

セロファン寒天培地法と抗菌剤 による形態変化

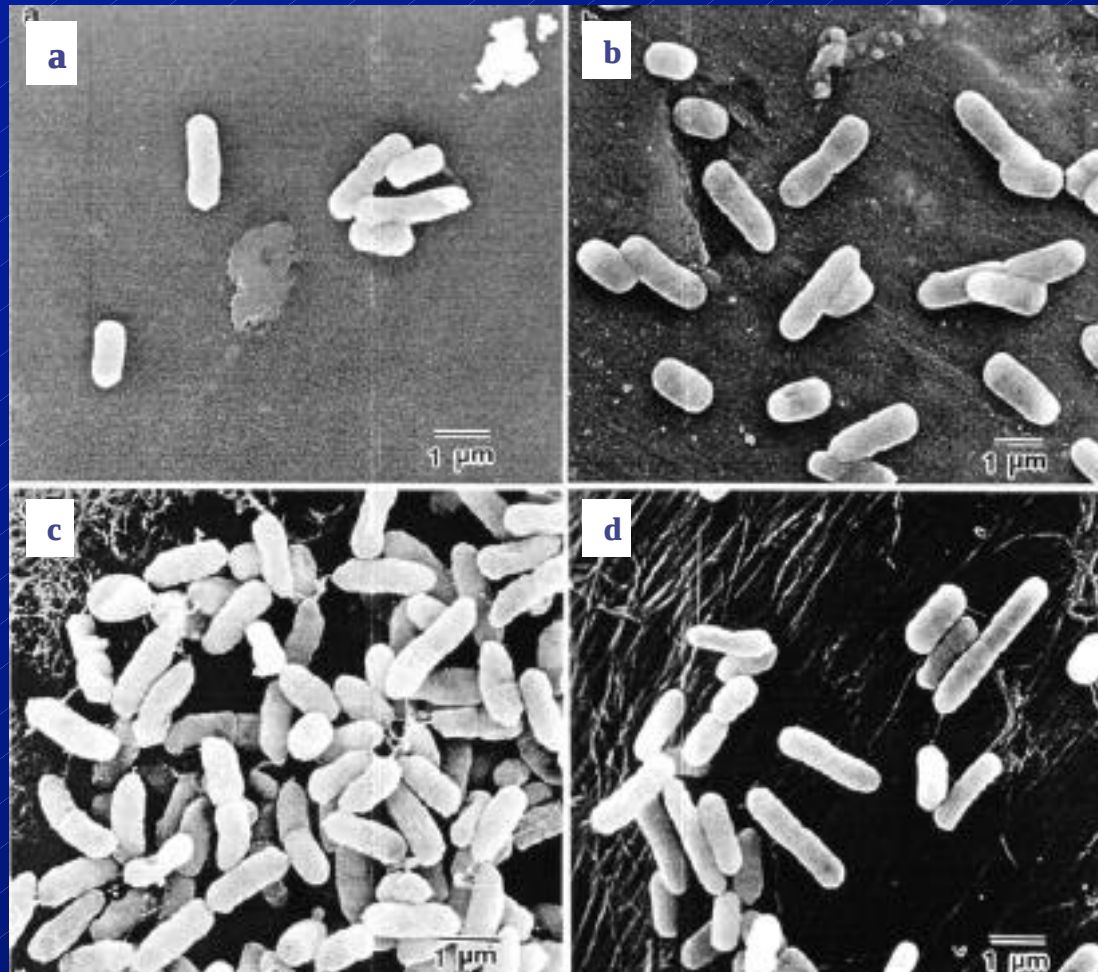
○ 一ノ瀬昭豊 1), カムルディンアハメド 2), 渡辺貴和雄 3), 大石和徳 3),
和泉伸一 4), 寺井陽子 3), 平山壽哉 5), 永武毅 3)

- 1) 長崎大・熱帯医学研究所・共同研究室, 3) 同・感染症予防治療分野
5) 同・病原因子機能解析分野, 2) トルコ国ビルケント大学・分子生物遺伝子
4) 長崎大・歯学・口腔解剖

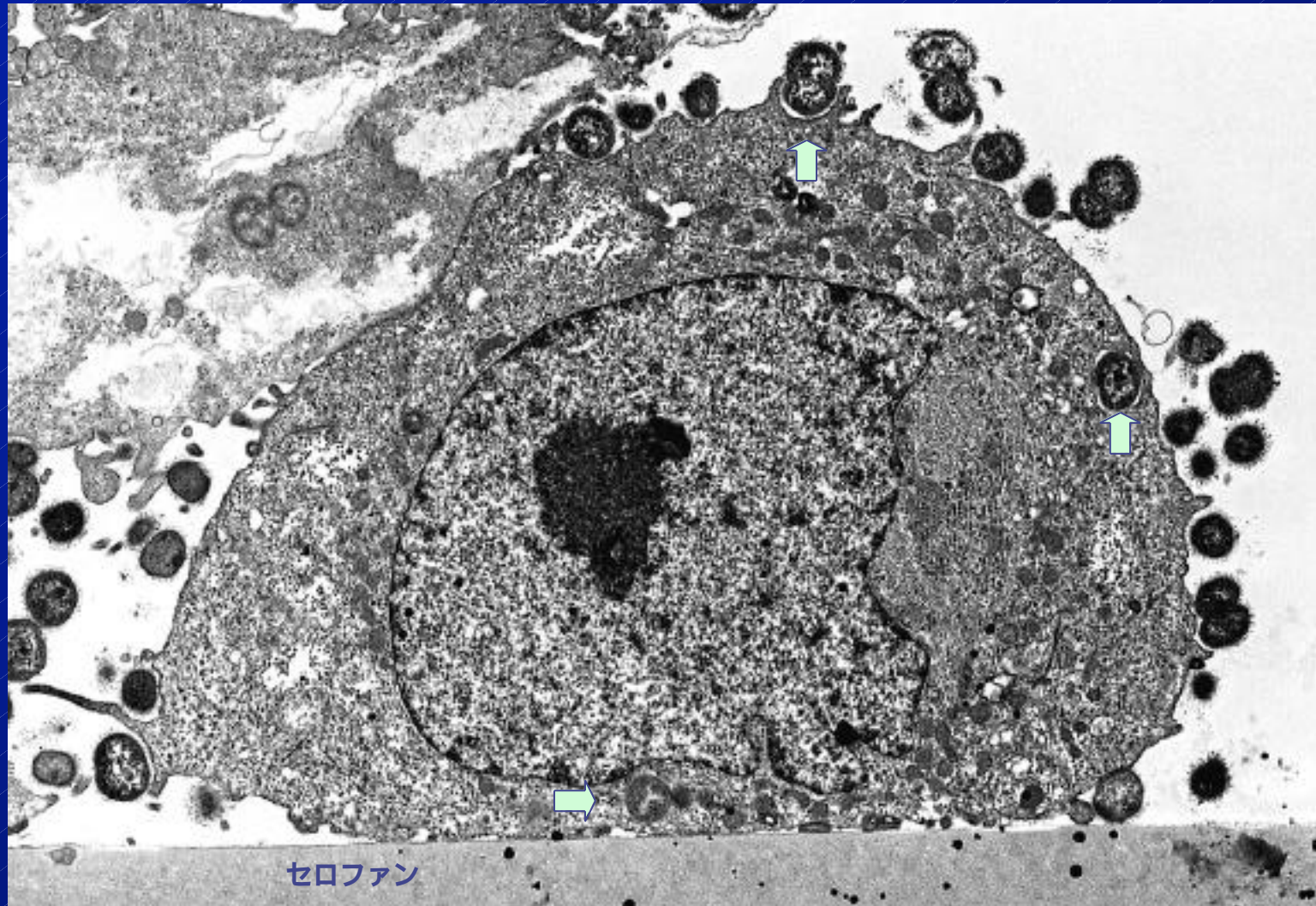
背景と目的

SEM で細菌を観察するには、寒天培地の細菌をかんさつする以外では細菌が増殖している自然の形態を観察できない。特にSEM で困難といわれる鞭毛の形成形態と微細構造の解析、また鞭毛や細胞壁構成成分が生体の免疫応答に関与する。と言われる事などから、私達はSEM およびTEM で細菌鞭毛の形成状態や、細胞壁の微細構造を常に観察できる事を目的に、セロファン寒天培地を用いたSEMおよびTEM 両用 試料作製法の開発を試みた。また、セロファン寒天培地を使用してストレス実験を試みた。

- a: スライドガラス
b: アルミホイール
c: 寒天平板法
d: 濾紙



セロファン上に培養された咽頭癌由来細胞と取り込まれる
Moraxella catarrhalis 菌



材料および方法

菌液の準備 : 病原性大腸菌 *E. coli* O157:H7(ベロトキシン陰性)と、
Burkholderia pseudomallei SP-186 を生理食塩水で 10^8 cfu/ml
に懸濁し菌液とした。

セロファンの準備: SEM 用は花束アレンジ用で、約 60 μ m 厚さ、
TEM 用は市販の工作用カラーセロファンで、約 37 μ m 厚
を使用した。

- * 水に一晩漬して脱色乾燥後、 6×8 mm² に細切り、イオン
スプッター装置(JFC-1100)を使用してイオンエッチングを
セロファン両面に、DC 1.2 kV, 10 mA で7 分間行い、V 字
状の深い溝を作製した。

