

CCA (Disodium 4-chloro-2, 2'-iminodibenzoate) の 感染抵抗性増強作用に関する検討

宮川 智秀・野藤 隆夫・遠藤 久男・岡崎 博司

中外製薬株式会社新薬研究所

(昭和 56 年 10 月 23 日受付)

各種細菌感染時における生体の防禦因子を異にする菌種を用い、正常あるいは生体防禦能減弱マウスに対する感染治療実験から、CCA の感染抵抗性を検討した。

CCA は正常あるいは Cyclophosphamide (CPA) 投与により作成した生体防禦能減弱マウスの *P. aeruginosa* J-163 株感染に対し、感染 7 日後の生存率を本剤非投与群に比べ 22~24% 上昇させ延命効果を認めた。また生体防禦能減弱マウスにおける *P. aeruginosa* あるいは *K. pneumoniae* 感染治療実験で、CCA 併用群は治療に用いた抗生物質の ED₅₀ 値を約 13~24% 減少させることが認められた。さらに、CCA は CPA 投与マウスの投与 4 日後の白血球数減少を抑制するとともに、多核白血球・マクロファージの貪食殺菌能、Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元能ならびに Carbon clearance 能を上昇させ、総じて extracellular parasites 感染時に CCA は非特異的防禦機能を上昇させ感染抵抗性を増強させるものと考えられた。

一方、*M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel 株感染実験で CCA 併用群は生存率・体重推移で非併用群と大差を認めないものの、剖検上で root lung index 増加、肺結節形成減少などの改善が認められ、既に報告された CCA の細胞性免疫系に対する作用も合わせ考えると、CCA は intracellular parasites 感染時にも有用に働くことが示唆された。

Immunomodulator の一種である CCA は中外製薬株式会社研究所にて合成された新化合物 (Fig. 1) で、自己免疫疾患類似の病変を示す NZB/WF₁ マウスの尿中蛋白排泄の抑制ならびに延命効果を示すこと¹⁾、免疫抑制状態にある動物の免疫機能回復作用を有すること²⁻⁴⁾、DNA 型・RNA 型ウイルスに対し増殖阻止作用を有すること⁵⁾などが報告されている。

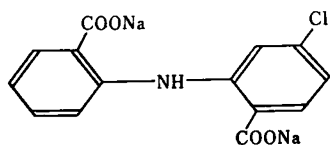
今回われわれは感染防禦に働く生体因子に対する応答を異にする菌種を用い、それらの実験感染動物に対する CCA の感染防禦効果を検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

CCA (中外製薬研究所), Carbenicillin (CBPC, 藤沢

Fig. 1 Chemical structure of CCA



Disodium 4-chloro-2, 2'-iminodibenzoate
C₁₄H₈Cl · N · Na₂O₄ M. W. 335. 65

薬品), Ceftezole (CTZ, 中外製薬), Streptomycin (SM, 明治製薬), Kanamycin (KM, 萬有製薬), Isoniazide (INAH, 第一製薬), Cyclophosphamide (CPA, 塩野義製薬) および Hydrocortisone (HC, 日本アップジョン) を用いた。

2. 使用菌株

extracellular pathogen として *P. aeruginosa* および *K. pneumoniae* を、intracellular pathogen として *M. tuberculosis* を選んだ。

P. aeruginosa および *K. pneumoniae* は東邦大学医学部微生物学教室より分与された患者分離株、*M. tuberculosis* は国立公衆衛生院衛生微生物学部より分与された新鮮分離株である。これらの菌株は virulent cells の selection を行なうため、数回動物に通過せしめた後、前二者は Heart infusion agar (Difco : 以下 HIA と略) plate 上にて、また後者は Dubos 液体培地中に増殖させた後それぞれの菌液を実験に供した。

3. 実験動物

マウス : ddY/s (SPF), 雄, 5 週令, 21. 4~29. 6 g。

4. extracellular pathogen 感染に対する効果

感染の惹起は、正常マウスならびに生体防禦能減弱マ

Table 1 Injection protocols to determine the effects of CCA on the outcome of murine infection with *P. aeruginosa* or *K. pneumoniae*

Drug	Doses	Route	Injection schedule*																	
Control			×	×	×	×	×	×												
Group I	CCA	50mg/kg	P.O.	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Group II	CPA	100mg/kg	I.P.																	
		100mg/kg	I.P.																	
		50mg/kg	P.O.																	
Group III	HC	100mg/kg	I.P.	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		100mg/kg	I.P.	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		50mg/kg	P.O.	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
				-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

* An "x" in the chart indicates days when animal were injected
Animal: Mice, ddY (SPF), ♂, 5w, 23.4~28.6g.

