

Loracarbefによる大腸菌の形態変化について

吉竹裕子・望月治美・佐藤 清
協和醸酵工業株式会社医薬研究所*

Loracarbef(LCBF)を*Escherichia coli* F3385に作用させた時の菌の形態変化について位相差顕微鏡および電子顕微鏡を用いてceftiofur(CCL)と比較検討した。

位相差顕微鏡による観察：濃度依存的に菌の伸長化が進み、バルジを形成し、溶菌に至った。24時間後には生存菌体の修復像が観察された。

走査型電子顕微鏡による観察：LCBF, CCLを作用した菌は、ほぼ同様の形態変化が観察された。すなわち、3.13 μ g/ml 2時間作用により菌の伸長化とバルジの形成が観察され、4時間後には溶菌像やそれに伴う扁平化した菌体が多数観察された。LCBFでは伸長化した菌の先端部分にSpheroplast様構造と思われる菌の膨化が観察された。

透過型電子顕微鏡による観察：LCBFとCCLの作用では、ほぼ同様な形態変化が観察された。2時間で伸長化した菌が現れ、バルジや細胞質内に電子密度の低下した部分が観察された。4時間後には、細胞質の内容物がほとんど失われ希薄化した菌および一部修復像も観察された。

また、*Staphylococcus aureus* 209-Pと*Klebsiella pneumoniae* F1928についても位相差顕微鏡による形態変化の観察を行った。両菌株とも濃度依存的に形態変化が観察された。*K. pneumoniae* F1928については、LCBFは低濃度でも早期から菌の伸長化とバルジが確認できた。

以上の結果、LCBFは抗菌像の面からCCLとほぼ同質で同程度の抗菌活性を有していると考えられた。

Key words : loracarbef, カルバセフェム, 形態変化

Loracarbef(LCBF)は協和醸酵工業(株)で開発中の新しい経口カルバセフェム系抗生物質である。その化学構造はceftiofur(CCL)に類似し、ほぼ同様の抗菌スペクトラムを有している¹⁻⁴⁾。

本研究は、LCBFの*Escherichia coli*に対する抗菌作用を形態学的変化の面から探る目的で行った。なお、一部*Staphylococcus aureus*および*Klebsiella pneumoniae*についても同様な実験を行った。

I. 材料及方法

1. 使用薬剤

検討薬剤としてLCBF(Lot No.DPD11927), CCL(塩野義製薬)を使用した。

2. 使用菌株

協和醸酵工業(株)医薬研究所の保有菌株を使用した。位相差顕微鏡観察には*S. aureus* 209-P, *E. coli* F3385および*K. pneumoniae* F1928を、電子顕微鏡観察には*E. coli* F3385を使用した。MICは、*S. aureus* 209-Pに対してLCBFは0.2 μ g/ml, CCLは0.2 μ g/ml, *E.*

coli F3385に対してLCBFは0.39 μ g/ml, CCLは1.56 μ g/ml, *K. pneumoniae* F1928に対してLCBFは0.78 μ g/ml, CCLは3.13 μ g/mlである。

3. 殺菌作用

被検菌として*E. coli* F3385を使用した。前培養は、Mueller Hinton broth (MHB; Difco, U.S.A.) 10mlにて37 $^{\circ}$ C 18時間振盪培養した菌液を10⁹CFU/mlとした。これを新鮮なMHBに移植して1 \times 10⁷CFU/mlになるように調製し、37 $^{\circ}$ Cで1時間振盪培養したものを実験に供した。それぞれMIC濃度およびその2倍, 4倍希釈した薬剤を添加し、最終容量10mlとして37 $^{\circ}$ Cで振盪培養した。薬剤添加後経時的に菌液を0.5ml採取し、適宜希釈を行い、Mueller Hinton agar (MHA; Difco, U.S.A.)を用いて混釈法により生菌数を測定した。

4. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上に、条件検討で決定したMIC値を含む種々の濃度の薬剤を添加したMHAを使って、フィルム寒天培地を作製した。これに*S. aureus* 209-P,

