

血清または多形核好中球共存下における Cefuroxime の殺菌効果について

奥村 和夫・横田 健

順天堂大学医学部細菌学教室

加藤 日出子・遼 彦 二

新日本実業株式会社東京研究所

新しい Cephalosporin 誘導体である Cefuroxime の生体内における殺菌作用を検討するために、この薬物と血清中の補体の殺菌作用および白血球による食菌、殺菌作用との相乗効果を、他の β -lactam 薬を比較薬として追及した。MIC 以下の Cefuroxime 存在下で増殖した大腸菌は新鮮血清(補体)による殺菌作用と多形核白血球から放出される殺菌物質に対し明らかに殺菌されやすくなっており、この性質は Cephaloridine やその他の現用 β -lactam 薬に比べてかなり特徴的であった。しかし、白血球の食菌作用に対してはとり込まれやすくなっている事実は認められなかった。

MIC 以下の Cefuroxime 存在下で増殖した大腸菌が生体の感染防御機構の重要な一部である補体による殺菌や白血球から放出される殺菌物質に対し影響を受けやすくなっている事実は、この薬が *in vitro* の MIC 値から考えられるより良好な治療効果を実験的感染症に示す理由のひとつであるとえられる。

Cefuroxime (以下 CXM) は英国 Glaxo 社により開発された Cephalosporin 系新誘導体¹⁾で、 β -lactamase に抵抗性を示し、広い抗菌スペクトラムを有している²⁾。

さて、 β -lactam 系抗生物質は細菌細胞壁の合成阻害により細胞壁の脆弱化をひき起こし、低浸透圧下では溶菌が生じ、等張下では sphaeroplast が形成される。また、種々の β -lactam 抗生物質は細胞壁合成に関与する carboxytranspeptidase 群に対する親和性に差があり³⁾、作用部位が多数存在することが知られている。

CXM は *in vitro* において、低濃度できわめて特徴的な長糸状細胞形成³⁾ (filament form) を大腸菌にひき起こすが殺菌の効果 (MBC) は他薬と同程度である。一方、マウスでの感染治療実験では MIC 値に比較し、ED₅₀ 値が小さく、*in vivo* でのすぐれた有効性が認められた。

本研究は以上の事実を考慮し、感染に対する複雑な生体防御機構のうち、特に重要な役割を演じていると考えられる補体による溶菌と白血球による食菌、殺菌に対して低濃度の β -lactam 薬存在下で増殖した菌がどのような態度を示すかを検討したものである。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

E. coli NIH JC-2*E. coli* 1864 E*Citrobacter* 102*Proteus vulgaris* 45780*Proteus morganii* IID 602*Proteus vulgaris* IID 874*Proteus mirabilis* IID 994*Citrobacter freundii* IID 976*Pseudomonas aeruginosa* PA01*Staphylococcus aureus* Smith diffuse

2. 供試薬

Cefuroxime (CXM), Cephaloridine (CER), Cephalothin (CET) は Glaxo 社, Cefazolin (CEZ) は藤沢薬品工業, Cefmetazole (CMZ) は三共, Ampicillin (ABPC) は明治製薬, Penicillin G は Glaxo 社のものを使用した。

新鮮ヒツジ血清は Arvine Scientific Sales Co. Inc. 製を使用した。

3. 感染治療実験

各種菌株の実験的感染症に対する CXM の治療効果を検討し、CER, CMZ と比較した。

マウス (ICR 系, 雄, 18~20g) は感染菌の毒力の検討には 1 群 5 匹, 治療実験には 10 匹を使用した。被検菌液は普通寒天培地 (栄研) の斜面に 37°C 一夜培養した菌細胞を滅菌生理食塩水に懸濁して所定の細胞密度とした。

感染実験に際してムチンを添加する場合はその最終濃度が 5% になるように上記菌液と混合し、ムチン添加、無添加の場合ともに菌液 0.5 ml をマウス腹腔内に接種した。感染菌量は菌株により異なるが 5 MLD~50 MLD

の量になるよう調製した。

試験薬は菌接種1時間後に1回皮下投与した。薬物投与の翌日から5日後までの生死動物数よりED₅₀をprobit法により算出した。

4. MICの測定

各試験薬の被検菌に対するMICは平板希釈法および液体培地希釈法で測定した。平板希釈法は化学療法学会標準法に準じて行ない、新鮮血清の添加による殺菌作用への影響は液体培地希釈法で行なった。

