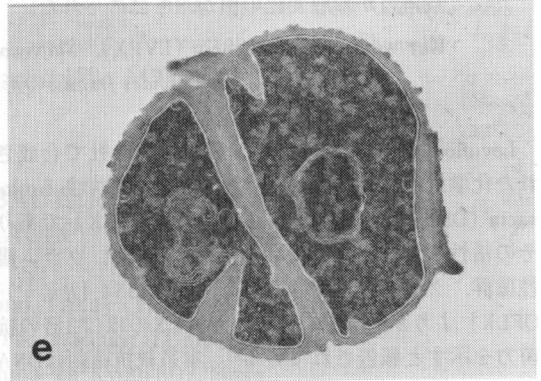
a

a. Normal *S. aureus* cells

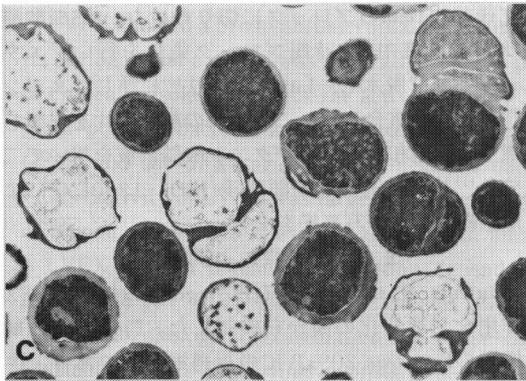
d

d. 0.39 $\mu\text{g/ml}$, 2h ; Lysis

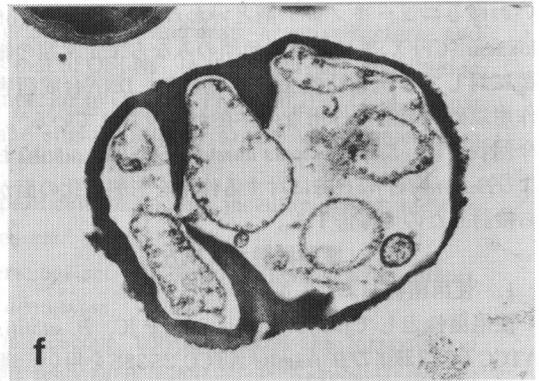
b

b. 0.10 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Abnormal cell division

e

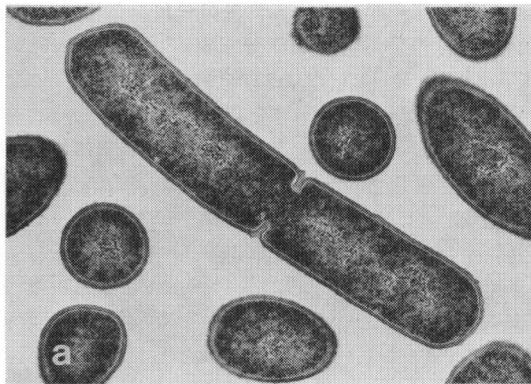
e. 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 1h ; Abnormal cell division and thickening of cross wall

c

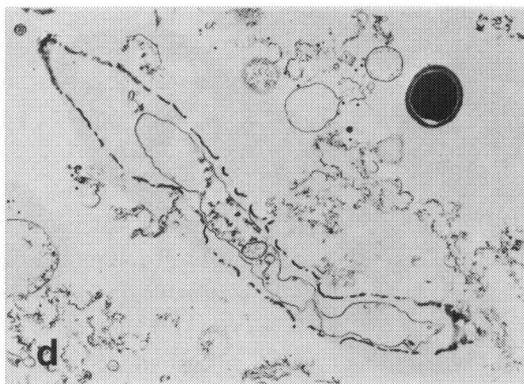
c. 0.39 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Lysis and thickening of cell wall

f

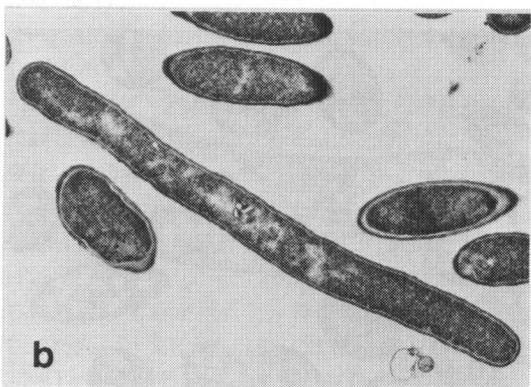
f. 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 2h ; LysisFig. 1. Transmission electron micrographs of *S. aureus* 209-P JC cells exposed to levofloxacin.



