

T-1982 と血清・補体および白血球の協力的殺菌作用

横田 健・関口玲子

順天堂大学医学部細菌学教室

新Cephem系抗生物質、T-1982の良好な生体内効果を説明する目的で、この薬剤と血清・補体との協力的殺菌作用、MIC以下の量(sub MIC)の存在下でのマクロファージ(M ϕ)の食菌、殺菌効果、T-1982の宿主生体に対する直接的感染防御力促進作用の有無などを検討した。

それぞれ単独では殺菌が完全でないT-1982の50%増殖阻止濃度(ID₅₀)と20%ヒト非働化血清+2%モルモット補体を共存させると、*Escherichia coli* NIHJ JC-2の10⁵個の生細胞は数時間以内に完全に殺菌され、その効力は既存の第一～第三世代Cephem系抗生剤より強かった。

T-1982はPBP 3, Ib, Iaの順に結合するので培養したマウスM ϕ に*E. coli* NIHJ JC-2を加え、1/2 MICのT-1982存在下で培養すると、菌細胞はフィラメント化およびバルジ形成し、M ϕ によく食菌されるのみでなく、M ϕ 内の菌体は容易に消化され、薬剤無添加時にM ϕ 内の大腸菌が再増殖し、M ϕ を破壊するのと、明らかに対照的であった。

*Candida*を攻撃菌として行なった感染防御実験では宿主に対する直接的な免疫促進効果は認められなかったので、T-1982の良好な生体内効果は、菌表層を補体や白血球による殺菌作用を受けやすくなるように変化させるためと結論された。

新Cephem系抗生物質T-1982は、その試験管内抗菌力から類推されるより、生体内効果が高い特徴がある。 β -lactam薬剤は菌の細胞壁合成を抑えて抗菌力を示すので、表層の変化した菌細胞は生体の防御機構、すなわち血清・補体による殺菌や、白血球による貪食作用を受けやすくなり、一般に生体内効果が高いことが想像される。本研究の目的は、T-1982が特にその点で優れているかどうか検討したものである。また β -lactam薬剤のあるものに、もし生体の免疫促進作用があるとすれば、これも良好な生体内効果に結びつくので、その研究も併せて行なった。

I. 材料および方法

抗生物質感受性試験用の*Escherichia coli* NIHJ JC-2を被検細菌として使用した。また試験管内および生体内感染防御実験の被検微生物としては、 β -lactam薬剤の影響を受けない*Candida parapsilosis*および*C. albicans*を用いた。

1) T-1982およびその分解産物(T-1982A, T-1982B)の*E. coli* NIHJ JC-2に対する50%発育阻止濃度の測定

液体培地としてLブイヨン¹⁾を使用し、正確に薬剤の発育阻止濃度(MIC)以下の量(sub MIC)の影響を見るため、50%増殖阻止濃度(ID₅₀)を以下の方法で算出した。5 mlのLブイヨンに6.25～0.0125 μ g/mlの倍数希釈したT-1982を加え、*E. coli* NIHJ JC-2の生細胞

4 $\times$ 10⁵ cells/mlを接種し、37 $^{\circ}$ Cで18時間振とう培養後、それぞれの試験管の増殖濁度をKlett summerson比色計でNo. 66のフィルターを使用して測定し、対照の50%の増殖濁度を示す薬剤量をID₅₀とした。

2) モルモット補体と β -lactam薬剤の協力的殺菌作用の試験方法

ID₅₀のT-1982, T-1982A, T-1982B, Cefmetazole (CMZ)またはCefazolin (CEZ)を添加した10 mlのLブイヨンを2本ずつ作り、それぞれの1本に非働化したヒト血清(Miles Laboratory)を20%およびモルモット補体(東芝化学)を2%加えた後、*E. coli* NIHJ JC-2を2 $\times$ 10⁵ cells/ml接種した。37 $^{\circ}$ Cで振とう培養を続けながら、0, 1, 3, 5および24時間目にその一部をとり、適当に対数希釈した後、0.1 mlずつ2枚のMac-Conkey平板にコンラージ棒を使って塗抹し、37 $^{\circ}$ C 1夜培養後の集落数の平均値から生菌数計算を行なった。