液体培地はブイヨン、20%蔗糖と0.2% MgCl₂加ブイヨン、20%新鮮ヒツジ血清加ブイヨンおよび90%新鮮ヒツジ血清加ブイヨンの4種類を使用した。

試験薬濃度は各薬とも100 μg/mlを基点として倍々希釈で添加し、これに終末菌濃度が、10⁸ cells/mlになるように菌を接種して37°C、24時間培養後、明らかに菌の発育を阻止している薬剤濃度をMIC値とした。

5. CXMの殺菌効果に及ぼす血清の影響

CXMの*E. coli* NIH JC-2株に対する殺菌効果をブイヨンおよび20%血清加ブイヨンをういて検討した。薬物濃度は各試験薬のブイヨン中でのMIC値の1/2, 1/5および1/10とした。上記の薬剤添加培地に*E. coli* NIH JC-2株を10⁸ cells/mlになるように接種し、37°Cの温浴中で振盪培養を続けながら1, 3, 5時間後の生菌数を平板塗抹法で測定した。

6. 薬物存在下で培養された菌に対する白血球による食菌、殺菌作用

a) 多形核白血球(polymorphonuclear leukocytes: PMN)の調製⁴⁾

ウサギの腹腔に0.1% グリコーゲンの生理食塩水溶液200 ml (ヘパリン10 u/ml 含有)を投与、4時間後さら

に等張リン酸緩衝液 [PBS(-)]200 mlを腹腔注射したのち開腹して腹水は無菌的に採取し、これをシリコン処理遠心管で800 rpm 5分間遠心したのちPBS(-)で洗浄してPMNを得た。

b) PMN-抗生物質共存時の生菌数の測定

HANKS液またはPMNのHANKS浮遊液(5×10⁸ cells/ml) 5 mlに薬剤を1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MICあるいは1/16 MIC加え、さらに被検菌液を終末濃度が1×10⁸ cells/mlになるように接種後、37°Cで振盪培養を続け2時間後、4時間後に生理食塩水で希釈して生菌数の測定を行なった。HANKS液中の生菌数を対照とし、さらに食菌系および対照の各1 mlを遠心管にとり、3,500 rpm, 20分間遠心し、上清を除いたのち、滅菌蒸留水を1 ml加えて低張処理によりPMNを破壊後にも同様に生菌数を測定した。

c) 薬物前処理菌体のPMNによる食菌、殺菌作用

薬物無添加または1/2, 1/4, 1/8, 1/16 MICのβ-lactam抗生物質を含むブイヨンに10⁸ cells/mlの*E. coli* NIH JC-2株を接種し、37°C, 4時間培養後、それぞれの培養液を4 mlずつとり、3,500 rpm, 20分間遠心、生理食塩水で1回洗浄後、HANKS液4 mlを添加して細菌浮遊液を調製した。この菌液0.5 mlにPMN浮遊HANKS液4.5 ml (PMN最終密度5×10⁸ cells/ml)を加え、37°C, 4時間振盪培養前後の生菌数を低張処理を行なったもので行なわなかったものについて比較した。対照としてPMNを含まない系を用いた。

II. 実験結果

1. 感染治療効果

各種被検菌による感染実験に対するCXM, CERおよびCMZの治療効果をTable 1に示した。CXMは

Table 1 Protective effect of CXM, CER and CMZ on experimental mice infections

Test organisms	Infection challenge dose cells/mouse (×LD ₅₀)	Mucin (%)	ED ₅₀ (mg/mouse)			MIC(μg/ml)					
			CXM	CER	CMZ	CXM		CER		CMZ	
						10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶
<i>E. coli</i> NIH JC-2	1.6×10 ⁹ (10)	—	9.9	8.5	9.0	6.25	6.25	3.13	1.56	1.56	0.78
	6.3×10 ⁸ (10)	5	0.36	0.31	0.20						
<i>E. coli</i> 1864 E	1.2×10 ⁹ (23)	—	11.5	≥20	6.45	12.5	6.25	6.25	3.13	≤0.78	≤0.78
	2.4×10 ⁸ (20)	5	0.025	0.052	0.034						
<i>Citrobacter</i> 102	2.0×10 ⁹ (5)	—	≥23.2	>40	>40	6.25	1.56	>200	100	50	50
	2.0×10 ⁸ (5.9)	5	1.25	21.0	2.67						
<i>P. vulgaris</i> 45780	1.3×10 ⁹ (15)	—	0.5	9.5	0.41	50	25	>200	>200	6.25	3.13
	4.3×10 ⁷ (20)	5	0.31	>5.0	0.32						
<i>S. aureus</i> Smith diffuse	1.0×10 ⁹ (10)	—	0.088	0.016	0.3	≤0.78	≤0.78	≤0.1	≤0.1	1.56	≤0.78
	6.5×10 ⁸ (46)	5	0.043	0.004	0.18						