*〒411 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188

E. coli F3385および*K. pneumoniae* F1928をMHBで37°C18時間振盪培養して 1×10^8 CFU/mlになるように調製した菌液5 μ lを接種し(最終 5×10^6 CFU/プレート), カバーガラスで寒天表面を覆い周囲をマニキュアで封じた。これを恒温装置付の倒立位相差顕微鏡(DIAPHOT-TMD; Nikon)に装着し, 37°Cで培養しながら, 経時的に観察および撮影を行った。

5. 電子顕微鏡観察

1) 菌の培養

菌株は*E. coli* F3385を使用した。MHBを用いて37°Cで18時間振盪培養した菌液を新鮮なMHB 10mlに1ml接種した。37°Cで1時間振盪培養し, 対数期の途上の菌(5×10^6 CFU/ml)で以下の実験に供した。

2) 走査型電子顕微鏡(SEM)による観察

種々の濃度の薬剤で2または4時間処理した菌体を遠心集菌し, MHBに再浮遊した。そこに, 0.1Mカコジル酸buffer pH7.4(0.2Mサッカロース)に溶解した2.5%グルタルアルデヒド(和光純薬)を等量混合し, 4°Cで2時間前固定をした。0.1Mカコジル酸bufferで洗浄後, 1%四酸化オスミウム(和光純薬)で2時間後固定した。エタノール系列で脱水後, 酢酸イソアミル(和光純薬)で置換した試料を臨界点乾燥装置(JCFD-3,

日本電子)で乾燥し, イオンコーター(IB-3, エイコーエンジニアリング)を用いて金をコートした。SEM(JSM 820, 日本電子)により, 加速電圧10KVで観察および撮影を行った。

3) 透過型電子顕微鏡(TEM)による観察

薬剤で2または4時間処理した菌体を遠心集菌し, SEMの試料作成と同様にエタノール系列で脱水後, 酸化プロピレン(和光純薬)を置換剤としてEpoxy樹脂に包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを装着した超マイクロトーム(ULTRACUTN, Reichert-Nissei)で作製し, 酢酸ウラニル(関東化学)ークエン酸鉛(Reynolds法)の二重染色を行った。TEM(H7000, 日立)を用い加速電圧75KVで観察および撮影を行った。

II. 実験結果

1. 殺菌作用

LCBFおよびCCLの*E. coli* F3385に対する殺菌作用について検討した結果をFig. 1に示した。

E. coli F3385に対して両薬剤とも濃度依存的に殺菌作用を示した。1.56 μ g/ml以下の低濃度においては, 0~6時間までの早い時期にLCBFは, CCLに比べやや殺菌力が強い傾向を示した。24時間後にはMIC値で再増殖がみられたが, LCBF 1.56 μ g/ml, CCL 3.13 μ g/ml

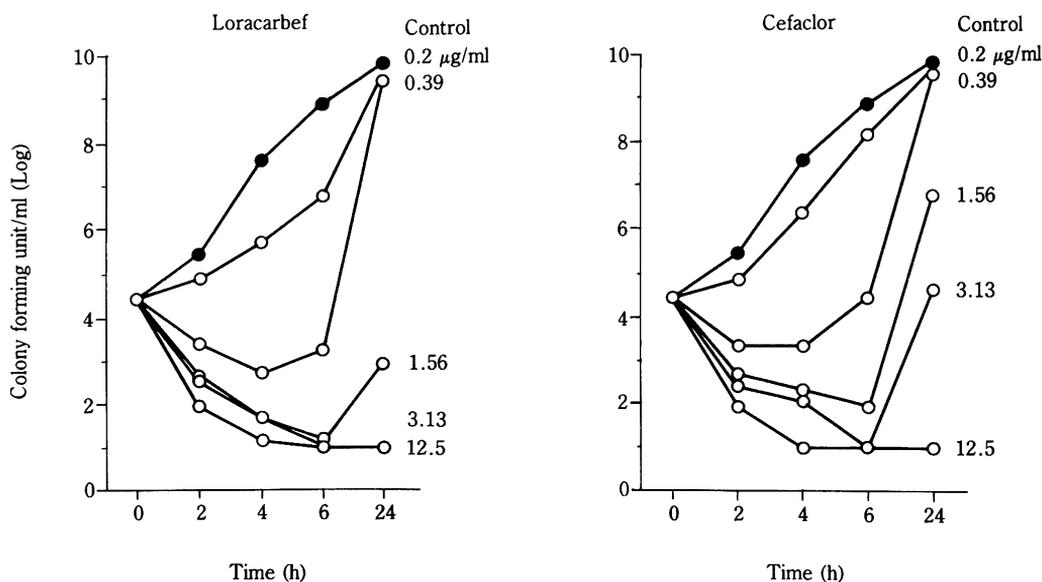


Fig. 1. Bactericidal activity of loracarbef and cefaclor against *Escherichia coli* F3385.