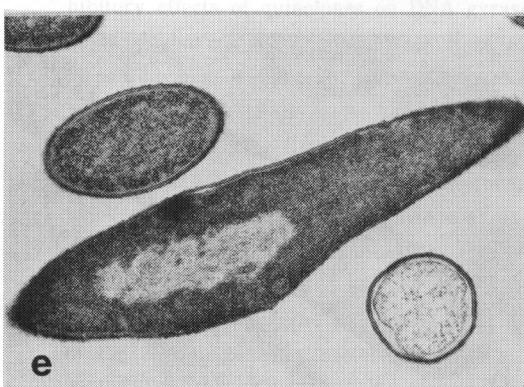
a. Normal *B. subtilis* cells



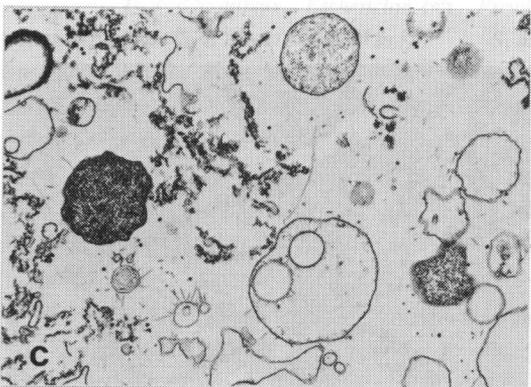
d. 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Lysis of filamentous cells



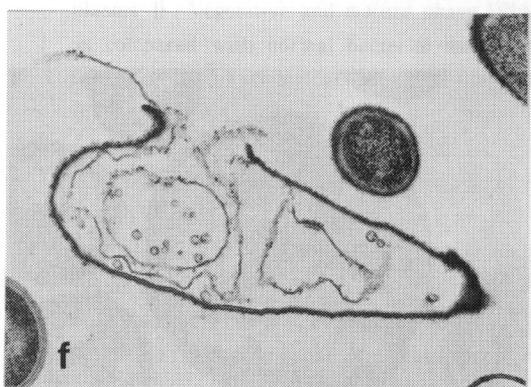
b. 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 2h ; Filamentous cells



e. 0.20 $\mu\text{g/ml}$, 1h ; Swelling of the cell (bulge)

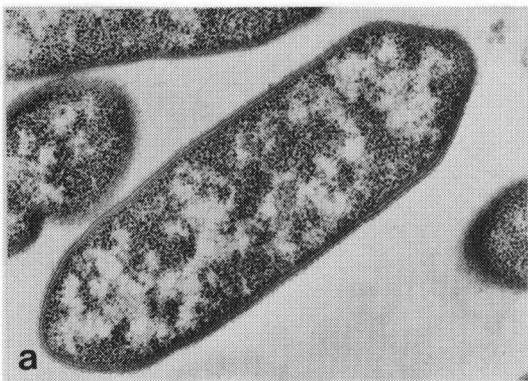


c. 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Lysis and spherical cells