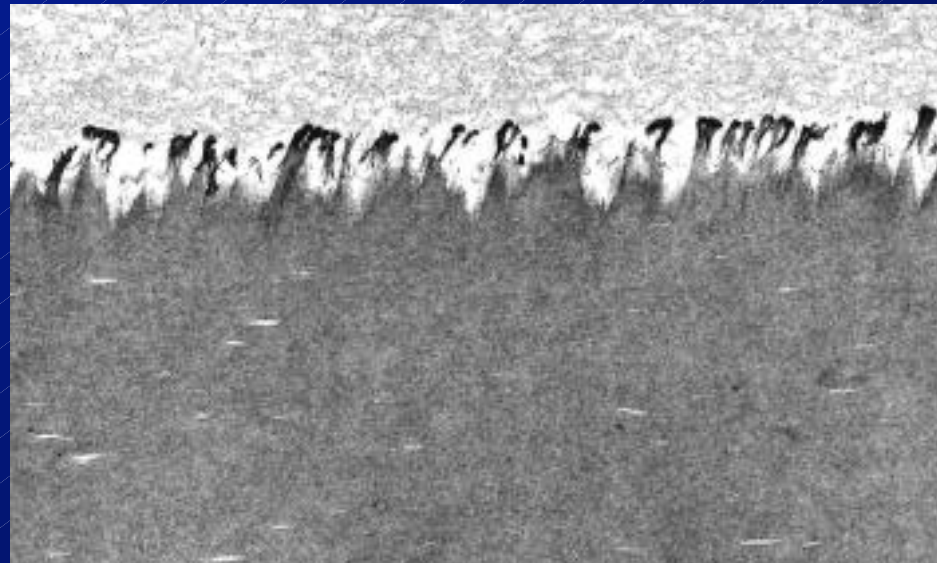
培地の準備 : *E. coli*ドルガルスキー改良培地を。
Burkholderia pseudomallei ... ブレインハートインフュージョ
ン寒天培地を使用した。

- * SEM 用は硬めの 5 % 溶液 (電子線でひび割れを生じない
よう)、TEM 用は少し軟らか目の 4 % 溶液 (包埋樹脂が浸
透するよう) を作製し溶解後、オートクレーブで滅菌して、
55 の湯煎器に漬けた。

未処理のセロファンの断面

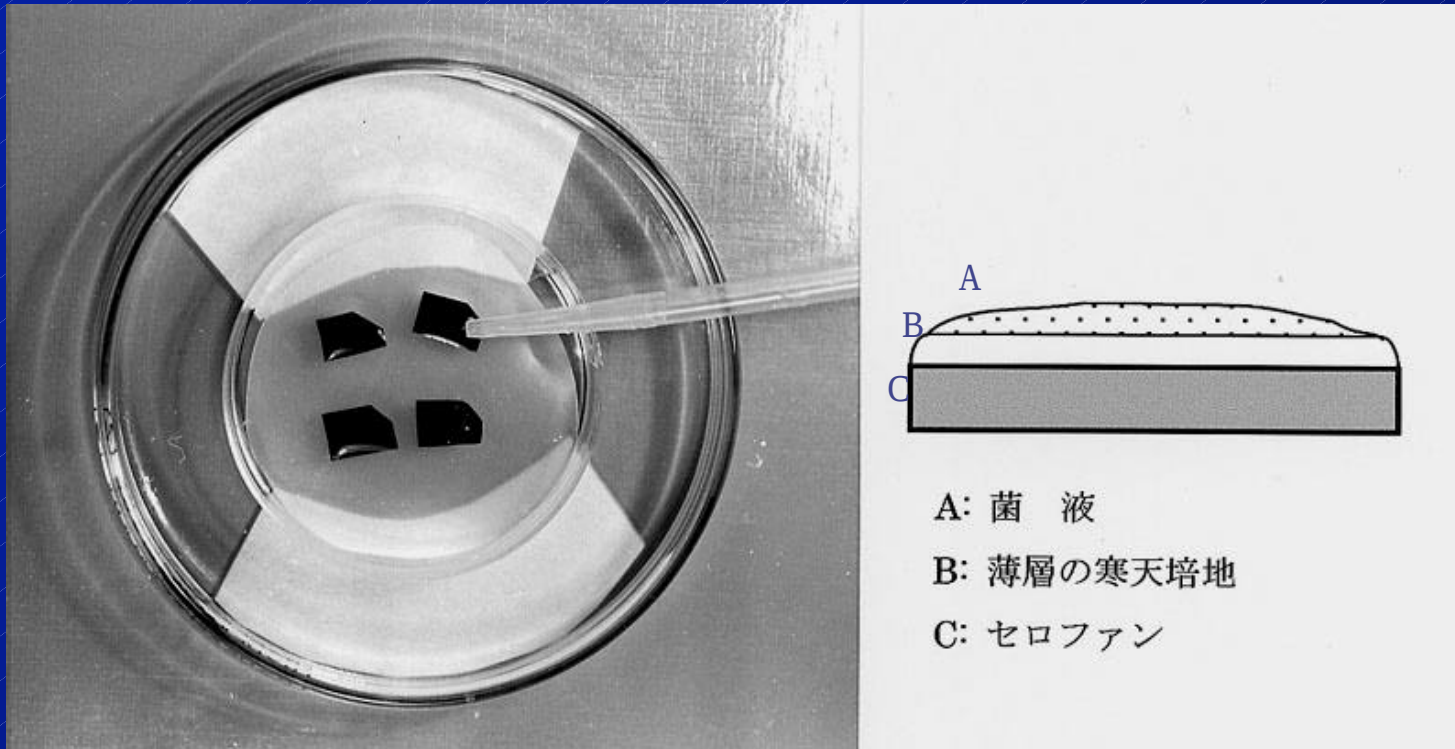


セロファン表面をイオン
エッチングした後の断面
(DC1.2 kV 10 mA, 7分)

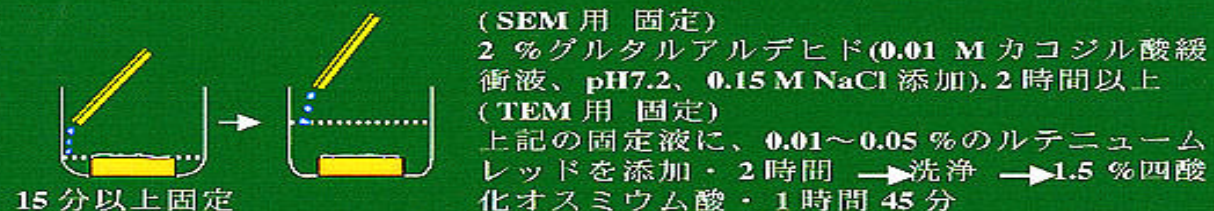




湯銭鍋と寒天培地を溶解したバイヤル瓶



湿室の作製と接種法。湿室内のパラフィルム上にセロファン寒天培地をのせ、菌液をピペットで滴下して接種する。



(脱 水)

50 % アセトン・10 分
70 % アセトン・10 分
80 % アセトン・10 分
90 % アセトン・10 分

* 脱水 90 % まで 4 °C

SEM 試料作製

TEM 試料作製

95 % アセトン・10 分
100 % アセトン・10 分
↓
酢酸イソアミール・20 分
↓
臨界点乾燥
↓
載台に接着後、イオンス
パターン・Au-Pd, 1200 V,
10 mA・20 nm 厚に蒸着
↓
JSM 840A, 10 kV, WD:15mm
で観察