Table 2 Effect of fresh sheep serum on the antibacterial activity of CXM and other β -lactam drugs

Antibiotic Medium*	CXM				CEZ				CER			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>E. coli</i> NIH JC-2	6.25	6.25	1.56	—	1.56	1.56	1.56	—	3.13	3.13	1.56	—
<i>P.morganii</i> IID 602	0.78	0.39	0.20	—	50	25	50	—	100	100	50	—
<i>P.vulgaris</i> IID 874	12.5	12.5	1.56	0.39	100	100	100	25	100	100	100	12.5
<i>P.mirabilis</i> IID 994	0.20	0.20	0.10	—	3.13	3.13	0.78	—	6.25	3.13	1.56	—
<i>C.freundii</i> IID 976	3.13	12.5	0.78	—	3.13	12.5	0.78	—	6.25	25	1.56	—
<i>P.aeruginosa</i> PA01	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	CET				PCG				ABPC			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>E. coli</i> NIH JC-2	12.5	12.5	6.25	—	50	50	50	—	6.25	12.5	6.25	—
<i>P.morganii</i> IID 602	100	100	50	—	50	50	25	—	6.25	6.25	1.56	—
<i>P.vulgaris</i> IID 874	100	100	100	12.5	100	100	100	12.5	12.5	50	50	6.25
<i>P.mirabilis</i> IID 994	1.56	0.78	0.78	—	0.78	0.78	0.78	—	0.78	0.78	0.20	—
<i>C.freundii</i> IID 976	25	25	6.25	—	25	100	25	—	3.13	12.5	1.56	—
<i>P.aeruginosa</i> PA01	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

* Medium No. 1. : Nutrient broth (NB)
 2. : NB+20% sucrose, 0.2% MgCl₂
 3. : NB+20% sheep serum
 4. : NB+90% sheep serum

E. coli NIH JC-2, *E. coli* 1864 E, *Citrobacter* 102, *P. vulgaris* 45780 および *S. aureus* Smith diffuse 株によるマウスの実験感染症に対しすぐれた治療効果を示した。CXM はグラム陰性菌の感染に対しては CER よりすぐれ、CMZ と同等かややすぐれた結果が得られた。グラム陽性菌の感染に対しては CER より劣るが CMZ よりすぐれていた。これを各菌に対する *in vitro* の MIC 値と比較してみると、*in vitro* では *Citrobacter* 102 を除き CMZ が最も強い MIC 値を示し、CXM は *E. coli* 1864 E に対しては CER に比べてもやや劣ったが同菌によるマウスの実験感染に対しては、CXM, CER および CMZ の ED₅₀ がムチンを使った場合それぞれ 0.025 mg/kg, 0.052 mg/kg および 0.034 mg/kg となり、*in vivo* では CXM が明らかに最もすぐれた治療効果を示した。

2. 新鮮ヒツジ血清加による MIC の変動

何故 CXM が *in vitro* の MIC 値から想像されるよりすぐれた治療効果を示すのかを明らかにするために感染治療実験につかった株および各種標準株に対する β -lactam 薬の MIC 値の血清添加による変動をブイオン中で検討した。

