

## Ritipenem (Ritipenem acoxil の活性体) による 各種グラム陰性桿菌の形態変化

西野武志・田中真由美・長辻祥子・大槻雅子  
京都薬科大学微生物学教室\*

新しい経口用ペネム系抗生物質 ritipenem (RIPM) の *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* および *Acinetobacter calcoaceticus* に対する抗菌作用を位相差顕微鏡, 走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて, 形態変化の面から検討した。さらに *E. coli* のペニシリン結合蛋白質 (PBPs) に対する親和性についても検討を行った。

*E. coli* および *S. marcescens* に RIPM を作用させたところ bulge 状の細胞および球形細胞そして溶菌像が観察された。一方, *K. pneumoniae* および *A. calcoaceticus* では RIPM の作用により球形細胞と溶菌像を認めた。また, bulge 状になった *E. coli* では内膜の切断像が, そして球形化した *A. calcoaceticus* では隔壁形成部位に膨隆像が観察された。*E. coli* の PBP に対しては RIPM は PBP 2 に対して最も良好な親和性を示した。この結果は形態変化の観察結果と良く一致していた。

**Key words :** ritipenem, 形態変化, PBP

Ritipenem (RIPM) は 1982 年に合成された新しいペネム系抗生物質で, 本剤は各種  $\beta$ -lactamase に安定であり, グラム陽性菌群およびグラム陰性菌群に対して広範囲な抗菌スペクトルを有する<sup>1, 2)</sup>。今回私どもは RIPM を *Escherichia coli* K-12, *Klebsiella pneumoniae* NCTC9632, *Serratia marcescens* T-55 および *Acinetobacter calcoaceticus* Ac-54 に作用させた時の形態変化について検討を行ったので報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 使用菌株および薬剤

使用菌株としてはグラム陰性菌の *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* NCTC9632, *S. marcescens* T-55 および *A. calcoaceticus* Ac-54 を用い, 薬剤としては RIPM (ファルミタリア カルロエルバ社 (現ファルマシア社)) の力価の明らかなものを用いた。使用菌株に対する RIPM の MIC は *E. coli* K-12 に対しては  $0.78 \mu\text{g/ml}$ , *K. pneumoniae* NCTC9632 に対しては  $1.56 \mu\text{g/ml}$ , *S. marcescens* T-55 に対しては  $1.56 \mu\text{g/ml}$ , *A. calcoaceticus* Ac-54 に対しては  $0.39 \mu\text{g/ml}$  であった。

#### 2. 位相差顕微鏡による形態観察

スライドガラス上に RIPM を含んだ Heart infusion agar (HIA, ニッスイ) フィルムを作成し, 振盪培養を行った対数増殖期の Heart infusion broth (HIB, ニッスイ) 各菌液を HIA フィルム寒天に塗抹し, パラフィンで封入した。この標本を  $37^\circ\text{C}$  保温下, 位相差顕微鏡 (日本光学) により経時的に観察した。

#### 3. 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 HIB に移し, 対数期中期まで振盪培養後, RIPM の所定の濃度を添加した。以後経時的に菌液を採取し, 1.5% glutaraldehyde で前固定後, 遠心集菌し, Kellenberger 緩衝液<sup>3)</sup> で洗浄, 1% osmium acid により本固定を行った。この試料をアルコール系列で脱水し, 走査型電子顕微鏡試料作製の場合, 酢酸イソアミルに置換し, 臨界点乾燥法<sup>4)</sup> により乾燥を行った。その後カーボン, 金にて蒸着し走査型電子顕微鏡 JSM-35 (日本電子) で菌体の表面構造を観察した。透過型電子顕微鏡試料作製の場合, 脱水後 Luft らの方法<sup>5)</sup> 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, 酢酸ウラニル飽和溶液およびクエン酸鉛溶液を用いて二重染色<sup>6)</sup> し, 透過型電子顕微鏡 (JEOL-1200 EX) により観察を行った。