3) T-1982 sub MIC存在下におけるマウスマクロファージによる大腸菌食菌作用の検討

マクロファージ(M ϕ)は、ICR雄マウスの腹腔内を10% fetal calf serum加MCDB 103培地²⁾ 5 mlで洗って採取し、遠心洗浄の後、同培地 5 mlに浮遊させた。この0.1 ml(約10⁴ cells)をカバースリップを沈めたFalcon multidishの各wellに接種し、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂存在下で30分静置し、同培地を1 mlずつ加えて5% CO₂ 1夜培養した。翌日、浮遊細胞を除き、L-CM (condi-

tioned medium of L-929)³⁾ 20%を添加した同培地 1 ml 中で 2 時間培養して *Mφ* を活性化後、1 夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2 を *Mφ* の 50 倍量 (5×10^6 cells/well) 接種した。同時に一部の区画には 1~1/4MIC の T-1982 または Cefotaxime (CTX) を加えて培養した。薬剤添加後 1, 2, 4 時間目に一部のカバースリップを取り出し、Saline G で軽く洗浄後、光学顕微鏡の観察にはメタノール固定後ギムザ染色を行なった。走査電顕用には、2%グルタルアルデヒドで固定し、エタノールで脱水後、酢酸イソamil置換法で臨界点乾燥を用い、白金-パラジウム蒸着して観察した。また一部の食細胞は 1 mM EDTA 加 PBS (-) で壁面からはがし、2%グルタルアルデヒドと 2%オスミウム酸の二重固定後、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂包埋法で超薄切片を作った後、酢酸ウラニウムと鉛で染色後観察した。

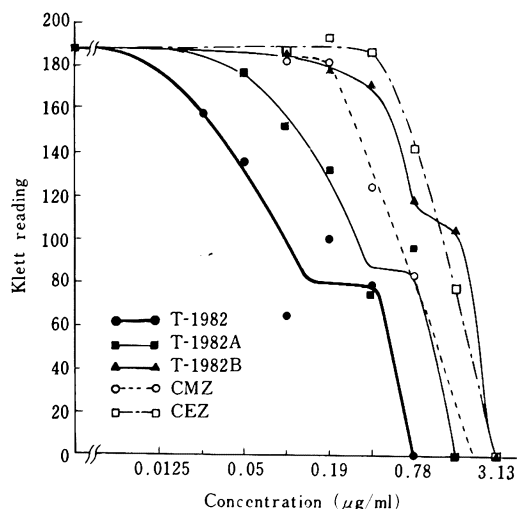
4) 試験管内マウス骨髓細胞活性化実験

T 1982, CMZ, CEZ および Ampicillin (ABPC) についてのマウス骨髓細胞への試験管内分化促進作用の有無を野沢らの方法⁴⁾により検討した。すなわちマウス BALB/C 雌 4 週齢の大腿骨を無菌的に取り出し、滅菌 Saline G 1 ml をつめた注射筒にツベルクリン針をつけ、骨髓腔を圧力洗浄する操作を 3 回繰り返した。骨髓細胞浮遊液を集め細胞を遠心後、それを 10% fetal calf serum 加 MCDB 103 培地で 2 回洗浄し、同培地で 10^6 cells/ml になるように再浮遊した。前記の薬剤を同培地に溶かし、3~3,000 $\mu\text{g/ml}$ 液をつくり、その 10 μl を Falcon 96 穴平底マイクロタイタープレート (滅菌済) の各 well に加え、さらに骨髓細胞浮遊液 100 μl (10^5 cells) を添加した。これに新鮮培地 180 μl と *Candida parapsilosis* 2×10^8 cells/ml 浮遊液を倍々希釈したものを 10 μl 混合した。*C. parapsilosis* はサブローブドウ糖寒天上に 27°C 48 時間培養し、これを Saline G に浮遊、対数希釈して原液とした。上記のマイクロタイタープレートを 37°C で 48 時間 5% CO_2 で培養し、真菌浮遊液各希釈段階における *Candida* 発育の有無と、平板法で測定した真菌浮遊液中の正確な *Candida* 生細胞の数の比から、骨髓細胞より分化した食細胞の活性の強弱を調べた。各 β -lactam 薬剤の免疫促進効果は、薬剤存在下の骨髓細胞による *Candida* 殺滅作用と薬剤無添加時のそれとの比較から検討した。

5) T-1982 その他のマウス生体内感染防御効果の有無の検討

試験管内にとり出された多形核白血球 (PMN) や培養された *Mφ* は、必ずしも生体内と同じ強さの機能を発揮するとはかぎらない。現在免疫促進物質の食菌作用に

Fig. 1 Growth turbidity of *E. coli* NIHJ JC-2 with various amount of antibiotics including T-1982