ウスの腹腔内に菌液を接種して行なった。

感染菌は HIA plate 上で前培養後、生理食塩液に懸濁・希釈し、その 0.2 ml を接種した。

なお、生体防禦能減弱マウスは Cyclophosphamide (以下 CPA と略) 100 mg/kg を 1 日 1 回連続 4 日間、あるいは Hydrocortisone (以下 HC と略) 100 mg/kg を 1 日 1 回連続 6 日間、腹腔内に投与して作成した。CCA は 50 mg/kg を 24 時間毎に連続経口にて、CPA 併用群では 4 日間、HC 併用群では 6 日間同時に投与した (Table 1)。

抗生物質は、生理食塩液にて 3 倍段階希釈し、各々を 1 群 5 匹のマウスに菌接種 1 および 3 時間後の 2 回皮下に投与した。

生存率は菌感染後 9 日間観察して検討し、また ED₅₀ 値は菌感染後 5 日間観察して各群マウスの生存率より算出した。

5. 非特異的防禦機能に及ぼす作用

正常マウス腹腔内に 10 u/ml ヘパリン加 0.1% グリコーゲンを注入し 4 時間後に開腹して多核白血球 (以下 PMLs と略) を、あるいは流動パラフィンを注入し 3 日後に開腹してマクロファージ (以下 Mφ と略) をシリコン処理遠心管に採取した。これらの食細胞は Hanks' BSS で 3 回 100 g にて洗浄後実験に供した。

貪食殺菌能の検討は食細胞・CCA・*S. marcescens* 101 の三者からなる系、その対照として CCA・*S. marcescens* 101 の系、食細胞・*S. marcescens* 101 の系、および *S. marcescens* 101 のみの系を設定し、これらを 37°C 4 時間緩徐に振盪後 9,500 g にて菌・食細胞を沈殿さ

せ、Hanks' BSS にて洗浄、滅菌蒸留水にて食細胞破壊後残存総生菌数の測定により行なった。

NBT 還元能の検討は BAERNER らの方法⁹⁾および岡村らの方法⁷⁾に準じて行なった。なお、食細胞の刺激には *S. marcescens* 101 の加熱死菌体を使用した。

Carbon clearance 能の検討は CCA 1 mg/mouse を経口にて 10 日間前投与したマウスを使用し、ペリカン・インク (C 11/1431 a, Günther-Wagner) を用い、Brozzi らの方法⁸⁾に準じて行なった。

6. intracellular pathogen 感染に対する効果

滅菌蒸留水に溶解した CCA 50 mg/kg (0.2 ml) を 24 時間毎に 7 回連続経口投与したマウスに、*M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel の Dubos 液体培地培養原液を生理食塩液で希釈した菌液 (4.5×10⁵ cells/mouse) を尾静脈内に接種し、感染を惹起した。

CCA ならびに通常使用有効量の 1/2 量 (以下 1/2 ED₅₀ 量と略) の各種抗菌剤は、滅菌蒸留水あるいは生理食塩液に溶解し、0.2 ml ずつを経口または皮下に、菌感染 24 時間後より 1 日 1 回 7 日間連続して投与した (Table 2)。

効果の判定に当っては、マウスの生存率、体重変化、マウス死亡時の肺ならびに脾の変化⁹⁾、およびマウス死亡時の肺・脾重量より算出した Root lung index (以下 RLI と略)、Root spleen index (以下 RSI と略)¹⁰⁾などを考慮して検討を加えた。

なお、対照群には滅菌蒸留水 0.2 ml を CCA 投与と同様に経口にて投与した。

Table 2 Injection protocols to determine the effect of CCA or other antimicrobial agents on the outcome of murine infection with *M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel

Drug	Doses	Route	n	Injection schedule*	
Normal			5		
Control			5		
Group I	CCA	50mg/kg	P.O.	5	All infected with <i>M. tuberculosis</i> (LV.)
	SM	0.5 mg/mouse	S.C.	5	
Group II	SM	0.5 mg/mouse	S.C.	5	
	CCA	50mg/kg	P.O.	5	
Group III	KM	0.5 mg/mouse	S.C.	5	
	KM	0.5 mg/mouse	S.C.	5	
Group IV	CCA	50mg/kg	P.O.	5	
	INAH	0.05mg/mouse	P.O.	5	
Group IV	INAH	0.05mg/mouse	P.O.	5	
	CCA	50mg/kg	P.O.	5	