以上では増殖が抑制された。

2. 位相差顕微鏡による観察

薬剤添加4時間後(*S. aureus*は6時間後)の位相差顕微鏡で観察した菌の形態変化をFig. 2~4に示した。

E. coli F3385については(Fig. 2)LCBF, CCLとも0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において菌体の若干の伸長化が認められ、時間とともに中央部分に溶菌と思われる変化がみられた。24時間後には生存菌体の修復像が認められたが、LCBF, CCLの間に大差はなかった。

S. aureus 209-Pでは(Fig. 3)両薬剤とも2時間後から0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で菌体の膨化が認められ、薬剤濃度の増加と共にその割合が増し、溶菌像も認められた。また、経時的に膨化、溶菌が進んだが、24時間後には回復の傾向がみられた。

K. pneumoniae F1928では(Fig. 4)LCBFはCCLに比べ早い時間から菌に影響を与え、0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においてLCBFは2時間からバルジの形成が認められたが、CCL

では4時間まで確認できなかった。溶菌像についてもLCBFは50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で4時間から認められたが、CCLでは6時間から出現した。24時間後には両薬剤とも再増殖した菌体が認められたが、部分的な修復像はなかった。

3. 走査型電子顕微鏡による観察

E. coli F3385の薬剤未処理菌の像をFig. 5に示した。

LCBFおよびCCLを*E. coli* F3385に3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用させ、経時的にその形態変化を観察した(Fig. 6, 7)。

LCBF, 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加後2時間で菌は伸長化し、大小のバルジの形成や部分的な膨化が観察され、また一部には溶菌像も観察できた。4時間後には、菌の伸長化は更に顕著なものとなり、溶菌に伴い扁平化した菌が多数観察できた。隔壁形成をしていると考えられるくびれや、結び目様の構造物も観察された。6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2時間後では菌は伸長化し、バルジ形成と共に多く

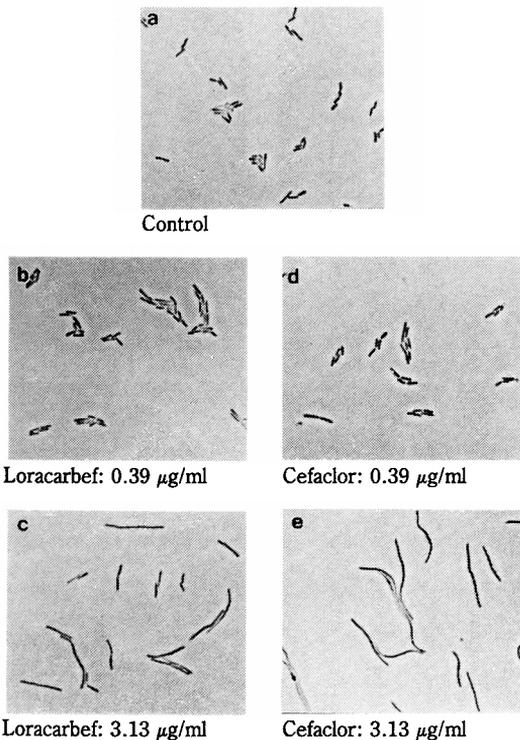


Fig. 2. Phase-contrast micrographs of *Escherichia coli* F3385 exposed to loracarbef and cefaclor for 4h.

