

多形核好中球による *Pseudomonas aeruginosa* の食食殺菌効果と 抗生物質の作用

峯 靖弘・野々山重男・西 田 実
藤沢薬品・中央研究所

(昭和 48 年 11 月 18 日受付)

感染を含む種々の侵襲に対して複雑な生体の防御機能が多様に反応することはよく知られている。喰細胞、とくに多形核好中球、マクロファージなどは防御機能に関与する因子として重要な役割を演じているが、感染治療における抗生物質とどのようななかかわりあいをもつかという問題については十分な検討がない¹⁻⁶⁾。本邦においては藤井および紺野ら、中沢らが映画および電顕像で白血球またはマクロファージと菌および抗生剤との相互作用を観察している⁷⁻⁹⁾。

筆者らは喰細胞として、まず多形核好中球をとりあげ、その *Pseudomonas aeruginosa* に対する食食殺菌効果を定量的に検討し、2, 3 の抗生物質の影響を検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株

Pseudomonas aeruginosa 705, 721, 724, 792, 7005 NCTC-10490 株を使用した。各菌株の前培養液を 3,500 rpm で 20 分遠心し、HANKS の塩類溶液 (HANKS' BSS) で洗浄後、実験に供した。

2. 使用抗生物質

抗生物質はつぎのものを使用した。

Carbenicillin (CB-PC), Gentamicin (GM), Polymyxin B (PL-B)。

3. 多形核好中球 (PMN) の採取

PMN は正常家兎の腹腔内に、50 単位ヘパリン含有の 0.1% glycogen を 200 ml 投与し、4 時間後に開腹して PMN をシリコン処理遠心管に無菌的に採集した。なお混在する赤血球を除去するため沈澱した細胞を蒸留水で 20 秒処理後直ちに食塩水で等張にし、HANKS' BSS で洗浄した。このようにして得られた細胞の約 98% は PMN であつた。なお一定の活性をもつ PMN を得るため少なくとも 3 羽のウサギから得た PMN を混合して実験に使用した。

4. PMN の *Ps. aeruginosa* に対する食食殺菌作用

PMN の HANKS' BSS 浮遊液 (8×10^6 /ml) を、シリコン処理遠心管 (3×7 cm) に 5 ml ずつ分注した。これに HANKS' BSS で洗浄した *Ps. aeruginosa* を接種し、振盪しながら 37°C, 4 時間反応後、3,500 rpm 20

分遠心し、PMN と *Ps. aeruginosa* を沈澱させた。この沈澱した細胞に滅菌蒸留水を加え PMN を破壊後、通常のコロニー形成法で残存総生菌数を測定した。

5. 抗生物質共存下の PMN の食食殺菌作用

PMN の HANKS' BSS 浮遊液 (8×10^6 /ml) と種々の濃度の抗生物質溶液 (MIC, 1/4·MIC, 1/16·MIC) および *Ps. aeruginosa* (10^6 /ml) の 3 者からなる系、その対照として抗生物質と *Ps. aeruginosa* の系、PMN と *Ps. aeruginosa* の系および *Ps. aeruginosa* を HANKS' BSS に加えた系を調製した。それを 37°C で 4 時間振盪し、3,500 rpm 20 分間遠心して菌および PMN を沈澱させた。なおこの時点で抗生物質を完全に除去するため、HANKS' BSS で 2 回洗浄した。沈渣の PMN および菌に滅菌蒸留水を加え、PMN を破壊した後、残存総生菌数を測定した。