95 % アセトン、1~2×5 mm² に細切・10 分
100 % アセトン・10 分
無水アセトン・40 分

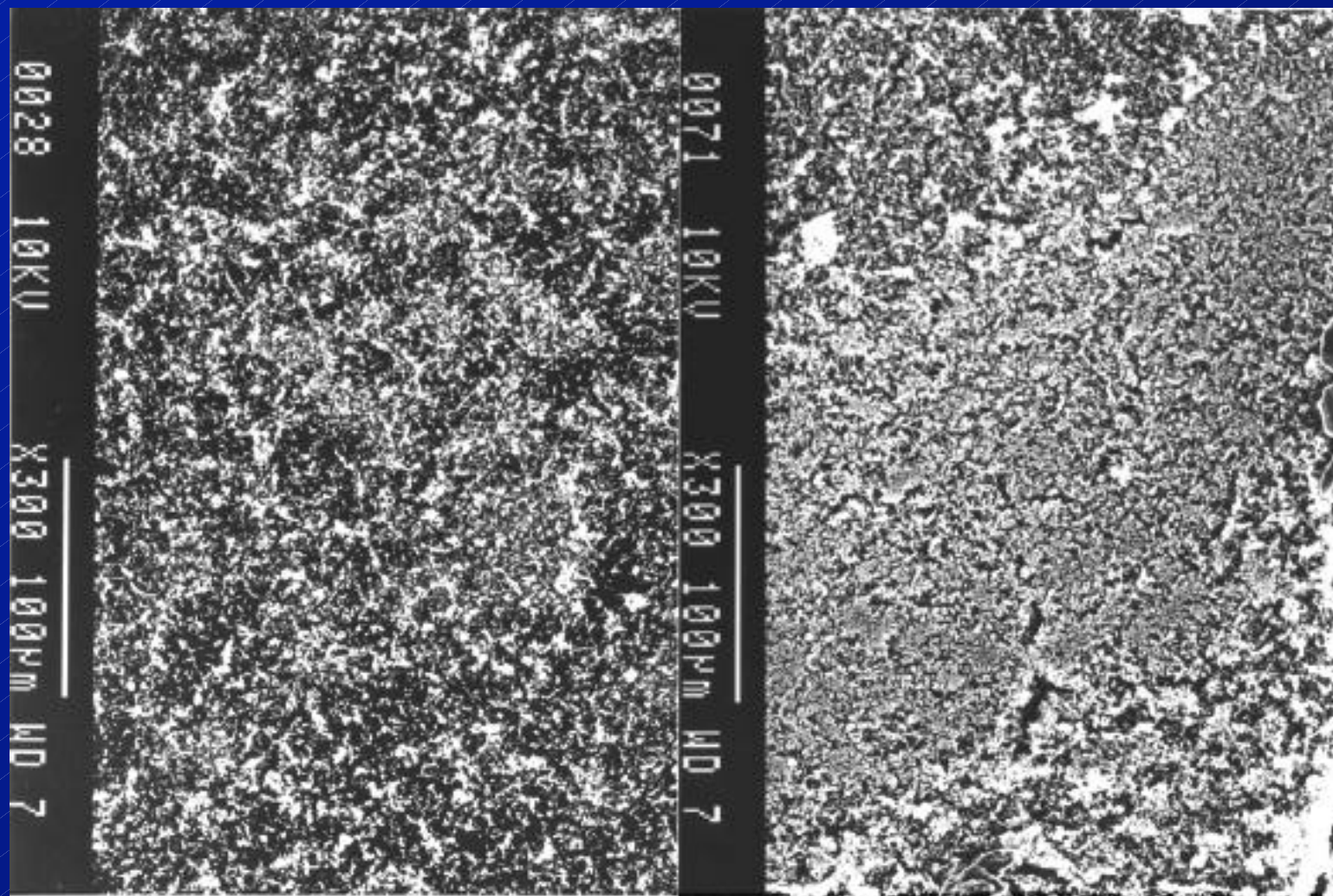
↓
プロピレンオキシド・20 分

↓
低粘度樹脂クエトール 653 : プロピレン
オキシド (6 : 4)、一晚震盪機で震盪

↓
小型デシケーター中の蒸発法でプロ
ピレンオキシドを蒸発 (1~2 晩)

↓
新しい混合樹脂でシリコン包埋板に包埋、
37 °C で 2 時間、60 °C で 2 晩重合完結する

↓
ウルトラカット E でダイヤモンド使用・80 nm
切片を作製し、酢酸ウラニル 45 分、クエン酸
鉛 15 分染色。その後カーボン蒸着を行い
透過型電子顕微鏡 (JEM-100 CX, 80 kV) で観察



大腸菌(E.coli) a: 37 °C. 6hrs 培養 b: 37 °C. 16hrs 培養 (撮影倍率 ×300)

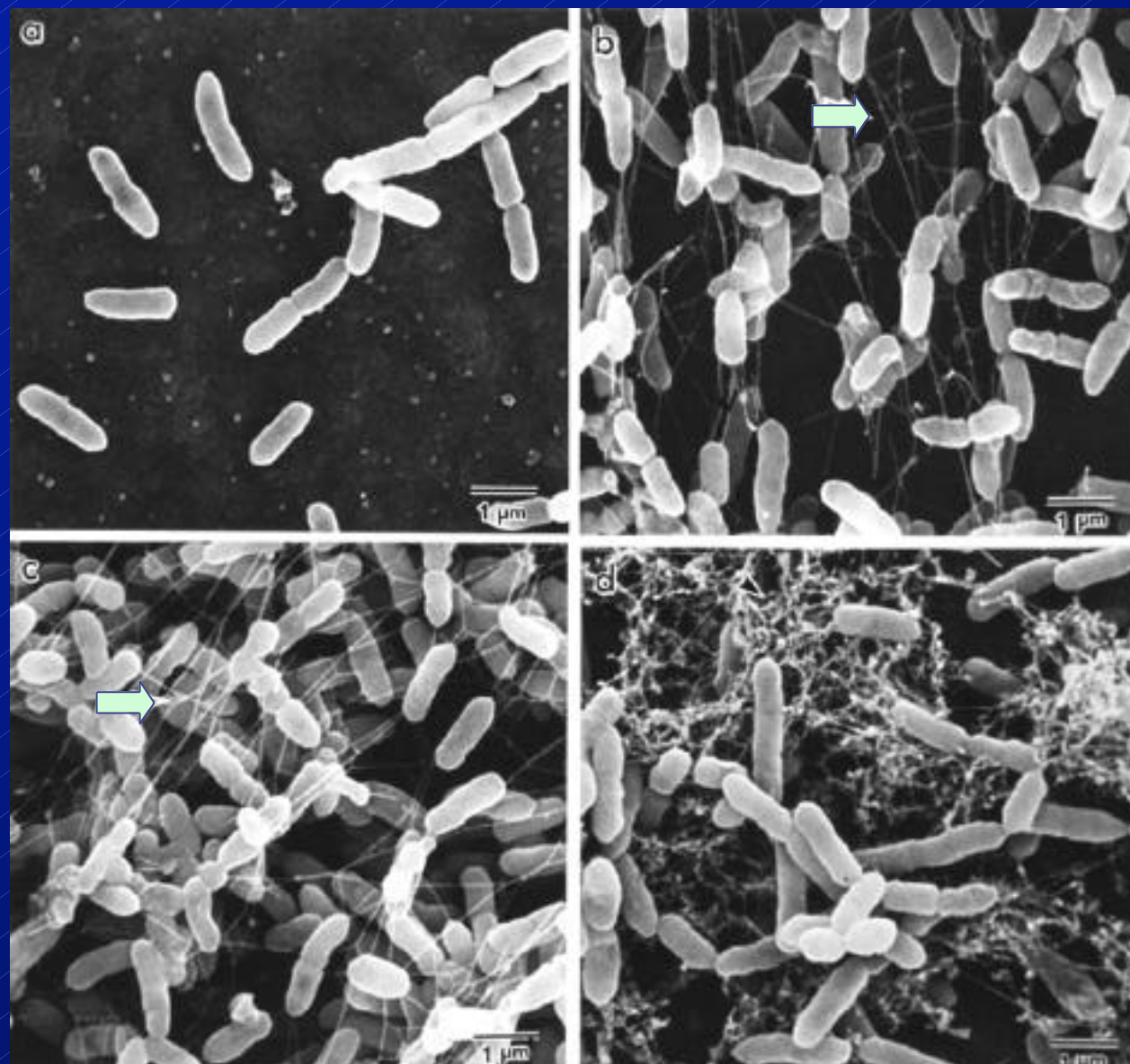
セロファン寒天培地に
増殖した *B. pseudomallei*

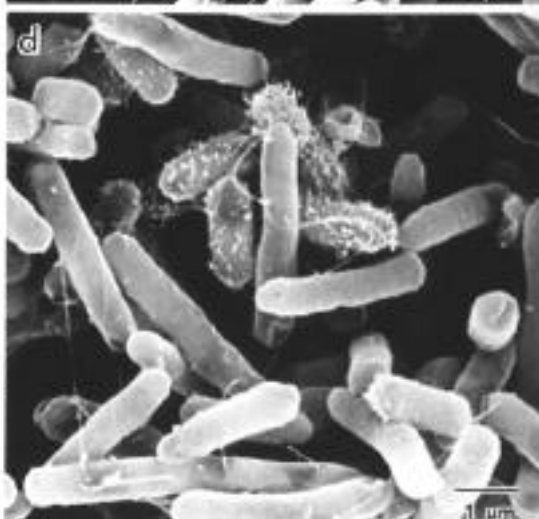
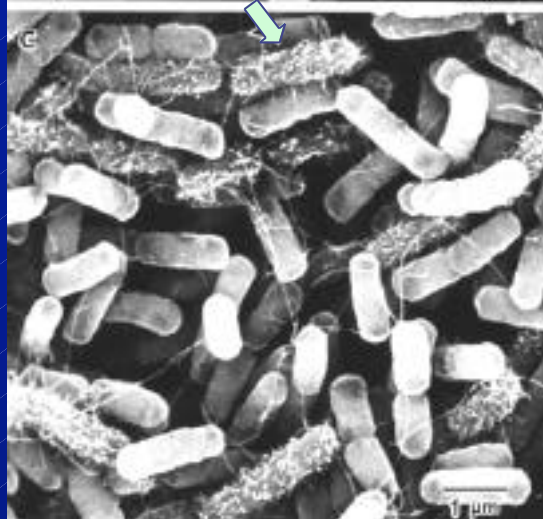
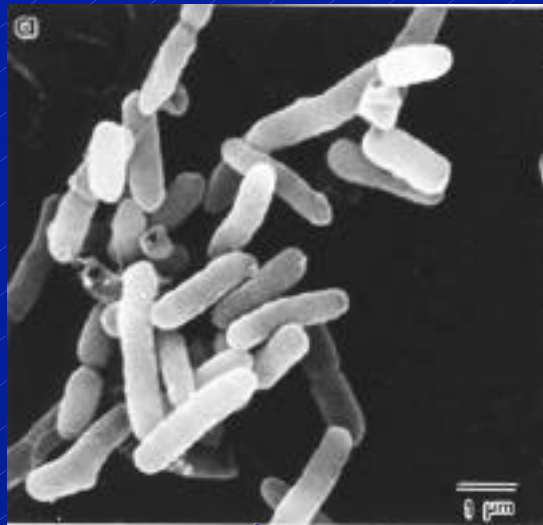
a: 2 時間培養