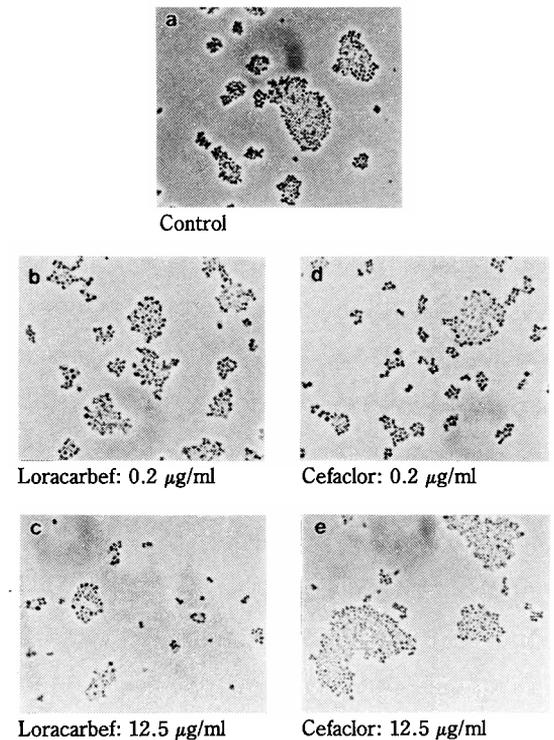


Fig. 3. Phase-contrast micrographs of *Staphylococcus aureus* 209-P exposed to loracarbef and cefaclor for 6 h.

の溶菌像が観察できた。4時間後には、 $3.13\mu\text{g/ml}$ 作用時同様にバルジの形成、溶菌像、偏平化した菌体や隔壁形成と思われるくびれが観察された。また、フィラメントの先端付近の膨化も観察された。

CCLについても $3.13\mu\text{g/ml}$ 、 $6.25\mu\text{g/ml}$ 共にほぼ同様の形態変化が経時的に観察された。 $3.13\mu\text{g/ml}$ では2時間後から菌の伸長化とバルジの形成が観察され、4時間後には溶菌像やそれに伴う偏平化した菌体が多数観察された。また、隔壁形成をしていると考えられるくびれや結び目様の構造物についても同様であった。しかし、LCBFで観察された様なフィラメント先端付近の膨化は、今回の実験では観察できなかった。

4. 透過型電子顕微鏡による観察

薬剤未処理*E. coli* F3385の超薄切片像をFig. 8に示した。

LCBF添加後2時間の形態は、Fig. 9に示すように $3.13\mu\text{g/ml}$ 、 $6.25\mu\text{g/ml}$ 共に細胞分裂が妨げられ伸長化

した菌体が観察された。菌体各部にバルジが形成された様な像や、膜の一部が細胞質内に陥入した像が観察された。また、溶菌に伴い菌体内内容物の一部が流

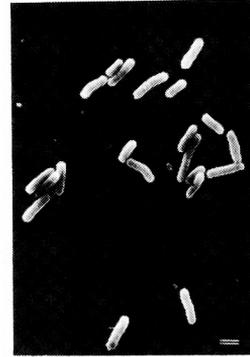


Fig. 5. Scanning electron micrograph of untreated *Escherichia coli* F3385 (bar: $1\mu\text{m}$).

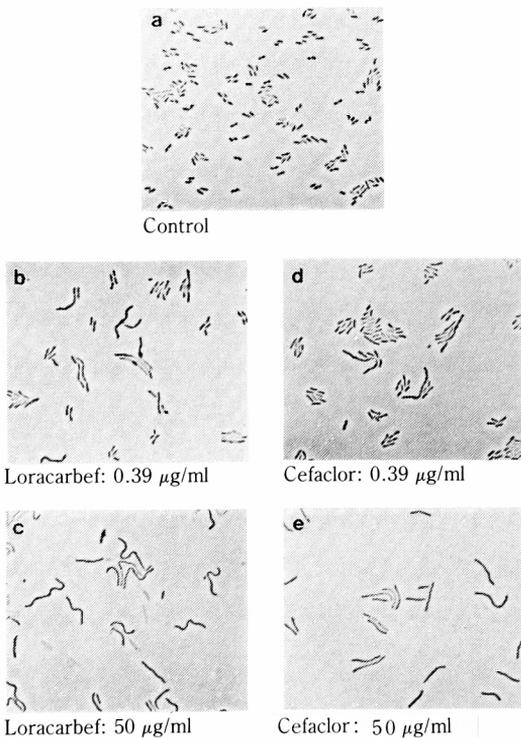


Fig. 4. Phase-contrast micrographs of *Klebsiella pneumoniae* F1928 exposed to loracarbef and cefaclor for 4 h.