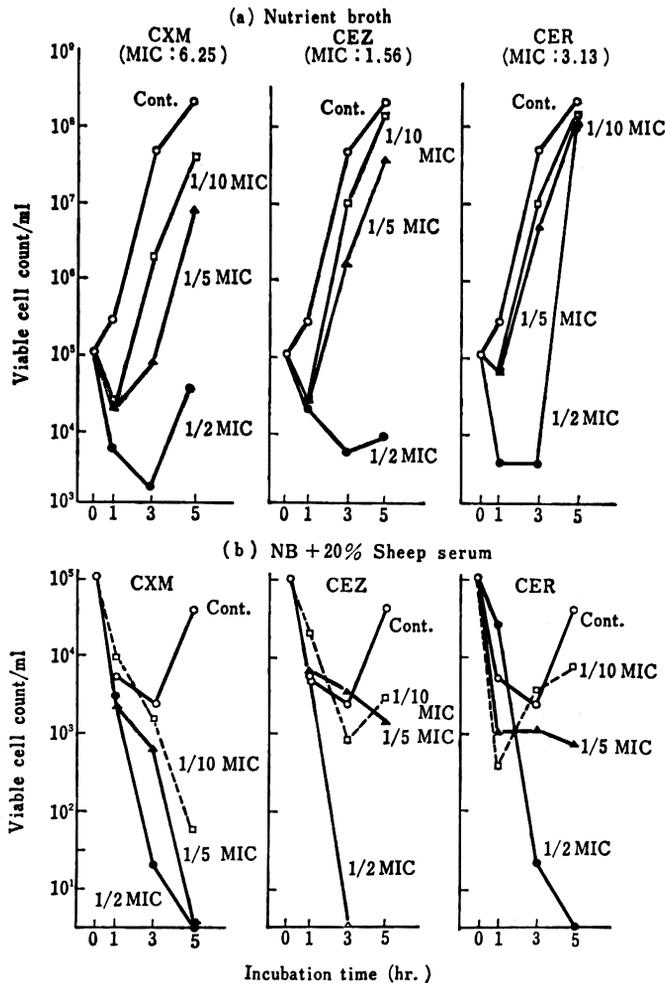
Table 2 に見るようにブイオンに 20% 蔗糖と 0.2% MgCl₂ を加えたときも加えないときも各薬の種々の細菌に対する MIC 値は大差なく β -lactam 薬は少なくとも MIC 濃度付近では spheroplast の形成は少ないと考えられたが、これは菌種により多少異なり、*Citrobacter* や

P. vulgaris では高張液で保護されているときの方が大きな MIC 値を示した。20% 新鮮ヒツジ血清加ブイオン中では各薬ともある種の被検菌に対する MIC 値が小さくなる傾向を示し、これは薬剤および被検菌の種類によりかなりの差が見られるが、CXM では *Pseudomonas* を除く他菌種すべて、特に *E. coli* と *P. vulgaris* に対する MIC 値が著明に低下した。この傾向は CER, CET が CXM につぎ、その他の試験薬では血清添加による MIC 値の変動は少なかった。90% 新鮮ヒツジ血清加ブイオン中で増殖が認められたのは *P. vulgaris* および *P. aeruginosa* の 2 種類だけで他の菌株は 10⁵ cells/ml を接種しても増殖は見られなかった。*P. aeruginosa* に対する各薬の MIC は 90% 血清添加によっても影響をまったく受けなかったが、*P. vulgaris* に対しては各薬とも 90% 血清添加により MIC が約 1/5 に増強された。

3. 大腸菌に対する各抗菌薬の新鮮血清添加時の殺菌効果の変動

CXM, CER および CEZ の *E. coli* NIH JC-2 株に対する殺菌効果を比較し、さらに新鮮ヒツジ血清を 20% 添加したとき、これらの試験薬の殺菌効果がどのように影響されるかを検討した。Fig. 1 に示すとおり試験薬加ブイオン中での生残菌数は 3 剤とも 1/10 MIC および 1/5 MIC 添加では培養開始後 2 時間目に若干低下し、その後増殖が再開されて 5 時間後には薬物無添加ブイオン中の生菌数に近い値となったが、1/2 MIC 添加では CER

Fig. 1 Influence of fresh sheep serum on the bactericidal activity of CXM, CEZ and CER