#### 4. Penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性

PBPs に対する RIPM の親和性の検討は, Spratt の方法<sup>7)</sup> に準じて *E. coli* K-12 株の膜画分を調製し, [<sup>14</sup>C]-penicillin G との競合により行った。対照薬には imipenem (IPM, 萬有製薬) を用いた。

### II. 実験結果および考察

#### 1. 位相差顕微鏡による観察

*E. coli* K-12 における観察結果を Fig. 1 に示した。 $0.39 \mu\text{g/ml}$  の作用では, control と同様の増殖像が観察されたが,  $0.78 \mu\text{g/ml}$  (MIC) では bulge 状の細胞

\*京都府京都市山科区御陵中内町 5

が、さらに 1.56 および 3.13  $\mu\text{g/ml}$  では多くの溶菌像を認めた。*S. marcescens* T-55 の場合も、*E. coli* K-12 の場合と同様、1.56  $\mu\text{g/ml}$  (MIC) 以上の濃度で bulge 状の細胞や溶菌像を認めた (Fig. 2)。一方、*K. pneumoniae* NCTC9632 および *A. calcoaceticus* Ac-54 に RIPM を作用させた時の形態変化を Fig. 3, Fig. 4 に示したが、*E. coli* K-12 や *S. marcescens* T-55 の場合と異なり、MIC 作用時において bulge 状の細胞は観察されず、球形細胞や溶菌像が観察された。

*E. coli* K-12, *S. marcescens* T-55 と *K. pneumoniae* NCTC9632, *A. calcoaceticus* Ac-54 との間に RIPM により形態変化に差が見られたので、次に *E. coli* K-12 および *A. calcoaceticus* Ac-54 を用いて、電子顕微鏡

によりさらに検討を行った。

## 2. 走査型電子顕微鏡による観察

*E. coli* K-12 に RIPM を作用させた時の走査電顕像を Fig. 5, (b), (c), (d), (e) に示した。Fig. 5 (a) は正常な *E. coli* K-12 で、Fig. 5 (b), (c) は RIPM の 0.78  $\mu\text{g/ml}$  (MIC) 作用後 2 時間および 4 時間の像で、菌体は若干伸び、中央部が膨化した像が観察される。Fig. 5 (d), (e) は RIPM の 3.13  $\mu\text{g/ml}$  作用後 2 時間および 4 時間の像で、(d) では典型的な bulge 状の細胞が、また (e) では多くの溶菌像が観察された。

*A. calcoaceticus* Ac-54 に RIPM を作用させた時の走査電顕像を Fig. 6 (b), (c) に示した。Fig. 6 (a) は正常な像で、表面構造は smooth であり、小さな桿状形態が観

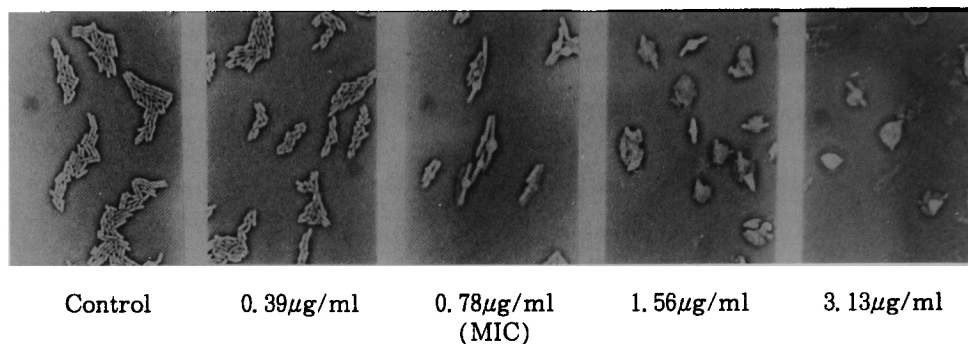


Fig. 1. Phase-contrast micrographs of *E. coli* K-12 exposed to ritipenem for 3 hours.