及ばず影響を判定する最も正確な方法は、免疫促進物質で前処理されたマウスの腹腔内に、使用した薬剤の直接作用を受けない微生物を多量に接種し、その死亡数を無処理マウスのそれと比較することと考えられる⁵⁾。

ddY 雄 4 週齢マウス 10 匹を 1 群とし、第 1 群には生理食塩水 0.2 ml を、第 2 群には生理食塩水 0.2 ml に溶かした 0.4 mg の T-1982 を、第 3 群には同様に調製した CMZ 溶液を 7 日間皮下注射した。前処理終了翌日に *Candida albicans* 生細胞 2.0×10^8 cells をそれぞれのマウス腹腔内に感染させ、48 時間までの死亡数を比較した。なお *C. albicans* はサブロー・グルコースブイヨン中で 37°C 18 時間培養したもの、生理食塩水で 1 回洗浄後、光電比色計を使用し、正確に 4×10^8 cells/ml になるように生理食塩水に浮遊し、その 0.5 ml を注射した。実験は 2 回繰り返して行なった。

II. 成 績

1) T-1982 およびその分解産物の *E. coli* NIHJ JC-2 に対する 50% 発育阻止濃度 (ID_{50})

6.25 から 0.0125 $\mu\text{g/ml}$ にいたる T-1982, T-1982 A, T-1982 B, CMZ または CEZ の倍数希釈系列各濃度を含む L ブイヨン中での被検菌の 37°C, 18 時間後の濁度を Fig. 1 に示した。T-1982 およびその分解産物の特徴は、 ID_{50} 濃度付近において、ある濃度範囲で濁度が一定になり、増殖阻止カーブに肩が見られることである。CMZ や CEZ にはこの現象は認められなかった。数回行なった増殖カーブからの T-1982, T-1982 A, T-1982 B, CMZ および CEZ の平均 ID_{50} はそれぞれ 0.21,

Fig. 2 Change of viable cell numbers of *E. coli* NIHJ JC-2 in the presence of ID₅₀ CMZ or CEZ with or without 20% human serum and 2% guinea pig complement

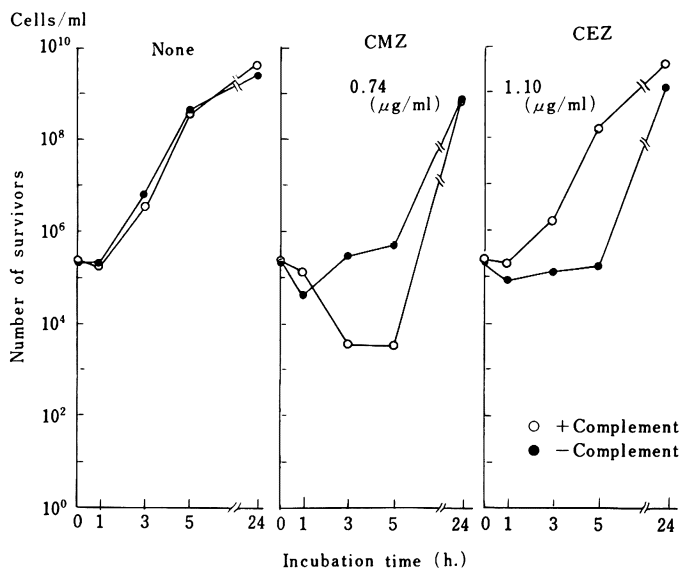
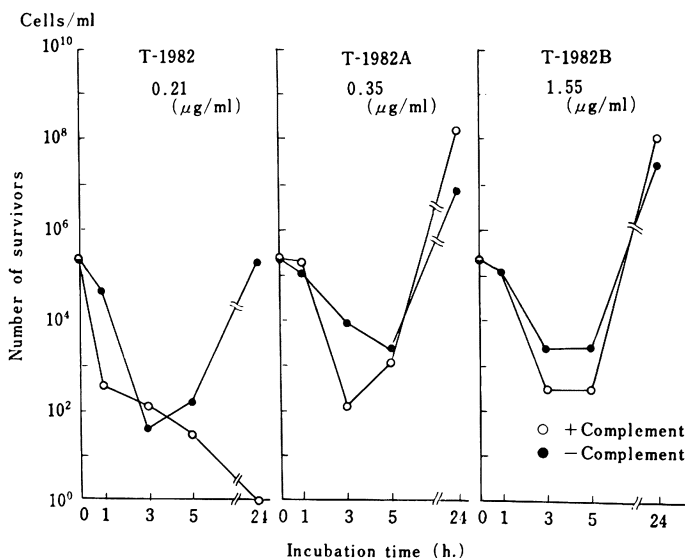