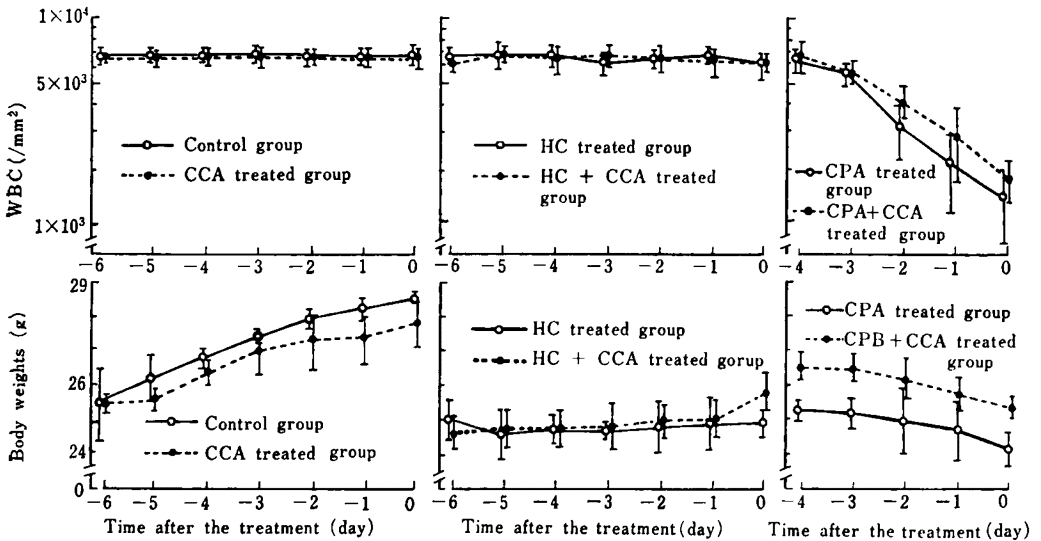
-7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

Days of experiment

Sacrifice of all animals

* An "X" in the chart indicates days when animal were injected
 Animal : Mice, ddY (SPF), ♂, 5w, 26.9-28.4 g

Fig. 2 Change in average WBC and body weights of mice after treated with CCA, HC and CPA



Animal : Mice, ddY (SPF) ♂, 5w, 24.4 - 26.4g 10mice/group
 Hydrocortisone(HC) : I.P. administration, Six times; -6, -5, -4, -3, -2, -1 days
 Cyclophosphamide(CPA) : I.P. administration, Four times; -4, -3, -2, -1 days
 CCA : Orally administration, Six times(HC treated group) and four times(CPA treated group)

II. 実験成績

1. extracellular pathogen 感染に対する効果

a. 各種薬剤のマウスに対する影響

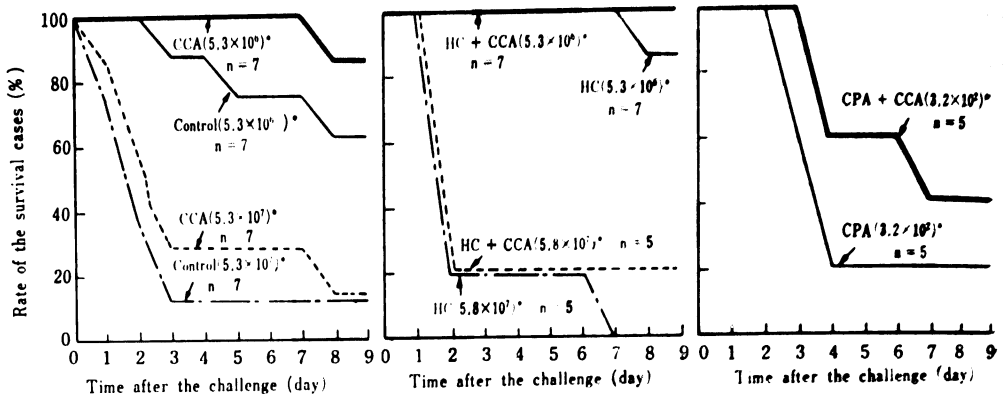
CPA, HC および CCA を単独あるいは併用投与した際のマウスにおける体重変化ならびに末梢血白血球 (以下 WBC と略) 数の変動を, 正常マウスのそれと比較し

て Fig. 2 に示した。

CCA 投与群の平均体重ならびに WBC 数の推移は対照群に類似し, 正常マウスに CCA はほとんど影響を与えないことが認められた。

HC あるいは HC+CCA 投与マウスは, いずれもゆるやかな体重増加と, 正常対照群マウスと類似の WBC 数

Fig. 3 Rate of the survival cases of pretreated mice after the challenge with *P. aeruginosa* J-163



()*: Challenge dose cells/mouse (I.P.)