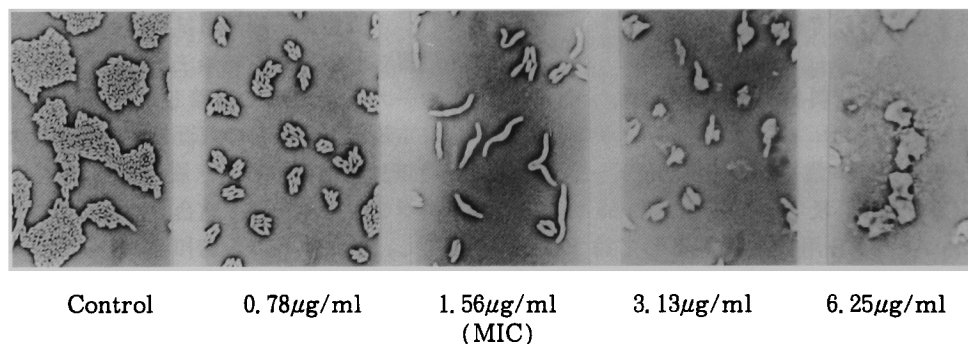


Fig. 2. Phase-contrast micrographs of *S. marcescens* T-55 exposed to ritipenem for 4 hours.

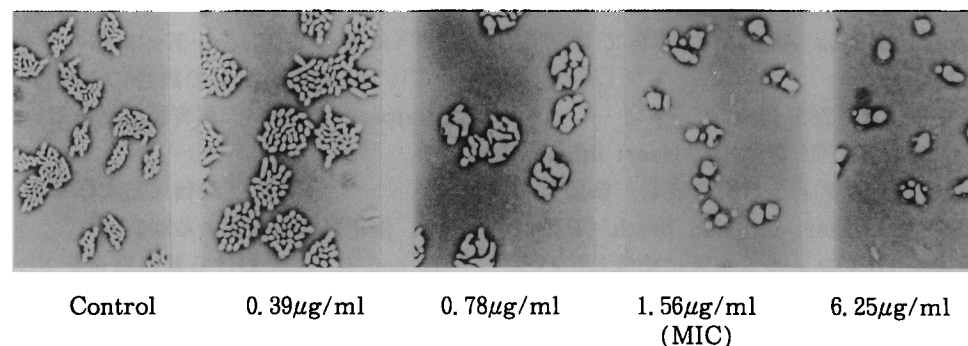


Fig. 3. Phase-contrast micrographs of *K. pneumoniae* NCTC 9632 exposed to ritipenem for 3 hours.

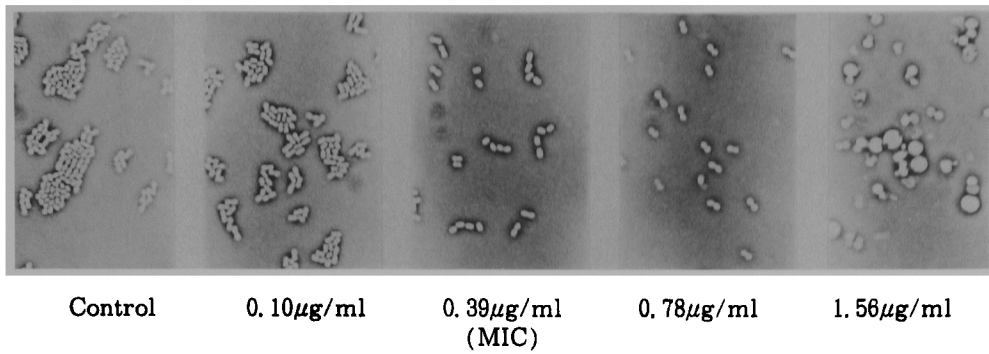


Fig. 4. Phase-contrast micrographs of *A. calcoaceticus* Ac-54 exposed to ritipenem for 4 hours.