b: 4 時間培養

c: 8 時間培養

d: 16 時間培養



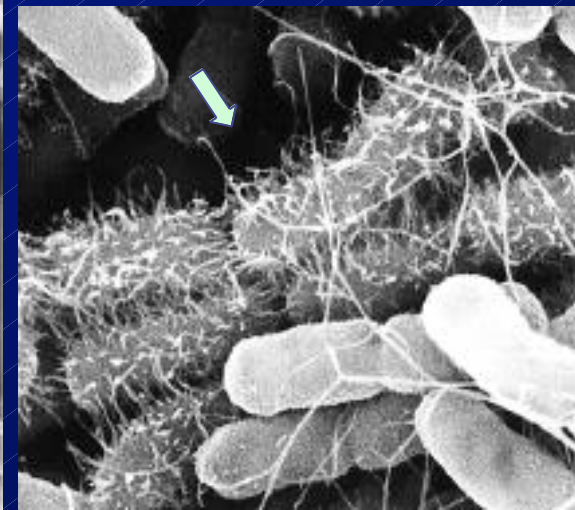


a: 2 時間培養

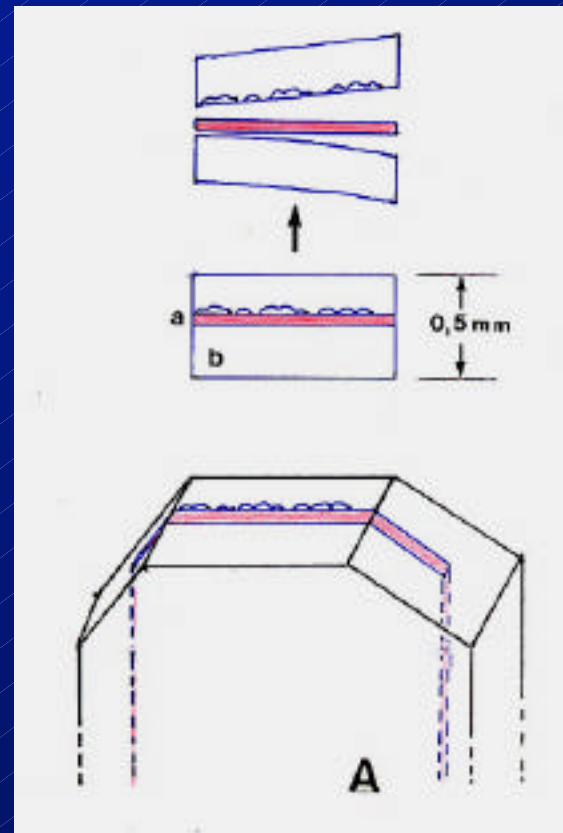
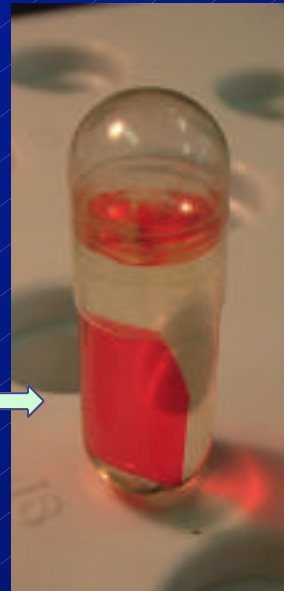
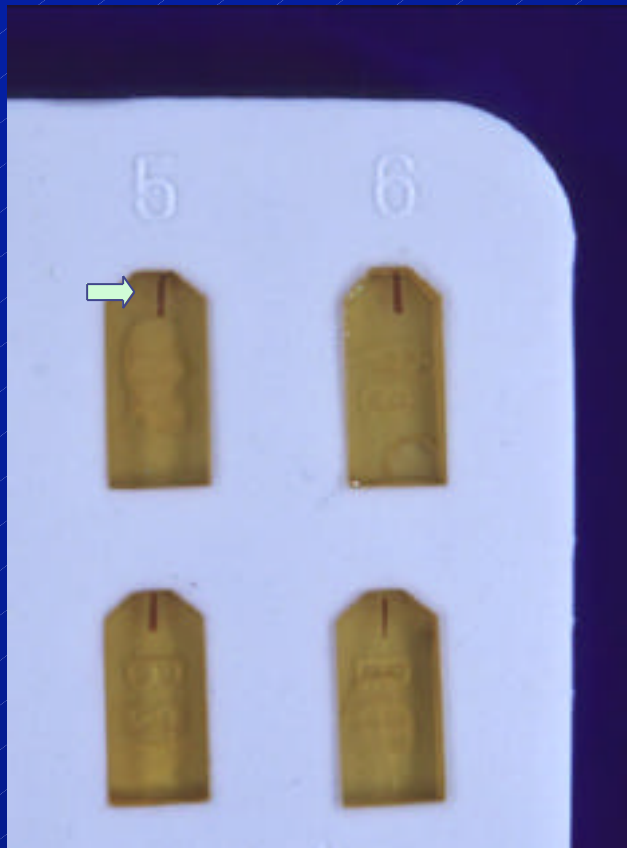
b: 4 時間培養

c: 6 時間培養

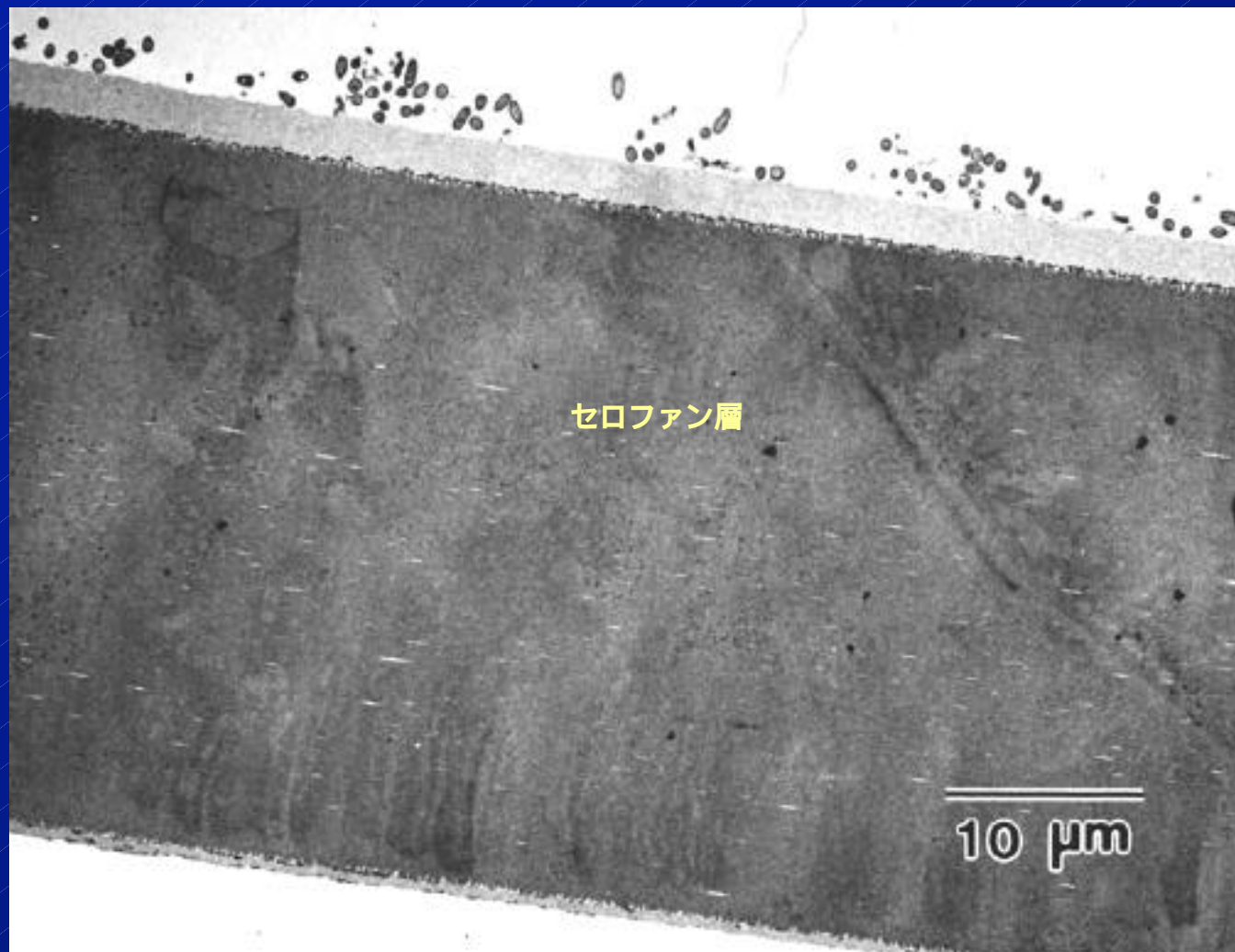
d: 16 時間培養



セロファン寒天培地に増殖した *E. coli* O157:H7(ベロトキシン陰性)