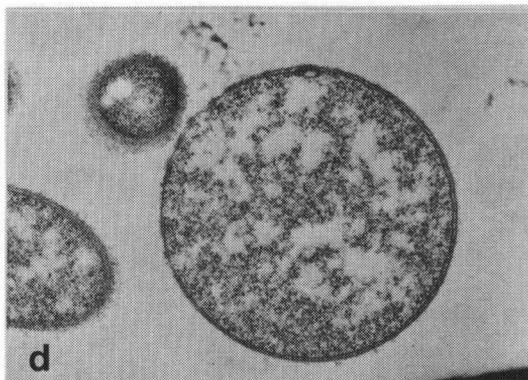


f. 0.20 $\mu\text{g/ml}$, 1h ; Lysis

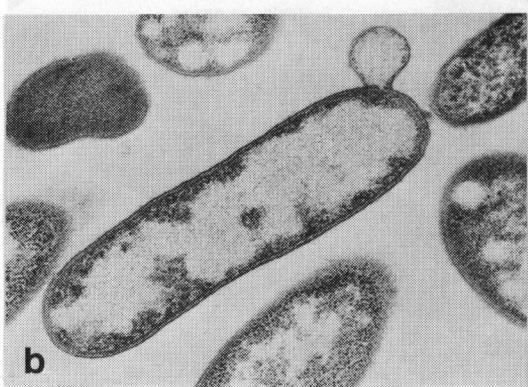
Fig. 2. Transmission electron micrographs of *B. subtilis* ATCC 6633 cells exposed to levofloxacin.



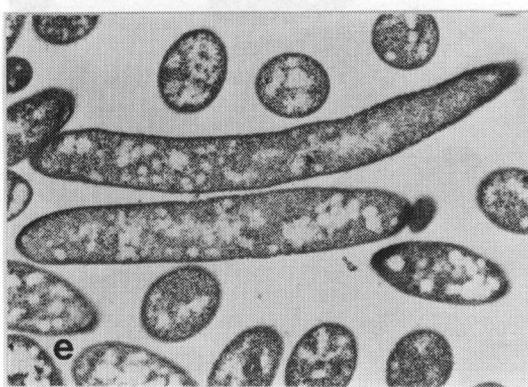
a. Normal *B. fragilis* cells



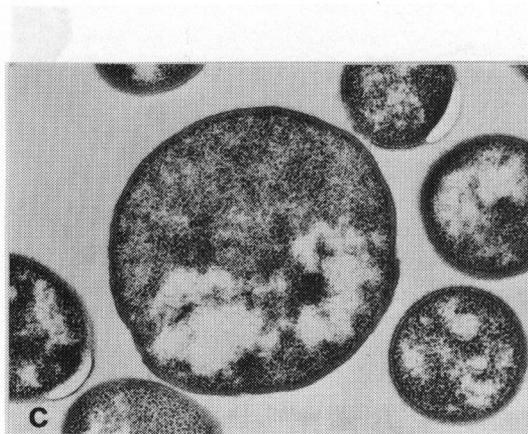
d. 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 6h ; Spherical cell



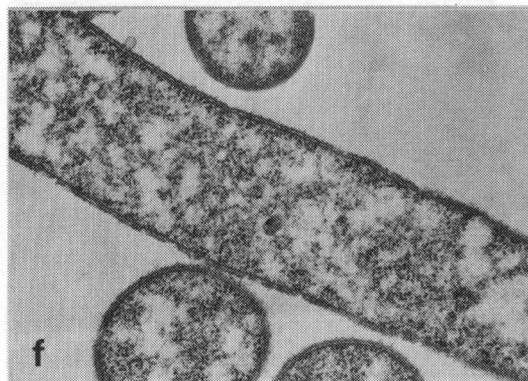
b. 0.39 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Bleb



e. 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Filamentous cells with collapsed outer layer



c. 0.39 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Spherical cell



f. 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 4h ; Magnification of outer layer

Fig. 3. Transmission electron micrographs of *B. fragilis* ATCC 25285 cells exposed to levofloxacin.

を開始する細胞が多く観察された。0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1 MIC)作用時には分裂異常とともに細胞壁の肥厚や溶菌像が認められ、細胞質内には膜様構造がみられた (Fig. 1c, d)。1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4 MIC)作用後にも、Fig. 1e, fに示したように、細胞分裂の異常、細胞壁の肥厚および溶菌像が認められた。

B. subtilis ATCC 6633にLVFXを作用させた後の形態を観察したところ、正常な細菌ではFig. 2aに示したように、細胞壁・細胞質・核等を明瞭に観察することができた。0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1 MIC)作用2時間後には菌体の伸長化がみられ (Fig. 2b)、作用4時間後にはFig. 2cおよびdに示したように、球形化した菌体の溶菌像、細胞壁の切断像が観察された。0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4 MIC)作用1時間後には、膨化した細胞や溶菌像がみられた (Fig. 2e, f)。