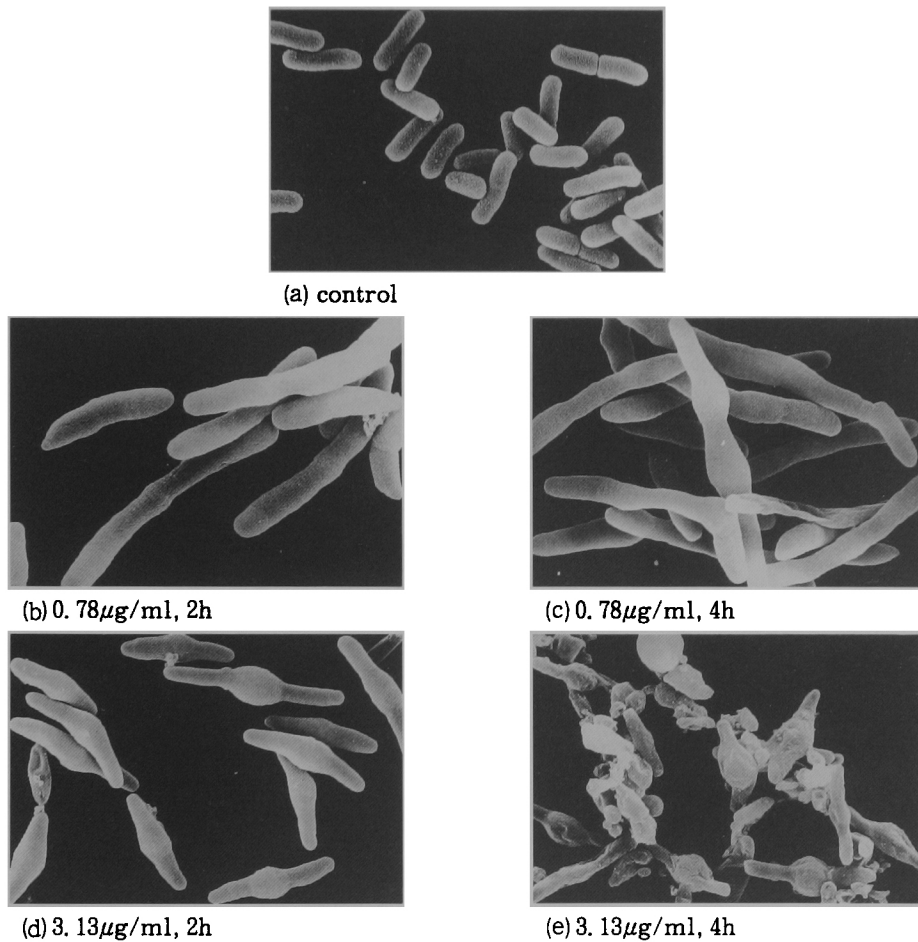


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *E. coli* K-12 cells.

(a) Untreated *E. coli* cells.

Cells after 2h (b) and 4h (c) of exposure to 0.78  $\mu\text{g/ml}$  of ritipenem.

Cells after 2h (d) and 4h (e) of exposure to 3.13  $\mu\text{g/ml}$  of ritipenem.