Fig. 3 Change of viable cell numbers of *E. coli* NIHJ JC-2 in the presence of ID₅₀ T-1982, T-1982A, or T-1982B with or without 20% human serum and 2% guinea pig complement



0.35, 1.55, 0.74 および 1.1 $\mu\text{g/ml}$ と算出された。

2) ヒト血清およびモルモット補体と T-1982 およびその他の抗生剤の大腸菌に対する協力的殺菌作用

L ブイヨンにヒト非働化血清を20%およびモルモット補体2%と、ID₅₀ の T-1982 またはその他の薬剤を共存

させた時の大腸菌に対する殺菌曲線を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。T-1982, ID₅₀ 存在下で血清および補体無添加時, 37°C 3時間培養後一度生菌数は低下するが, その後再増殖が見られる。それに対し血清・補体が共存すると, 時間と共に生菌数は減少し, 24時間後にはほぼ

Fig. 4 Death of mouse macrophages phagocytizing normal cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown without drugs at 4 hrs after the incubation

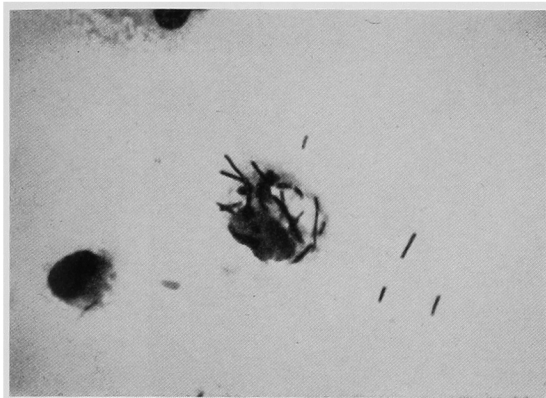


Fig. 5 Digestion of long filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/2 MIC of T-1982 by cultured mouse macrophages at 4 hrs after the incubation

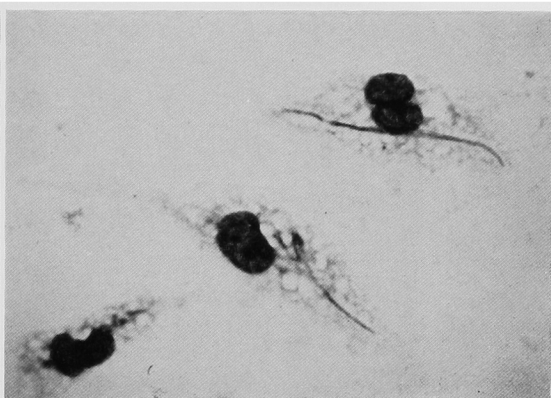
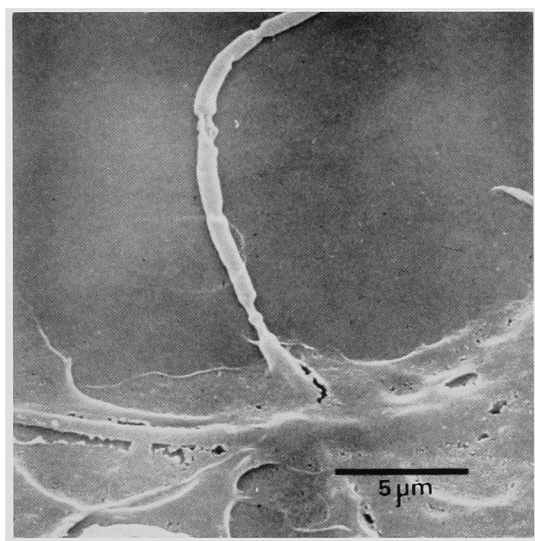


Fig. 6 Scanning electronmicrography of cultured mouse macrophages phagocytizing filamentous cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1/2 MIC of T-1982 at 4 hrs after the incubation