抗生物質存在下における PMN の食食殺菌活性は次式によつて K_{rel} 値として表示し、 K 値が大きいほど食食殺菌活性の大きいことを示す。

$$K = \log \left(\frac{a \cdot p}{b \cdot c} \right)$$

p : 菌+PMN の 4 時間後の残存生菌数

a : 菌+抗生剤の 4 時間後の残存生菌数

b : 菌+抗生剤+PMN の 4 時間後の残存生菌数

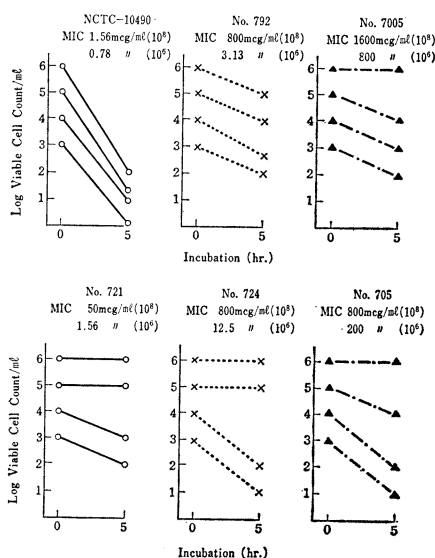
c : 菌だけの 4 時間後の生菌数

K : 抗生剤共存下における PMN の食食殺菌活性の相対的増強係数

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{PMN の効果: } \log \frac{c}{p}, \text{ 抗生剤の効果: } \log \frac{c}{a} \\ \text{PMN+抗生剤の効果: } \log \frac{c}{b} \\ \log \frac{c}{b} = K \left(\log \frac{c}{p} + \log \frac{c}{a} \right) = K \left(\log \frac{c^2}{pa} \right) \\ K = \frac{\log c/b}{\log c^2/pa} = \log \frac{c}{b} - \log \frac{c^2}{pa} = \log \frac{cpa}{bc^2} = \log \frac{ap}{bc} \end{array} \right.$$

ただし、上記の式が成立するのは、 a, p の残存生菌数が極端に減少しない場合、例えば 10^6 接種で a, p が 10^4 以下にならない場合である。菌数が極端に減少すれば抗生剤の作用が強すぎるか、PMN の活性が強すぎる

Fig. 1 Phagocytosis of *Ps. aeruginosa* by PMN
—Relation to CB-PC-susceptibility and/or
inoculum size—



のでこのような場合は、いずれかの反応物質濃度を下げ、上記の条件に適合するようにする。またこの式を導く背景は生菌数の指数的な減少、例えば好中球の作用で 10^6 の菌が 10^4 に殺菌された場合および 10^4 の菌が 10^2 になる場合、これらの食食殺菌活性を相対値で表わすと、いずれも指数 2 と表現する。

6. 抗生物質による *Ps. aeruginosa* の前処理

Ps. aeruginosa を Heart infusion broth に 10^6 /ml 浮遊させ、種々の濃度の抗生物質を添加後、 37°C で 3

時間振盪した。反応後抗生物質を除去するため、すみやかに HANKS' BSS で 3 回洗浄し、再び HANKS' BSS を加えてもとの液量とした。PMN を加え 37°C でさらに 4 時間反応し、同様の方法で残存生菌数を測定した。