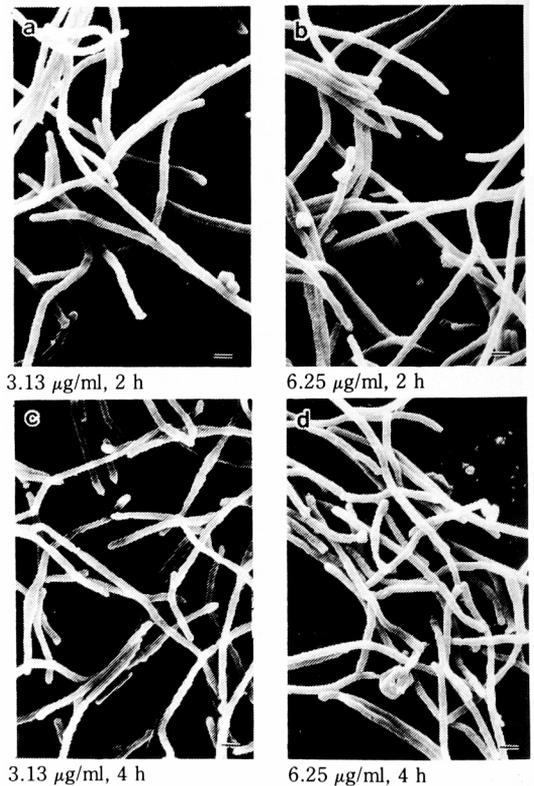


Fig. 6. Scanning electron micrograph of *Escherichia coli* F3385 exposed to loracarbef (bar: $1\mu\text{m}$)

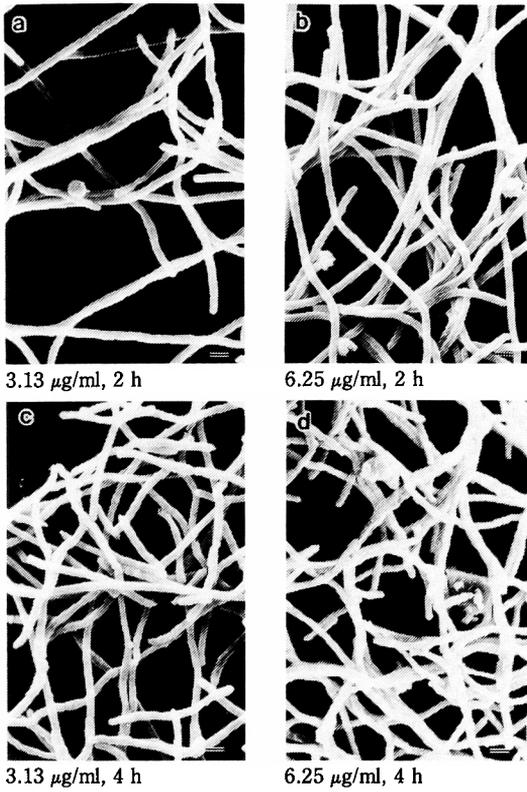


Fig. 7. Scanning electron micrograph of *Escherichia coli* F3385 exposed to cefaclor (bar: 1 μm).

出したためか、あるいは原形質分離をおこしたためか細胞質内に電子密度が低下した部分が観察できた。SEMでは3.13 μg/mlより6.25 μg/mlの方が若干伸長化の進んだ菌体が観察できたが、TEMではほとんど同様の形態を示した。4時間後(Fig. 10)3.13 μg/mlでは、伸長化した菌にバルジが形成された像や、菌体内内容物がほとんど流出して外膜と細胞質膜のみになった像が



Fig. 8. Transmission electron micrograph of untreated *Escherichia coli* F3385 (bar: 1 μm).