察される。Fig. 6 (b), (c)はそれぞれ 0.39  $\mu\text{g/ml}$  (MIC) 作用後 4 時間および 1.56  $\mu\text{g/ml}$  作用後 2 時間の像で、球形細胞や溶菌像が観察されたが、*E. coli* K-12 の場合のような bulge 状の細胞は見られなかった。

### 3. 透過型電子顕微鏡による観察

*E. coli* K-12 に RIPM を作用させた時の透過電顕像を Fig. 7 (b), (c), (d), (e)に示した。Fig. 7 (a)は正常な像で、Fig. 7 (b), (c)はいずれも 0.78  $\mu\text{g/ml}$  (MIC) 作用後 4 時間の像で、Fig. 7 (d), (e)は 3.13  $\mu\text{g/ml}$  作用後 1 時間および 2 時間の像である。bulge 状になった内部

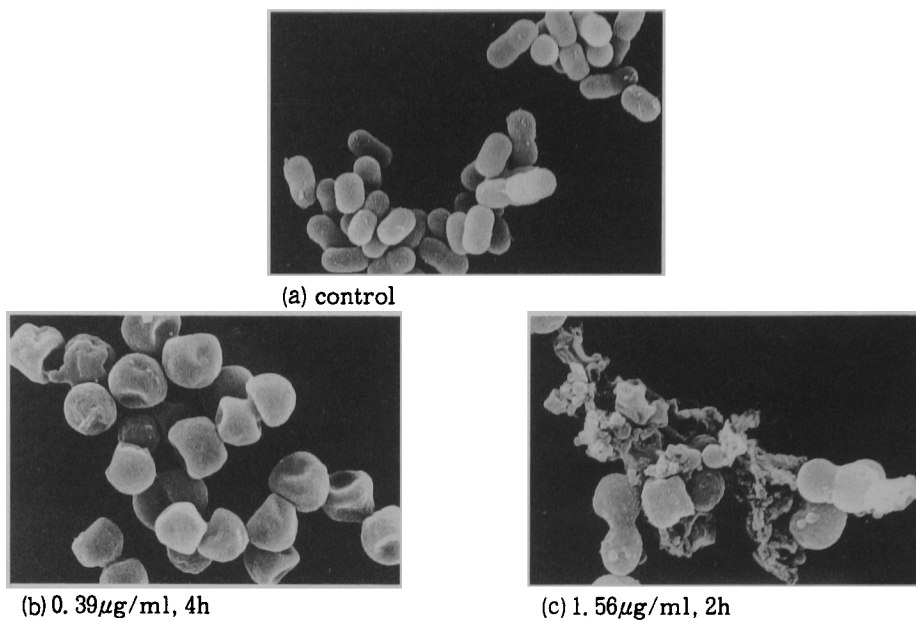


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *A. calcoaceticus* Ac-54 cells.  
 (a) Untreated *A. calcoaceticus* cells.  
 (b) Cells after 4h of exposure to 0.39  $\mu$ g/ml of ritipenem.  
 (c) Cells after 2h of exposure to 1.56  $\mu$ g/ml of ritipenem.