を除き CXM および CEZ とともに培養開始 5 時間後でも強い発育抑制がみられた。

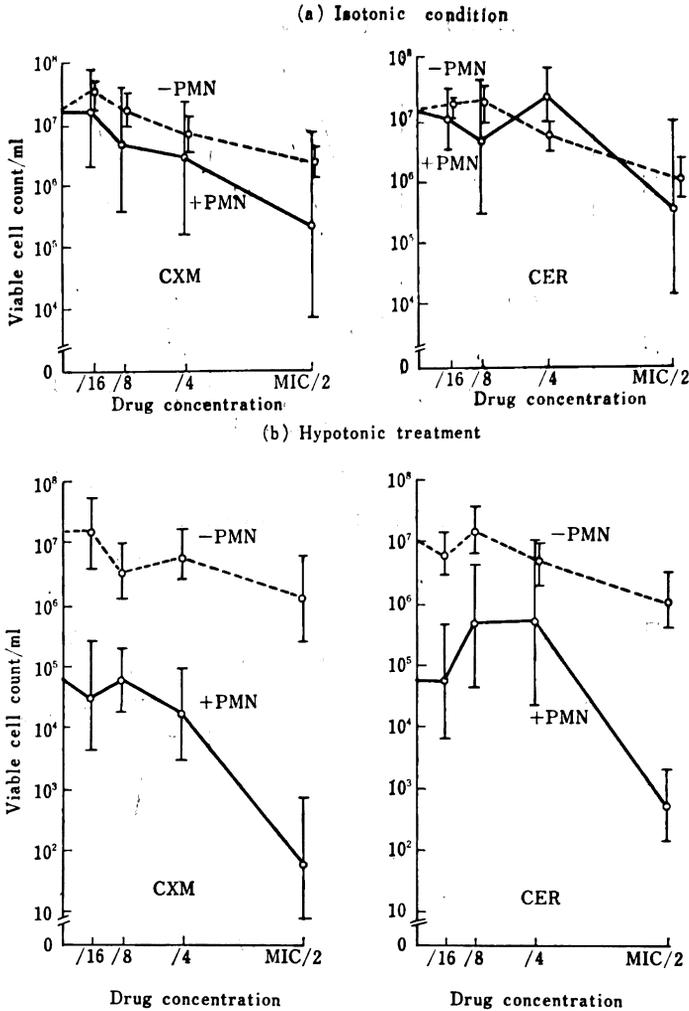
新鮮ヒツジ血清をブイオンに 20% 添加して同様に実験を行なると Fig. 1 の下段に示すように各薬とも血清添加により殺菌作用が増強され、1/2 MIC 添加では培養開始後 5 時間ではほぼ完全に殺菌されていた。一方、1/5 MIC または 1/10 MIC 添加では CER と CEZ では 3 時間以後は生残菌数が低下しないかあるいは若干増加の傾向を示し、5 時間後にも相当数の生残菌が認められた。これに対し CXM では 1/5 MIC 添加で 5 時間後にはほぼ完全に殺菌され、1/10 MIC 添加でも生残菌の再増殖は全く認められず、20% 新鮮血清存在下で CXM の殺菌作用は著明に増強されることが明らかになった。すなわち、CXM は CER や CEZ に比較し、MIC 以下の濃度で

も菌の表面構造を変え、新鮮血清による殺菌作用をより受けやすくする力が強いと考えられ、*in vivo* の感染治療実験のすぐれた有効性の一因となっているものと思われる。

4. 白血球の β -lactam 薬存在下における *E. coli* に対する食菌、殺菌作用

E. coli NIH JC-2 菌細胞を PMN と MIC 以下の濃度の CXM または CER と共存させたときの生残菌数を比較した。すなわち、PMN、菌細胞および薬物を混合後、2 時間および 4 時間目に生残菌数を測定して PMN による食菌、殺菌作用を検討した。Fig. 2 に 4 時間目の結果を示したが、低張処理による PMN の破壊を行なわなければ *E. coli* の生細胞は抗血清を加えないかぎりほとんど食菌されず、低張処理により PMN を破壊すると薬物

Fig. 2 Effect of CXM and CER on the phagocytosis and killing of *E. coli* cells by rabbit polymorphonuclear leukocytes