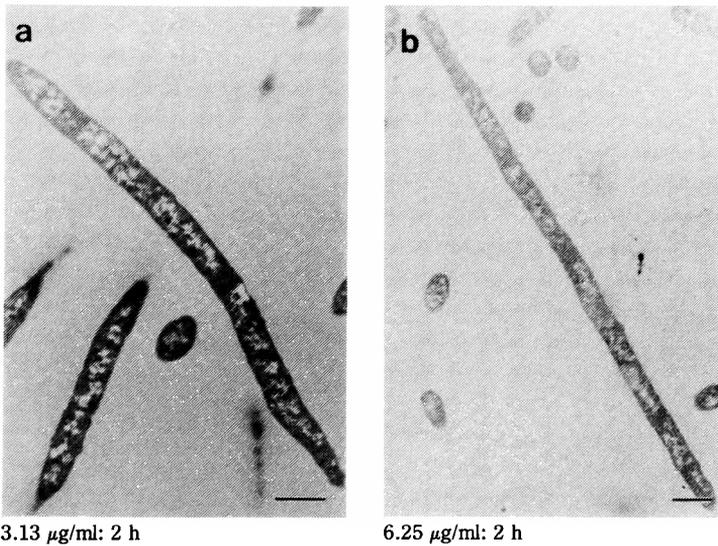


Fig. 9. Transmission electron micrograph of *Escherichia coli* F3385 exposed to loracarbef (bar: 1 μm).

観察できた。また、菌の修復像と思われる隔壁形成によるくびれを有する菌も観察された。6.25 $\mu\text{g/ml}$ 添加後の変化は、3.13 $\mu\text{g/ml}$ とほとんど同様であった。

CCLを添加した菌は、LCBFとほぼ同様に形態変化した。2時間では伸長化した菌が現れ、バルジや細胞質内に電子密度の低下した部分も観察された(Fig. 11)。4時間後には、細胞質の内容物がほとんど失わ

れたり希薄化した菌が観察できた。また、LCBF同様菌の修復像と思われる隔壁形成によるくびれも観察された(Fig. 12)。

Ⅲ. 考 察

LCBFはCCLとほぼ同様な抗菌スペクトルを有し、*S. aureus*, *E. coli*および*K. pneumoniae*に有効な新しい経口カルバセフェム系抗生物質である²⁻⁴⁾。特に、グラ

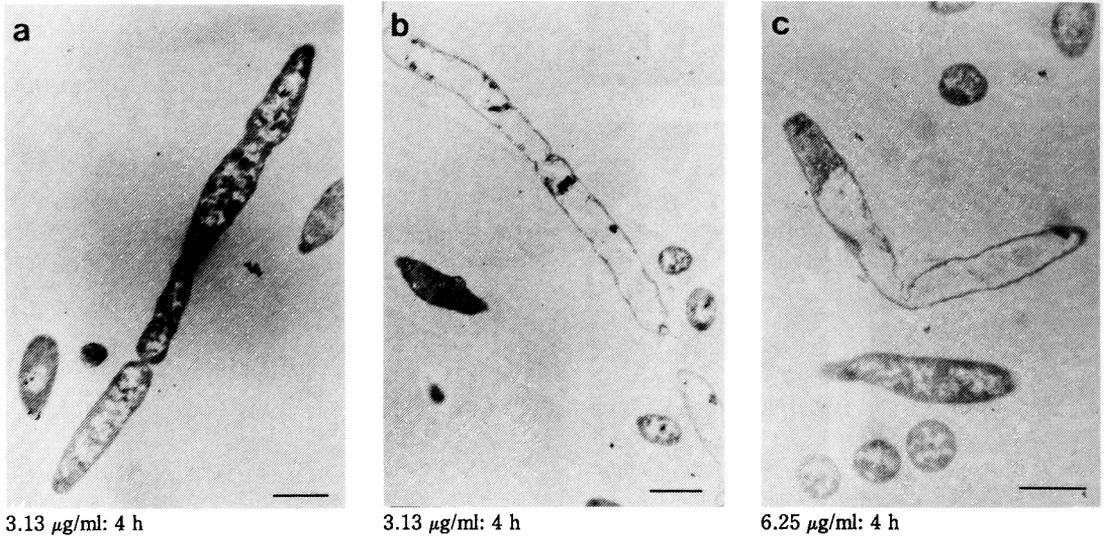


Fig. 10. Transmission electron micrograph of *Escherichia coli* F3385 exposed to loracarbef (bar: 1 μm).