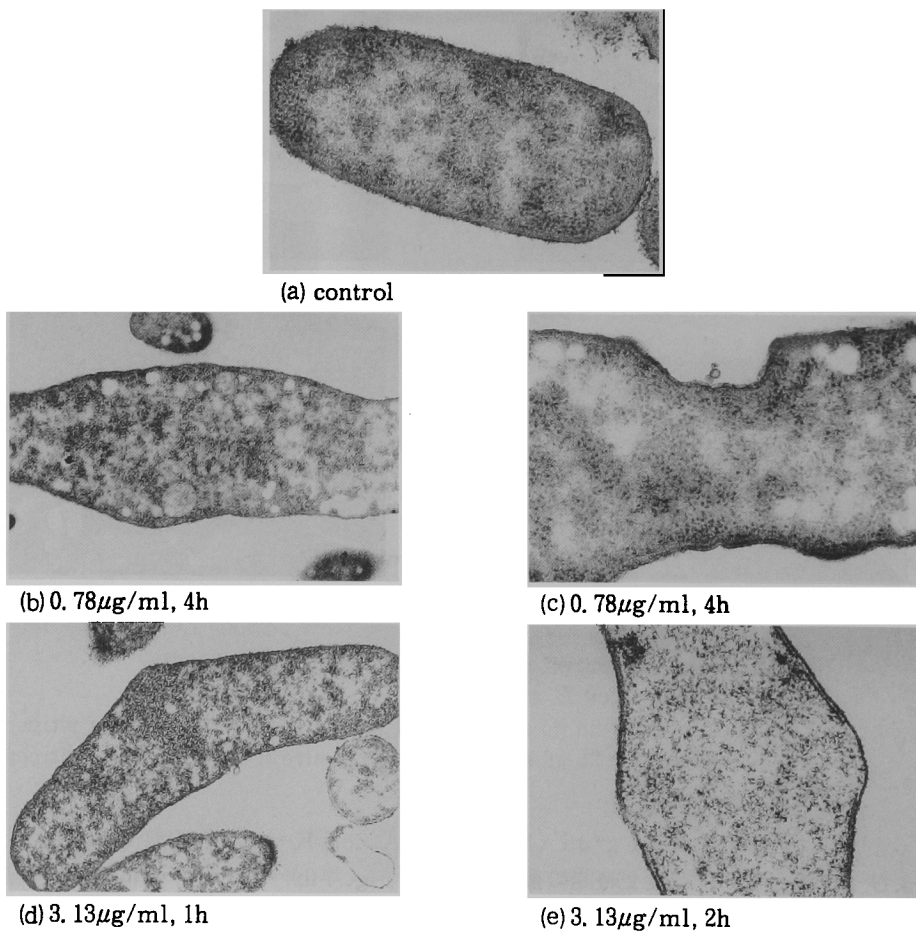


Fig. 7. Transmission electron micrographs of *E. coli* K-12 cells.  
 (a) Untreated *E. coli* cells.  
 (b), (c) Cells after 4h of exposure to 0.78  $\mu$ g/ml of ritipenem.  
 Cells after 1h (d) and 2h (e) of exposure to 3.13  $\mu$ g/ml of ritipenem.