完全に殺菌された。一方、T-1982A, T-1982BおよびCMZのID₅₀存在下では、血清・補体共存時に薬剤単独時に比しより強く殺菌されるが、24時間後には再増殖が認められる。CEZには補体との協力的殺菌作用が見られなかった。

3) T-1982 sub MIC存在下のマウスMφによる大腸菌食菌作用

培養したマウス腹腔Mφに*E. coli* NIHJ JC-2を加えると、感染後1時間で食菌像が認められ、細胞内の大腸菌の数は約3時間でピークに達するが、それ以後は大

腸菌の増殖がMφの殺菌消化力にうち勝ち、4時間後にはFig. 4のごとくMφが破壊されて、菌体が外に遊出しているものが多い。

T-1982 MIC~1/2 MICを上記のMφによる大腸菌食菌系に加えると、Fig. 5のごとくややフィラメント化した細胞もよく食菌される上、4時間後でも菌体の消化が進みMφは障害を受けない。この食菌像はFig. 6のごとく走査電顕でも、正常な形態を保ったMφが多数のフィラメント化した大腸菌細胞を貪食していることが確認される。T-1982 MIC存在下で大腸菌を貪食したMφ

Fig. 7 Ultrathin section of mouse macrophages phagocytizing cells of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1 MIC of T-1982 at 5 hrs after the incubation. N : nucleus of macrophage, B : bacterial cells in phagosomes

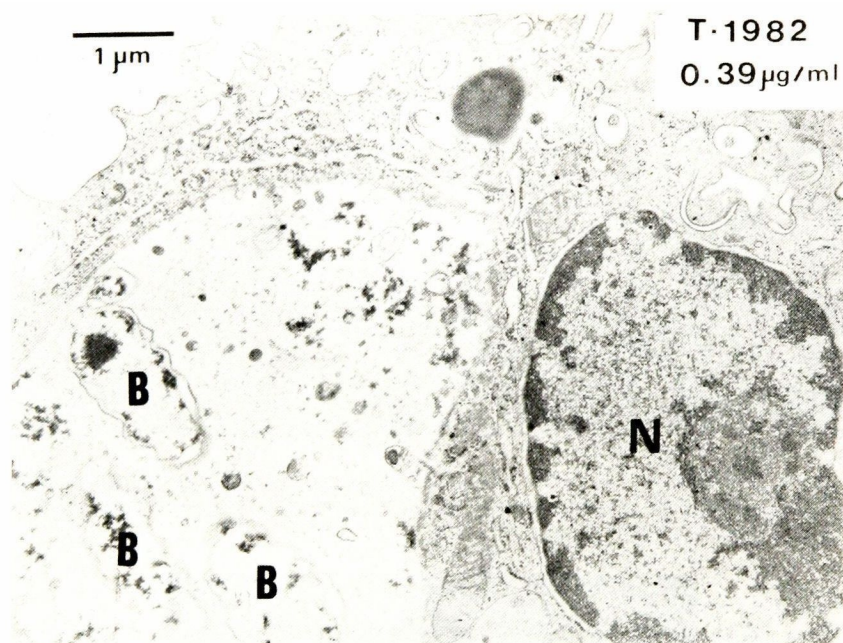


Fig. 8 Ultrathin section of mouse macrophages phagocytizing cells of *E. coli* T-1982 grown with 1 MIC of T-1982 at 5 hrs after the incubation. N : nucleus of macrophage, B : bacterial cells in a large phagosome