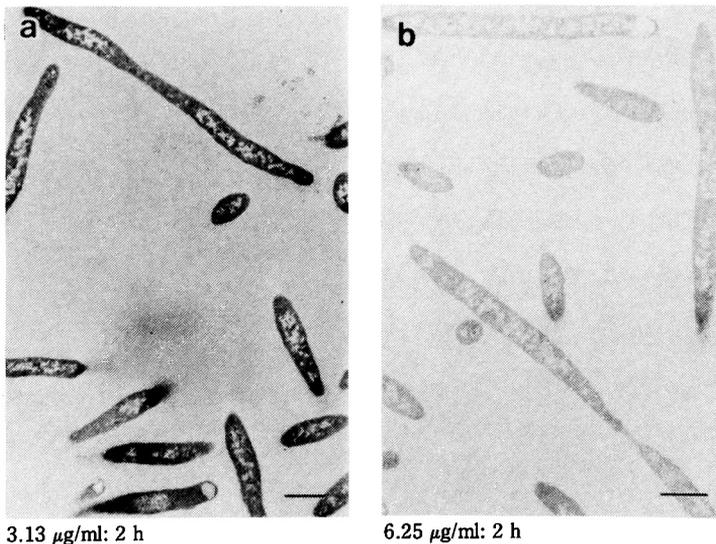


Fig. 11. Transmission electron micrograph of *Escherichia coli* F3385 exposed to cefaclor (bar: 1 μm).

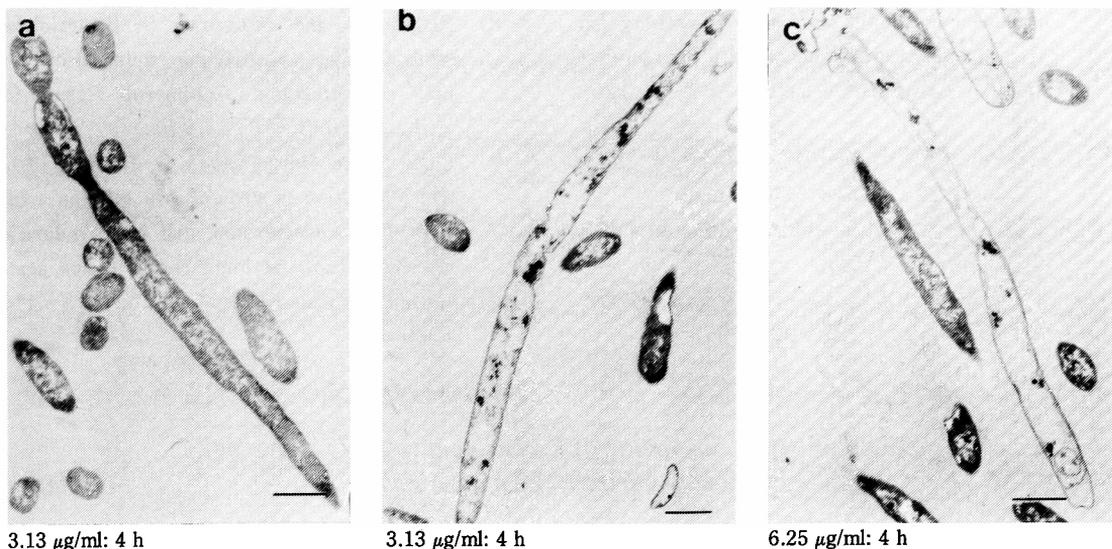


Fig. 12. Transmission electron micrograph of *Escherichia coli* F3385 exposed to cefaclor (bar: 1 μm).

ム陰性菌の *E. coli* と *K. pneumoniae* に対しては *in vitro* において CCL と同等かそれ以上の抗菌作用を有すると報告されている²⁻⁴⁾。本研究は LCBF の *in vitro* 抗菌作用のうち、菌の形態学的変化に及ぼす作用について CCL と比較検討した。