無添加時でも生残菌数が著明に減少して PMN 破壊により強力な殺菌物質が遊離されることがわかる。

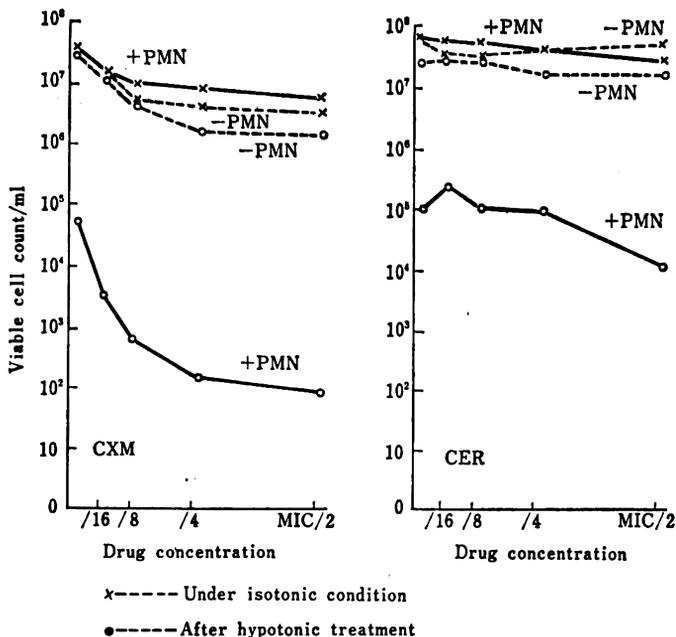
Fig. 2 はまた、CXM または CER を 1/16~1/2MIC 添加したときの 4 時間後の結果について 3 回の平均および偏差値も示しているが、低張処理による PMN の破壊を行なわなくても CXM 添加時には *E. coli* の細胞は PMN により食菌または殺菌されやすくなっていることがわかる。

低張処理により PMN を破壊すると放出された殺菌物質が CXM または CER と相乗効果を示し著明に生残菌数は減少するが、この場合も CXM 添加時の方が CER の場合より強い PMN 殺菌物質との相乗効果を示してい

る。

さらに 1/16~1/2MIC の CXM または CER 存在下で 4 時間培養された *E. coli* NIH JC-2 の菌細胞を洗浄後薬物無添加の条件下で PMN と接触させ、生残菌数を検討したところ、Fig. 3 に示すように、CXM および CER の場合ともに低張処理を行なわない限り生残菌数の減少は著明でなく、CXM または CER の 4 時間前処置が菌細胞を食菌されやすい状態に変化させてはいなかった。

しかし、低張処理による PMN の破壊を行なうと生残菌数は著明に減少し、特に低濃度の CXM で 4 時間前培養された菌では 1/16 MIC 濃度でも生残菌数の大幅な減少がみられ明らかに菌細胞が PMN の殺菌物質に殺菌さ

Fig. 3 Phagocytic and killing effect of PMN on *E. coli* cells precultured with CXM or CER

れやすくなっていることを示している。これに対しCERでは1/2 MIC濃度で前培養された菌が若干PMNの殺菌物質に弱い程度でCXMに比べるとその作用は弱い。

以上の結果をCXMが低濃度で大腸菌細胞を著明に形態変化させることと考えあわせると、CXMによって引き起こされた細胞形態の変化が菌のPMNの殺菌物質に対する殺菌されやすさと関係している可能性があり、興味深い。

III. 考 察

新しいCephalosporin誘導体であるCXMの生体内における殺菌作用を検討するため、この薬と血清中の補体の殺菌作用および白血球による食菌、殺菌作用との相乗効果を追及した。複雑多岐にわたる感染防御機構のうち、補体の殺菌作用、白血球による食菌作用、さらにそれに対するオプソニン効果などの重要性はよく知られているが、その詳しい仕組みにはなお多くの未知のものがある。

抗生物質による感染治療の場合、試験薬とこれらの作用がどのようにかわりあうかについての報告も種々あるが⁵⁻⁷⁾、これもまだ充分ではない。わが国においても β -lactam薬とこれら生体防御機構の関係の検討が報告されつつある。

紺野ら⁸⁾はCEX, CEZ投与後、尿中にみられる大腸菌の形態的変化の観察からfilament formを形成した菌で

はその食食に多数の白血球を必要とし、かつ、その殺菌に要するエネルギーの消耗が大きいと考へ、filament formを形成する抗菌薬は治療に不利ではないかと指摘している。一方、峯ら⁹⁾はCBPC処理によりみられる*P. aeruginosa*のfilament formがPMNによる食菌殺菌作用に対し、特に食菌されやすいという傾向は認められないと報告している。