Fig. 3に、*B. fragilis* ATCC 25285に対するLVFXの作用を示した。正常な*B. fragilis*では、Fig. 3aに示したように外膜・ペリプラズム・内膜の三層構造が明瞭に観察され、0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1/4 MIC)作用後には大きな変化は認められなかった。0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1 MIC)作用4時間後には桿菌状を保ちながらブレップ様構造を有する細胞 (Fig. 3b)と外膜に切断が生じた球形化した細胞 (Fig. 3c)が存在した。0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用6時間後にはさらに外膜の切断が進行し、伸長化細胞もみられた。1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4 MIC)作用後には伸長化、球形化 (Fig. 3d, e)とともに外膜の分断像がみられた (Fig. 3f)。また、細胞内に小空胞の形成が認められた。

ピリドンカルボン酸系抗菌剤作用後の形態変化については、これまで*S. aureus*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*等を用いた報告があり¹²⁻¹³⁾、*S. aureus*では分裂異常、膨化、そして溶菌像が、グラム陰性桿菌では伸長化、原形質分離、細胞内空胞等が観察されている。我々の結果においても同様の変化が認められ、さらに外膜の切断像もみられたことより、Smith⁸⁾が提唱したOFLX、CPFXでのDNA合成阻害以外の第二の作用機作の可能性が示唆された。

文 献

- 1) Imamura M, Shibamura S, Hayakawa I, and Osada Y: Inhibition of DNA gyrase by optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 325~327, 1987
- 2) Hayakawa I, Atarashi S, Yokohama S, Imamura M, Sakano K, and Furukawa M: Synthesis and antibacterial activity of optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 163~164, 1986
- 3) Liu L F and Wang J C: *Micrococcus luteus* DNA gyrase: active components and a model for its supercoiling of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2098~2102, 1978
- 4) Miller R V and Scurlock T B: DNA gyrase (topoisomerase II) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 110: 694~700, 1983
- 5) Aoyama H, Sato K, Fujii T, Fujimaki K, Inoue M, and Mitsunashi S: Purification of *Citrobacter freundii* DNA gyrase and inhibition by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 104~109, 1988
- 6) Hoshino K, Sato K, Une T, and Osada Y: Inhibitory effects of quinolones on DNA gyrase of *Escherichia coli* and Topoisomerase II of fetal calf thymus. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1816~1818, 1989
- 7) Tanaka M, Sato K, Kimura Y, Hayakawa I, Osada Y, and Nishino T: Inhibition by quinolones of DNA gyrase from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agent Chemother* 35: 1489~1491, 1991
- 8) Smith J T: Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. *Pharma J* 233: 299~305, 1984
- 9) Kellenberger E, Ryter A, and Sechaud J: 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, 1963
- 10) Luft J H: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409~414, 1961
- 11) Reynolds E S: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208~212, 1963
- 12) Voigt W-H: The influence of ciprofloxacin on the ultrastructure of gram-negative and gram-positive bacteria. (ed) Adam D, Hahn H, and Opferkuch W. The influence of antibiotics on the host-parasite relationship II. Springer-Verlag, Berlin, 1985
- 13) Elliot T S, Shelton A, and Greenwood D: The response of *Escherichia coli* to ciprofloxacin

and norfloxacin. J Med Microbiol 23: 83~88,

1987

MORPHOLOGICAL ALTERATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,
BACILLUS SUBTILIS AND *BACTEROIDES FRAGILIS* BY
LEVOFLOXACIN

Mayumi Tanaka, Masako Otsuki and Takeshi Nishino
Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University,
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

The antibacterial effect of levofloxacin (LVFX, DR-3355) against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacteroides fragilis* was examined by transmission electron microscopy from the viewpoint of morphological alteration.

When *S. aureus* was exposed to LVFX, abnormal cell division was observed at lower concentrations, and thickening of the cell wall and cell lysis were observed at concentrations over the MIC.

The cells of *B. subtilis* became filamentous, swollen or lysed after treatment with LVFX, and some cells had degraded cell walls.

In *B. fragilis*, filamentous cells, bleb-like structures, a degraded outer membrane and subsequent cell lysis were observed after exposure to LVFX.