LCBF の作用により *E. coli* は伸長化、バルジ形成から溶菌に至る形態変化を示した。菌体の伸長化には作用点である penicillin binding proteins (PBPs) と β -ラクタム剤との親和性が関与していると言われている⁵⁻⁷⁾。LCBF は *E. coli* に対して CCL と同様に PBP1A, PBP1B, PBP3, PBP4 に親和性があると報告³⁾されている。隔壁形成に係わる PBP3 に結合親和性を持つため両薬剤とも 2 時間後で菌の伸長化が観察された。また、バルジや溶菌像も観察され、4 時間後には更に菌の伸長化が進み、SEM では溶菌に伴い扁平化した菌や、TEM では外膜と細胞質膜のみになった菌が観察された。LCBF では、SEM で 4 時間後 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においてフィラメント先端部分に Spheroplast 様構造ではないかと思われる菌の膨化が認められた。この現象も、PBPs において LCBF が細胞伸長の機能を持つ PBP1A, PBP1B に対する親和性を有しているために起きたのではないかと考えられる。一方、LCBF, CCL とともに 4 時間後には、隔壁形成によるくびれや薬剤未処理菌と同様な形態を示した菌なども観察され、菌の修復が行われていると思われる。

S. aureus において高濃度では抗菌作用の低下があり逆転現象がみられた。これは β -ラクタム系抗生物質に

おいて西野ら⁸⁾および Eagle ら⁹⁾によってすでに確認されている現象 (paradoxical effect) と同一であろうと考えられる。

K. pneumoniae は LCBF の作用によって *E. coli* 同様伸長化からバルジ形成、溶菌へと至った。しかし、長時間が経過しても菌の伸長化は *E. coli* に比べ短く、短時間でバルジ形成へ進んだ。また 24 時間後に部分的にも修復像はみられず、生存菌体による再増殖のみであった。

以上、*E. coli* を中心に LCBF の抗菌像を検討したが、伸長化、バルジ形成、溶菌と進む過程が観察された。以上の成績は CCL でも同様に観察される形態変化であった。

文 献

- 1) Mochida K, Ogasa T, Shimada J, Hirata T, Sato K and Okachi R: Synthesis and antibacterial activity of novel 3-substituted carbacephem. *J Antibiot* 42: 283~292, 1989
- 2) Cao C, Chin N X and Neu H C: In-vitro activity and β -lactamase stability of LY163892. *J Antimicrob Chemother* 22: 155~165, 1988
- 3) Sato K, Okachi R, Matsukuma I, Mochida K and Hirata T: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of KT3777, a new orally active carbacephem. *J Antibiotics* 42: 1844~1853, 1989
- 4) Sato K, Okachi R, Mochida K and Hirata T: KT3777 (LY163892), a new orally active car-

- bacephem antibiotic: antibacterial activity and pharmacokinetics in animals. 27th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Abst No. 1203, 1987
- 5) 西野武志: 抗菌化学療法剤の作用機序および耐性。臨床検査33: 1118~1126, 1989
- 6) 紺野昌俊: Sub-MICsの概念と意義。臨床検査33: 1127~1134, 1989
- 7) 松橋通生, 櫻田清彦: ペニシリン結合蛋白質。医学のあゆみ111: 992~927, 1979
- 8) Nishino T and Nakazawa S: Bacteriological study on effects of β -lactam group antibiotics in high concentrations. Antimicrob Agents Chemother 9: 1033~1042, 1976
- 9) Eagle H and Musselman A D: The rate of bactericidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentration against certain organisms. J Exp Med 86: 1118~1126, 1989

Morphological alteration of *Escherichia coli* by loracarbef, a new carbacephem antibiotic

Hiroko Yoshitake, Harumi Motizuki and Kiyoshi Sato

Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

1188 Shimotogari, Nagaizumicho, Suntogun, Shizuoka 411, Japan

Loracarbef (LCBF) is a novel oral β -lactam antibiotic in the carbacephem group. The effect of LCBF on the morphology of *Escherichia coli* F3385 was examined using a phase contrast microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope with reference to cefaclor (CCL).

In morphological observation by a phase contrast microscope, organisms were elongated at concentrations from 0.39 to 3.13 $\mu\text{g/ml}$. With scanning and transmission electron microscopes, exposure to 3.13 or 6.25 $\mu\text{g/ml}$ of LCBF resulted in the formation of marked filamentous cells. Spheroplast-like structures and lytic cells could be observed after LCBF treatment.

These morphological changes produced by LCBF were highly similar to those produced by CCL.