抗生物質で前処理した *Ps. aeruginosa* に対する PMN の食食殺菌活性、 K_{rel} 値を前記の式に準じて次のように求めた。

P : 抗生物質無処理菌+PMN の 4 時間後の残存生菌数

A : 抗生物質処理菌+PMN の 4 時間後の残存生菌数

B : 抗生物質処理菌の 4 時間後の生菌数

C : 抗生物質処理菌の 4 時間後の生菌数

$$K = \log \left(\frac{P \cdot A}{B \cdot C} \right)$$

実験結果

1. 多形核好中球の *Ps. aeruginosa* に対する食食殺菌効果

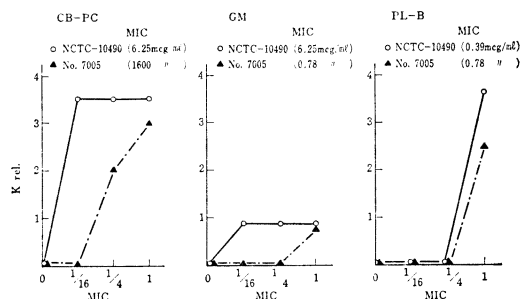
CB-PC に対する感受性の異なる *Ps. aeruginosa* 6 株の PMN による食食殺菌のうけ方を比較した。Fig. 1 のとおり、反応系中の PMN を 8×10^6 /ml と一定にし、*Ps. aeruginosa* の接種量を 10^3 /ml から 10^6 /ml と変えた。NCTC-10490 株は PMN によつて極めて食食殺菌をうけ易く、いずれの接種菌量とも 10^3 /ml 以上食食殺菌された。しかし他の株はいずれも 10^6 または 10^5 /ml の接種では十分な食食殺菌をうけなかつた。ただ接種菌量を $10^4 \sim 10^3$ /ml と少なくすると、PMN によつて食食殺菌され易い株と比較的抵抗する株に分けられた。しかし CB-PC 感受性と PMN による食食殺菌との間には相関が認められなかつた。

2. 抗生物質の共存下における多形核好中球の *Ps.*

Table 1 Phagocytosis of *Ps. aeruginosa* by PMN in presence of CB-PC, GM and PL-B

Antibiotic	Strain	PMN	O	1 / 16 MIC		1 / 4 MIC		MIC	
					K rel.		K rel.		K rel.
CB-PC	7005	—	2×10^6	8×10^5		4×10^5		1×10^5	
		+	4×10^6	2×10^6	0	7×10^3	2.1	2×10^2	3.0
	NCTC-10490	—	2×10^6	1×10^6		1×10^6		9×10^5	
		+	5×10^5	1×10^2	3.5	1×10^2	3.5	1×10^2	3.5
GM	7005	—	5×10^6	5×10^6		5×10^6		5×10^5	
		+	1×10^5	1×10^5	0	2×10^5	0	1×10^3	1.0
	NCTC-10490	—	5×10^6	8×10^5		9×10^4		3×10^4	
		+	5×10^4	1×10^3	1.0	1×10^2	1.0	3×10^1	1.0
PL-B	7005	—	7×10^6	2×10^6		8×10^6		3×10^6	
		+	7×10^6	2×10^6	0	4×10^6	0	6×10^2	2.5
	NCTC-10490	—	5×10^6	5×10^6		7×10^6		4×10^6	
		+	2×10^6	9×10^5	0	2×10^6	0	3×10^2	3.5

Fig. 2 Phagocytosis of *Ps. aeruginosa* pretreated with CB-PC, GM, and PL-B by PMN



aeruginosa に対する食食殺菌作用

抗 *Pseudomonas* 性抗生物質, CB-PC, GM, PL-B が PMN の *Ps. aeruginosa* に対する食食殺菌作用にどのような影響を与えるかについて検討した。

PMN および *Ps. aeruginosa* を HANKS' BSS 中で各抗生物質 (最終濃度 1/16·MIC, 1/4·MIC および MIC) と 37°C で 4 時間 incubate し, 抗生物質の効果を K rel. 値で比較した。結果は Table 1 および Fig. 2 に示した。GM の存在下ではいずれの濃度においても PMN の食食殺菌活性は増強されなかつた。つぎに PL-B の存在下では 1/16·MIC および 1/4·MIC の低濃度では PMN の食食殺菌活性は全く影響をうけないが, MIC 濃度では両株に対する食食殺菌作用は著明に増強された。いつばう, CB-PC 存在下では食食殺菌活性の増強は著明である。すなわち *Ps. aeruginosa* NCTC-10490 株では, CB-PC が殺菌作用を発現しない低濃度, 1/16·MIC の存在で PMN の活性は増強される。また 7005 株に対しても 1/4·MIC の存在で PMN の活性が増強さ

れた。

3. 抗生物質前処理 *Ps. aeruginosa* に対する多形核好中球の食食殺菌作用

種々の濃度の抗生物質で *Ps. aeruginosa* をあらかじめ前処理し, damage をうけた菌が PMN の食食殺菌作用にどのような挙動を示すかを検討した。Table 2 および Fig. 3 にその結果を示す。いずれの抗生物質で前処理した場合も 1/4·MIC あるいは MIC で若干食食殺菌作用を受け易くなる傾向がみられた。しかし CB-PC の共存時に観察されたほど, 著明な増強は認められなかつた。