Animal: Mice, ddY (SPF), ♂, 5w, 23.4 - 28.6g

Hydrocortisone(HC): I.P. administration, Six times; -6, -5, -4, -3, -2, -1 days

Cyclophosphamide(CPA): I.P. administration, Four times; -4, -3, -2, -1 days

CCA: Orally administration, Six times(HC treated group) and four times(CPA treated group)

Table 3 Preventive effects of CCA against experimental infection in host-defence decreased mice

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Challenge does		Pretreatment	ED ₅₀ mg mouse
	CBPC	CTZ	cells/mouse	$\times \text{LD}_{50}$ *		
<i>P. aeruginosa</i> J-163	50		1.97×10^3	—	CPA	2.99
					CPA + CCA	2.39
<i>P. aeruginosa</i> J-276	25		2.26×10^3	3.16	CPA	8.34
					CPA + CCA	6.32
<i>K. pneumoniae</i> 3K25		1.56	1.41×10^3	1.78	CPA	4.35
					CPA - CCA	3.79

Animal: Mice, ddY (SPF), ♂, 5w, 19.5 - 23.4g, 5 mice group

Infection: I.P. challenge without gastric mucin

Cyclophosphamide(CPA): I.P. administration, Four times; -4, -3, -2, -1 days

CCA: Orally administration, Four times; -4, -3, -2, -1 days

Therapy: S.C. administration, Twice; 1, 3 hrs. after the challenge

*: CPA pretreated mice

MIC: Inoculum size; 1 loopful of 10^6 cells/ml

の推移を示し、CCAはHC投与マウスにもほとんど影響を与えないことが認められた。

一方、CPAあるいはCPA+CCA投与マウスでは、両群共体重は徐々に低下を示すものの類似のパターンを示した。また、WBC数は両群とも投与後明らかな減少がみられ、4日後に最低値(CPA群: $1.4 \times 10^3/\text{mm}$, CPA+CCA群: $1.8 \times 10^3/\text{mm}$)を示した。しかしCCA併用投与群のWBC数は非併用群より約8%高値を示し、CCAはWBC数減少に伴う生体防禦能減弱を抑制する

ことが示唆された。

b. 感染マウスの生存曲線に及ぼす影響

P. aeruginosa J-163株の各菌量感染時の生存曲線を、正常マウスならびに生体防禦能減弱マウスの両系で求め、Fig. 3に示した。

正常マウスに対する感染では、感染菌量 5.3×10^6 cells/mouse および 5.3×10^7 cells/mouse のいずれの場合でも、CCA投与群は対照群に比べ感染2~3日後から明らかな延命効果を示した。また、HC投与マウス

では CCA を併用することにより、感染 6~7 日後より生存率に差がみられた。さらに、CPA 投与マウスにおいては、感染 2 日後より明瞭な延命効果が CCA 投与群に認められた。

c. CCA の抗生物質感染治療増強効果

CPA および CPA+CCA 前投与マウスに *P. aeruginosa* J-163 株および *P. aeruginosa* J-276 株を感染させた場合の全身感染症に対する治療効果を CBPC にて、また *K. pneumoniae* 3K 25 株を感染させた時の治療効果を CTZ にて検討し、各 ED₅₀ 値を Table 3 に示した。

CPA+CCA 前投与群の ED₅₀ 値は CPA 前投与群のそれに比べ、*P. aeruginosa* J-163 株感染時約 20%、*P. aeruginosa* J-276 株感染時約 24%、*K. pneumoniae* 3K 25 株感染時約 13% とそれぞれ低く、CCA はこれらの菌感染時の感染抵抗性を増強し、各抗生物質と協力的に働くことが認められた。

2. 非特異的防禦機能に及ぼす作用

マウスの腹腔 Mφ ならびに PMLs を用いて検討した食食殺菌能、NBT 還元能に及ぼす CCA の作用ならびに Carbon clearance 能に対する結果を一括して Table 4 に示した。

Table 4 Effects of CCA on several defence factors

Phagocytosis and killing activity

Mφ or PMLs		Control cells/ml	CCA (0.5mg/ml) cells/ml	K
Mφ	--	8.60 × 10 ⁵	6.76 × 10 ⁵	0.61
	+	5.08 × 10 ⁵	9.90 × 10 ⁴	
PMLs	--	5.92 × 10 ⁵	3.58 × 10 ⁵	0.36
	+	3.00 × 10 ⁵	8.00 × 10 ⁴	

Org. : *S. marcescens* 101

Mφ : 2 × 10⁶ cells/ml

PMLs : 2 × 10⁶ cells/ml

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

p : viable bacteria counts after 4 hrs. of org. + PMLs (or Mφ)

a : viable bacteria counts after 4 hrs. of org. + Drug

b : viable bacteria counts after 4 hrs. of org. + PMLs (or Mφ) + Drug

c : viable bacteria counts after 4 hrs. of org.