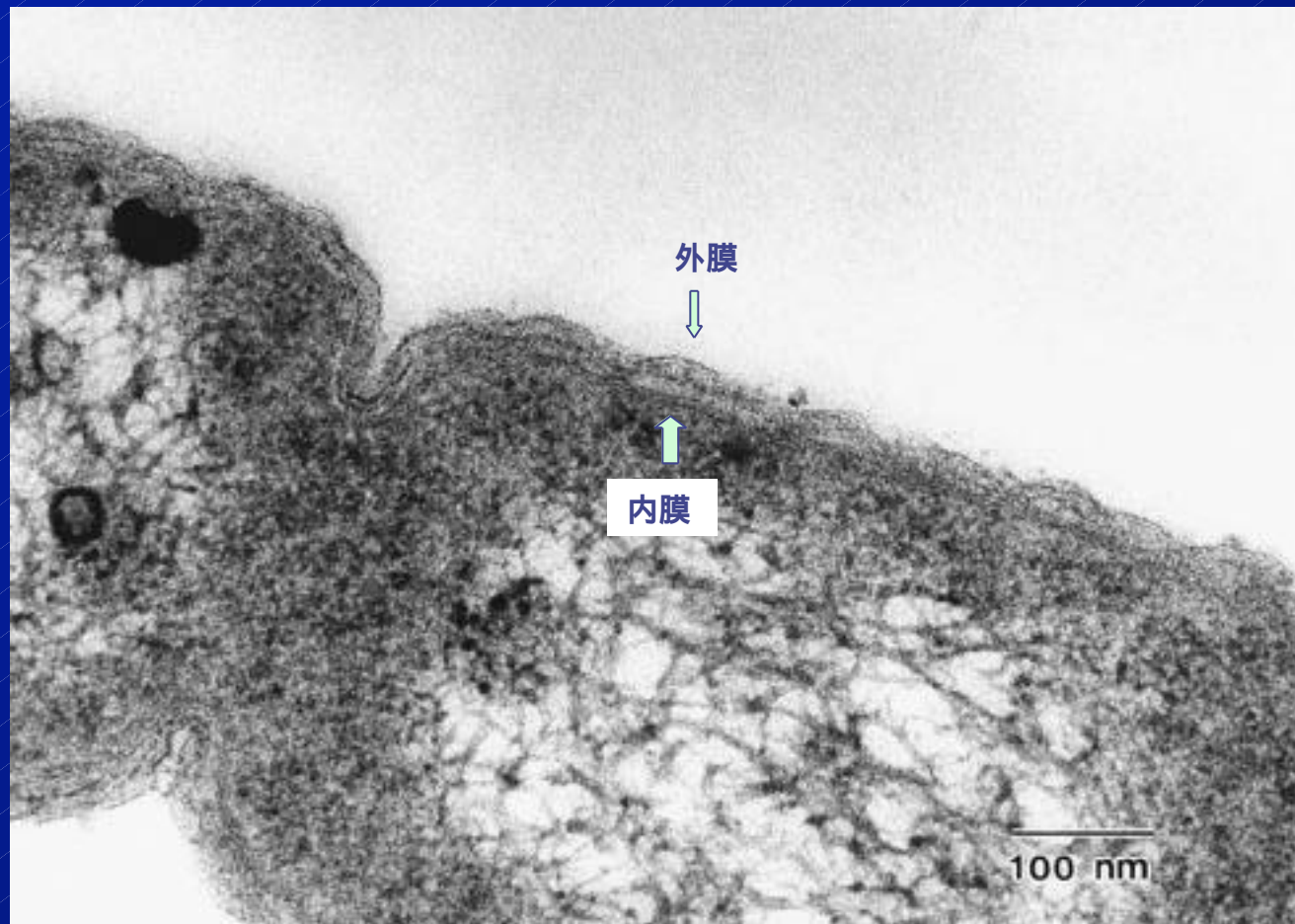
セロファン寒天培地の包埋とトリミングの図



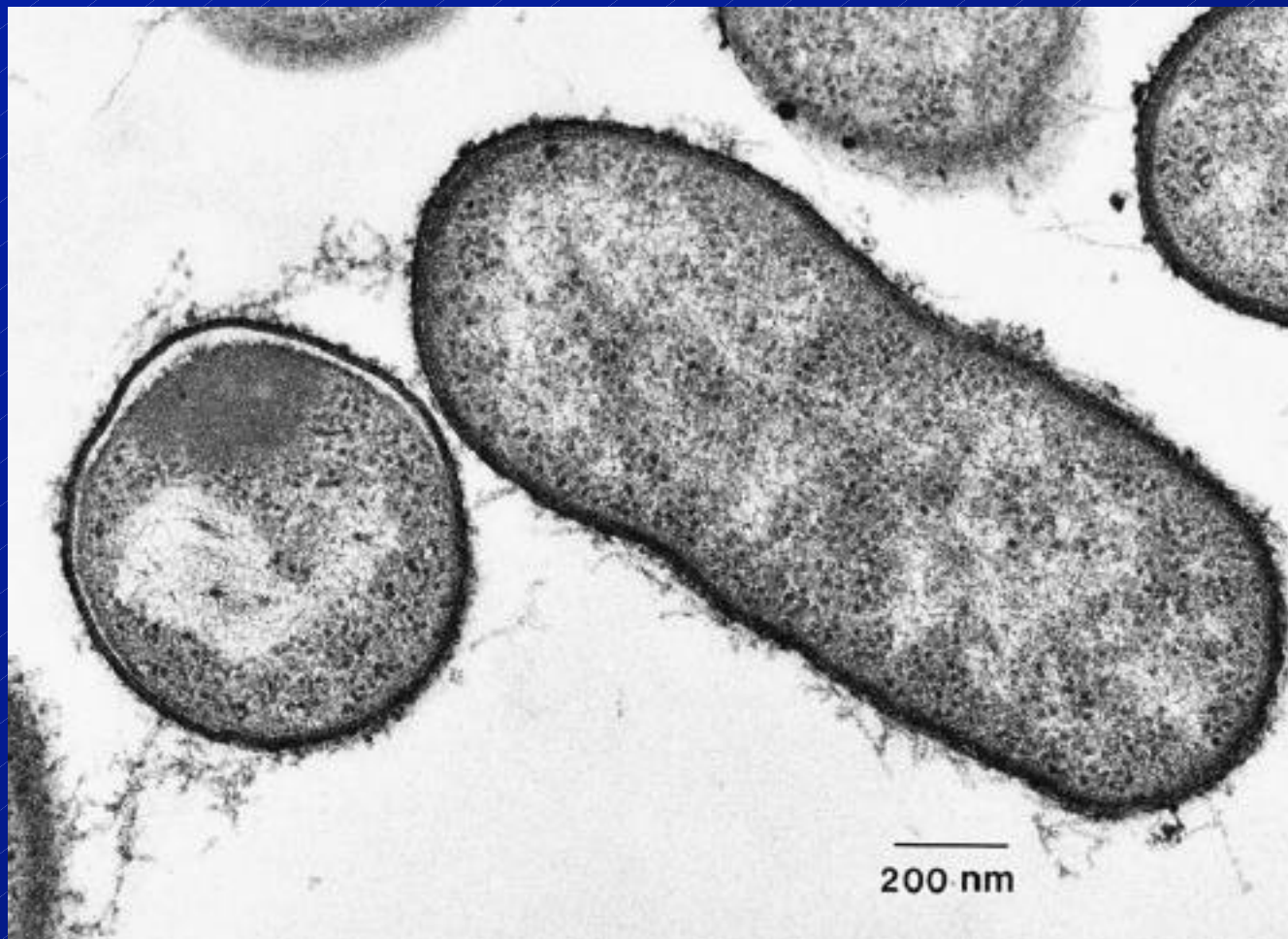
B. Pseudomallei が増殖したセロファン寒天培地断面の
弱拡大TEM像