4. CB-PC による *Ps. aeruginosa* の形態変化と食食殺菌作用

適当な濃度の CB-PC で *Ps. aeruginosa* を処理すると, filament 化した菌が得られる^{10,11)}。菌のこのような形態変化と PMN による食食殺菌作用との関連性を検討した。HI-broth 中で CB-PC の MIC 濃度と *Ps. aeruginosa* 792 を接触させ, 30 分, 1 時間, 3 時間目に Sampling した。Fig. 4 に明かなように, 30 分処理では伸長した菌が一部観察されたが全体としてはほぼ正

Fig. 3 Phagocytosis of *Ps. aeruginosa* by PMN in presence of CB-PC, GM, and PL-B

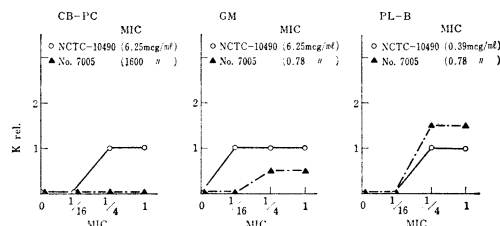
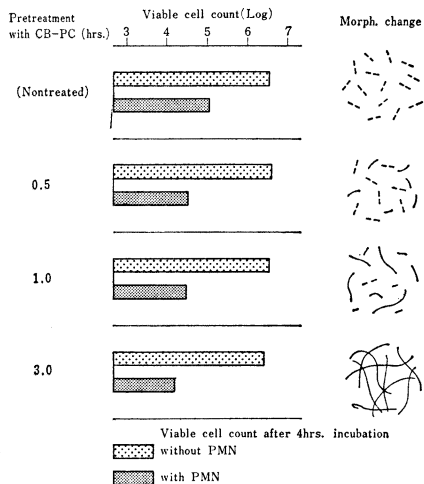


Table 2 Phagocytosis of *Ps. aeruginosa* pretreated with CB-PC, GM and PL-B by PMN

Antibiotic	Strain	PMN	O	1/16 MIC		1/4 MIC		MIC	
					K rel.		K rel.		K rel.
CB-PC	7005	—	7×10^4	4×10^4	0	1×10^4	0	2×10^3	0
		+	9×10^4	3×10^4		6×10^3		3×10^3	
	NCTC-10490	—	6×10^6	1×10^7	0	1×10^5		4×10^3	
		+	6×10^5	3×10^7		1×10^3	1.0	4×10^1	1.0
GM	7005	—	2×10^6	2×10^6	0	3×10^2		1×10^2	
		+	2×10^6	2×10^6		1×10^2	0.5	3×10^1	0.5
	NCTC-10490	—	5×10^7	2×10^4	1.0	2×10^2		1×10^2	
		+	5×10^7	2×10^3		2×10^2	1.0	1×10^2	1.0
PL-B	7005	—	9×10^7	9×10^7	0	2×10^4		1×10^3	
		+	8×10^7	8×10^7		5×10^2	1.5	4×10^1	1.5
	NCTC-10490	—	8×10^7	4×10^7	0	7×10^4		1×10^4	
		+	4×10^7	2×10^7		3×10^3	1.0	7×10^2	1.0

Fig. 4 Relation between CB-PC-induced morphological changes of *Ps. aeruginosa* 792 and phagocytosis by PMN



常に近い形態を保つ。反応時間の経過とともに filament 化が進み、3 時間では全ての菌が完全に filament 化した。このような変化は供試株の全てに認められた。

食食殺菌活性については 30 分前処理では PMN との反応後、4 時間目の残存総生菌数が $6 \times 10^4/\text{ml}$ であるのに対し、1 時間前処理では $5 \times 10^4/\text{ml}$ 、3 時間前処理では $3 \times 10^4/\text{ml}$ であった。これらの形態変化と PMN による食食残菌作用の相関性をみた場合、いずれの株についても filament 化している菌が強い食食殺菌作用を受ける傾向は認められなかった。