NBT reduction activity

(ΔO.D. value)

	Control	CCA (0.5mg/ml)	K
Mφ	0.0050	0.018	3.60
PMLs	0.0075	0.013	2.17

O.D. : 710 nm

Mφ : 3 × 10⁵ cells/ml

PMLs : 3 × 10⁵ cells/ml

ΔO.D. = Phagocytosis (+) O.D. - Phagocytosis (-) O.D.

$$K = \frac{\Delta O.D. \text{ of drug}}{\Delta O.D. \text{ of control}}$$

Carbon clearance activity

	Clearance rate	Phagocytic index (α)
Control	13.8%	0.85
CCA	42.2%	1.75

Animal : Mice, ddY (SPF), ♂, 38 days old, n=5

Pretreatment : 10 days before the test

CCA : 10mg/mouse p.o.

$$\alpha = \frac{W}{WLS} \times \sqrt[3]{K_s}$$

W : body weight, L : liver weight, S : spleen weight

食食殺菌能に及ぼす CCA の作用は軽微であり、Mφ に対する作用の方が PMLs に対するそれより強いことが認められた。

NBT 還元能に及ぼす作用も PMLs より Mφ に強く、対照群に比べ 3.6 倍の効果がみられた。

一方、carbon 投与 15 分後の clearance rate は 42.2%、phagocytic index は 1.75 で CCA は網内系機能にもかなり良く働くことが認められた。

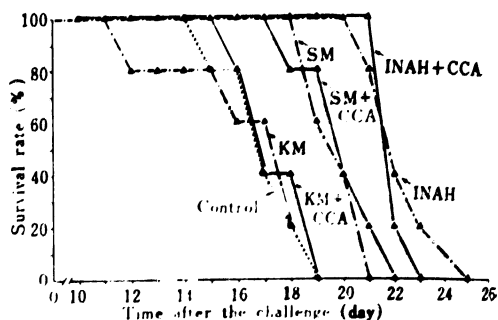
3. intracellular pathogen 感染に対する効果

M. tuberculosis subsp. *bovis* Ravenel 感染マウスの生存曲線を各投与薬剤群ごとにまとめて Fig. 4 に、またその時のマウス体重推移を投与薬剤群ごとに Fig. 5 ~ 7 に、さらにマウス死亡時の RLI・RSI・肺剖検所見・脾剖検所見を一括して Fig. 8 に示した。

生存曲線から、各群の 50% 生存日数 (SD₅₀) を比較すると、対照群 16.7, SM 投与群 19.5, SM+CCA 投与群 19.8, KM 投与群 17.3, KM+CCA 投与群 16.8, INAH 投与群 21.7, INAH+CCA 投与群 21.6 で、各薬剤投与群は対照群に比べ各々効果がみられたものの、同一抗菌剤投与群において CCA 併用の有無による差は認められなかった。

また体重の推移では、いずれも CCA 併用有無による同一抗菌剤投与群内における比較では差を認めず、INAH あるいは INAH+CCA 投与群が対照群に比べ、感染 8 日以後体重の減少がゆるやかになる以外、他の薬剤投与群では対照群と類似の推移を示した。

Fig. 4 Survival rates of mice after the challenge with *M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel



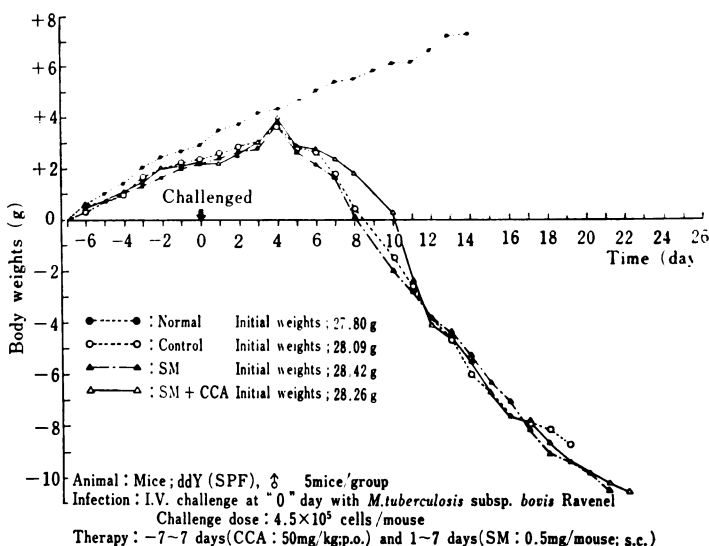
Animal: Mice, ddY(SPF), ♂, 5mice/group
Infection: I.V. challenge with *M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel
Challenge dose: 4.5×10^5 cells/mouse
Therapy: -7~7 days (CCA; 50mg/kg; p.o.) and 1~7 days
(SM; 0.5mg/mouse; s.c.)
(KM; 0.5mg/mouse; s.c.)
(INAH; 0.05mg/mouse; p.o.)