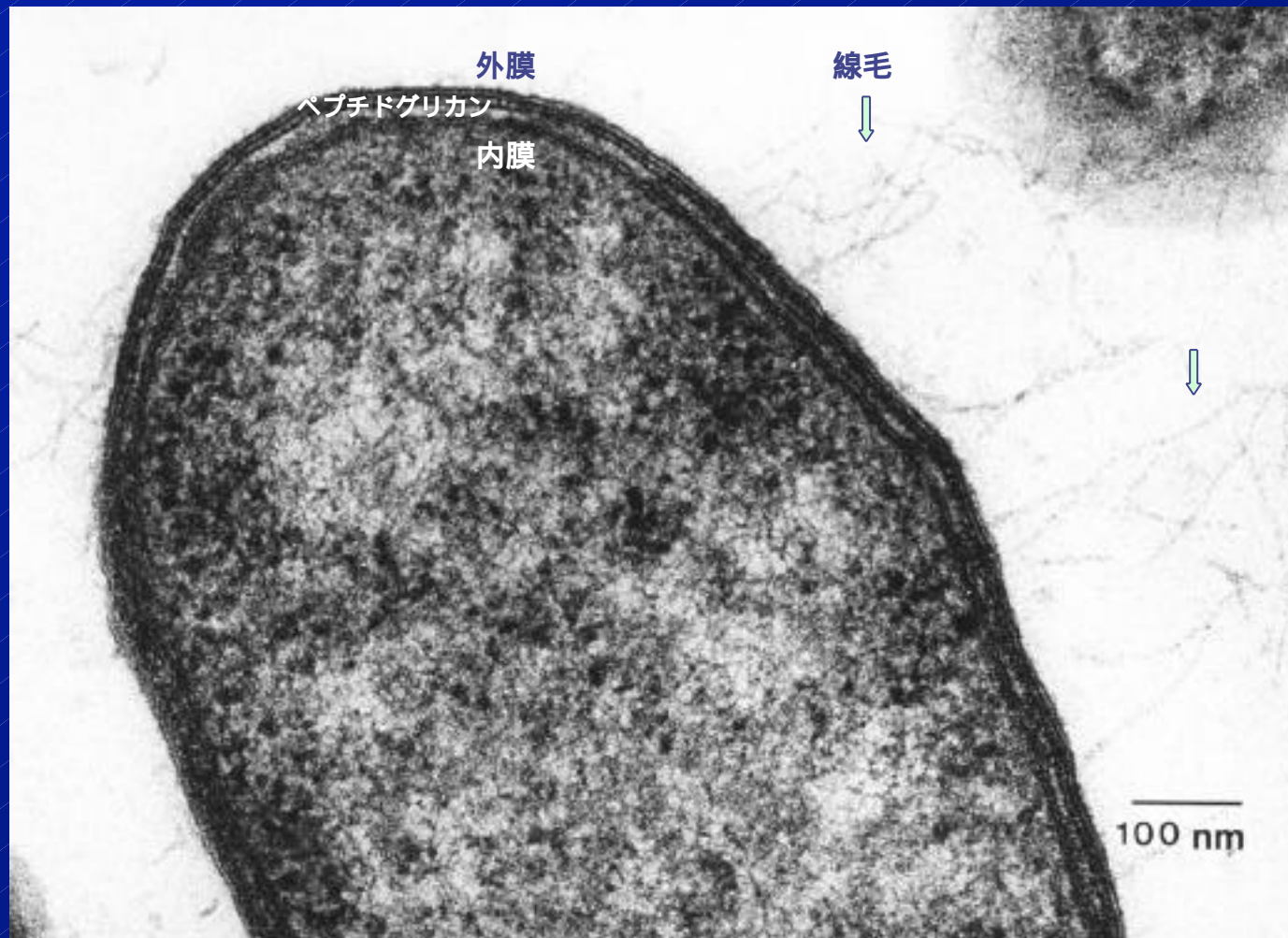
B. pseudomallei がセロファン寒天培地上に増殖した強拡大TEM像



B. pseudomallei の強拡大TEM像



E. Coli O157:H7(ベロトキシン陰性)の拡大像



E. Coli O157:H7(ベロトキシン陰性)の強拡大像

Nitrite Reductase from *Pseudomonas aeruginosa* Released by Antimicrobial Agents and Complement Induces Interleukin-8 Production in Bronchial Epithelial Cells

BORANN SAR,^{1,*} KAZUNORI OISHI,¹ AKIHIRO WADA,² TOSHIYA HIRAYAMA,²
KOUJI MATSUSHIMA,³ AND TSUYOSHI NAGATAKE¹

Department of Internal Medicine¹ and Department of Bacteriology,² Institute of Tropical Medicine,
Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, and Department of Molecular Preventive Medicine,
School of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113,³ Japan

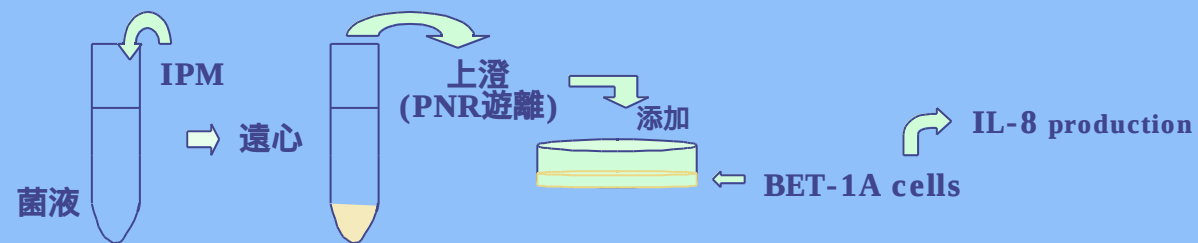
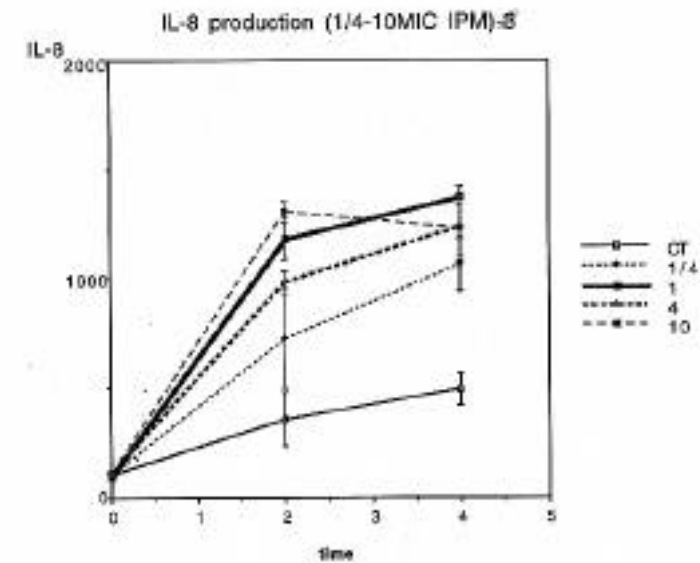
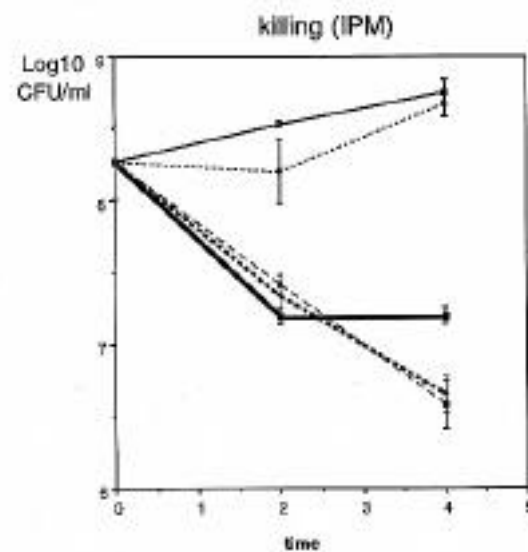
Received 7 October 1998/Returned for modification 6 January 1999/Accepted 28 January 1999

We have recently reported that nitrite reductase, a bifunctional enzyme located in the periplasmic space of *Pseudomonas aeruginosa*, could induce interleukin-8 (IL-8) generation in a variety of respiratory cells, including bronchial epithelial cells (K. Oishi et al. Infect. Immun. 65:2648-2655, 1997). In this report, we examined the mode of nitrite reductase (PNR) release from a serum-sensitive strain of live *P. aeruginosa* cells during in vitro treatment with four different antimicrobial agents or human complement. Bacterial killing of *P. aeruginosa* by antimicrobial agents induced PNR release and mediated IL-8 production in human bronchial epithelial (BET-1A) cells. Among these agents, imipenem demonstrated rapid killing of *P. aeruginosa* as well as rapid release of PNR and resulted in the highest IL-8 production. Complement-mediated killing of *P. aeruginosa* was also associated with PNR release and enhanced IL-8 production. The immunoprecipitates of the aliquots of bacterial culture containing imipenem or complement with anti-PNR immunoglobulin G (IgG) induced a twofold-higher IL-8 production than did the immunoprecipitates of the aliquots of bacterial culture with a control IgG. These pieces of evidence confirmed that PNR released in the aliquots of bacterial culture was responsible for IL-8 production in the BET-1A cells. Furthermore, the culture supernatants of the BET-1A cells stimulated with aliquots of bacterial culture containing antimicrobial agents or complement similarly mediated neutrophil migration in vitro. These data support the possibility that a potent inducer of IL-8, PNR, could be released from *P. aeruginosa* after exposure to antimicrobial agents or complement and contributes to neutrophil migration in the airways during bronchopulmonary infections with *P. aeruginosa*.