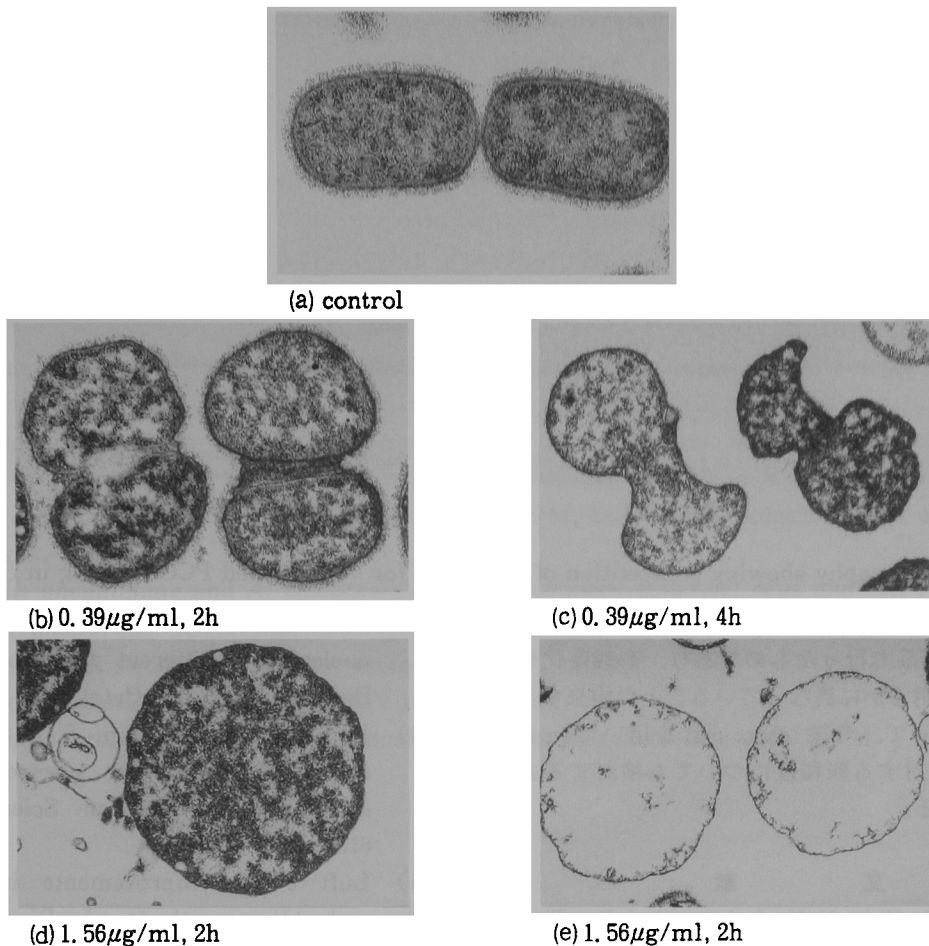


Fig. 8. Transmission electron micrographs of *A. calcoaceticus* Ac-54 cells.  
 (a) Untreated *A. calcoaceticus* cells.  
 Cells after 2h (b) and 4h (c) of exposure to 0.39  $\mu\text{g/ml}$  of ritipenem.  
 (d), (e) Cells after 2h of exposure to 1.56  $\mu\text{g/ml}$  of ritipenem.

には空胞様構造(b)や内膜の断裂像(e)が観察され、さらに stretched constriction (c)や典型的な bulge 状の細胞(d)も観察された。

*A. calcoaceticus* Ac-54 に RIPM を作用させた時の透過電顕像を Fig. 8 (b), (c), (d), (e) に示した。Fig. 8(a) は正常な *A. calcoaceticus* Ac-54 で外膜の外側に莢膜様構造が観察される。Fig. 8 (b), (c) はそれぞれ 0.39  $\mu\text{g/ml}$  (MIC) 作用後 2 時間および 4 時間の像で、隔壁形成部位に膨隆像(b)や分裂異常像(c)が見られる。Fig. 8 (d), (e) はいずれも 1.56  $\mu\text{g/ml}$  作用後 2 時間の像で外膜が剥れた spheroplast 様構造(d)や溶菌像(e)が観察される。

#### 4. PBP<sub>s</sub> に対する親和性

*E. coli* K-12 の PBP<sub>s</sub> に対する RIPM の親和性を Fig. 9 に示した。対照薬として用いた IPM と同様 RIPM も PBP 2 に対して強い親和性を有しており、次いで 1a, 1bs の順であった。PBP 1a, 1bs, 2, 3,

4, 5/6 に対する RIPM の 50% 阻害濃度はそれぞれ 0.025, 0.030, 0.016, 0.500, 0.069 および 0.102  $\mu\text{g/ml}$  であった。

以上の結果より RIPM は *E. coli* や *S. marcescens* では bulge を形成し、*A. calcoaceticus* では bulge を形成しないことが判った。同様な現象はカルバペネム系抗生物質の panipenem (PAPM) を *E. coli* と *Pseudomonas aeruginosa* に作用させた時に観察されており、*E. coli* では球形細胞が、そして *P. aeruginosa* では bulge 状の細胞が観察されたと報告されている<sup>8)</sup>。この様な形態変化の差は、両菌種に対する PAPM の PBP<sub>s</sub> に対する親和性の差に由来しており、RIPM も *E. coli* と *A. calcoaceticus* の PBP<sub>s</sub> に対して異なった親和性を有するために、形態変化でも差が見られたものと推察される。しかし、RIPM と同様な親和性を示す IPM では、*E. coli* で bulge 形成は見られない。この差は恐らく PBP<sub>s</sub> に対する親和性は、精製した細胞質膜画分を