一方、剖検所見を各群ごとに比較すると、CCA 併用群は非併用群に比べ、いずれも RLI が増加を示し肺結節形成の減少に反して、うっ血性変化の増大が認められた。また各薬剤投与群の RSI は各々同系の対照群に比べ増加を示すものの、同一抗菌剤投与群内で比較すると、CCA 併用群が若干減少を示した。脾臓の変化は各群とも CCA 併用群が若干少なく、剖検上から、CCA 併用群は非併用群に比べて改善が認められた。

III. 考 察

各種細菌感染時における生体の防禦因子はその菌種に

Fig. 5 Change in average body weights of mice



Animal: Mice; ddY (SPF), ♂, 5mice/group
Infection: I.V. challenge at "0" day with *M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel
Challenge dose: 4.5×10^5 cells/mouse
Therapy: -7~7 days (CCA: 50mg/kg; p.o.) and 1~7 days (SM: 0.5mg/mouse; s.c.)

Fig. 6 Change in average body weights of mice

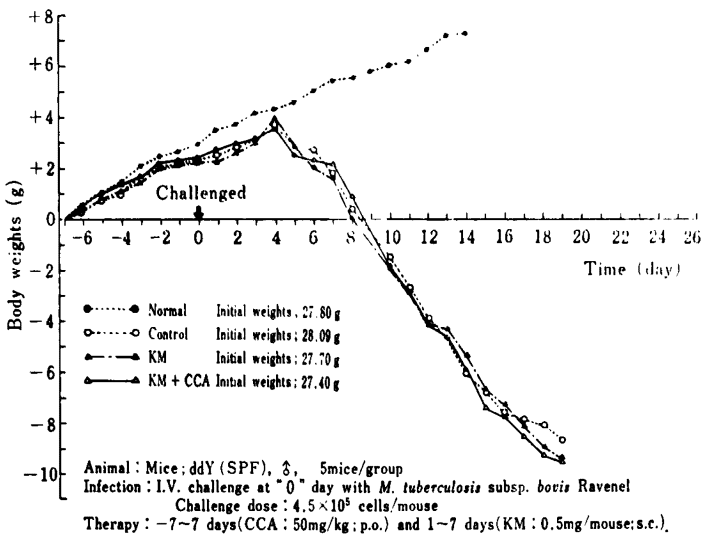
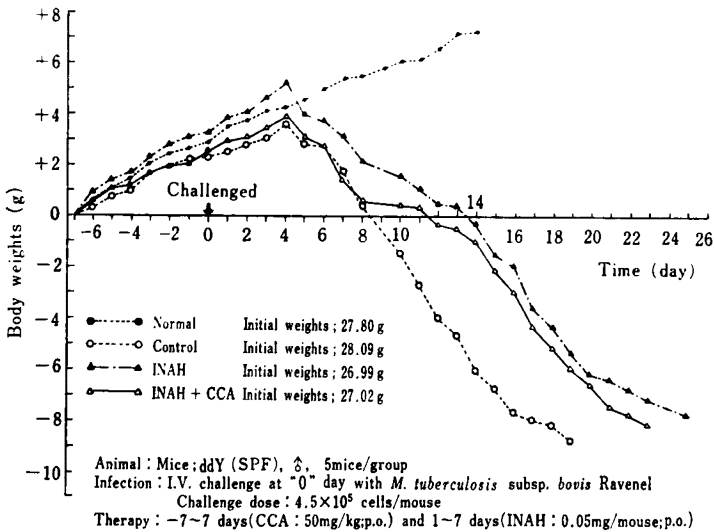