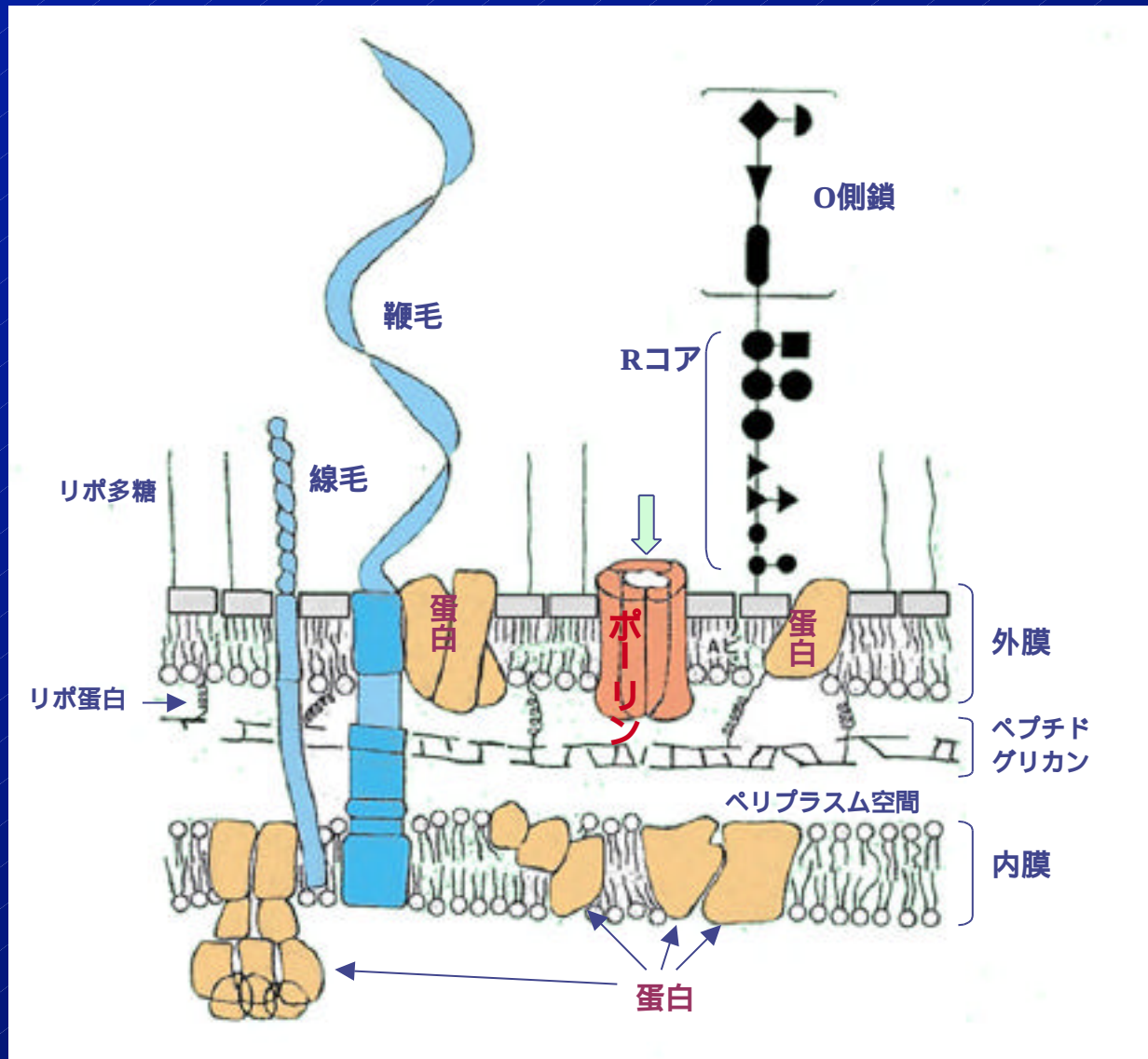
Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is a virulent pathogen in immunocompromised hosts (32). Nosocomial pneumonia caused by *P. aeruginosa* is associated with a high rate of

Pseudomonas nitrite reductase (PNR) with a molecular mass of 60,204 Da is recognized as a periplasmic component active in energy generation (38). The enzymatic activity of PNR is not

Killing of *P.aeruginosa* It-1 strain and IL-8 production by BET-1A cells in response to the reaction mixture containing different concentration of IPM



グラム陰性菌の表層構造



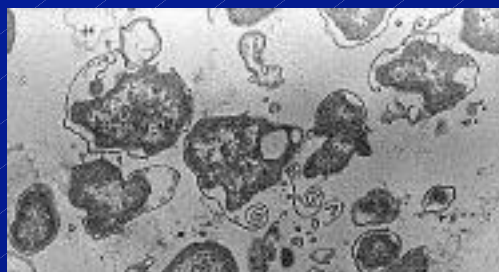
緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* It-1) の抗菌剤 Imiperem による形態変化



G M (ゲンタマイシン) : アミノグリコシド系・蛋白合成阻害剤

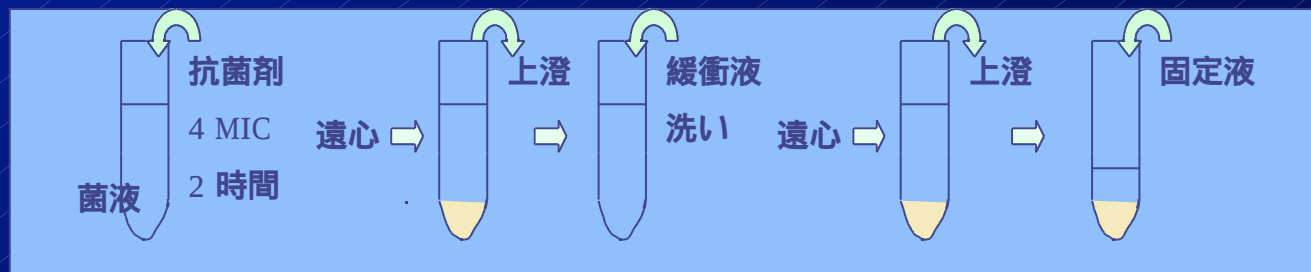


C A Z (セフトアジジム) : セフェム系・細胞壁合成阻害剤



I P M (イミペレム) : カルバペネム系・細胞壁合成阻害剤

* 他に C P F X : DNA合成阻害剤など



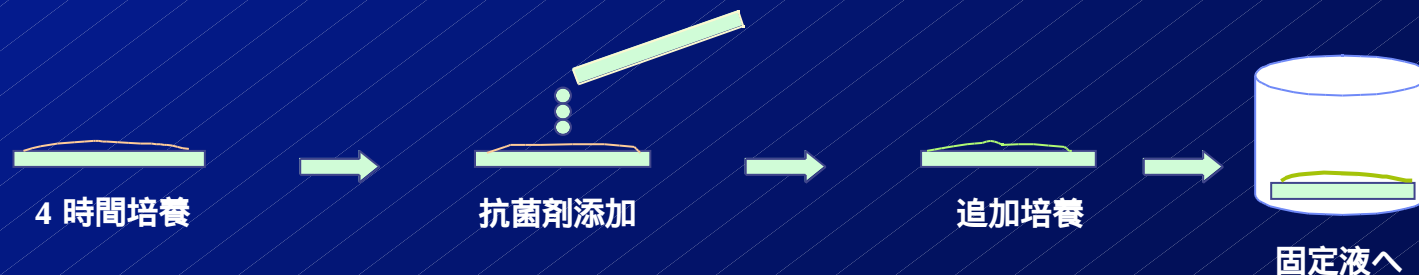
応用・セロファン寒天培地による緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* It-1) の抗菌剤(Imiperem) による形態変化

菌液の準備： 接種する菌液は生食水で 10^7 cfu /mL に調整。

抗菌剤の準備： 抗菌剤は Imiperem を使用し、2 MIC ($3.12 \mu\text{g} / \text{mL}$) となるよう調整。

* 最終濃度は菌液と混合されて、1 MIC ($1.56 \mu\text{g} / \text{mL}$) となる。

方法： Trypticase Soy Agar を使用したセロファン寒天培地に、菌液 $10 \mu\text{L}$ を滴下し、 37°C の恒温器を用いて、湿室条件で 4 時間培養後、増殖している細菌のコロニー上に抗菌剤 $10 \mu\text{L}$ (濃度 2 MIC) を滴下し、追加培養を行った。その後、1 時間、2 時間、4 時間、16 時間 経過ごとに取り出し、固定液に浸して、SEM および TEM 両用の試料作製を行った。