今回、著者らが行ったCXMでの実験結果では大腸菌に対する新鮮血清(補体)による殺菌作用と多形核白血球から放出される殺菌物質に対し、MIC以下の低濃度のCXM存在下で培養された菌は明らかに殺菌されやすくなっており、この性質はCERやその他の現用の β -lactam薬に比べてかなり特徴的であることが明らかになった。しかし、白血球の食食作用に対しては、少なくとも抗血清を加えない限りCXM存在下で培養された菌がとり込まれやすくなっている事実は認められなかった。

MIC以下のCXM存在下で増殖した大腸菌が生体の感染防御機構の重要なものの一部である補体による殺菌や白血球から放出される殺菌物質に対し影響を受けやすくなっている事実は、この薬が*in vitro*のMIC値から考えられるより良好な治療効果を実験的感染症に示す理由の一つと考えられる。しかし、先に述べたように白血球、特に多形核白血球(PMN)の細菌に対する食食、殺

菌作用には不明の点も多く、特に PMN が細菌をとり込んでから殺すのか、殺菌してからとり込むのか議論のわかれるところである。

低濃度の CXM 存在下で増殖した菌が PMN にとり込まれやすくなるが、PMN の殺菌物質により殺菌されやすくなっていることを示す本研究の成果は、細菌の表面構造の変化と殺菌のされやすさの関係を明らかにする緒となるのみならず、PMN やマクロファージの食菌、殺菌能を研究するためにも有力な補助手段となり得るし、また新しい β -lactam 抗生物質を開発するとき、その効力は必ずしも *in vitro* の抗菌力のみならず左右されるものでないことを示す例になるかもしれない。

文 献

- 1) O'CALLAGHAN, C. H. ; R. B. SYKES, D. M. RYAN, R. D. FOORD & P. W. MUGGLETON: Cefuroxime-A new cephalosporin antibiotic. J. Antibiot. 29 : 29~37, 1976
- 2) O'CALLAGHAN, C. H. ; R. B. SYKES, A. GRIF-FITHS & J. E. THORNTON : Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic : activity *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 9 : 511~519, 1976
- 3) GOODWIN, C. S. & J. P. HILL : Lysis of enterobacteria by cefoxitin, cefuroxime and cephalothin. Antimicrob. Agents Chemother. 11 : 26~30, 1977
- 4) 峯 靖弘, 野々山重男, 西田実 : 多形核好中球による *Pseudomonas aeruginosa* の貪食殺菌効果と抗生物質の作用。Chemotherapy 22 : 247~251, 1974
- 5) HOLMES, B. ; P. G. QUIE, D. B. WINDHORST, B. POLLARA & R. A. GOOD : Protection of phagocytized bacteria from the killing action of antibiotics. Nature 210 : 1131~1132, 1966
- 6) RICHARDSON, M. & J. N. HOLT : Synergistic action of streptomycin with other antibiotics on intracellular *Brucella abortus in vitro*. J. Bacteriol. 84 : 638~646, 1962
- 7) HOEPRICH, P. D. & C. H. MARTIN : Effect of tetracycline, polymyxin B and rifampin on phagocytosis. Clin. Pharm. Ther. 11 : 418~422, 1969
- 8) 紺野昌俊 : 抗菌剤の評価のあり方。医薬品研究, 9 : 1~35, 1978

EFFECTS OF CEFUROXIME AND OTHER CEPHALOSPORINS ON OPSONIFICATION OF SERUM AND PHAGOCYTOSIS OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES TO *E. COLI*

KAZUO OKUMURA and TAKESHI YOKOTA

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo

HIDEKO KATO and HIKOJI TSUJI

Tokyo Research Laboratories, Shin Nihon Jitsugyo Co., Ltd.

Cefuroxime, a new semisynthetic cephalosporin, induced filament formation of *E. coli* NIH JC-2 at subinhibitory concentration.

In the present report, the relationship was studied between phagocytosis and filament formation of the organism.

The phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes (PMN) of *E. coli* was unaffected *in vitro* by 1/2 MIC per ml in the medium of either cefuroxime or cephaloridine. However, phagocytic and killing effect of PMN on *E. coli* preincubated with cefuroxime or cephaloridine was activated significantly after hypotonic treatment, and the effect was more remarkable with cefuroxime than with cephaloridine.

Bactericidal activity *in vitro* of cefuroxime was enhanced by increasing the concentration of serum used as opsonin.