考 察

CRAIG らは、さきに *Staphylococcus aureus* と *Staphylococcus epidermidis* では喰細胞による食菌のうけ方に相違のあることを¹²⁾、また ROGERS らは *Staph. aureus* の病原株と非病原株との間にも食菌に対する抵抗性に差があることを報告している¹³⁾。さきにわれわれは、*Ps. aeruginosa* の CB-PC 耐性株の細胞表層部の脂質構成が感受性株と異なること、そして前者は後者より Tris-EDTA-Lysozyme の溶菌作用に抵抗することを報告した¹⁴⁾。*Ps. aeruginosa* のこのような性状が、PMN による食食殺菌と関連性をもつかどうかを検討したが、Tris-EDTA-Lysozyme 感受性と PMN の食食殺菌効果との間には全く相関性はなかった。とくに指摘したいことは、反応系に接種した菌量によって食菌効果は大きく影響され、接種菌量が少ないほど効果は強くあらわれる。これは過剰の菌またはその分泌物による食菌作用の抑制に起因するのかもしれない。

1968 年、ALEXANDER らは Penicillin 存在下で、いつたん白血球にとり込まれた *Staph. aureus* は、Peni-

cillin の作用から防御されること、および Penicillin Streptomycin 処理によって傷害をうけた菌は、白血球によって食菌をうけ易いと報告している¹⁵⁾。われわれが行なつた *Ps. aeruginosa* に対する PMN の食食殺菌作用は、抗生物質の前処理によってある程度増強されるが、むしろ食菌反応系で喰細胞、菌および抗生物質の 3 者の共存下で食食殺菌作用が著明に増強された。このことは、食菌および殺菌の過程において抗生物質の連続的な作用、換言すれば菌に対する連続的な damage が必要なものかもしれない。

生体内の防御因子は PMN 以外にも多くの要因がある¹⁶⁻¹⁸⁾。従がつて PMN と特定の抗生物質との相乗的な殺菌効果だけで、生体側の感染防御系との関係を速断することはできない。われわれは大腸菌に対する血清の殺菌因子の活性と、PMN の食食殺菌活性との間に相関性があることを報告している¹⁴⁾、これらの因子などを含めて総合的な評価をすべきものと考えている。

以上の成績から、抗生物質の *in vitro* の抗菌力は明らかに有力な 1 つの評価基準ではあるが、もつと生体因子の関与を加味した条件で抗生物質の抗菌力を評価すべきものと考ええる。

要 約

1) *Pseudomonas* の CB-PC 感受性と多形核好中球の食食殺菌に対する感受性との間には相関性はみとめられない。

2) 抗生物質共存下における多形核好中球の *Pseudomonas* に対する食食殺菌作用は、CB-PC の 1/16-MIC という低濃度においても食食殺菌作用の増強がみられ、抗生物質無添加では食食殺菌作用をうけにくい株でも著明に食食殺菌作用をうける。しかし GM にはほとんどこのような作用は認められず、たほう PL-B においては MIC 濃度においてだけ増強が認められた。

3) 抗生物質によって前処理された *Pseudomonas* については、共存下にくらべ PMN の食食殺菌作用の著明な増強は認められなかった。

4) CB-PC による *Pseudomonas* の filament 形成と食食殺菌作用のうけ方との間には相関性が認められなかった。

本研究に御指導と御助言を賜りました中央研究所・中野所長および熊田副所長に深く感謝します。なお本研究に御協力下さった藤野未知子さん、清水裕子さんに謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) SHAFFER, J.M., KUCERA, C.J. & SPINK, W. W.: The protection of intracellular *Brucella* against therapeutic agents and the bactericidal action of serum. J. Exp. Med. 97: 77-91,