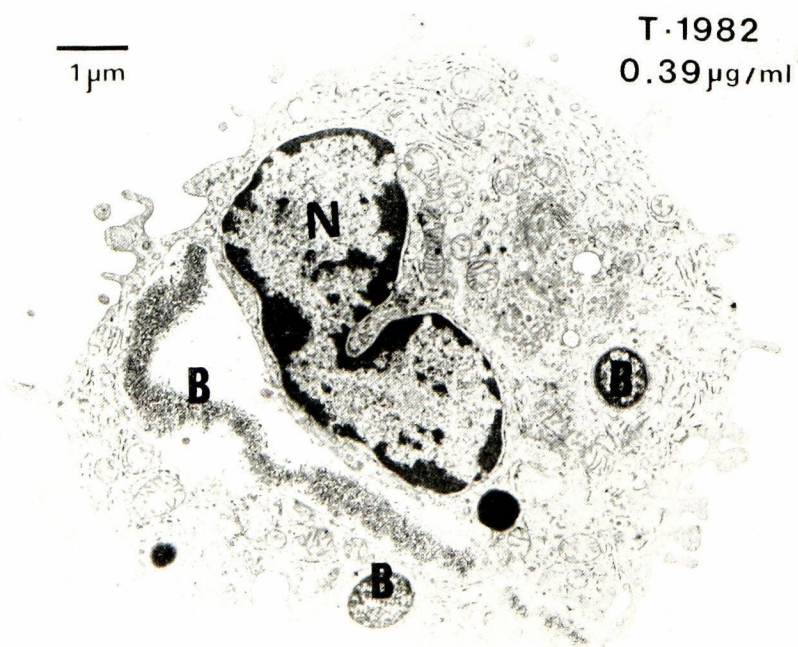


Fig. 9 Ultrathin section of mouse macrophages phagocytizing filamentous cell of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1 MIC of T-1982 at 5 hrs after the incubation. B : filamentous bacterial cell phagocytized by pseudopod

T-1982
0.39 $\mu\text{g/ml}$

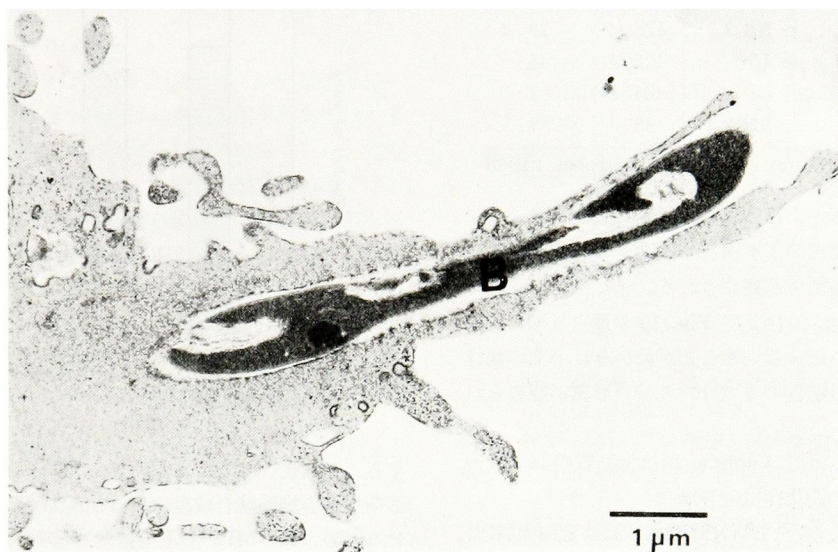


Fig. 10 Ultrathin section of mouse macrophages phagocytizing a filamentous cell of *E. coli* NIHJ JC-2 grown with 1 MIC of T-1982 5 hrs after the incubation. B : bacterial cell with bulge

T-1982
0.39 $\mu\text{g/ml}$

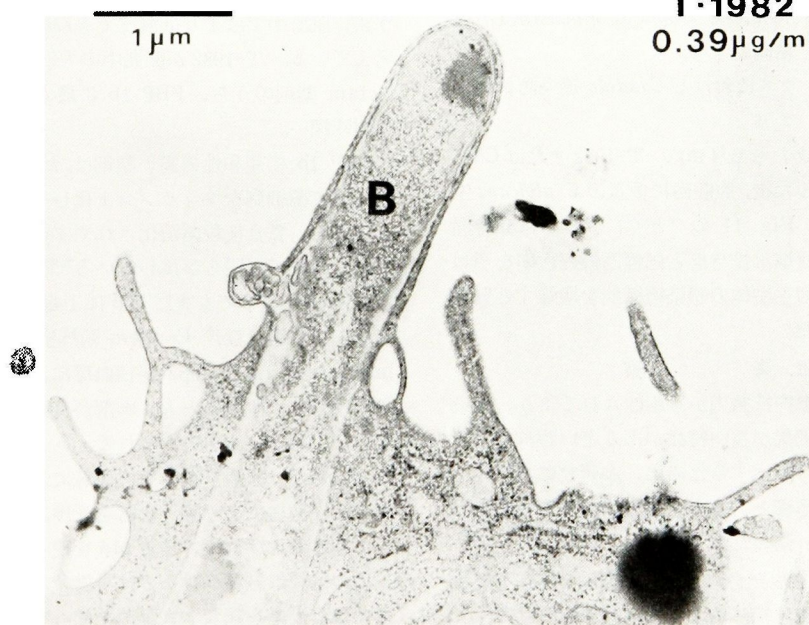


Table 1 Effects of β -lactams on the candidacidal activity of bone marrow cells

Conc. (μ g/ml)	MNMK* (Increase, Fold)			
	T-1982	CMZ	CEZ	ABPC
0	18	16	32	7
0.1	36(2)	32(2)	128(4)	28(4)
1.0	36(2)	16	128(4)	7
10	18	4	64(2)	7
100	9	32(2)	32	7