Fig. 7 Change in average body weights of mice

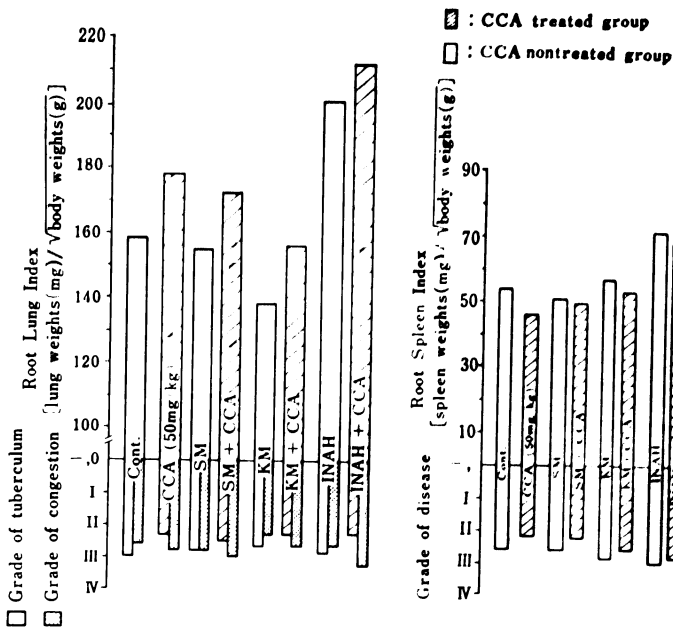


よって異なり, extracellular pathogen に分類される *P. aeruginosa* あるいは *K. pneumoniae* 感染では多核白血球ならびに非免疫マクロファージが関与する一方, intracellular pathogen である *M. tuberculosis* 感染への生体抵抗性には, 感作リンパ球を介してマクロファージが活性化される細胞性免疫の関与が必須であるといわれている¹²⁾。

われわれの行なった *P. aeruginosa* J-163 株腹腔内感

染実験において, CCA は正常マウスならびに CPA 投与により生体防禦能を減弱させたマウスで, 7日後の生存率を約 20% 上昇させ, また CPA 投与群マウスの白血球数低下を約 8% 抑制した。さらに生体防禦能減弱マウスにおける *P. aeruginosa* J-163 株, *P. aeruginosa* J-276 株, *K. pneumoniae* 3K25 株感染治療実験で, 治療に使用した抗生物質の ED₅₀ 値を約 13~24% 減少させることが認められた。非特異的防禦因子に及ぼす影

Fig. 8 Combination treatment with antimicrobial agents and CCA against tuberculosis in mice



響の検討から CCA は血管網内系賦活作用を有するとともに NADH oxidase の活性を促進し食食殺菌能を増強することが示唆された。一方、野垣らの報告¹³⁾によれば、CCA は *S. aureus* diffuse 株感染マウスの死亡率を 25~30% 低下させ、同時に検討された *in vitro* 実験で PMN の殺菌力を増強することが認められている。これらの結果は、CCA が生体の非免疫性防禦因子に関与し、その感染抵抗性を増強しているものと考えられた。

寺井ら¹⁴⁾によれば、実験のマウス結核症における死亡時像は非免疫動物と免疫動物で異なった所見がみられ、前者では肺重量・組織学的変化の増大がみられるのに反し、後者では結節形成の軽度化・出血性反応の著明化がみられ、慢性期に斃死する免疫マウスの原因はアレルギー反応が関与することを示唆している。

今回の *M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel 株感染に対する CCA の効果をみると、CCA 投与群、非投与群間の生存率・体重推移には大きな差を認めなかったものの、CCA 投与群は非投与群に比べ肺結節形成の減少に反しうっ血性変化の増大を認め、アレルギー反応の関与も考えられ、CCA が生体の細胞性免疫にも関与していることが観察された。しかし、本成績とこれまでの報告¹⁴⁾を合わせ考えると、CCA が細胞性免疫成立における活性化マクロファージの出現にまで関与しているとは考え難く、あってもごく弱いものと思われた。

以上の結果から、CCA は生体の多核白血球・非免疫マクロファージなどの非免疫性因子ならびにある種の細

胞性免疫因子に関与し、細菌の感染抵抗性を増強させるものと考えられた。

菌株の分与をいただきました東邦大学・五島彦智子先生、国立公衆衛生院・山崎省二先生に深謝申し上げます。

本論文の要旨は第 29 回日本化学療法学会総会において発表した。

文 献

- OHSUGI, Y.; T. NAKANO, S. HATA, R. NIKI, T. MATSUNO, Y. NISHII & Y. TAKAGAKI: N-(2-Carboxyphenyl)-4-chloroanthranilic acid disodium salt: prevention of autoimmune kidney disease in NZB/NZWF₁ hybrid mice. *J. Pharm. Pharmac.* 30: 126~128, 1978
- 大杉義征, 中野利昭, 畑 俊一, 松野 隆, 竹田 泰久, 西井易穂, 高垣善男: N-(2-carboxyphenyl)-4-chloroanthranilic acid に関する研究, 第 2 報, 免疫機能に対する影響。第 97 回, 日本薬学会, 東京, 4 月, 1977
- 石渡理恵子, 大森 斉, 山本 格: 免疫調節剤に関する研究 (第 2 報), *In vitro* IgM 抗体産生に及ぼす CCA の作用。第 55 回, 日本薬理学会近畿部会, 広島, 6 月, 1979
- 中沢孝子, 安倍千之, 塩川優一, 上条清明: 免疫調節剤のマウス rosetto formation に対する免疫薬理学的研究。第 8 回, 日本免疫学会, 京都, 11 月, 1978
- 木村孝雄, 野藤隆夫, 畑 俊一, 岡崎博司: CCA