- 1953
- 2) CHARLES JENKIN & BARUJ BENACERRAF: *In vitro* studies on the interaction between mouse peritoneal macrophages and strains of *Salmonella* and *Escherichia coli*. J. Exp. Med. 112: 403~417, 1960
- 3) RICHARDSON, M. & J. N. HOLT: Synergistic action of streptomycin with other antibiotics on intracellular *Brucella abortus in vitro*. J. Bact. 84: 638~646, 1962
- 4) BEULAH HOLMES, PAUL G. QUIE, DOROTHY B. WINDHORST, BERNARD POLLARA & ROBERT, A. GOOD: Protection of phagocytized bacteria from the killing action of antibiotics. Nature 210: 1131~1132, 1966
- 5) HOEPRICH, P. D. & C. H. MARTIN: Effect of tetracycline, polymyxin B, and rifampin on phagocytosis. Clin. Pharm. & Ther. 11: 418~422, 1969
- 6) GERALD L. MANDELL & T. KEITH VEST: Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by rifampin: *in vitro* and *in vivo* studies. J. Infect. Dis. 125: 486~490, 1972
- 7) 紺野昌俊: 第 18 回日本化学療法学会・東日本支部総会にて発表, 1970
- 8) 紺野昌俊: 第 19 回日本化学療法学会・総会にて発表, 1971
- 9) 中沢昭三, 小林米作, 高岡成好: 第 44 回日本細菌学会・総会にて発表, 1971
- 10) 中沢昭三: 第 18 回日本化学療法学会・総会にて発表, 1970
- 11) 中沢昭三: 第 19 回日本化学療法学会・総会にて発表, 1971
- 12) CRAIF, C. P. & E. SUTER: Extracellular factors influencing staphylocidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes. J. Immunology 97: 287~296, 1966
- 13) ROGERS, D. E. & R. TOMPSETT: The survival of *Staphylococci* within human leukocytes. J. Exp. Med. 95: 209~230, 1952
- 14) 西田 実: 緑膿菌の薬剤耐性機序——主として Carbenicillin 耐性について——。第 25 回日本細菌学会関西支部総会シンポジウム発表
- 15) ALEXANDER, J. W. & GOOD R. A.: Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes. J. Lab. Clin. Med. 71: 971~983, 1968
- 16) FLEMING, A.: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Pro. Roy. Soc. B. 93: 306~317, 1922
- 17) W. L. BLOOM, D. W. WATSON, W. J. CHROMARTIE & M. FREED J.: Infection with *Bacillus anthracis* (IV). Preparation and characterization of an anthracial substance from various animal tissues. J. Infect. Dis. 80: 41~52, 1947
- 18) PILLEMER, L. BLUM, I. H. LEPOW, O. A. ROSS, E. W. TODD & A. C. WARDLAW: The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. Science 120: 279~285, 1954

EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON PHAGOCYTOSIS OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES TO *PS. AERUGINOSA*

YASUHIRO MINE, SHIGEO NONOYAMA and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,
Osaka, Japan

The effect of antibiotics on phagocytosis of Polymorphonuclear leukocytes (PMN) was studied by use of *Ps. aeruginosa* as the test organism. The authors reported in previous papers that strains of *Ps. aeruginosa* resistant to CB-PC differ from the strains sensitive to this antibiotic in the ratio of lipid contained in the cell surface layer, and that these two groups of strains differ in the sensitivity to Tris-EDTA-Lysozyme.

The present study clarified that these two groups of *Ps. aeruginosa* strains do not differ in resistance to phagocytosis of PMN. CB-PC, when added to a culture medium, increases phagocytosis of PMN on *Ps. aeruginosa* at a concentration as low as the 1/16 MIC. Meanwhile, GM gave no influence on the phagocytosis, and PL-B enhanced it only at concentrations as high as its MIC. Phagocytosis of PMN was not facilitated even when the cells of *Ps. aeruginosa* had been pretreated with any of these antibiotics. No relation was found out between phagocytosis and filament formation of the organism.