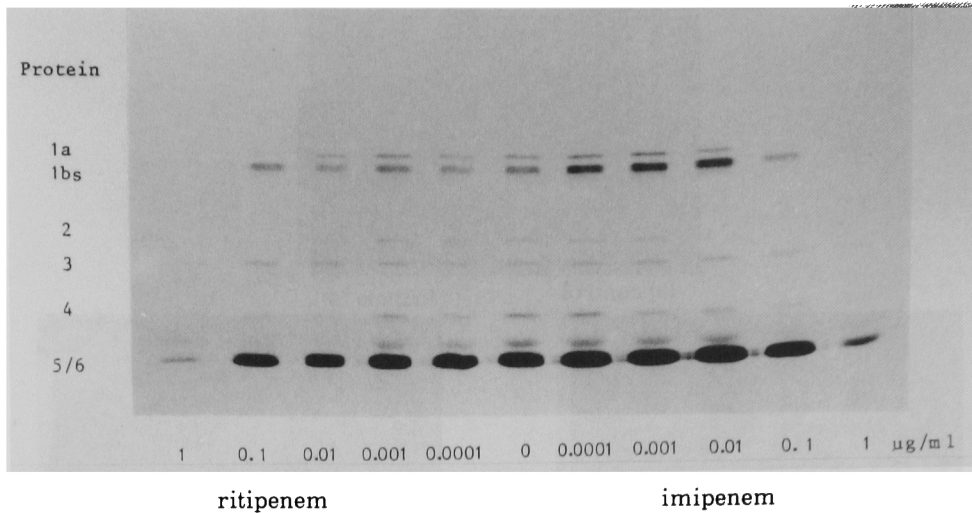


Fig. 9. Fluorography showing competition of ritipenem for  $^{14}\text{C}$ -labeled PCG binding in *E. coli* K-12.

用いて cell-free 系で行ったものであり、形態変化を観察した条件とは明らかに異なっていることに由来すると推察される。従って、今後 intact cell を用いた *in vivo* 系での PBP<sub>s</sub> に対する親和性についても検討する必要があると思われる。

#### 文 献

- 1) Neu H C, Chin N X, Labthavikul P : The *in vitro* activity of a novel penem FCE22101 compared to other  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 16 : 305~313, 1985.
- 2) Jarlier V, Nicolas M H, Philippon A, Giroir A M, Grosset J : *In-vitro* activity of FCE22101 and other  $\beta$ -lactam antibiotics against Enterobacteriaceae resistant to third generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 : 165~172, 1989
- 3) Kellenberger E, Ryter A, 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
- 4) Horidge G A, Tamm S L : Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science* 163 : 817~818, 1969
- 5) Luft J H : Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409~414, 1961
- 6) 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
- 7) Spratt B G : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 72 : 2999~3003, 1975
- 8) 西野武志, 福岡 隆, 本村琢哉, 西口由美子, 大槻雅子 : Panipenem/betamipron の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について。 *Chemotherapy* 39 (S-3) : 55~74, 1991

Morphological alterations of various gram-negative bacteria by ritipenem,  
the active compound of ritipenem acoxil

Takeshi Nishino, Mayumi Tanaka, Shoko Nagatsuji and Masako Otsuki

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

The antibacterial effect of ritipenem (RIPM) against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Acinetobacter calcoaceticus* was examined by phase-contrast, scanning electron and transmission electron microscopy from the viewpoint of morphological alteration. Moreover, the affinity of RIPM for penicillin-binding proteins (PBPs) in *E. coli* was evaluated.

When *E. coli* and *S. marcescens* were exposed to RIPM, bulge cells, spherical cells and cell lysis were observed.

Against *K. pneumoniae* and *A. calcoaceticus*, RIPM induced spherical cells and cell lysis.

An inner membrane defect was observed at the swollen site of bulge cells in *E. coli* and at spherical cells with swollen septa in *A. calcoaceticus*.

RIPM showed excellent affinity for PBP2 in *E. coli*.

These results agree with the morphological changes in *E. coli* treated with RIPM.