*MNMK: Maximum number of microbes killed

の超薄切片を見ると, Fig. 7 および Fig. 8 のごとく, ライソゾーム中で菌の表層構造が破壊され, 内容が漏出して空胞化した死菌体が確認される。またフィラメント菌体の食菌は Fig. 9 および Fig. 10 の通り, $M\phi$ が偽足を伸ばして取り込んでいることがわかる。一部の菌体には取り込まれる過程ですでにバルジ形成が認められる。

4) T-1982 その他 Cephem 系抗生物質の試験管内マウス骨髓細胞活性化作用の有無

野沢の方法により, マウス骨髓細胞の試験管内実験で, CEZ および ABPC には 0.1 μ g/ml 前後の濃度において, 軽度の分化促進効果が予測される成績が得られた。T-1982, CMZ はそれより弱い成績であった(Table 1)。しかしその効果は代表的な免疫刺激物質である LPS (Lipopolysaccharide) の MNMK (Maximum number of microbes killed) 64~128倍以上に比べるとはるかに弱いものなので, これによって Cephem 系抗生物質が免疫促進作用をもつと結論できない。

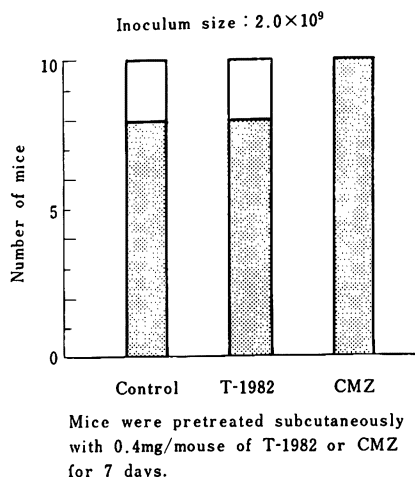
5) T-1982 のマウスにおける *Candida* 感染防御促進効果の有無

ddY マウス 1 匹あたり 0.4 mg の T-1982 または CMZ を 7 日間皮下投与した後, 腹腔内に多量の *C. albicans* 生細胞を接種すると, Fig. 11 のごとく, マウスは 48 時間以内に対照の生理食塩水投与群と同程度の死亡率を示した。T-1982 には宿主生体の感染防御能を増強する効果はないと結論された。

III. 考 察

T-1982 は試験管内抗菌力から想像されるより, 感染動物に対する治療効果が良い特徴があるといわれる。その理由の一端を明らかにするために, 本研究においては病原体側に対する影響と, 宿主生体側に対する効果をわけて調べることを計画した。

T-1982 はその 50% 発育阻止濃度 (ID_{50}) 存在下において, 大腸菌を血清・補体による殺菌効果を受けやすく

Fig. 11 Fatalities of mice pretreated with T-1982 or CMZ and then challenged intraperitoneally with *C. albicans*

するよう変化させることがわかった。一般に β -lactam 薬剤などの細胞壁合成阻害剤は, 菌の表面構造を変化させるため, sub MIC でも生体内では補体と協力的殺菌効果を示すことが多いが, これには誘導体ごとにある程度の差があることが確認されている⁶⁻⁸⁾。T-1982 は今まで調べられた範囲内では, 最もその効果が著しいので, これが生体内効果が良好な理由の一つであろう。

著者らは, ペニシリン結合タンパク質 (PBP) 1b に親和性の強い β -lactam 薬剤は, 単独での殺菌作用が強い。うえ, 血清中ではより低濃度でも殺菌されやすくなると考えている。T-1982 が開発中のものを含め, 既知の β -lactam 薬剤のうち, PBP 1b に最も親和性が高いことは興味深い。