- の抗ウイルス活性についての基礎的検討。第28回, 日本化学療法学会, 東京, 6月, 1980
- 6) BAEHNER, R. L. & D. G. NATHAN: Quantitative NBT test in chronic granulomatous disease. *New Engl. J. Med.* 278: 971~976, 1968
- 7) OKAMURA, N.; T. TAKANO, S. ISHIBASHI, D. AMANO & T. USUI: Sensitive and quantitative nitroblue-tetrazolium test for detecting chronic granulomatous disease. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 2175~2180, 1976
- 8) STUART, A. E.; J. A. HABESHAW & A. EDNA DAVIDSON: The carbon clearance test for *in vivo* phagocytosis. *Handbook of Experimental Immunology*. 31. 25~31. 29, Third edition, 1978 (Oxford)
- 9) 青木正和, 工藤賢治, 鏡木正大: マウス実験的結核症の病変度判定方法について。結核 36: 355~360, 1961
- 10) 工藤賢治, 青木正和: 結核の免疫に関する動物実験方法の検討 I。日本医学協力結核専門部会, 1966
- 11) 青木正和: 結核菌の毒力, その測定法と臨床的意義。結核 42: 301~303, 1967
- 12) 野本龜久雄, 光山正雄, 見明俊治: 生体防禦とマクロファージ。臨床免疫 12: 1~8, 1980
- 13) 野田兼朗, 近藤尚子, 本村直子, 畑俊一, 横田健: Disodium N-(2-carboxyphenyl)-4-chloro-anthranilate (CCA) の感染抵抗性の増強効果について。第53回, 日本細菌学会, 新潟, 4月, 1980
- 14) 寺井武雄, 永菅徳子, 山根英彦: 実験的マウス結核症における致死因子に関する考察。結核 39: 166~171, 1964

ENHANCING EFFECT OF CCA (DISODIUM 4-CHLORO-2, 2'-IMINODIBENZOATE) ON NONSPECIFIC RESISTANCE OF THE HOST TO BACTERIAL INFECTION

SATOHIDE MIYAKAWA, TAKAO NOTO, HISAO ENDO and HIROSHI OKAZAKI

Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

The effect of CCA on nonspecific resistance to infection with extracellular or intracellular parasites was studied using normal or host-defense decreased mice.

The number of survival animals were one-seventh 7 days after intraperitoneal infection with *P. aeruginosa* J-163 (challenge dose, 5.3×10^7 cells/mouse), and it increased to about 22% by oral pretreatment with CCA, 50 mg/kg once daily for 4 days, in normal mice. When the mice with decreased host-defense that produced by intraperitoneal administration of cyclophosphamide 100 mg/kg once daily for 4 days were infected with *P. aeruginosa* J-163 (challenge dose, 3.2×10^8 cells/mouse), the number of survival cases were one-fifth 7 days after infection, and it increased to about 24% by pretreatment with CCA using at the same time of cyclophosphamide. The protective effects of ceftazole against *P. aeruginosa* or *K. pneumoniae* infection were enhanced and their ED₅₀ values were reduced 13~24%, when CCA administered to the host-defense decreased mice before infections.

In mice infected intravenously with *M. tuberculosis* subsp. *bovis* Ravenel (challenge dose, 4.5×10^5 cells/mouse), the pre- and post-treatment of CCA (50 mg/kg orally once daily for 7 days before and after the challenge) with various antimicrobial agents (1/2 ED₅₀ dose, subcutaneously or orally once daily for 7 days after the challenge) revealed an increase in the root lung index and a decrease in the formation of lung tubercule in the necropsy mice. But no significant difference was observed in the survival rate as well as the mobility of body weights between CCA and non treated groups.

Furthermore, CCA activated phagocytosis, killing activity, NBT-reducing activity of macrophages and polymorpho nuclear leucocytes and also carbon clearance of the host.

From the experimental results mentioned above, it could be concluded that CCA may strengthen the resistance to infection with extracellular and intracellular parasites through potentiation of the nonspecific defense functions such as polymorpho nuclear leucocytes, macrophages and several cellular immunity of the host.