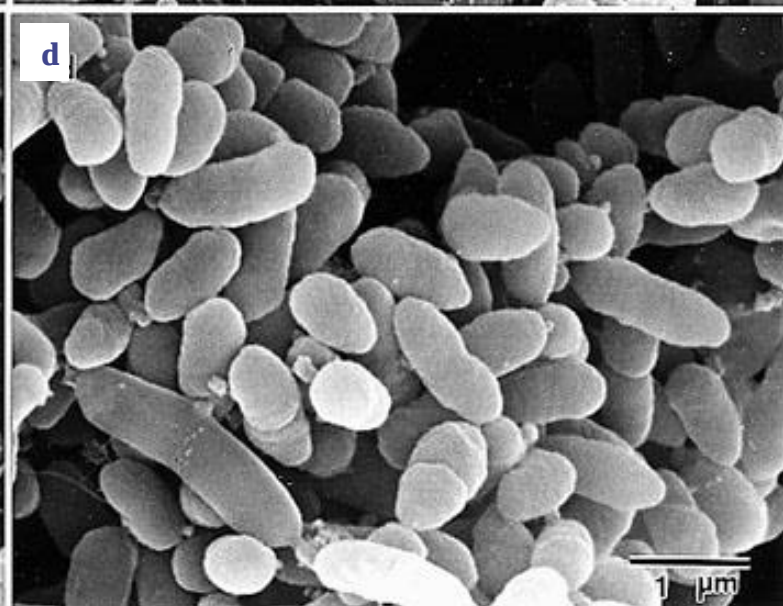
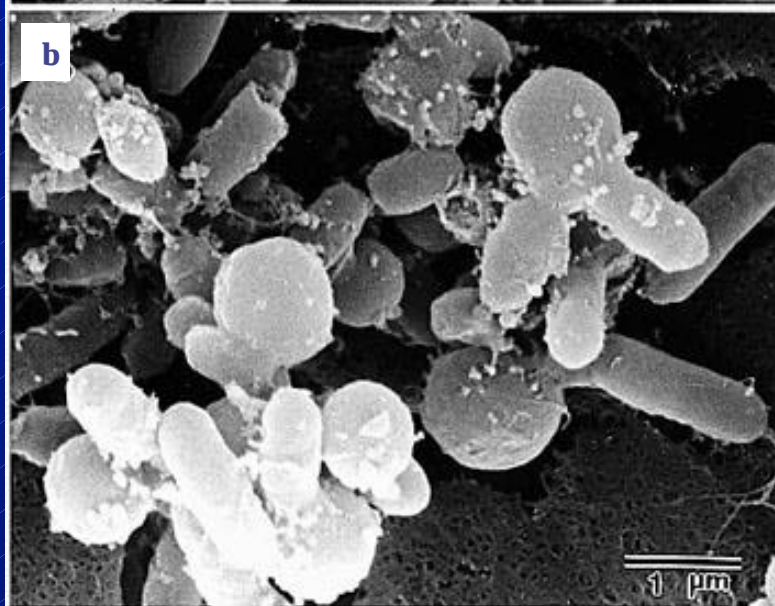
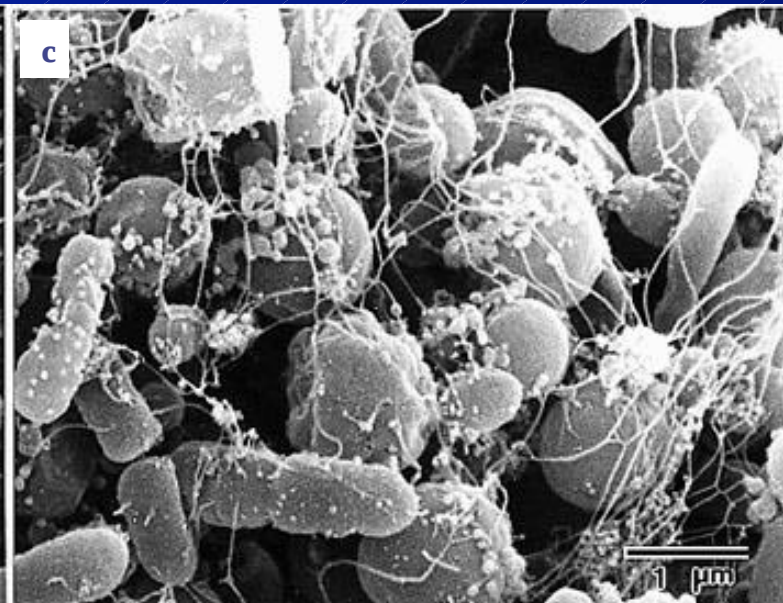
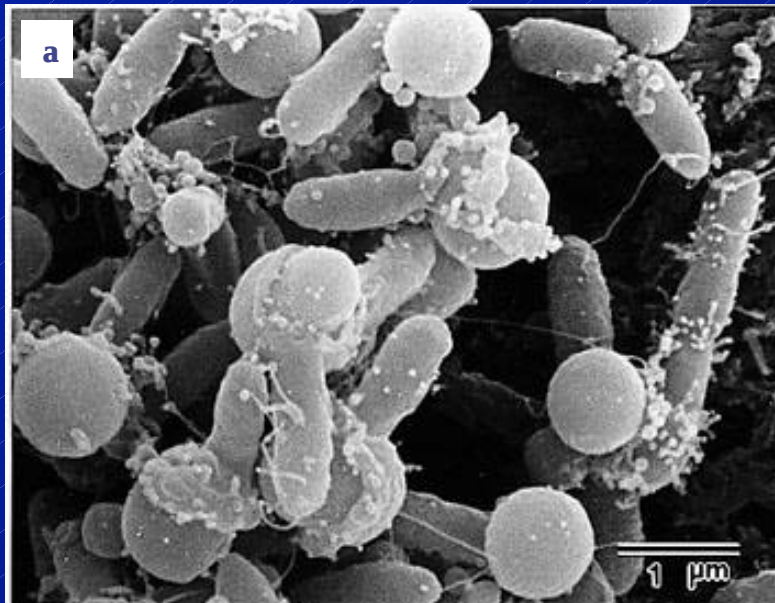
抗生劑添加

a: 1 時間

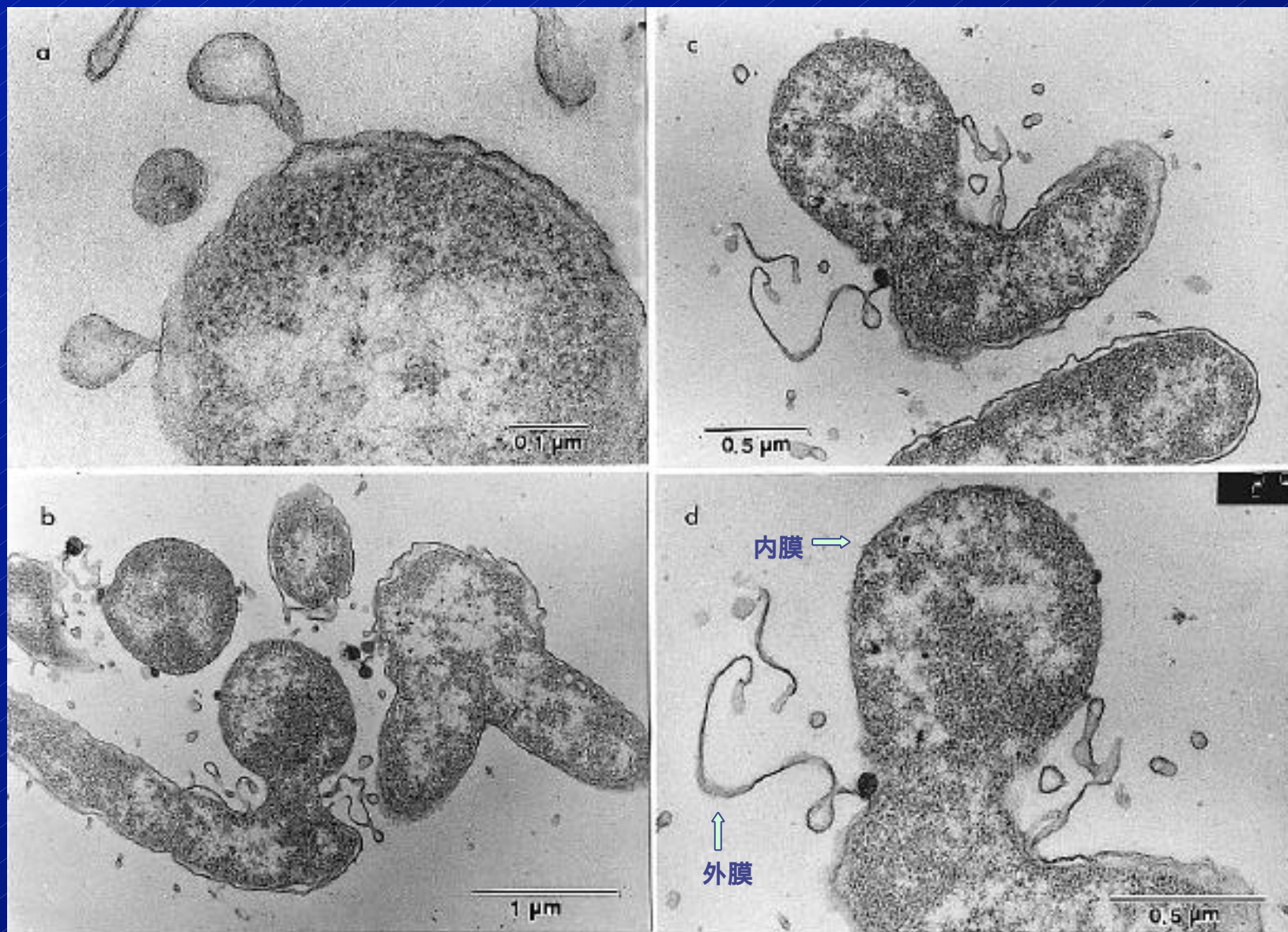
b: 2 時間

c: 4 時間

d: 16 時間



抗生剤添加後、1時間のTEM 像



[セロファン寒天培地法の考察]

- 1) セロファンの利点によつてセロファン寒天培地法が開発された。
(セロファンの利点)・電顕試料作製に用いる、あらゆる有機溶剤に不溶性である。
 - ・包埋樹脂との接着が良く、切削が容易である。
 - ・セロファン表面にイオンエッチング処理でV字谷を作れる。
 - ・イオン接着を行うポリ-L-リジン処理ができ、細胞培養も可。
- 2) セロファン表面をイオンエッチングする事でV字谷を作製する、一つのナノテクノロジーを行うことで、寒天が離脱することを防止できSEM試料作製が可能となつた。またTEM試料作製においても、樹脂との接着力が増し、切片においての破れを防止する事ができた。これにより同一試料からの良好なSEM, TEM像の観察が可能となり、鞭毛、線毛の形成過程が観察できた。
- 3) 低粘度エポキシ樹脂を使用のため、菌体内部まで良く樹脂が浸透し、穴開きも生じなかった。
- 4) 結果のような経時変化のコロニー像は、培養初期の自然な増殖過程の「その場」を捕らえているものと推定される。
- 5) 本法で鞭毛、線毛が頻繁に観察された。この理由は、生理食塩水に懸濁した細菌液の極微量をセロファン寒天培地上に接種し、乾燥防止のため湿室条件に保ち培養した事によると考えられる。
- 6) またストレス処理による「細菌のその場」の微細構造変化を観察できた事から、この「セロファン寒天培地」は、あらゆる微生物の抗菌試験や、食品関係に利用されている酵母を始め、あらゆる微生物の生育増殖試験にも応用できると考えられる。