PBP 1b に親和性の高い薬剤は, たとえ PBP 3 を同時に抑えて菌細胞をフィラメント化しても, $M\phi$ に食食されやすく, 食食後殺菌消化されやすい傾向にあることも著者らはすでに明らかにしている^{7,9)}。事実, T-1982 は 1/4 MIC 存在下でもまだ $M\phi$ による食菌消化を促進し, その作用は第三世代 Cephem 系抗生剤の一つ Cefotaxime より強い。T-1982 が白血球による菌細胞食食消化を受けやすくすることも, 本剤が良好な生体内効果をもたらす原因の一つと考えられる。

もちろん, 血清, 補体や白血球による殺菌作用は動物種および菌種により強い影響を受け, ヒト血清とモルモット補体およびマウス培養 $M\phi$ を使った本実験を直接人体内の効果に結びつけるのは早計であるが, 多くの動物種に炎症反応を起こす大腸菌を使っているの, 動物種

による強弱はあるにしても、傾向はつかめたものと考えられる。

T-1982 を含め β -lactam 薬剤には、宿主生体に対する感染防御能促進効果があるとする確実な成績は得られなかった。試験管内実験ではごく低濃度で若干の効果を期待させる傾向は見られたが、実際の感染の場に影響を与える程のものではない。

以上の成績から、T-1982 の良好な生体内効果は主として細菌の表層構造を、生体の貪食殺菌作用を受けやすくなるような方向に変化させるためと結論された。免疫力がきわめて低下してしまった終末感染患者以外では、程度の差はあれ生体防御機能が働いているので、菌をそれに処理されやすくする T-1982 のような薬剤は、臨床応用価値が高いものと考えられる。

文 献

- 1) LENNOX, E. S. : Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1 : 190~206, 1955
- 2) MCKEEHAM, W ; W.G. HAMILTON & R. G. HAM : Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 : 2023~2027, 1976
- 3) NOZAWA, R. T. & T. YOKOTA : Inhibition by glucocorticoids and cholera toxin of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth). *Cell. Physiol.* 100 : 351~364, 1979
- 4) NOZAWA, R. T. & T. YOKOTA : Microbicidal activity of bone marrow cells. Augmentation of *Candida* killing in culturing with fibroblast conditioned medium. *Microbiol. Immunol.* in the press, 1982
- 5) 野垣兼朗 : 各種薬剤の食菌作用に対する影響。日細菌誌 34 : 667~675, 1979
- 6) 奥村和夫, 横田 健, 加藤日出子, 達 彦二 : 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。Chemotherapy 27 : 76~82, 1979
- 7) 横田 健, 関口玲子 : Ceftizoxime (CZX) の大腸菌およびコレラ菌 penicillin 結合タンパク質に対する親和性と殺菌力の関係。Chemotherapy 28 : 44~49, 1980
- 8) 横田 健, 関口玲子, 東 映子 : Cefmenoxime (SCE-1365) の各種 β -lactamase およびペニシリン結合タンパク質に対する親和性とその抗菌力の関係。Chemotherapy 29 : 32~41, 1981

SYNERGY OF T-1982 FOR BACTERICIDAL EFFECT WITH THE COMPLEMENT AND CULTURED MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA and REIKO SEKIGUCHI

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

To clarify the prominent *in vivo* effect of T-1982, a new parenteral cephem antibiotic, studies were carried out on the synergetic bactericidal and phagocytic effect of the drug with serum complement and cultured mouse macrophages. Other investigations were also performed to see whether or not the drug possesses a direct immuno-potentiating effect to host animals.

10^5 cells of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 were completely killed within several hours in the presence of T-1982 at the concentration of 50% growth inhibition (ID_{50}) plus 20% human serum and 2% guinea pig complement, each of which showed incomplete bactericidal activity. This effect was found to be most prominent in T-1982 among known cephem antibiotics.

Since T-1982 binds the PBP 3, Ib and Ia, cells of *E. coli* are converted into filamentous bodies with bulges in the presence of subMIC of the drug. When live cells of *E. coli* NIHJ JC-2 were added to the mouse cultured macrophages with 1 to 1/2 MIC of T-1982, the filamentous bacterial cells were well phagocytized and digested within 4 hours. Whereas, normal bacterial cells added to the macrophages in the absence of the drug multiplied in the animal cells and destroyed them at 4 hours after incubation.

No immunostimulating effects were confirmed when mice were pretreated with T-1982 and then challenged with *Candida parapsilosis* or *C. albicans*. It was suggested that the prominence of *in vivo* effect of T-1982 depends upon the conversion of bacterial surface as to be easily killed by host defence mechanisms.